

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

POLYANA VELOSO RODRIGUES

**INFLUÊNCIA DA UREASE DE *Canavalia ensiformis* SOBRE O SISTEMA
CARDIOVASCULAR DE *Nauphoeta cinerea***

São Gabriel

2015

POLYANA VELOSO RODRIGUES

**INFLUÊNCIA DA UREASE DE *Canavalia ensiformis* SOBRE O SISTEMA
CARDIOVASCULAR DE *Nauphoeta cinerea***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Cháriston André Dal Belo

Coorientadora: Lúcia Helena do Canto Vinadé

São Gabriel

2015

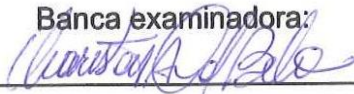
POLYANA VELOSO RODRIGUES

**INFLUÊNCIA DA UREASE DE *Canavalia ensiformis* SOBRE O SISTEMA
CARDIOVASCULAR DE *Nauphoeta cinerea***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso definido e aprovado em 20 de janeiro de 2015

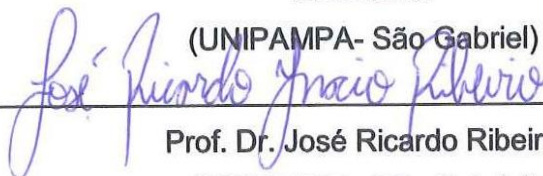
Banca examinadora:



Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

Orientador

(UNIPAMPA- São Gabriel)



Prof. Dr. José Ricardo Ribeiro

(UNIPAMPA- São Gabriel)



Prof.ª Adriana Sassi

(UNIPAMPA- São Gabriel)

Dedico este trabalho aos
meus pais, Maria do Socorro
Velo Rodrigues e Renato
Ferreira Rodrigues, que me
apoiaram e me incentivaram a
sempre dar o melhor de mim

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Renato e Maria do Socorro, e ao meu irmão Leandro, por todo amor, confiança, paciência e carinho. Sou muito grata por tê-los em minha vida!

Ao Professor Dr. Cháriston André Dal Belo, pela orientação, ajuda, apoio e ensinamentos.

Aos meus colegas do Laboratório de Neurobiologia e Toxinologia pelo apoio e amizade, principalmente à Fabíola Duarte da Silva, pela amizade e companheirismo e por compartilhar comigo este Projeto.

Aos professores do curso de Biotecnologia, pela contribuição e paciência, dentro de suas áreas, para a minha formação acadêmica.

Às pessoas que conheci em São Gabriel, em especial às minhas amigas de curso: Talita, Marina, Letícia e Jéssica, pelos momentos de companheirismo, pelas noites de estudos juntas, pelas risadas, pelo carinho, pelo apoio e contribuição. Jamais as esquecerei!

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente e acreditaram na realização dos meus sonhos e na minha formação acadêmica.

Muito Obrigada a Todos! Sem vocês nada disso seria possível!!

“Que os vossos esforços
desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem
foram conquistadas do que
parecia ser impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

Os estudos com baratas têm sido motivados pelo interesse no desenvolvimento de novos agentes com atividade inseticida natural, bem como em ensaios de farmacologia para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. A urease de *Canavalia ensiformis* (Jack Bean Urease, JBU) tem sido caracterizada como um inseticida natural. Apesar de seus efeitos sobre o sistema nervoso periférico de insetos já terem sido demonstrados, ainda não foi evidenciada a sua atividade sobre outros sistemas como, por exemplo, o cardiovascular. O objetivo desse trabalho foi investigar a atividade induzida pelo JBU sobre a modulação da frequência cardíaca de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* usando-se a preparação *in vivo* de coração semi-isolado, foram usadas baratas de ambos os sexos, adultos da espécie *N. cinerea* que foram alojadas em insetário com temperatura controlada (22-24°C), água e ração à vontade. Para a montagem da preparação as baratas foram anestesiadas por resfriamento (-20 °C por 10 min) e afixadas com alfinetes entomológicos em uma placa recoberta com isopor com a região ventral voltada para cima. A cutícula que recobre o abdome foi retirada com auxílio de uma tesoura oftálmica, os órgãos viscerais removidos cuidadosamente com o auxílio de uma pinça para a visualização do sistema vascular. A seguir o animal foi colocado sob uma lupa com aumento de 60X e os batimentos cardíacos contabilizados visualmente durante 30 min. Em experimentos controle apenas com a adição de solução salina a frequência cardíaca dos animais foi de 90 ± 120 batimentos/min ($n=9$). Quando a JBU (1,5, 3,0 e $6 \mu\text{g/g}$ animal) foi incubada, induziu um efeito cronotrópico positivo que foi de 94 ± 5 bat./min e 125 ± 3 bat./min com a administração da JBU ($3 \mu\text{g/g}$ de animal) tendo um aumento significativo de $20 \pm 4\%$ na frequência cardíaca, quando comparado com o controle salina ($p < 0,05$, $n=9$). Nessa série de experimentos a adição de neostigmina mimetizou o efeito cronotrópico positivo da urease o qual também foi inibido pela atropina, sabidamente um composto anticolinérgico. A acetilcolina ($5 \mu\text{M}$) teve um efeito cronotrópico positivo de $35 \pm 6\%$ maior em relação ao controle salina. Os resultados sugerem que a urease de *C. ensiformis* é capaz de modular a frequência cardíaca da *N. cinerea*. O efeito

cronotrópico positivo é contraposto pela atropina, um inibidor dos receptores muscarínicos, sugerindo uma interação do peptídeo com esse receptor. Nesse sentido, esse trabalho reforça o potencial biotecnológico da urease de *Canavalia ensiformis*, demonstrando a influência desse composto sobre o sistema colinérgico de baratas.

Palavras-chave: baratas, frequência cardíaca, JBU, bioinseticida.

ABSTRACT

Studies with cockroaches have been motivated by interest in the development of new agents with natural insecticide activity as well as in pharmacological essays for development of new therapeutic agents. *Canavalia ensiformis*' Urease (Jack Bean Urease, JBU) has been characterized as a natural insecticide. Although its effect on the peripheral nervous system of insects have already been demonstrated, it has not been demonstrated their activity on other systems as for example, cardiovascular. In this sense, the aim of this study was to investigate the activity induced by JBU on the modulation of heart rate cockroaches of the species *Nauphoeta cinerea* using the preparation in vivo semi-isolated heart. Thus, in this work were used both sexes of cockroaches, adults from *Nauphoeta cinerea* species were housed in temperature-controlled insectary (22-24°C), and water and feed ad libitum. To assemble the cockroaches preparation were anesthetized by cooling (-20 °C for 10 minutes) and affixed with entomological pins on a plate coated with Styrofoam with ventral region facing up. The cuticle that covers the abdomen was removed with the aid of an ophthalmic scissors, visceral organs removed carefully with tweezers to visualize the vascular system. Then, the animal was placed under a magnifying glass with an increase of 60X and heartbeat visually accounted for 30min. In the control experiments only with the addition of saline heart rate of the animals was 120 ± 90 beats / min (n = 9). When JBU (1.5, 3.0 and 6 µg /g animal) was incubated, induced positive chronotropic effect that was 94 ± 5 bat. / min and 125 ± 3 bat. / min with the administration of JBU (3 µg /g animal) having a mean increase of $20 \pm 4\%$ in heart rate when compared with the saline control (p <0.05, n = 9). In this series of experiments the addition of neostigmine mimicked the positive chronotropic effect of urease which was also inhibited by atropine, a known anticholinergic compound. Acetylcholine had a positive chronotropic effect of $35 \pm 6\%$ higher compared to the saline control. The results suggest that the urease *Canavalia ensiformis* is able to modulate the heart rate of *N.cinerea*. The positive chronotropic effect is counteracted by atropine, an inhibitor of muscarinic receptors, suggesting a peptide interaction with this receptor. Thus, this study reinforces the biotechnological potential of *Canavalia ensiformis* urease, demonstrating the influence of this compound on the cholinergic system of cockroaches.

Keywords: cockroaches, heart hate, JBU, biopesticide.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 O uso de agrotóxicos no Brasil	3
2.2 A <i>Canavalia ensiformis</i>	5
2.3 Ureases	7
2.4 Sistema Colinérgico em insetos	9
2.5 Iodeto de Acetilcolina	9
2.6 Neostigmina.....	11
2.7 Atropina	12
2.8 Baratas	14
2.9 O Sistema Cardiovascular de Baratas	15
3. JUSTIFICATIVA.....	17
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo Geral.....	18
5. MATERIAIS E MÉTODOS	20
5.1. Animais	20
5.2. Solução Fisiológica para insetos	20
5.3. Drogas.....	20
5.4. A Preparação coração semi-isolado de baratas.....	20
5.5 Análises Estatísticas	21
6. RESULTADOS.....	21
6.1. Efeito da JBU sobre a frequência cardíaca de <i>Nauphoeta cinerea</i>	22
6.2. Efeito de moduladores colinérgicos sobre as respostas cronotrópicas de <i>Nauphoeta cinerea</i>	23
7. DISCUSSÃO	26
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	29
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

Em um breve resumo histórico do uso de agrotóxicos, existem registros desde a Antiguidade Clássica (BOHMONT, 1981). Os agrotóxicos segundo a Lei Federal nº 7.802, de 12 de julho de 1989 (BRASIL, 1989), são os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento dos produtos agrícolas; para alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-la da ação de seres vivos nocivos. Na agricultura, fez-se necessário a utilização de agrotóxicos para o controle de pragas (principalmente, insetos).

Por volta de 1900, surgiram os primeiros herbicidas, mas um grande avanço no desenvolvimento dos agrotóxicos aconteceu por volta de 1940, com a redescoberta do DDT e dos organoclorados.

O uso incorreto e demasiado dos inseticidas químicos para o controle de patógenos na agricultura implica não só na contaminação ambiental, como também afeta a saúde dos seres vivos, a atuação destes sobre os inimigos naturais e induz o aparecimento de populações de insetos resistentes (BOHMONT, 1981).

Desse modo, inseticidas naturais vêm surgindo como uma alternativa importante e mais segura para o controle de insetos-pragas (LIMA et al., 2001).

Uma das vantagens da utilização de inseticidas naturais seriam a baixa toxicidade e alta especificidade, evitando assim, desequilíbrios nos ecossistemas e a ressurgência de pragas (OLIVEIRA-FILHO, 2008).

As plantas, no geral, podem produzir proteínas e peptídeos participantes nos mecanismos de defesa ao ataque de insetos, como por exemplo, proteínas inibidoras de proteases e de glicohidrolases e proteínas inativadoras de ribossomos. Além destes mecanismos, existem outros envolvidos como as tiaminases, quitinases, que podem conter substâncias com potencial de ação inseticida (RYAN, 1990; FELTON, 1996; BOLTER & JONGSMA, 1997; KOIWA et al., 1997; STOTZ et al., 1999) e as ureases (POLACCO & HOLLAND, 1993; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; FOLLMER, 2008; CARLINI & POLACCO, 2008).

Em 1926, James B. Sumner cristalizou a urease (OLIVIER, 1789) a partir de sementes de *Canavalia ensiformis* (Angiosperma, família Fabaceae) (jackbean ou feijão-de-porco); esta leguminosa é altamente resistente ao ataque de insetos. A semente de *C.ensiformis* contém proteínas de grande interesse bioquímico e biotecnológico como citado anteriormente. São exemplos desses peptídeos, a urease (SUMNER, 1926), a concanavalina A (SUMNER & HOWELL, 1936), inibidores de tripsina (UBATUBA, 1955) e a canatoxina (CARLINI & GUIMARÃES, 1981).

Estudos recentes demonstram que os peptídeos derivados da JBU apresentam ação inseticida, demonstrando o potencial biotecnológico da JBU como um provável bioinseticida (STANISÇUASKI & CARLINI, 2012).

Compostos com atividade inseticida de diferentes origens já foram caracterizados, modulando o sistema nervoso (central e periférico), o sistema digestório e cardiovascular de insetos-praga.

Dentre as atividades farmacológicas, inerentes à atividade inseticida induzida pela JBU, destacam-se a neurotoxicidade e a atividade antidiurética (STANISÇUASKI et al., 2009).

Algumas espécies de baratas têm sido usadas como modelos para ensaios de neurofarmacologia devido ao seu baixo custo de criação e manutenção e por possuírem sistemas intrínsecos de órgãos que permitem o estudo da interação de drogas e neurotoxinas em sítios específicos, semelhantes aos estudos em vertebrados.

Nesse sentido, ainda não foi evidenciado uma atividade direta da Jack Bean Urease sobre o sistema cardiovascular de insetos, tornando a preparação de coração semi-isolado de baratas um modelo importante para esse estudo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O uso de agrotóxicos no Brasil

Embora a prática da agricultura esteja presente na humanidade há mais de dez mil anos, o uso intensivo de agrotóxicos para o controle de pragas e doenças das lavouras existe há pouco mais de meio século. Os agrotóxicos tiveram origem após as grandes guerras mundiais, quando a indústria química fabricante de venenos então usados como armas químicas, encontraram na agricultura um novo mercado para os seus produtos (LONDRES, 2011). No Brasil, uma série de políticas cumpriram o papel de forçar a implementação da chamada “modernização da agricultura”, processo que resultou em altos custos sociais, ambientais e de saúde pública. Neste processo, teve papel central a criação, em 1965, do Sistema Nacional de Crédito Rural, o qual vinculava a obtenção de crédito agrícola à obrigatoriedade da compra de insumos químicos pelos agricultores. Outro elemento chave foi criação, em 1975, do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas, no âmbito do II Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), que proporcionou recursos financeiros para a criação de empresas nacionais e a instalação no país de subsidiárias de empresas transnacionais de insumos agrícolas. Outro fator que ainda colaborou de forma marcante para a enorme disseminação da utilização dos agrotóxicos no Brasil foi o marco regulatório defasado e pouco rigoroso que vigorou até 1989 (quando foi aprovada a Lei 7.802), que facilitou o registro de centenas de substâncias tóxicas, muita das quais já proibidas nos países desenvolvidos (PELAEZ et al, 2009; SILVA, et al, 2005).

Atualmente, são usados em todo o mundo 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos. No Brasil, anualmente, o consumo de agrotóxicos tem sido superior a 300 mil toneladas de produtos comerciais. Se for expresso em quantidade de ingrediente-ativo (i.a.), são consumidas anualmente cerca de 130 mil toneladas no país; isto representa um aumento no consumo de agrotóxicos de 700% nos últimos quarenta anos, enquanto a área agrícola aumentou 78% nesse mesmo período. (SPADOTTO et al., 2004).

Mesmo com uso tão intensivo de venenos, as chamadas pragas agrícolas conseguem desenvolver mecanismos e persistir nos campos.

Existem atualmente 366 ingredientes ativos registrados no Brasil para o uso agrícola, pertencentes a mais de 200 grupos químicos diferentes, que dão origem a 1.458 produtos formulados para venda no mercado. São inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, acaricidas, rodenticidas, moluscidas, formicidas, reguladores e inibidores de crescimento. Os herbicidas sozinhos representam 48% deste mercado, seguidos pelos inseticidas (25%) e pelos fungicidas (22%) (PELAEZ et al., 2009).

A problemática da utilização de agrotóxicos se dá por que as pragas agrícolas possuem a capacidade de desenvolver resistência aos venenos aplicados: com o tempo, os agrotóxicos vão perdendo eficácia e levando os agricultores a aumentar as doses aplicadas e/ou recorrer a novos produtos. Outro elemento chave neste processo é que o desequilíbrio ambiental provocado por estes sistemas leva também ao surgimento de novas pragas. Em outras palavras, insetos ou plantas que antes não provocavam danos às lavouras, passam a se comportar como invasores e atacar as plantações (LONDRES, 2011). Além disso, apesar de possuírem um alvo específico, os defensivos agrícolas, afetam as estruturas biológicas de outros seres com os quais entra em contato; essas substâncias possuem origem química, que permanecem na natureza, degradam o solo, contaminam a água, se acumulam nos alimentos e conseqüentemente podem gerar efeitos agudo e/ou crônicos na saúde humana.

Por essa razão, recentemente a procura por moléculas naturais com características inseticidas tem sido uma excelente alternativa não só no controle de insetos-pragas, mas também uma alternativa mais pertinente do ponto de vista econômico e de saúde pública.

2.2 A *Canavalia ensiformis*

A *Canavalia ensiformis*, popularmente feijão de porco, é uma espécie tropical de origem centro-americana, é encontrado em estado silvestre nas Antilhas e nas zonas africanas e asiáticas (GUSHIKEN, 2011). Pertencente à família Fabaceae é amplamente cultivada nos países tropicais como cobertura verde. É uma planta do tipo perene, com porte de arbusto, sendo tolerante a seca e crescendo bem em solos pobres, com uma característica de grande resistência a insetos e pragas (LORENZI & MATOS, 2008).

Essa planta é bastante produtiva, podendo produzir até sete toneladas de sementes por hectare. Estas sementes são ricas em carboidratos, óleos e proteínas (~ 40% do peso seco), e por apresentar essas características, a *Canavalia ensiformis* tem grande potencial na utilização na alimentação para humanos e animais; as suas folhas podem ser usadas como verdura, e as sementes podem ser cozidas como feijão comum, embora precisem passar por tratamento prévio para a eliminação de suas toxinas (UDEDIBIE & CARLINI, 1998). A toxicidade das sementes de *Canavalia ensiformis* é o resultado do efeito de vários compostos tóxicos e anti-nutricionais. Estes compostos mais tóxicos podem variar de acordo com a espécie, dificultando a aplicação de estratégias para a detoxificação das sementes. Entre as proteínas com efeito tóxico e/ou anti-nutricional presentes nas sementes do feijão-de-porco pode se citar: inibidores de tripsina, a lectina, a concanavalina A, e também as ureases (Figura 1).

Figura 1- *Canavalia ensiformis*: vagem, folhas (E) e sementes maduras (D)

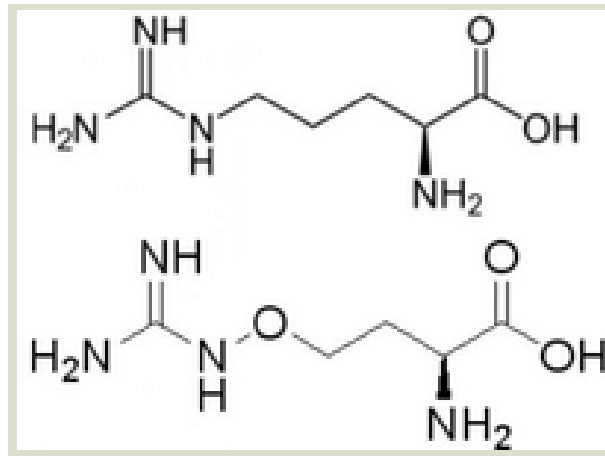


Fonte: (<http://www.ufrgs.br/laprotox/o-que-fazemos/linhas-de-pesquisa/ureases-de-plantas/ureases-de-canavalia-ensiformis/aspectos-nutricionais-da-canavalia-ensiformi>)

Entre os compostos que não são protéicos, mas que contribuem para a toxicidade das sementes estão além dos taninos e saponinas, a canavanina, que é um análogo do aminoácido arginina.

O aminoácido não protéico L-canavanina (Figura 2) acumula-se na semente de feijão-de-porco podendo atingir concentrações de até 2% de seu peso seco. Por ter uma semelhança com a arginina (Figura 2) do qual difere estruturalmente por apresentar um átomo de oxigênio a mais, a canavanina é tóxica para bactérias, insetos e outros invertebrados, podendo ser incorporada em proteínas tornando-as não funcionais. No entanto, a canavanina é atóxica para vertebrados, por possuírem uma arginil-T-RNA sintase mais específica para a arginina, não formando canavanil-T-RNA (ROSENTHAL, 1977).

Figura 2– Estrutura molecular da Arginina (cima) e L-canavanina (baixo)



Fonte: (<http://www.ufrgs.br/laprotox/o-que-fazemos/linhas-de-pesquisa/ureases-de-plantas/ureases-de-canavalia-ensiformis/aspectos-nutricionais-da-canavalia-ensiformi>)

2.3 Ureases

As ureases são enzimas níquel-dependentes que tem como função catalisar a hidrólise da uréia em uma molécula de dióxido de carbono e duas moléculas de amônia (DIXON et al., 1975). São encontradas em plantas, fungos e bactérias, mas não são sintetizadas por animais (MOBLEY et al., 1995).

Em 1926, Sumner isolou e cristalizou a maior das ureases (a JBU ou feijão-de-porco), demonstrando que as enzimas são proteínas e que estas podem ser cristalizadas (Figura 3). Além disso, a descoberta de que o níquel era um sítio ativo componente das ureases levou à primeira demonstração de um papel biológico para o níquel (DIXON et al., 1975).

Independente da sua origem (de plantas, fungos ou bactérias) e de sua organização estrutural, as ureases são proteínas homólogas que compartilham de 50 a 60% de identidade de sequência, sugerindo uma mudança a partir de uma enzima ancestral em comum (MOBLEY et al., 1995; SIRKO & BRODZIK, 2000; FOLLMER, 2008).

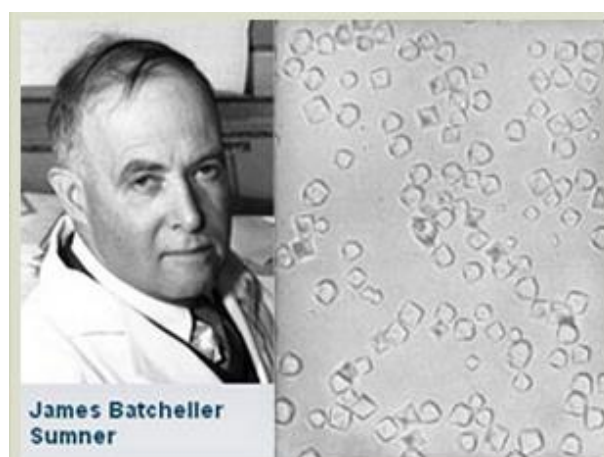
As ureases de plantas e de fungos são usualmente trímeros(α)₃ ou hexâmeros (α)₆ de uma subunidade de ~90 KDa, que contém cerca de 840 aminoácidos; enquanto que as ureases de bactérias são multímeros de duas ou três subunidades [α,β,γ]₃, correspondendo a “fragmentos” da cadeia única de ureases vegetais e fúngicas(MOBLEY et al., 1995; SIRKO & BRODZIK, 2000) (Figura 4).

Atualmente, são conhecidas três isoformas de urease na planta de *Canavalia ensiformis*: a JBURE-I, JBURE-II e a Canatoxina.

A isoforma que é mais abundante é a chamada JBURE-I ou JBU(Jack Bean Urease), ou “feijão-de-porco”.

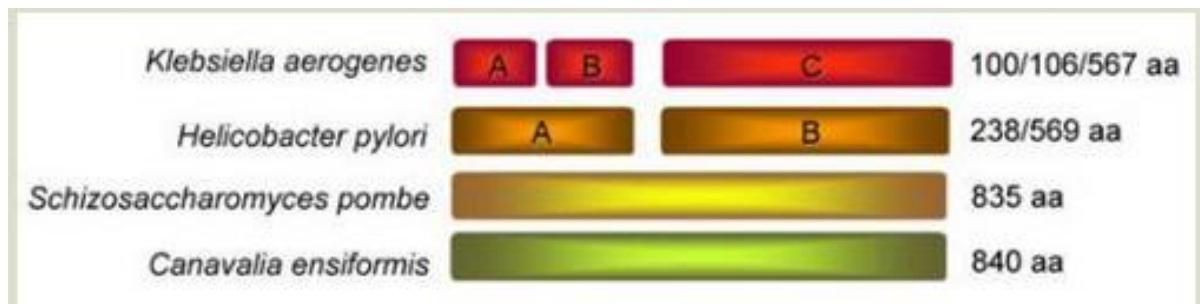
Essas isoformas são altamente tóxicas para diferentes insetos, sua toxicidade é mediada pela interação com a proteína inativa, que se torna ativa quando há liberação de um peptídeo de um fragmento de cerca de 10 KDa de uma proteína. Essa liberação se dá por ação das enzimas digestivas cisteínicas e aspárticas (catepsina B e C) presentes no trato digestivo de alguns insetos, não sendo tóxicos para aqueles que possuem a sua alimentação à base de enzimas serínicas (tripsina). Esse peptídeo foi caracterizado como Pepcanatox (CARLINI et al., 1997; FERREIRA-DASILVA et al., 2000).

Figura 3– James Sumner(1887-1955), da Cornell University, Ithaca, NY, USA, e os cristais da uréase de *Canavalia ensiformis* obtidos pela primeira vez em 1926.



Fonte: (<http://sandwalk.blogspot.com/2007/10/nobel-laureate-james-batcheller-sumner.html>)

Figura 4- Organização estrutural de ureases. Em plantas (*C.ensiformis*), fungos (*S.pombe*) e bactérias (*K.aerogenes*)



Fonte: (<http://www.ufrgs.br/laprotox/o-que-fazemos/linhas-de-pesquisa/ureases-aspectos-estruturais>)

2.4 Sistema Colinérgico em insetos

Assim como nos vertebrados, os insetos apresentam mais de um receptor colinérgico, e esses receptores colinérgicos são caracterizados por nicotínicos, muscarínicos, e receptores mistos (CALLEC, 1985). No Sistema Nervoso Central dos insetos existem mais receptores nicotínicos que muscarínicos e a acetilcolina não é o mediador sináptico nas junções neuromusculares, como é nos vertebrados, por este motivo, os tecidos musculares dos insetos não apresentam nenhum tipo de receptor de acetilcolina (ACh).

A estrutura completa dos receptores de ACh em insetos ainda não está bem elucidado, mas têm-se a evidência que os receptores da acetilcolina compreende parte do canal de sódio, assim como nos vertebrados (BREER & SATTELLE, 1987).

2.5 Iodeto de Acetilcolina

Uma substância química que é liberada pela terminação nervosa é denominada neurotransmissor.

A acetilcolina (ACh), foi o primeiro composto identificado como neurotransmissor central. A ACh está presente em uma variedade de locais no

interior do Sistema Nervoso Central.; ela é sintetizada nos terminais nervosos a partir da ação da enzima acetil-coenzima A (acetil-CoA, o qual é sintetizado a partir da glicose) e colina, numa reação catalisada pela colina acetiltransferase (CAT) (Figura 5). A presença de CAT em um neurônio é, portanto, uma forte indicação de que a ACh é usado como um dos seus transmissores.

Cerca de 10.000 moléculas de ACh são empacotados em cada vesícula por um transportador vesicular de ACh.

Diferente da maioria dos neurotransmissores de moléculas pequenas, a ação pós-sináptica de ACh em muitas sinapses colinérgicas (a junção neuromuscular em particular) não são terminadas por recaptação mas sim, pela ação de uma enzima hidrolítica, a acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima é concentrada na fenda sináptica, assegurando uma diminuição rápida na concentração de ACh após a sua libertação a partir do terminal pré-sináptico. A AChE possui uma atividade catalítica muito elevada (cerca de 5000 moléculas de ACh por molécula de AChE por segundo) e hidrolisa ACh em acetato e colina, impedindo o acúmulo de acetilcolina nas sinapses colinérgicas(SILVA, 2006).

Entre os muitos fármacos que interagem com enzimas colinérgicas, têm-se os organofosforados. Compostos tais como difenil-tricloroetano (DTT) e o ácido herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foram originalmente desenvolvidos como inseticidas. Os organofosforados pode ser letal para os seres humanos (e insetos), por inibirem a AChE, causando o acúmulo de ACh nas sinapses colinérgicas. Este acúmulo de ACh despolariza a célula pós-sináptica e se torna recipiente a subsequentes libertações de acetilcolina, fazendo com que, entre outros efeitos, ocorra paralisia neuromuscular. (SILVA, 2006).

Figura 5- Metabolismo da acetilcolina nos terminais nervosos colinérgicos

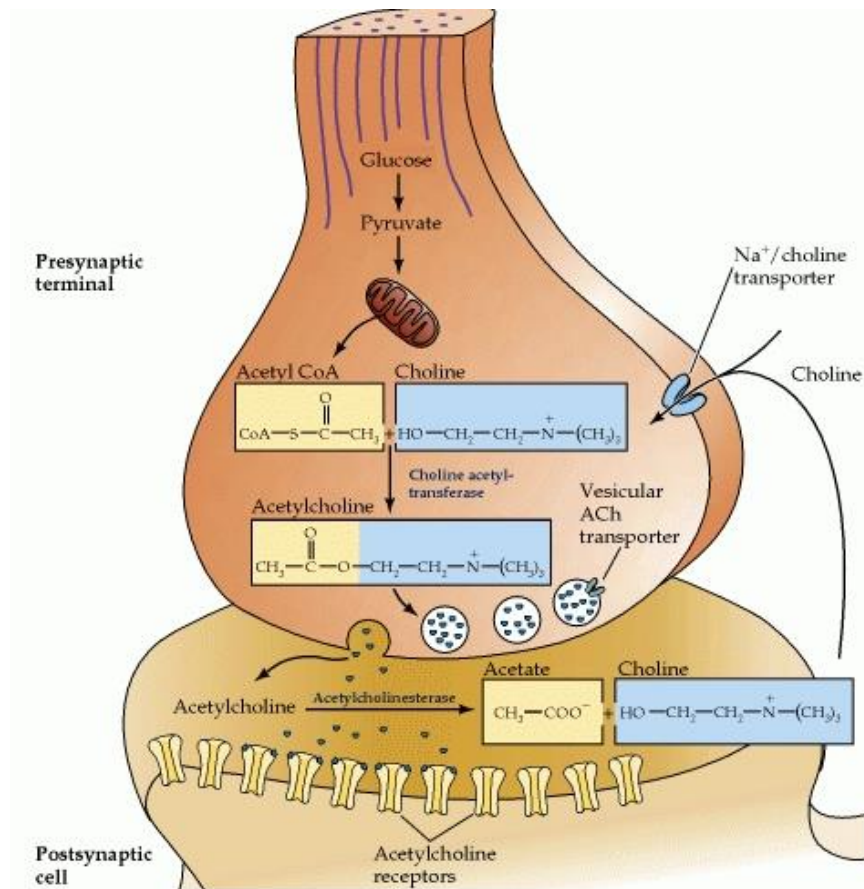


Fig. 5. A síntese de acetilcolina a partir de colina e acetil-CoA requerem colina-acetiltransferase. Acetil-CoA é derivado a partir do piruvato gerado pela glicólise, enquanto a colina é transportada para os terminais via um transportador dependente de Na⁺. Após a liberação, a acetilcolina é rapidamente metabolizada pela enzima acetilcolinesterase e a colina é transportado de volta para o terminal.

Fonte: Neuroscience, 2001

2.6 Neostigmina

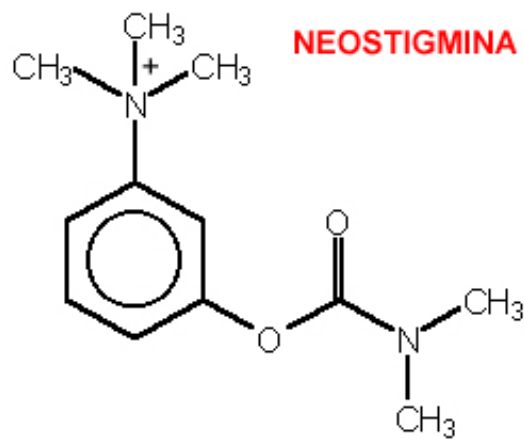
A Neostigmina é um composto sintético de amônio quaternário (Figura 6) que atua inibindo a enzima Acetilcolinesterase, evitando a degradação da acetilcolina por esta enzima, estimulando indiretamente os receptores nicotínicos e muscarínicos, e assim facilitando a transmissão do impulso nervoso na placa motora.

As aminas mono- e bisquaternárias (edrofônio, ambenônio, demecário) são anticolinesterásicos que tem a ação de inibir a acetilcolinesterase através da

formação de uma ligação não-covalente com o centro ativo da enzima. O edrofônio (Figura 7) compete com a acetilcolina pela ligação no local aniônico do centro ativo.

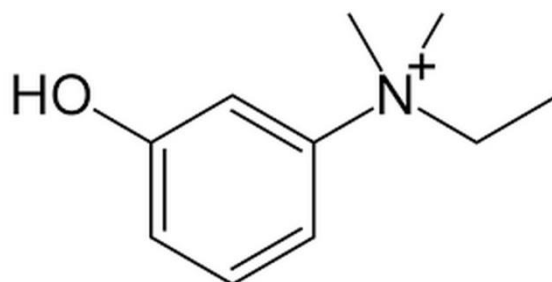
Os anticolinesterásicos do grupo dos carbamatos interagem com o local esterásico da enzima de modo semelhante ao da acetilcolina. A Neostigmina é um exemplo de anticolinesterásicos do grupo dos carbamatos (SILVA, 2006).

Figura 6- Estrutura Molecular da Neostigmina



Fonte: (<http://www.iqb.es/diccio/n/ne.htm>)

Figura 7- Estrutura molecular do edrofônio



Fonte: (<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Edrophonium.svg>)

2.7 Atropina

Os anticolinérgicos antimuscarínicos são representados por fármacos de origem natural, como a atropina, e por derivados sintéticos.

A atropina é um alcalóide encontrado na planta *Atropa belladonna* (beladona) (Figura 8) e outras de sua família, é um estimulante do sistema nervoso parassimpático que inibe a atividade do neurotransmissor acetilcolina.

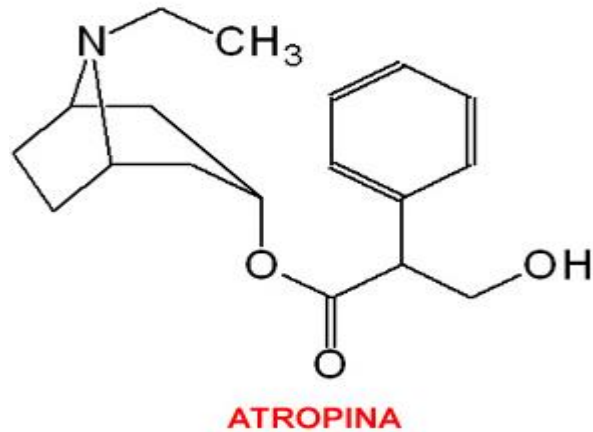
A atropina é formada por ésteres orgânicos pela combinação de um ácido aromático (ácido trópico) e bases orgânicas complexas formando tropina (tropanol), que encerram amônio terciário. (Figura 9) (SILVA, 2006).

Figura 8- Figura ilustrativa da Planta *Atropa belladonna*



Fonte: (http://pt.wikipedia.org/wiki/Atropa_belladonna)

Figura 9- Estrutura molecular da Atropina



Fonte: (<http://quimica-alcaloide.blogspot.com.br/>)

2.8 Baratas

Animais existentes há mais de 300 milhões de anos, as baratas já somam cerca de 4.000 espécies no mundo. Pertencentes do Filo Artrophoda, da Classe Insecta, da Subclasse Pterygota, da Infraclasse Neoptera e da Ordem Blattaria; estes insetos são hospedeiros de várias bactérias, fungos, vermes, vírus e protozoários, que tem a possibilidade de transmitir doenças aos seres humanos (baratas domésticas). Possuem hábitos noturnos, já que este é o período em que buscam alimentos e parceiros para reprodução. São animais com desenvolvimento paurometabólico, ou seja, a fêmea adulta põe ovos, gerando ninfas que são muito semelhantes ao indivíduo adulto, tanto no habitat quanto nos hábitos. Como todo inseto, as baratas possuem o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen, três pares de pernas (saindo do tórax) e um par de antenas. O corpo é geralmente ovalado e achatado dorsoventralmente.

Atualmente, a utilização de animais em pesquisas e estudos científicos, é uma prática bastante comum para toda a comunidade científica; dentre estes organismos, têm-se destacados a utilização de insetos (COSTA-NETO, 2005).

Estes organismos são modelos de referência em estudos de ensino e pesquisa, já que apresentam baixo custo de criação, sobrevivem a temperatura ambiente, são

facilmente observáveis com lupa e não precisam ser aprovados por uma Comissão de Ética para serem utilizados.

A *Nauphoeta cinerea* (OLIVIER, 1789), (Figura 10) é uma espécie de baratas provavelmente nativa do Leste da África, se espalhando para outras regiões do mundo através do comércio. Os adultos apresentam dimensões entre 25-29 mm de comprimento. Possuem coloração acizentada matizada; pronoto com desenho característico, com asas manchadas que não cobrem o abdômen. São animais onívoros com habitat noturno (SCHICKLER, 2013).

Figura 10- *Nauphoeta cinerea*



Fonte: (<http://www.biolib.cz/en/image/id24329/>)

2.9 O Sistema Cardiovascular de Baratas

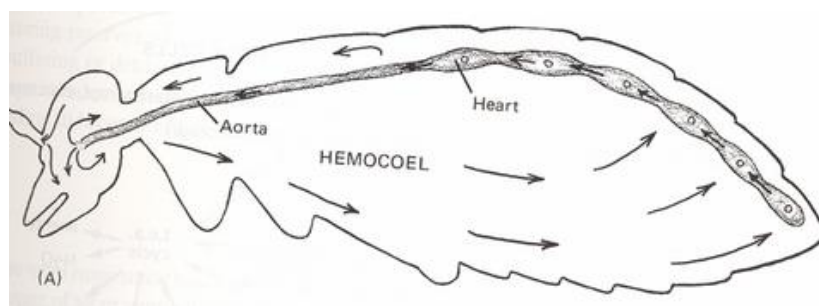
Os insetos possuem um sistema circulatório aberto onde o sangue (hemolinfa) corre livremente na cavidade do corpo, onde entra em contato com todas as suas estruturas internas. O sistema circulatório tem como função efetuar todas as trocas químicas entre os órgãos do corpo, transportar nutrientes, produtos de excreção, hormônios, etc. Já a hemolinfa, serve como meio de armazenamento de água, aminoácidos e como fluido hidráulico para a transmissão e manutenção da pressão do sangue. Apresenta um vaso dorsal, que é um tubo formado por fibras musculares e tecido fibroso, composto posteriormente pelo coração e anteriormente pela aorta (Figura 11). O coração é formado por 12 câmaras, possuindo válvulas

ostiolares que impedem a volta da hemolinfa do vaso dorsal para a cavidade do corpo (Figura 12).

Apresentam órgãos pulsáteis acessórios, que são órgãos especializados em bombear sangue, ficando situados na base das antenas, asas e patas. As contrações do coração de baratas apresentam três etapas: a sístole (que é a contração), a diástole (que é o relaxamento) e a diástase (que é o período de repouso).

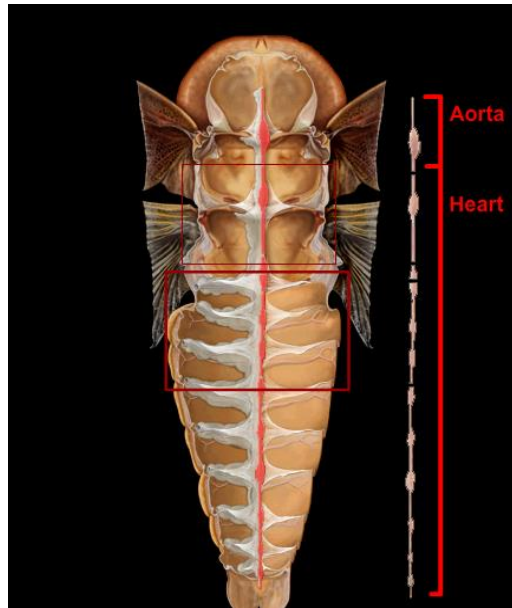
Durante vários anos, o coração de algumas espécies de baratas vem sendo utilizadas em estudos como fatores cardiovasculares, estudo de aminas biogênicas e da acetilcolina (JONES, 1974; GKRSCH, 1972; RICHTER & STURZEBECKER, 1971; HERTHL, 1971; GARDNER & ROUNDS, 1969). Com maior frequência, é utilizado o coração semi-isolado, onde após a remoção dos órgãos internos, o coração exposto ligado à cutícula dorsal é banhado em solução salina, onde podem conter os compostos que são os objetos de estudo (MILLER, 1969).

Figura 11– Aparelho Circulatório dos Insetos



Fonte: (<http://marcosfilgueira.wikidot.com/aparelho-circulatorio-dos-insetos>)

Figura 12– Visualização virtual do Sistema Circulatório interno de baratas



Fonte: (www.orkin.com/cockroaches/virtual-roach/)

3. JUSTIFICATIVA

Uma recente preocupação global é a escassez de alimentos, o que representa um desafio para a agricultura no sentido de aumentar a produção de alimentos. Dados da organização mundial da Saúde (OMS) demonstram que 30% da população mundial sofrem com a falta de alimentos. Nesse sentido o desenvolvimento de compostos com atividade entomotóxica menos tóxicos para seres humanos e animais, e mais eficientes contra insetos-praga atrai a atenção de um amplo número de pesquisadores em todo o mundo. Danos às culturas devido a insetos, fungos, bactérias e vírus podem representar até 35% do total de perdas na produção agrícola. Portanto, é necessário melhorias para o controle de pragas (PARDO-LÓPEZ, et al., 2013). De modo geral, os praguicidas químicos utilizados para controle de pragas são extremamente tóxicos para organismos que não são o alvo e, em muitos casos, são prejudiciais para a saúde dos seres humanos e animais. Além disso, inseticidas químicos são recalcitrantes, ou seja, demoram a ser degradados, levando à contaminação do solo e da água. Outro problema, é que

muitos insetos desenvolveram resistência aos diferentes praguicidas químicos, resultando em um controle ineficiente em insetos pragas (DEVINE & FURLONG, 2007).

A utilização de inseticidas biológicos, como substitutos para produtos químicos, é uma alternativa para o controle de insetos em culturas agrícolas.

Deste modo, o estudo de plantas que contenham substâncias com ações inseticidas é de grande interesse para a comunidade científica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Investigar os efeitos da urease (JBU) no sistema cardiovascular de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar a ação da JBU sobre o sistema cardiovascular usando a preparação coração semi-isolado de *N. cinerea*;
- Investigar o potencial bioinseticida da JBU em modelo experimental de *N. cinerea*;

- Identificar os potenciais receptores envolvidos na modulação do sistema nervoso de *N. cinerea* por meio do uso de ensaios farmacológicos, utilizando compostos conhecidos como a Neostigmina, a Acetilcolina e a Atropina.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizadas baratas adultas de ambos os sexos da espécie *Nauphoeta cinerea* e acondicionadas em caixa especial para insetos. Os animais foram mantidos em temperatura de 20-24°C e alimentados com ração de cachorro (Purina®) e água potável *ad libitum*.

5.2. Solução Fisiológica para insetos

Solução fisiológica para insetos – composição em mM – Cloreto de Sódio (NaCl), 150mM; Cloreto de Cálcio (CaCl₂), 2mM; Cloreto de Potássio (KCl), 10mM e Tris-HCl, 10mM ajustado para pH 6.8 usando 2N NaOH.

5.3. Drogas

As ureases foram utilizadas nas concentrações de 1,5µg/g animal, 3,0µg/g animal, 6,0µg/g animal.

O iodeto de acetilcolina foi utilizado na concentração de 5 µM.

A neostigmina foi utilizada na concentração de 5 µM.

A atropina foi utilizada na concentração de 1 µM.

5.4. A Preparação coração semi-isolado de baratas

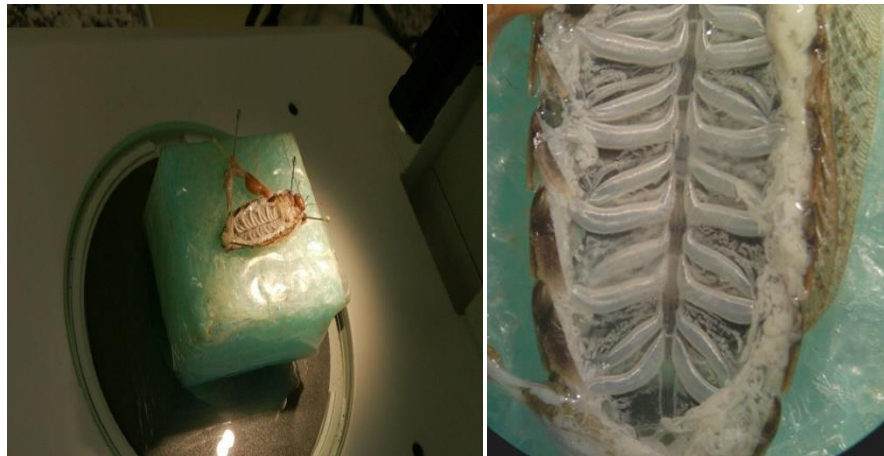
A preparação do coração semi-isolado de barata (Figura 13) (BAUMANN & GERSCH, 1982) foi utilizada para avaliar os efeitos farmacológicos induzidos pela JBU. Para cada dose testada da urease foram utilizados nove animais (n=9). Baratas adultas da espécie *Nauphoeta cinerea* foram anestesiadas deixando-as por 5 minutos no freezer e imobilizadas em placas de isopor por meio de alfinetes

entomológicos com o lado ventral voltado para cima. As margens laterais do abdômen foram cortadas ao longo de cada lado com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e uma pinça, removendo assim a cutícula abdominal, expondo as vísceras que foram cuidadosamente afastadas para que o coração ficasse de maneira exposta.

O coração foi banhado com a solução fisiológica a 0,015 mM em temperatura ambiente. Após os 5 minutos iniciais para a estabilização da frequência cardíaca, os diferentes tratamentos foram adicionados sobre o coração.

A frequência cardíaca foi monitorada e contada durante 30 minutos com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus, Damstat, Alemanha). Após esse período, a preparação foi lavada com solução fisiológica e monitorada por mais 5 minutos para verificar se houve recobro da frequência cardíaca.

Figura 13- Imagem da porção ventral da *N. cinerea*



Fonte: Fabíola Duarte

5.5 Análises Estatísticas

Os dados foram plotados ponto a ponto com média e erro padrão, com auxílio do programa Microsoft Excel (Microsoft Office Excel 2003). A análise estatística foi realizada utilizando o método Anova para medidas repetidas por meio do software OriginPro 8 (OriginLabCo, Northampton, MA, USA).

6. RESULTADOS

6.1. Efeito da JBU sobre a frequência cardíaca de *Nauphoeta cinerea*

Nos ensaios com a preparação coração semi-isolado de *Nauphoeta cinerea*, obteve-se uma resposta tempo-dependente induzida pelas diferentes concentrações de JBU. Assim em preparações controle, sem a adição de nenhum tratamento a resposta cronotrópica foi de 94 ± 5 bat./min. Quando a concentração menor de JBU ($1,5 \mu\text{g/g}$ de animal) foi administrada ($n=9$), esta causou uma pequena aceleração na frequência cardíaca da barata (105 ± 3 bat./min), porém, não foi significativa quando comparada ao controle. A JBU causou a aceleração da frequência cardíaca do animal de forma significativa, comparada com o controle, quando sua concentração intermediária ($3 \mu\text{g/g}$ animal) foi administrada ($n=9$), chegando a 120 ± 3 bat./min. Este efeito teve início logo após a aplicação da JBU sobre o coração, e atingiu seu pico em torno de 5min após a aplicação, mantendo-se durante os 30min de observação (Figura 14). Após a lavagem do coração com salina, esse efeito diminuiu, chegando a frequência cardíaca do início do experimento. A maior concentração de JBU ($6 \mu\text{g/g}$ de animal) não teve efeito significativo sobre a frequência cardíaca do animal (100 ± 3 bat./min).

Figura 14- Efeito da JBU (1,5, 3,0 e 6 μ g de animal) sobre o sistema cardiovascular de *Nauphoeta cinerea*

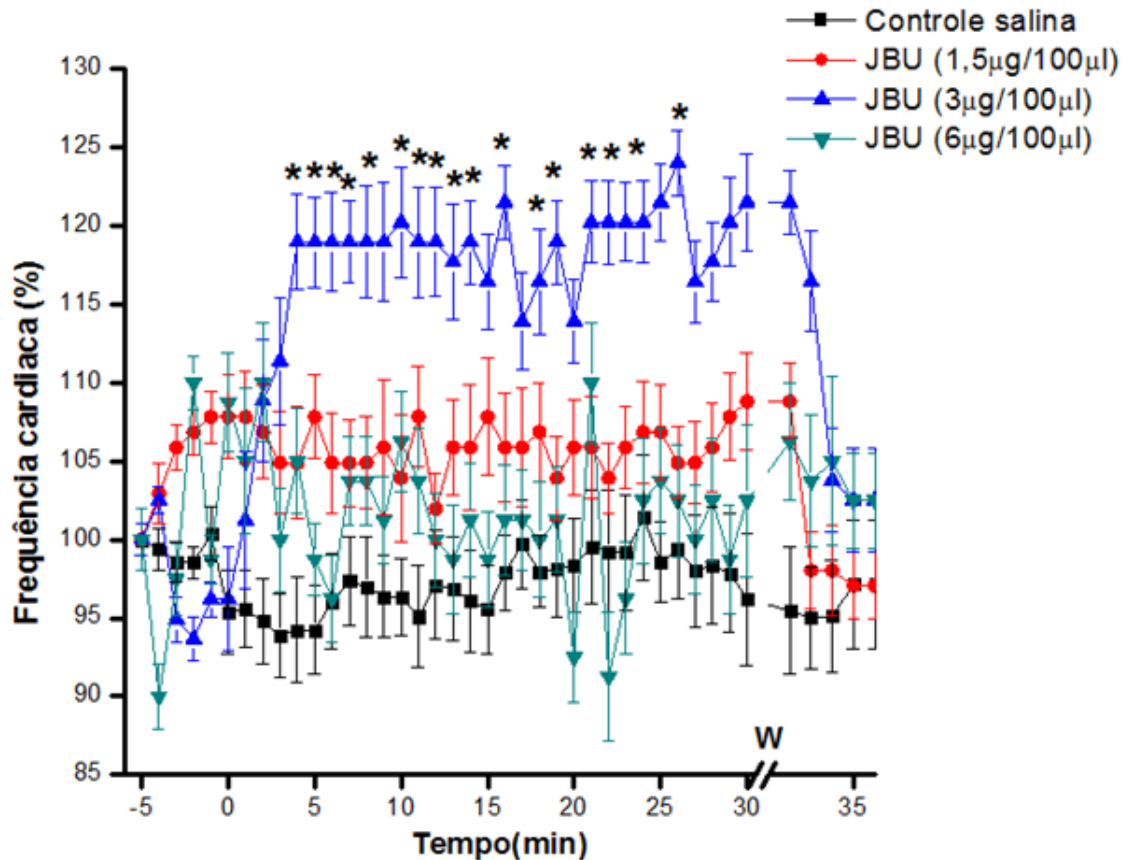


Figura 14- Gráfico da resposta cardíaca da barata com o tratamento de diferentes concentrações de JBU, mostrando o aumento da frequência cardíaca do animal com a administração da concentração intermediária de JBU. Cada ponto corresponde a média \pm erro-padrão.

6.2. Efeito de moduladores colinérgicos sobre as respostas cronotrópicas de *Nauphoeta cinerea*

Sabe-se que a frequência cardíaca de insetos é modulada positivamente por agentes colinérgicos. Assim, quando a neostigmina (5 μ M) foi ensaiada sobre a preparação coração semi-isolado (n=9) houve um aumento de 30% na frequência cardíaca dos animais (Figura 15). Esse efeito foi semelhante ao induzido pela JBU (3 μ g de animal). Nos ensaios utilizando a JBU (3 μ g/g de animal) com tratamento

prévio de Atropina ($1\mu\text{M}$), esta inibiu o aumento da frequência cardíaca induzido pela JBU (Figura 15).

Figura 15- Efeito cronotrópico positivo induzido pela neostigmina ($5\mu\text{M}$) sobre o sistema cardiovascular de *Nauphoeta cinérea*

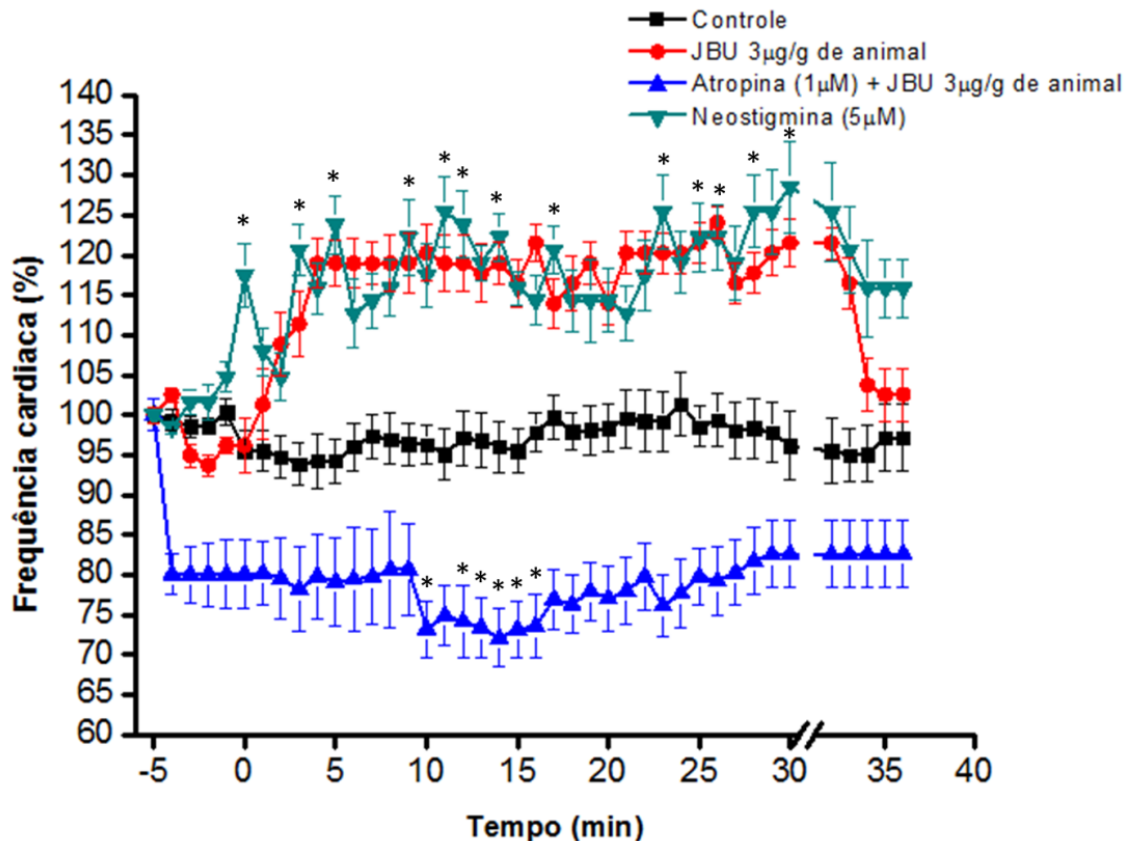


Figura 15- Comparação entre os efeitos da neostigmina e da JBU sobre o sistema cardiovascular de *N.cinerea*. Note que o pré-tratamento da preparação com atropina ($1\mu\text{M}$) inibiu o efeito cronotrópico positivo da JBU.

A acetilcolina aumentou a frequência cardíaca. A Ach está presente em nervos colinérgicos que mareiam o túbulo cardíaco da barata (COLLINS & MILLER, 1976) Em insetos a acetilcolina induz um aumento da frequência cardíaca e a octopamina uma diminuição. Nossos dados demonstram que a acetilcolina possivelmente está atuando sobre o sistema colinérgico de baratas pelo aumento da frequência cardíaca(Figura 16) (OSBORNE, 1996).

Figura 16- Efeito cronotrópico positivo induzido pela neostigmina (5 μ M) e Acetilcolina (5 μ M) sobre o sistema cardiovascular de *Nauphoeta cinérea*

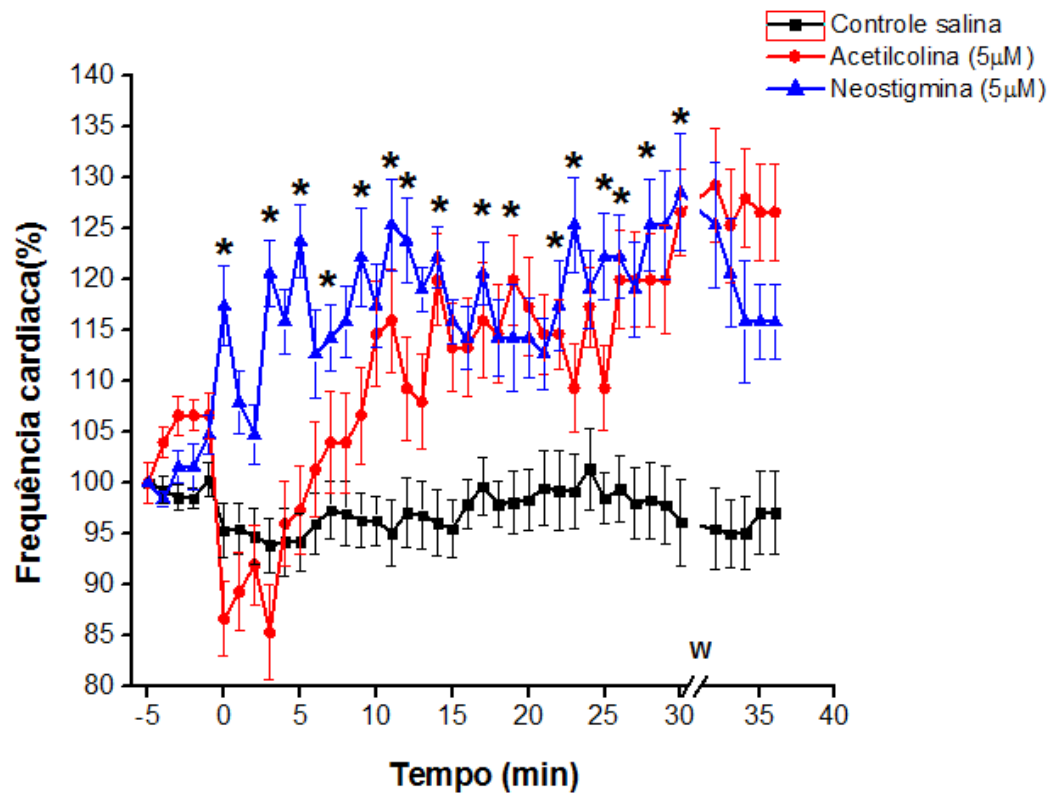


Figura 16- Comparação entre os efeitos da neostigmina e da acetilcolina sobre o sistema cardiovascular de *N.cinerea*.

7. DISCUSSÃO

Nesse trabalho demonstrou-se a atividade tóxica da urease de *C. ensiformis* sobre o sistema cardiovascular de baratas da espécie *N. cinerea*. O envolvimento do sistema colinérgico nesse efeito, bem como suas conseqüências no desenvolvimento do processo entomotóxico serão discutidos a seguir.

Inicialmente o coração de baratas foi considerado um órgão neurogênico, mas esta idéia foi logo preterida já que estudos demonstraram que mesmo após a remoção dos nervos cardíacos e o tratamento com tetrodotoxina, que é uma toxina com potencial poder de bloqueio dos canais de sódio, paralisando a condução nervosa; o coração continuava a bater ritmicamente. Deste modo, foi sugerido que os nervos cardíacos marginais ao sistema cardiovascular de baratas não seriam capazes de controlar os batimentos cardíacos em relação ao número de sístoles e diástoles, mas sim, sendo capaz de controlar a frequência cardíaca (ADIYODI, 1981).

Ensaio realizado sobre a frequência cardíaca de *N. cinerea*, demonstraram que a acetilcolina induz um efeito mimético ao da JBU. Em insetos a frequência cardíaca é modulada positivamente pela acetilcolina, que advém de nervos adjacentes ao túbulo cardíaco (COLLINS & MILLER, 1977). Em nossas condições experimentais a JBU induziu aceleração cardíaca, semelhante a neostigmina, um inibidor da atividade da acetilcolinesterase. Esse efeito sugere uma exacerbação da neurotransmissão colinérgica nesse órgão como demonstrado por RODRIGUES *et al.* (2012), que mostrou o mesmo efeito usando a anatoxina a(s), um organofosforado natural. Esse dado também sugere que, além da atividade anticolinesterásica, a JBU poderia estar despolarizando nervos colinérgicos cardíacos, através do seu efeito permeabilizante de membranas (PIOVESAN *et al.*, 2014), o que também favoreceria um aumento da frequência cardíaca dos animais. Quando foi utilizada a dose de JBU intermediária (3 µg/g animal) com o prévio tratamento de Atropina (1µM), ocorreu a inibição do aumento da frequência cardíaca que seria induzido pela JBU,

Nos ensaios utilizando a JBU (3 $\mu\text{g/g}$ de animal) com tratamento prévio de Atropina (1 μM), esta inibiu o aumento da frequência cardíaca induzido pela JBU, inibição esta ocorrida, pelo fato da atropina ser um anticolinérgico.

A acetilcolina (5 μM) teve um efeito cronotrópico positivo de $35\pm 6\%$ maior em relação ao controle salina.

8. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesse trabalho de conclusão de curso, bem como os aspectos relevantes que foram discutidos, nos permitem relacionar as seguintes conclusões:

- A JBU induz alterações cronotrópicas positivas sobre o sistema cardiovascular de *Nauphoeta cinerea*;
- Apesar de a JBU modular significativamente a frequência cardíaca de insetos, o efeito não é suficiente para matar os animais, mas pode, por exemplo, aumentar a chance deles serem predados por outros animais;
- A JBU (1,5, 3 e 6µg/g de animal) não é letal para a barata *Nauphoeta cinerea*, apesar dos animais ficarem letárgicos após 24h da administração do composto. Esse fato pode ser explicado pela ausência de enzimas do tipo catepsinas no sistema digestivo de *Nauphoeta cinerea*, ou pelo fato de ter sido administrado a urease pela via da hemolinfa.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Investigar a interação da JBU com diferentes receptores do coração por meio de ensaios de imuno-florescência;
- Investigar qual porção da molécula da JBU estaria envolvida na neurotoxicidade induzida em baratas, por análises bioquímicas e produção de peptídeos derivados da JBU.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIYODI, K.G. **The American Cockroach**. Kluwer Academic Publishers, V.6, p.34-35, 1981.
- BAUMANN, E.; GERSCH, M. **Purification and identification of neurohormone-D**, a heart accelerating peptide from the corpora cardiaca of the cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochem*, v. 12, p.7-14, 1982.
- BOHMONT, B. L. **The new pesticide user's guide**. Fort Collins: B & K. Enterprises, V.1,1981.
- BOLTER, C.; JONGSMA, M.A. **The adaptation of insects to plant peptidase inhibitors**. *J. Insect Physiol.* V.43(10), p.885-895, 1997.
- BRASIL, **Lei n.º 7.802, de 12 de julho de 1989**. "Lei Federal dos Agrotóxicos". Brasília, Diário Oficial da União de 12/07/1989.
- BREER, H.; SATELLE, D.B. **Molecular properties and functions os insect acetylcholine receptors**. *The Journal os Insect Physiology.* V.33, p.771-790, 1987.
- CARLINI, C.R., GUIMARÃES, J.A. **Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (Jackbean) seeds, distinct from concanavalin A**. *Toxicon* V. 19, p. 667-676, 1981.
- CARLINI, C.R., GROSSI-DE-SÁ, M.F. **Plant toxic proteins with insecticidal properties**. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*.V. 40(11), p. 1515-1539, 2002
- CARLINI, C.R.; OLIVEIRA, A.E.; AZAMBUJA, P.; XAVIER-FILHO, J.; WELLS, M.A. **Biological effects of canatoxin in different insect models**. Evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. *J. Econ. Entomol.* V. 90, p. 340-348, 1997.
- CARLINI, C.R. & POLACCO, J.C. **Toxic properties of urease**. *Crop Science.* V.48, p. 1665-1672, 2008.

- COLLINS, C. & MILLER, T. **Studies on the action of biogenic amines on cockroach heart.** Department of Entomology. Division of Toxicology and Physiology; University of California, Exp. Bio. v.67, p.1-15, 1977.

- COSTA-NETO, E. V. **Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources.** Anais da Academia Brasileira de Ciências. V. 77(1), p. 33-43, 2005.

- DEVINE,G.J.; FURLONG, M.J. **Insecticide use: contexts and ecological consequences.** Agr. Hum. Values. V. 24, p. 281–306, 2007.

- DIXON, N.E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. **Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme.A simple biological role for nickel?** Journal of The American Chemical Society. V.97(14): p. 4131-4133, 1975.

- FELTON, G. W. **Nutritive quality of plant protein: Sources of variation and insect herbivore responses.** Arch. Insect Biochem. Physiol. V.32(1), p.107-130, 1996.

- FERREIRA-DASILVA, C.T.; GOMBAROVITS, M.E.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, C.M.; CARLINI, C.R.**Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes.** Arch. Insect Biochem. Physiol. V. 44, p. 162-171, 2000.

- FOLLMER, C. **Insights into the role and structure of plant ureases.** Phytochemistry. V.69, p. 18-28, 2008.

- GARDNER, F. E. & ROUNDS, H. D.**The pharmacology of cardioaccelerators in the central nervous system of *Periplaneta americana* L.** Comp. Biochem. Pkysiol. V.29, p. 1071-8, 1969.

- GKRSCH, M. **Experimentelle Untersuchungen zum Freisetzungsmechanismus von Neurohormonen nach elektrischer Reizung der Corpora Cardiacia von *Periplaneta americana* in vitro.**J. Insect Pkysiol. V. 18, p. 2425-39, 1972.

- GUSHIKEN, A. **Feijão-de-porco: *Canavalia ensiformis*,** 2011. Disponível em: <<http://www.agrogushi.com.br/canavalia-ensiformis-feijao-de-porco/>>. Acesso em: 14 de dezembro de 2015.

- HERTHL, W. **Untersuchen rur neurohormonalen Steuerung des Herzens der Amerikanischen Schabe *Periplaneta americana* L.** Zool. Jb. Pkysiol. V.76, p. 152-84, 1971.

- JONES, J. C. **Factors affecting heart rates in insects.** In *The Physiology of Insecta*, vol. V (ed.M. Rockstein), p. 119-67. New York: Academic Press, 1974.
- KOIWA, H., KATO, H., NAKATSU, T., ODA, J., YAMADA, Y., SATO, F. **Purification and characterization of tobacco pathogenesis-related protein PR-5d, na antifungal thaumatin-like protein.** *Plant Cell Physiol.* V. 38(7), p. 783-791, 1997.

- LIMA, U. A.; AQUARONE E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL,W. **Biotechnologia Industrial.** São Paulo, Edgard Blucher Ltda, vol.3, 2001.

- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida.** Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, p.17-23, 2011

- LORENZI, H.; ABREU MATOS, F.J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**, 2ª edição. São Paulo: Plantarum, V.544, p.25-137, 2008.

- MILLER, T. **Cockroach heart response to cardioaccelerators.** *Entomologia. exp. appl. ia*, p.53-61, 1969.

- MOBLEY, H.L.; ISLAND, M.D.; HAUSINGER, R.P. **Molecular biology of microbial ureases.** *Microbiol.*V. 59, p.451-480, 1995.

- NATION, J. L., **Insect physiology and biochemistry**,2nd Edition, 2001.

- PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.C.; LAMANTIA, A.S.; MCNAMARA, J.O.; WILLIAMS, M. **Neuroscience, 2nd edition.** Sunderland (MA). p. 720-725.

- OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Embrapa Cerrados.** Planaltina, DF, Brasil, 2008.

- OLIVIER, G.A. **Entomologie, ou histoire naturelle dès insectes, avec leurs caracteres génériques et spécifiques, leur description, leur synonymie et leur figure enluminee.Coléoptères.**Paris. (Baudouim), 1789.

- OSBOURNE, R. **Insect Neurotransmission: Neurotransmitters and Their Receptors.** *PharmacolTher.* V.69, p.117-142. 1996.

- PARDO-LÓPEZ, L., SOBERÓN, M., BRAVO, A.; **Bacillus thuringiensis insectidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection.** *FEMS Microbiology Reviews.* V.37,p.3-22, 2013.

- PELAEZ, V.; TERRA, F.H.B; SILVA, L.R.. **A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente.** Artigo apresentado no XIV Encontro Nacional de Economia Política / Sociedade Brasileira de Economia Política - São Paulo/SP, de 09/06/2009 a 12/06/2009. p.22.

- PIOVESAN A. R., MARTINELLI A. H. S., LIGABUE-BRAUN R., SCHWARTZ J. L., CARLINI C. R. **Canavalia ensiformis urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers.** *Archives of Biochemistry and Biophysics.* V. 547, p. 6-17. 2014.

- POLACCO, J.C., HOLLAND, M.A. **Roles of ureases in plant cells.** *Int. Ver. Cytol.* V. 145, p. 65-103, 1993.

- PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D., et al. **Neuroscience.** 2nd Edition. Sunderland (MA), 2001.

- RICHTER, K. & STURZEBECKER, J. **Zur Wirkung von Neurohormon D aus *Periplaneta americana* L. (Insecta) auf das Herz und das Herzganglion von *Tegenaria atrica* C. L. Koch und *Coelotes atropos* Walckenaer (Arachnida-Araneae).** *Zool. Jb. Pkysiol.* Bd.V. 76, p.64-79, 1971.

- RODRIGUES, D.T.; NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; DIAS, J.M.M. **Cultivo in vitro de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral.** *Revi Ceres.* V. 59, p.9–15, 2012.

- ROSENTHAL, G.A. **The biological effects and mode of action of L-canavanine, a structural analogue of L-arginine.** *The quarterly review of biology.* V.52, p.155-180, 1977.

- RYAN, C. A. **Petidase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens.** *Ann.Rev. Phytopathol.* V.28, p. 425-449, 1990.

- SCHICKLER, G. *Barata cinerea*, 2013. Disponível em: <<http://www.nutrinsecta.com.br/artigos/barata-cinerea-nauphoeta-cinerea/>> Acesso em: 20 de dezembro de 2014.

- SILVA, J.M.;NOVATO-SILVA, E.;FARIA, H.P.; PINHEIRO, T.M.M. **Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural.** In *Ciência & Saúde Coletiva*, V. 10(4), p.891-903, 2005.

- SILVA, P.**Farmacologia.** 7 ed.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2006.

- SIRKO, A.; BRODZIK, R.**Plant ureases: role and regulation.** *Acta Biochim.Pol.*V.47, p.1189-1195, 2000.

- SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L. C.; ANDREA, M. M. de. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42).

- STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C.R. **Plant ureases and related peptides: Understanding Their Entomotoxic Properties.***Toxins* 4(2),p. 55-67, 2012.

- STANISÇUASKI, F.; TE BRUGGE, V.; CARLINI, C.R.; ORCHARD, I. **In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec in *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules.***J. Insect Physiol.* V.55,p. 255-263, 2009.

- STOTZ, H.U., KROYMAN, J., MITCHELL-OLDS, T. **Plant-insect interactions.** *Cur. Opinion Plant Biol.* V. 2(4), p.268-272, 1999.

- SUMNER, J.B. **The isolation and crystallization of the enzyme urease.** *Journal of Biological Chemistry*, V.69, p.435-441, 1926.

- SUMNER, J.B.; HOWELL, S.F. **The identification of the hemagglutinin of the jackbean with concanavalin A.** Journal of Bacteriology, V.32,p. 227-237, 1936.

- UBATUBA, F.B. **Occurrence of a trypsin inhibiting factor in seeds of *Canavalia ensiformis*.** Revista Brasileira de Biologia, V.15, p. 1-8, 1955.

- UDEDIBIE, A.B.I.;CARLINI, C.R. **Questions and answers to the edibility problem of *Canavalia ensiformis* seeds.** Animal Feed Science and Technology.V. 74, p.95-106,1998.

-

