



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

ÍRIS FLÁVIA DE SOUSA GONÇALVES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PROTEÍNAS LARVICIDAS CONTRA *Aedes Aegypti* SOBRE O PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*): TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES E LARVAS E INIBIÇÃO DE PROTEASES INTESTINAIS

FORTALEZA

2022

ÍRIS FLÁVIA DE SOUSA GONÇALVES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PROTEÍNAS LARVICIDAS CONTRA *Aedes Aegypti* SOBRE O PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*): TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES E LARVAS E INIBIÇÃO DE PROTEASES INTESTINAIS

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do grau de mestre em bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Davi Felipe Farias
Coorientadora: Prof. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G629a Gonçalves, Íris Flávia de Sousa.

Avaliação dos efeitos de proteínas larvicidas contra *Aedes aegypti* sobre o peixe-zebra (*Danio rerio*) : toxicidade aguda em embriões e larvas e inibição de proteases intestinais / Íris Flávia de Sousa Gonçalves. – 2022.

60 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Davi Felipe Farias.

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

1. Inseticidas biológicos. 2. Inibidor de proteases. 3. Avaliação de Risco. 4. Peixe-zebra. 5. Ecotoxicologia. I. Título.

CDD 572

ÍRIS FLÁVIA DE SOUSA GONÇALVES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PROTEÍNAS LARVICIDAS CONTRA *Aedes Aegypti* SOBRE O PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*): TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES E LARVAS E INIBIÇÃO DE PROTEASES INTESTINAIS

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do grau de mestre em bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovado em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Davi Felipe Farias (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

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

Dra. Terezinha Maria de Sousa
Princess Máxima Center for Pediatric Oncology (PMC)

Aos meus pais, Ilena e Chagas.

AGRADECIMENTOS

Institucionalmente, agradeço à Universidade Federal do Ceará (UFC) – Fortaleza (CE), em especial, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Departamento de Biologia e à Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – João Pessoa (PB), em especial ao Departamento de Biologia Molecular, que juntamente com seus quadros de funcionários e colaboradores, proporcionaram as condições necessárias para que este trabalho fosse realizado e concluído.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas.

Ao Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec) da Universidade Federal do Ceará, ao Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco) e à Unidade de Produção de Organismos Modelos Não Convencionais (UNIPOM), ambos da Universidade Federal da Paraíba, onde foram realizados os experimentos aqui descritos.

De forma pessoal, agradeço a Deus, por ser o guia e o autor do meu caminho.

Aos meus pais Ilena e Chagas, por todo amor, cuidado e incentivo. Obrigada por nunca medirem esforços para a realização dos meus sonhos e por fazerem deles, os seus.

Ao meu avô Chico (*in memoriam*), por todo o zelo e dedicação que teve comigo ao longo da vida. Obrigada, “vozinho”, continua me zelando de onde estiveres.

Ao meu orientador Prof. Dr. Davi Farias, por ir sempre além da orientação. Obrigada, Davi, pela paciência, pelo humanismo e pela amizade ao longo dos últimos anos.

Aos amigos Simone Soares, Renata Cosmo, Samara Araújo, Tássio Macedo, Ruana Araújo, Luma Pinheiro, Lucas Ferreira, Cristiane Coutinho, Tifânia Santos, Mariana Luz Fernanda Borges e Filipi Marchi, por estarem sempre presentes em minha vida, apesar da distância física. Obrigada, amigos, por sempre torcerem por mim.

Aos meus irmãos Monique e Átilla, pelas trocas que tivemos, pelas conversas e pelo apoio nos últimos tempos.

Aos meus sobrinhos Ana Júlia, Théo, Davi e Maria Thereza, por trazerem mais leveza para minha vida.

A minha família materna (tias, tios, primas e primos) pelas orações e pela torcida para que meus objetivos fossem alcançados.

Aos amigos e colegas do mestrado que estiveram comigo durante esta trajetória, em especial Lucas Pacheco e Veríssimo Vieira, com o quais dividi não só muitas horas de estudo, mas também muitas alegrias.

Aos colegas do Bioprospec (Pedro Matheus, Luiz Carlos, Joaquim Lopes, Thiago Almeida) e do LabRisco (Leonardo Vieira, Rafael Martins, Marília da Guia, Juliana Alves, Cleyton Gomes) por toda a ajuda e por todos os momentos de descontração dentro e fora do laboratório.

Aos colegas que conquistei em Fortaleza e em João Pessoa, por tornarem minha estadia, nessas cidades, mais leve e especial.

À minha Coorientadora Prof. Dra. Ana de Fátima, à Prof. Dra. Daniele Sousa e à Dra. Terezinha Souza por se mostrarem disponíveis na contribuição e melhoria deste trabalho, através de suas avaliações.

Gratidão a todos. Minha trajetória até aqui não foi fácil, mas sem vocês, o caminho teria sido bem mais difícil.

RESUMO

Há vários anos tem sido investigada na flora da Caatinga a presença de compostos com propriedades inseticidas contra o vetor da dengue, o mosquito *Aedes aegypti*. Um desses compostos, é o inibidor de tripsina obtido de sementes da espécie vegetal *Leucaena leucocephala* (LTI). O LTI é capaz de retardar o desenvolvimento e causar mortalidade das larvas, além de atuar de forma deletéria sob a eclodibilidade dos ovos do mosquito. Este inibidor também potencializa a atividade da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que é um dos biopesticidas mais estudados. Aliando suas propriedades bioquímicas e inseticidas, essas moléculas são ótimas candidatas para o desenvolvimento de fitoinseticidas. Contudo, durante o desenvolvimento desses produtos, a avaliação da segurança para uso em ambiente aquático é uma etapa importante, especialmente avaliando o seu efeito sobre organismos não-alvos. Nesse contexto, o peixe-zebra (*Danio rerio*) consiste em um vertebrado modelo com inúmeras vantagens para este tipo de estudo, dentre elas, está a sensibilidade das fases iniciais de sua vida a estressores ambientais. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos das proteínas larvicidas contra *Ae. aegypti*, LTI e protoxinas *Bt*, ao organismo modelo peixe-zebra no que concerne à avaliação de toxicidade aos seus estágios iniciais de vida e à presença de efeitos inibitórios do LTI sobre proteases intestinais desse peixe. Para isso, foi realizado teste de toxicidade aguda do LTI e protoxinas *Bt*, de forma isolada e combinada, em embriões e larvas de peixe-zebra. Além disso, foi investigado a possível interação entre o LTI e da tripsina do peixe-zebra com o auxílio de ferramentas computacionais, bem como foi obtido o extrato intestinal do peixe-zebra adulto de ambos os sexos para avaliação da presença de atividade inibitória de tripsina do LTI numa perspectiva de inferir sobre possíveis prejuízos ao processo digestório, nutrição e desenvolvimento de peixes expostos a essa formulação. Os resultados mostraram que concentrações de LTI (250 mg/L), *Bt* (0,13 mg/L) e LTI + *Bt* (250 mg/L + 0,13 mg/L), 10 vezes superiores àquelas com ação inseticida, não causaram mortes e nem induziram mudanças morfológicas durante o desenvolvimento embrionário e larval (3 a 144 hpf) de peixe-zebra. As análises de “docking molecular” evidenciaram a interação entre o LTI e a tripsina de peixe-zebra através de interações hidrofóbicas, além de uma ligação de hidrogênio entre a Arg58 do LTI e a His23 da tripsina. De fato, o LTI (0,1 mg/mL) foi capaz de inibir *in vitro* a atividade tripsínica dos extratos intestinais de peixes fêmeas e machos em 83 e 85%, respectivamente, enquanto a mistura LTI e *Bt* (ambos na concentração de 0,1 mg/mL) promoveu inibição de 69 em fêmeas e 65% em machos. Este achado sugere um potencial efeito antinutricional do LTI e da sua mistura com *Bt* a organismos não alvo em concentrações

próximas àquelas que apresentam ação larvicida. Em geral, esses dados levam à conclusão de que, em um ambiente natural, essa mistura larvicida pode apresentar efeitos deletérios em organismos aquáticos, especialmente àqueles com digestão proteica dependente de enzimas do tipo tripsina.

Palavras-chave: inseticidas biológicos; inibidor de proteases; avaliação de risco; peixe-zebra; ecotoxicologia.

ABSTRACT

For several years, the presence of compounds with insecticidal properties against the dengue vector, the *Aedes aegypti* mosquito, has been investigated in the flora of the Caatinga. One of these compounds is the trypsin inhibitor obtained from seeds of the plant species *Leucaena leucocephala* (LTI). LTI is capable of delaying the development and causing mortality of larvae, in addition to acting in a deleterious way on the hatching of mosquito eggs. This inhibitor also potentiates the activity of the bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), which is one of the most studied biopesticides. Combining their biochemical and insecticidal properties, these molecules are excellent candidates for the development of phytoinsecticides. However, during the development of these products, safety assessment for use in the aquatic environment is an important step, especially evaluating their effect on non-target organisms. In this context, the zebrafish (*Danio rerio*) is a model vertebrate with numerous advantages for this type of study, among them is the sensitivity of the early stages of its life to environmental stressors. Thus, the present work aimed to evaluate the effects of larvicidal proteins against *Ae. aegypti*, LTI and Bt protoxins, to the zebrafish model organism regarding the assessment of toxicity to its early life stages and the presence of inhibitory effects of LTI on intestinal proteases of this fish. For this, an acute toxicity test of LTI and Bt protoxins, isolated and combined, was performed in zebrafish embryos and larvae. In addition, the possible interaction between LTI and zebrafish trypsin was investigated with the aid of computational tools, as well as the intestinal extract of adult zebrafish of both sexes was obtained to evaluate the presence of trypsin inhibitory activity of the LTI to infer possible damages to the digestive process, nutrition and development of fish exposed to this formulation. The results showed that concentrations of LTI (250 mg/L), Bt (0.13 mg/L) and LTI + Bt (250 mg/L + 0.13 mg/L), 10 times higher than those with insecticidal action, did not cause deaths and did not induce morphological changes during embryonic and larval development (3 to 144 hpf) of zebrafish. The "molecular docking" analyzes showed the interaction between LTI and zebrafish trypsin through hydrophobic interactions, in addition to a hydrogen bond between Arg58 of LTI and His23 of trypsin. In fact, LTI (0.1 mg/mL) was able to inhibit in vitro the trypsin activity of intestinal extracts from female and male fish by 83 and 85%, respectively, while the mixture LTI and Bt (both at a concentration of 0.1 mg/mL) promoted inhibition of 69% in females and 65% in males. This finding suggests a potential anti-nutritional effect of LTI and its mixture with Bt to non-target organisms at concentrations close to those that have larvicidal action. In general, these data lead to the conclusion that, in a natural environment, this larvicidal mixture can have deleterious

effects on aquatic organisms, especially those with protein digestion dependent on trypsin-like enzymes.

Keywords: biological insecticides; protease inhibitor; risk assessment; zebrafish; ecotoxicology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>) em sua fase adulta	21
Figura 2 - Ciclo de desenvolvimento do peixe-zebra (<i>D. rerio</i>).	22
Figura 3 - Representação esquemática do intestino de peixe-zebra adulto e seus três segmentos principais	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAPNA	Benzoil-arginina-p-nitroanilina
BSA	Albumina Sérica Bovina
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
EcTi	Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i>
LTI	Inibidor de tripsina de <i>Leucaena leucocephala</i>
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PDB	Banco de dados de proteínas
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> , tetrametiletenodiamina
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
1.1	Insetos vetores de doenças	15
1.2	Controle de insetos vetores	15
1.2.1	<i>Bioinseticidas de origem vegetal</i>	17
1.2.1.1	<i>Inibidor de tripsina de <i>L. leucocephala</i> (LTI).....</i>	17
1.2.2	<i>Bioinseticidas de proteínas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>.....</i>	18
1.3	Bioprodutos com ação inseticida.....	19
1.4	Segurança de uso de bioprodutos com ação de inseticida.....	19
1.5	Peixe-zebra na avaliação de segurança de bioprodutos inseticidas	21
1.5.1	<i>Peixe-zebra como modelo para estudos de substâncias que afetam o processo digestório</i>	24
2	HIPÓTESES	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo Geral	27
3.2	Objetivos Específicos.....	27
4	MANUSCRITO	28
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
	REFERÊNCIAS	57

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Insetos vetores de doenças

As doenças humanas transmitidas por insetos vetores ainda são um importante problema de saúde pública e um fardo em termos de morbimortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento. Os vetores mais conhecidos são os insetos, principalmente os que abrangem os gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles*. Estes insetos são responsáveis pela transmissão de doenças como malária, Zika vírus, chikungunya, dengue, filariose, febre amarela e encefalites (WHO, 2017). Estas doenças ainda sobrecarregam os sistemas de saúde e são responsáveis por enormes perdas econômicas, tanto em termos de custos com saúde quanto de perda de produtividade (KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2013; SPARKS *et al.* 2015).

As doenças transmitidas por mosquitos tornaram-se mais comuns à medida que doenças que se encontravam geograficamente isoladas se espalharam globalmente (LEE *et al.* 2018). Além disso, o aumento significativo da população em muitas áreas levou a intenso desmatamento, irrigação e urbanização não planejadas, alterando drasticamente o ambiente e o clima, favorecendo a proliferação dos insetos vetores (ALTIZER; BARTEL; HAN, 2011; VONTAS *et al.*, 2012; KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2013).

Assim, várias são as atividades de pesquisadores no desenvolvimento de medicamentos e vacinas e na produção de substâncias químicas e biológicas, destinados ao combate dos insetos vetores de forma a minimizar as doenças transmitidas por eles (ALONSO *et al.*, 2013). Dessa maneira, fica clara a importância da compreensão ecológica e de evolução dos insetos vetores de doenças, dos patógenos e da produção de estratégias para controle destes vetores (ALMEIDA FILHO *et al.*, 2017).

1.2. Controle de insetos vetores

O controle vetorial pode ser definido como qualquer medida adotada contra insetos vetores, com o intuito de limitar a capacidade destes de transmitir doenças. O controle de mosquitos ainda é a principal estratégia utilizada para a atenuação das doenças vetoriais, pois reduzem ou interrompem o ciclo de transmissão dessas doenças (KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2013).

Esse controle pode ser feito através dos meios físicos (ex.: armadilhas para mosquitos), biológicos (ex.: liberação controlada de predadores), genéticos (ex.: mosquitos transgênicos), ambientais (ex.: redução de criadouros artificiais e educação ambiental) e químicos (ex.: compostos químicos sintéticos ou naturais), sendo este último a forma de controle

mais utilizada (ARAÚJO *et al.*, 2015; BALDACCHINO *et al.*, 2015).

Com a Revolução Verde (MMA, 2018), a modernização da agricultura, o aumento da população mundial, a urbanização, as mudanças climáticas significativas, o desmatamento exacerbado e a migração internacional levaram os insetos, que antes habitavam florestas, a se adaptarem às grandes cidades (ALTIZER; BARTEL; HAN, 2011; VONTAS *et al.*, 2012). Dessa forma, novas classes de inseticidas foram desenvolvidas como forma de controle desses insetos (GONÇALVES *et al.*, 2020).

O uso de inseticidas químicos utilizados no combate de mosquitos vetores ocorre há muitas décadas. Por exemplo, no ano de 1938, foi descoberto o primeiro inseticida de origem sintética. A detecção de propriedades inseticidas no DDT (diclorodifeniltricloroetano) pode ser considerada como uma das descobertas mais revolucionárias do século XX (PATTERSON, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2020).

O uso de grandes quantidades, bem como, o uso indiscriminado e pouco criterioso desses inseticidas, no Brasil e no mundo, tem gerado uma série de problemas há muitos anos (GONÇALVES *et al.*, 2020). Algumas espécies de insetos mostraram múltiplas resistências a diversas classes de inseticidas, tornando seu controle por métodos químicos extremamente difícil e caro. Aliado a isso, há ainda uma menor aceitação dos efeitos negativos decorrentes da utilização dos inseticidas como resíduos destes nos alimentos e no meio ambiente, contaminação de ambientes aquáticos e terrestres, bem como águas subterrâneas, além de efeitos sobre o solo e sobre organismos não-alvo (BEECH *et al.*, 2012; KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2013).

Dessa forma, surgem com muita frequência vários debates e questionamentos sobre os reais impactos dos inseticidas sintéticos químicos (GONÇALVES, *et al.*, 2020). Esses debates, por sua vez, impulsionam a busca por novos compostos, mais econômicos e seguros, com maior eficácia e duração da atividade e que sejam ambientalmente amigáveis (*eco-friendly*), visto que os inseticidas continuam sendo a forma mais importante dentre as abordagens integradas ao controle de vetores (LAPIED *et al.*, 2009; KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2013; SPARKS, *et al.*, 2015; MARCOMBE *et al.*, 2018). Logo, a pesquisa sobre bioinseticidas, principalmente os de origem vegetal, que possuam maior biodegradabilidade tem aumentado, visando minimizar o impacto ao ambiente, através de novos compostos que promovam a mortalidade das larvas dos mosquitos e previnam surgimento de linhagens resistentes (KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2013).

1.2.1. Bioinseticidas de origem vegetal

Atualmente, maior importância tem sido dada ao uso de inseticidas à base de plantas (inseticidas verdes ou fitoinseticidas) como agentes de controle de vetores e pragas de insetos (PONTUAL *et al.*, 2012; KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2013). Alguns fitoquímicos de várias famílias de plantas foram identificados com atividades larvicidas contra diferentes espécies de mosquitos e podem ter um importante potencial como substitutos dos agentes convencionais de controle de mosquitos (TRIPATHI *et al.*, 2009; TEHRI; SINGH, 2015).

Uma das vantagens do uso de inseticidas de origem vegetal diz respeito aos diferentes princípios ativos (metabólitos secundários, inibidores de tripsina, quitinases etc.) que estes possuem, dessa forma são diversos os mecanismos de ação em alvos. Por exemplo, os fitoinseticidas podem atuar sobre o sistema nervoso central dos insetos, dificultando o crescimento e o desenvolvimento e, também, sobre o metabolismo celular dos insetos (CORREA; SALGADO, 2011). Outra vantagem é que, os inseticidas de origem vegetal possuem ação e degradação rápidas, toxicidade moderada ou baixa para mamíferos, maior seletividade e podem ser utilizados como compostos sinérgicos à ação de inseticidas já utilizados (ALMEIDA FILHO *et al.*, 2017).

Muitos extratos vegetais de plantas e óleos essenciais têm sido estudados e apresentam potenciais larvicidas eficazes o que permite a utilização desses compostos no combate de vetores e, conseqüentemente, de diversas doenças de cunho vetorial (PONTUAL *et al.*, 2012). Souza e colaboradores (2012), por exemplo, isolaram o composto ativo m-pentadecadienil-fenol de sementes da espécie vegetal *Myracrodruon urundeuva* e demonstraram que, este composto apresentou potente atividade larvicida e pupicida e grande atividade inibitória da incubação de ovos do mosquito vetor *Ae. aegypti*. Do mesmo modo, Tabosa e colaboradores (2020) encontraram resultados positivos em relação à inibição do desenvolvimento do mosquito da dengue, quando este foi exposto ao inibidor de tripsina de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI). Consta ainda na literatura, outro exemplo notável de fitoinseticida, que pode ser utilizado para o controle do mosquito vetor da Dengue, Zika e chikungunya, o *Ae. aegypti*, este é o inibidor de proteases derivado da espécie vegetal de *Leucaena leucocephala* (LTI) (ALMEIDA FILHO *et al.*, 2017).

1.2.1.1. Inibidor de tripsina de L. leucocephala (LTI)

L. leucocephala é uma árvore leguminosa exótica, amplamente distribuída na vegetação brasileira, cujas sementes têm alto teor de proteína, das quais podem ser obtidas frações contendo inibidores de proteases (ALMEIDA FILHO *et al.*, 2017). A purificação e

caracterização de um inibidor de tripsina obtido das sementes desta espécie foram relatadas entre a década de 90 e os anos 2000, por Souza-Pinto e colaboradores (1996) e Oliva e colaboradores (2000). Os autores descreveram este inibidor como sendo dimérico, do tipo Kunitz, com duas subunidades diferentes com massas de 5 e 15 kDa ligadas por pontes dissulfeto, perfil que corresponde ao inibidor de tripsina de *L. leucocephala* (LTI) purificado anos depois, de forma independente, por Almeida Filho e colaboradores (2017). Resultados encontrados em estudos prévios, demonstraram que o LTI apresenta potente inibição da atividade proteolítica da tripsina bovina (superior a 90%). O LTI ainda apresentou termoestabilidade de sua atividade inibitória de tripsina até 80 °C e, mesmo em temperaturas entre 90 e 100°C, apresentou atividade entre 20 e 50%. Além disso, a atividade inibitória de tripsina deste inibidor é mantida em uma ampla variação de valores de pH (3,0 – 12,0), tanto em temperatura ambiente quanto em 70 °C, durante 10 min (NANDEESHA; THEERTHA, 2001; ALMEIDA FILHO *et al.*, 2017).

No que concerne à atividade contra insetos vetores de doenças, esse inibidor na concentração de 0,3 mg/mL, foi capaz de atuar na inibição da eclosão dos ovos de *Ae. Aegypti* em 50%. Além disso, o LTI foi capaz de inibir *in vitro* a atividade enzimática (proteolítica) do intestino médio (70%), e quando as larvas foram incubadas com solução de LTI observou-se uma inibição de 56%, de forma que o desenvolvimento foi comprometido em cerca de 25% e houve uma elevada taxa de mortalidade (86%) (ALMEIDA FILHO *et al.*, 2017). Dessa forma, o LTI tem sido considerado um inseticida promissor contra *Ae. aegypti*.

1.2.2. Bioinseticidas de proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*

Além dos fitoinseticidas, uma alternativa que tem sido utilizada para a substituição de inseticidas de origem sintética, é a bactéria gram-positiva *B. thuringiensis* (*Bt*). O *Bt*, durante a esporulação, produz cristais proteicos, conhecidos como delta-endotoxinas ou proteínas Cry. As proteínas Cry possuem atividade inseticida específica contra larvas de insetos de diversas ordens, incluindo a díptera, da qual faz parte o *Ae. aegypti* (PANG *et al.*, 1992; SCHNEPF *et al.*, 1998; TABOSA *et al.*, 2020), sendo, portanto, um agente para o controle biológico de insetos com elevada especificidade e com toxicidade baixa ou ausente em mamíferos (LACEY, 2007).

Quando ingeridos pelos insetos, os cristais proteicos são solubilizados como protoxinas no intestino devido ao pH alcalino desse órgão. Em seguida, essas protoxinas liberadas são ativadas por proteases serínicas encontradas no intestino médio. As toxinas ativas se ligam a receptores de membrana das células intestinais formando poros, causando, assim, uma desregulação osmótica e consequente morte do inseto (TABOSA, 2020; BRAVO *et al.*,

2011; MARCOMBE *et al.*, 2018). Aliado a isso, estudos prévios mostraram que o efeito tóxico das proteínas Cry pode ser potencializado por outras classes de moléculas com atividade inseticida, como inibidores de proteases, melhorando, desta forma, sua eficácia (PARDO-LÓPEZ *et al.*, 2009).

A razão para a potencialização da atividade das proteínas Cry por inibidores de proteases pode ser explicada pela exposição do inseto a pequenas quantidades do inibidor, o que promove uma alteração do seu perfil de enzimas proteolíticas e favorece a ativação das protoxinas Cry produzidas pelo *Bt*. Portanto, a toxicidade dessas delta-endotoxinas pode ser aumentada em até 20 vezes quando associadas a um inibidor de proteases (BROADWAY, 1997; PARDO-LÓPEZ *et al.*, 2009; MA *et al.*, 2013; TABOSA *et al.*, 2020).

Assim, aliando as propriedades inseticidas de inibidores de proteases e de protoxinas da bactéria *B. thuringiensis*, esses compostos podem ser ótimos candidatos para o desenvolvimento de bioprodutos inseticidas.

1.3. Bioprodutos com ação inseticida

Diante do cenário atual, se faz necessário combinar os conhecimentos e tecnologias existentes, desenvolvendo produtos e tecnologias de forma sinérgica e concomitante (MORRETO; RABINOVITCH, 2016), para reduzir a disseminação das doenças emergentes como dengue, Chikungunya e Zika que tem como vetor o mosquito *Ae. aegypti*.

Os resultados positivos de estudos sobre inseticidas não sintéticos, como o inibidor de protease LTI e o *Bt*, como um produto alternativo adequado para o combate de doenças emergentes transmitidas por vetores aumentam o interesse em investigar esses compostos (SENTHIL-NATHAN, 2020). A partir disso, alguns bioprodutos têm sido desenvolvidos por vários grupos de pesquisa, como velas e loções à base de nanocápsulas contendo óleos essenciais e formulações à base de inibidores de proteases com toxinas Cry, todos com atividade inseticida contra mosquitos vetores (CRAVEIRO *et al.*, 2006; TABOSA *et al.*, 2020).

Dessa maneira, o desenvolvimento de bioprodutos para auxiliar no combate dos vetores, seja de modo direto ou como um agente sinérgico a inseticidas já utilizados é de suma importância, uma vez que a magnitude dos problemas ocasionados pelas doenças emergentes é muito representativa. Para isso é essencial que seja atestada a segurança de uso dessas formulações, bem como, o potencial risco de contaminação em um cenário ambiental.

1.4. Segurança de uso de bioprodutos com ação de inseticida

Para o desenvolvimento tecnológico de um bioproduto, a descoberta a partir da

bioprospecção de uma substância com potencial aplicação é apenas uma das etapas de um complexo e dispendioso caminho até que esse bioproduto atinja o mercado (ASTOLFI FILHO *et al.*, 2015). Atestar a segurança de uso de bioprodutos, através da avaliação de riscos, é um requisito essencial para atender aos critérios estabelecidos nos atos normativos dos órgãos federais para o registro de formulações (NDOLO *et al.*, 2019).

Embora a ecotoxicidade dos bioinseticidas seja comparativamente menor que a dos pesticidas sintéticos, é importante avaliar os riscos que estes possam ter (SANGANYADO *et al.*, 2015). Em relação aos bioinseticidas, a orientação da OCDE é que estes só devem ser autorizados se apresentarem risco mínimo ou zero (CHANDLER *et al.*, 2011). Desse modo, são necessários diversos ensaios que comprovem que determinada substância atende os requisitos básicos de eficácia e segurança humana e ambiental (ANVISA, 2019).

Para avaliação da segurança humana e ambiental, são necessários testes de toxicidade aguda e, se necessário, a longo prazo. Em relação a segurança humana, é ainda importante a realização de testes de toxicidade via oral, de toxicidade decorrente da exposição de pele e olhos, de irritação e de alergenicidade (BURGES *et al.*, 1982; WHO; FAO, 2017; GOVERNMENT OF INDIA, 2017). Alguns exemplos incluem o teste de toxicidade aguda inalatória e avaliação de citotoxicidade em queratinócitos (MORAES, 2015; GOVERNMENT OF INDIA, 2017). Em relação a segurança ambiental, é fundamental a realização de teste de toxicidade a organismos não-alvo, incluindo os que estão em ambiente aquático.

Por exemplo, para o desenvolvimento de formulações bioinseticidas com atividade larvicida, como é o caso de formulações de proteína Cry com o inibidor de proteases de *L. leucocephala*, é imperativo investigar os possíveis efeitos tóxicos que se manifestarão em diferentes níveis de organização do ambiente aquático, desde estruturas celulares mais simples até indivíduos, populações e comunidades do ambiente aquático (COSTA *et al.*, 2008). Uma vez que essas formulações são utilizadas para o controle de mosquitos no estágio larval e suas aplicações se dão diretamente nos criadouros aquáticos (FERREIRA *et al.*, 2015; DUGUMA *et al.*, 2017), a deposição no ambiente aquático pode ocasionar modificações em processos como reprodução, migração e mortalidade das populações de organismos não-alvo, alterações na respiração e no fluxo de nutrientes (CONNELL, *et al.*, 1984; COSTA *et al.*, 2008).

Esse fato, corrobora com a importância da realização de testes de toxicidade de substâncias em ambientes aquáticos, principalmente os que se utilizam de peixes como modelo. Os peixes são bons bioindicadores para avaliar a poluição da água. A saúde do peixe desempenha um papel importante na proteção e avaliação da biota aquática (ISHI & PATIL, 2017). Para tal, o teste de toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra (*D. rerio*) pode ser um bom exemplo

(OECD, 2013).

1.5. Peixe-zebra na avaliação de segurança de bioprodutos inseticidas

O peixe-zebra (*Danio rerio*), também chamado de zebrafish ou paulistinha, é um pequeno teleósteo da família Cyprinidae, originário da Índia e caracterizado por um padrão distinto de cores alternando linhas claras e escuras (Figura 1) (PARICHY, 2015).

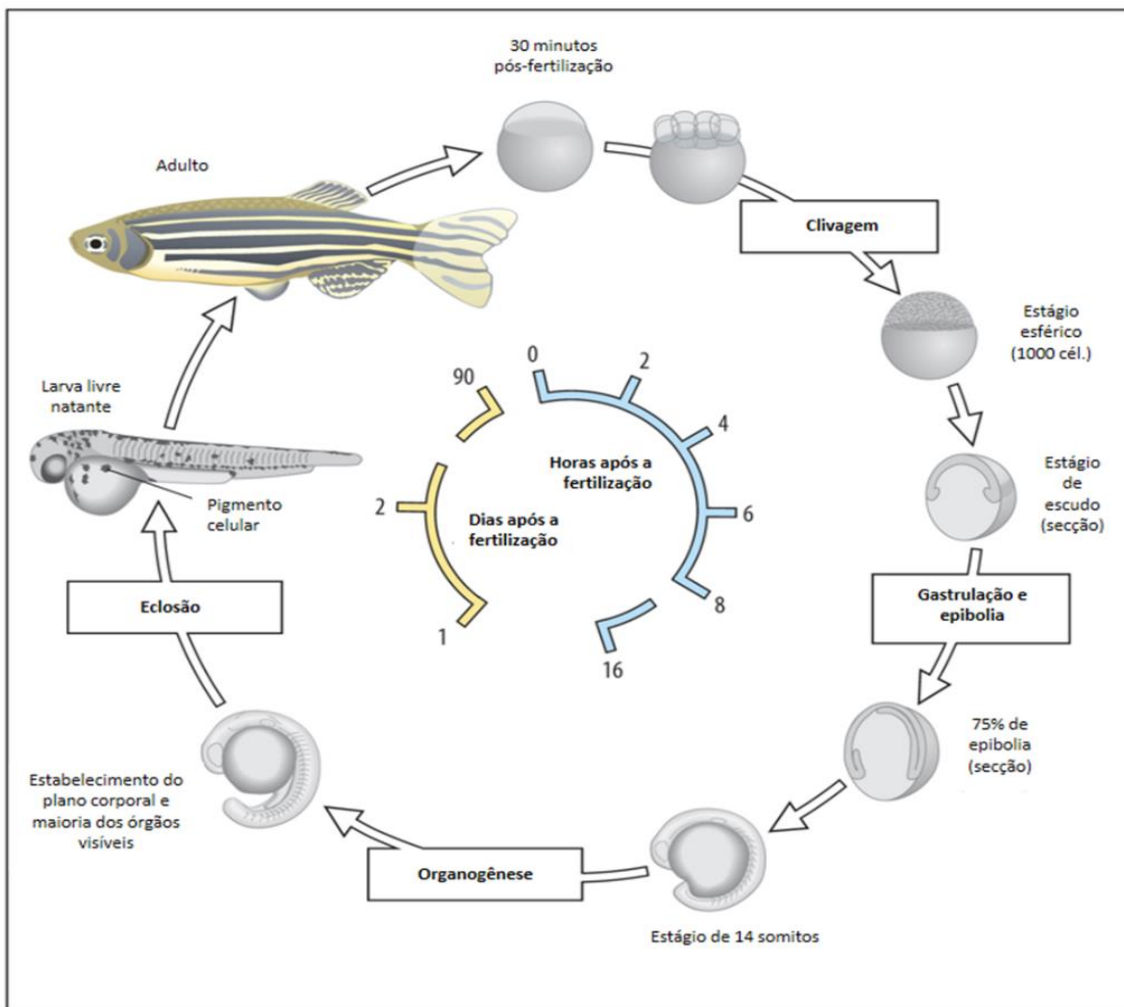
Figura 1- Peixe-zebra (*Danio rerio*) de ambos os sexos em sua fase adulta



Fonte: Adaptado de Rechi (2015)

É um peixe de água doce, de pequeno porte (3 a 4 cm) que apresenta alta taxa de fecundidade e maturação rápida (entre 48 e 72 horas evolui do estágio embrionário para o estágio larval e se torna adulto aos 3 meses de vida) (Figura 2). Além disso, possui desenvolvimento externo e aparência translúcida em estágios iniciais que facilitam a análise morfológica. Inclusos a essas características ainda citam-se: manutenção e criação com custos consideravelmente baixos, genoma completamente sequenciado e atualizado que permite manipulação genética e geração de indivíduos sensíveis às condições testadas e grande quantidade de ortólogos (SCHOLZ *et al.*, 2008; TAVARES; LOPES, 2013; HOWE *et al.*, 2013; BAMBINO *et al.*, 2017; MEYERS, 2018).

Figura 2 - Ciclo de desenvolvimento do peixe-zebra (*D. rerio*)



Fonte: Adaptado de D'Costa e Shepherd (2009).

Dado os atributos inerentes à biologia do desenvolvimento, o peixe-zebra tem se tornado um organismo importante nos últimos 30 anos, para diversos tipos de estudos, incluindo os de toxicidade, genéticos, farmacológicos e de desenvolvimento (PHAM *et al.*, 2016). Também, na parte ambiental, está sendo utilizado tanto para detectar a presença de agentes tóxicos, quanto para identificar como as exposições ambientais a esses agentes afetam a saúde humana e podem provocar doenças (BAMBINO;CHU, 2017). Além disso, tem sido ainda utilizado no desenvolvimento e melhoria de testes de avaliação de risco ambiental (SCHOLZ *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2020).

Os peixes e outros animais aquáticos de forma geral podem ser expostos às substâncias tóxicas de três formas diferentes: absorção direta por exposição dérmica, absorção pelas brânquias durante a respiração e absorção por via oral durante a alimentação ou ingestão

da água contaminada (HELFRICH, 2009; ADEDEJI; OKOCHA.,2012). Dessa forma, vários testes podem ser aplicados no peixe-zebra para avaliar os efeitos das substâncias em ambiente aquático.

O teste de toxicidade aguda em embrião de peixe-zebra (FET), nº 236, foi projetado em 2013 pela OECD (do inglês *Organisation for Economic Co-operation and Development*), com o intuito de estimar efeitos da exposição a determinados compostos químicos sobre o desenvolvimento inicial do peixe. Este teste tem sido cada vez mais utilizado para fins regulamentares e de pesquisa, uma vez que é adequado para uma ampla variedade de substâncias, exceto para compostos com massa molecular maior que 3 kDa e aqueles com toxicidade específica para estágios de vida juvenil e adulta (JUDSON *et al.*,2010; VIEIRA *et al.*, 2019).

Através do teste FET, os efeitos tóxicos decorrentes da exposição às formulações inseticidas podem ser avaliados no peixe-zebra através da observação de vários *endpoints* (efeitos adversos), sejam eles letais ou subletais (HILL *et al.*, 2005). Alguns dos *endpoints* que podem ser observados, encerram-se em: coagulação do ovo, atrasos na eclosão, alterações morfológicas na boca, no tamanho da cabeça e da cauda, no desprendimento da cauda, malformação de órgãos como o coração, deformação na coluna vertebral, edemas, alteração da pigmentação do corpo, não desenvolvimento dos somitos, dentre outros (OECD, 2013).

Sabendo que os contaminantes, através da absorção por via oral, podem atuar sobre a digestão e serem responsáveis por alterações bioquímicas que levam a distúrbios metabólicos e inibição de enzimas digestivas importantes e ao comprometimento do desenvolvimento dos peixes, a captação desses deve ser estimada e estudada (NAVFAC, 2000; ADEDEJI; OKOCHA., 2012). Por exemplo, a alteração na atividade da amilase e de algumas proteases afetam diretamente o metabolismo de carboidratos e proteínas (MAHMOUD *et al.*, 2020). Dessa forma, a análise dos efeitos dos poluentes nas atividades das enzimas digestivas é útil para destacar o risco de alteração destas nas características bioquímicas e fisiologia dos peixes (MAHMOUD *et al.*, 2020).

A partir disso, é possível prever os efeitos tóxicos que determinado composto venha ter no peixe-zebra, e conseqüentemente em outros organismos, e ainda determinar as concentrações das substâncias que possam causar efeitos biológicos e, dessa forma, orientar os níveis admissíveis desses compostos para uso (CHOW;CHAN, 2014). Reforçando que, as respostas moleculares do peixe-zebra a produtos químicos têm alto grau de relevância, uma vez que os mecanismos de transdução de sinal, a anatomia e a fisiologia do *D. rerio* são homólogas às dos seres humanos (SIMONICH *et al.*,2012). Nesse âmbito, o peixe-zebra é um excelente modelo para estudos que visam compreender os mecanismos tóxicos de determinada substância

química, como biopesticidas, bem como, para descobrir os possíveis efeitos adversos de curto e longo prazo ocasionados por essas substâncias (SCHOLZ *et al.*, 2008).

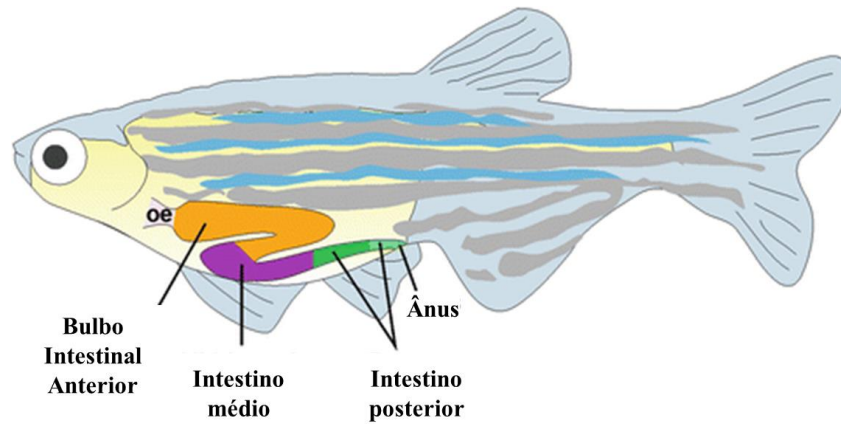
1.5.1. Peixe-zebra como modelo para estudos de substâncias que afetam o processo digestório

O peixe-zebra é onívoro e possui como hábito alimentar o consumo de larvas e insetos adultos. Além disso, pequenos crustáceos, algas, materiais vegetais e detritos diversos presentes em seu habitat podem servir como dieta para esta espécie (PARICHY, 2015).

Assim como ocorre em outros órgãos, o desenvolvimento, a organização e a fisiologia do trato gastrointestinal (TGI) do peixe-zebra apresentam muitas semelhanças com os humanos, dessa forma, comparações com o TGI dos mamíferos podem ser comuns. Apesar das semelhanças, há algumas diferenças funcionais e arquitetônicas importantes entre os sistemas GI de peixes-zebra e mamíferos, como por exemplo, o trato GI dos mamíferos é composto geralmente de cinco partes distintas (estômago, duodeno, jejuno, íleo e cólon), enquanto, o intestino do peixe-zebra é composto por bulbo intestinal anterior, intestino médio e intestino posterior e ânus, não contendo um órgão como o estômago (FLORES *et al.*, 2020) (Figura 3). Desta maneira, o processo digestivo nesta espécie, está intimamente ligado às enzimas pancreáticas e intestinais, como as endoproteases tripsina e quimotripsina e exoproteases carboxipeptidase A e α -amilase, sendo a tripsina a enzima proteolítica alcalina mais comum, principalmente durante os estágios iniciais da vida do peixe (GUERRERA *et al.*, 2015).

A tripsina pertence à família das serinoproteases e é responsável por muitos processos biológicos, por exemplo, a própria digestão de proteínas, ativação do zimogênio e mediação entre a ingestão de alimentos e a assimilação de nutrientes (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012; CANDIOTTO *et al.*, 2018), sendo portanto um ótimo indicador de mecanismos de toxicidade que afetem o desenvolvimento e o estado nutricional dos peixes.

Figura 3 - Representação esquemática do intestino de peixe-zebra adulto, evidenciando seus três segmentos principais



Fonte: Adaptado de Lobert e colaboradores (2016).

Desta forma, a utilização do peixe-zebra como sistema modelo e a caracterização da atividade de suas enzimas digestórias, como a tripsina, permitem a compreensão de possíveis mecanismos tóxicos provenientes da exposição de diversas substâncias (*ex.* LTI) que possam afetar de forma direta ou indireta este sistema.

2. HIPÓTESES

- O inibidor de protease de *L. leucocephala* e uma mistura de protoxinas de *B. thuringiensis*, de forma isolada e combinada, não causam efeitos tóxicos agudos ou alteração de marcadores de toxicidade em embriões e larvas de peixe-zebra, em virtude de suas elevadas especificidades contra os organismos alvo, neste caso larvas de *Ae. aegypti*.

- O extrato intestinal rico em proteínas com atividade proteolítica do tipo tripsina obtido de adultos de peixe-zebra não sofrem inibição significativa após exposição ao inibidor de tripsina de *L. leucocephala* ou de sua mistura com protoxinas de *B. thuringiensis*, em decorrência das baixas concentrações testadas (i.e. concentrações que se aproximam de um cenário realístico de uso dessas moléculas) e também por conta de condições bioquímicas ideais tais como pH e osmolaridade que são muito distintas entre o LTI e as serino-proteases de peixe-zebra.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de proteínas larvicidas contra *Ae. aegypti*, o inibidor de tripsina de sementes de *L. leucocephala* e uma mistura de protoxinas de *B. thuringiensis*, sobre o organismo modelo peixe-zebra (*D. rerio*) no que concerne à avaliação de toxicidade aos seus estágios iniciais de vida e à presença de efeitos inibitórios do LTI sobre proteases intestinais deste animal.

3.2. Objetivos Específicos

- Obter e caracterizar parcialmente o LTI e as protoxinas de *Bt*;
- Avaliar a estabilidade estrutural e biológica das proteínas larvicidas às condições do teste de toxicidade aguda com embriões de peixe-zebra;
- Avaliar os efeitos tóxicos agudos das proteínas larvicidas, de forma isolada e combinada, em embriões e larvas de peixe-zebra;
- Avaliar *in silico* a interação entre o LTI e a tripsina de peixe-zebra;
- Obter o extrato intestinal do peixe-zebra adulto de ambos os sexos rico em atividade do tipo tripsina;
- Avaliar a atividade inibitória de tripsina do LTI, isolado e combinado às proteínas *Bt*, contra o extrato proteico rico em atividade do tipo tripsina de peixe-zebra.

4. MANUSCRITO

O manuscrito a seguir foi escrito em Inglês e submetido à revista *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* classificada com Qualis A2 de acordo com a CAPES (2021) e fator de impacto 3,228 (Journal Citation Reports 2021), seguindo as exigências de formatação deste periódico.

Title: An innovative insecticidal approach based on plant protease inhibitor and *Bt* protoxins can disrupt fish digestion

An innovative insecticidal approach based on plant protease inhibitor and *Bt* protoxins can disrupt fish digestion

Íris Flávia Sousa Gonçalves^{a,b}, Cleyton de Sousa Gomes^b, Luiz Carlos Pereira Almeida Filho^c, Juliana Alves da Costa Ribeiro Souza^b, Bruno Anderson Matias Rocha^a, Pedro Filho Noronha de Souza^a, Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior^b, Ana Fontenele Urano Carvalho^{a,c}, Davi Farias^{a,b*}

^aPost-Graduation Program in Biochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Building 907, Campus Pici, Federal University of Ceara, 60455-970, Fortaleza, Brazil

^bDepartment of Molecular Biology, Federal University of Paraiba, 58051-900, João Pessoa, Brazil

^cDepartment of Biology, Building 909, Campus Pici, Federal University of Ceara, 60455-970, Fortaleza, Brazil

*Corresponding author:

Professor Davi F. Farias, Ph.D.

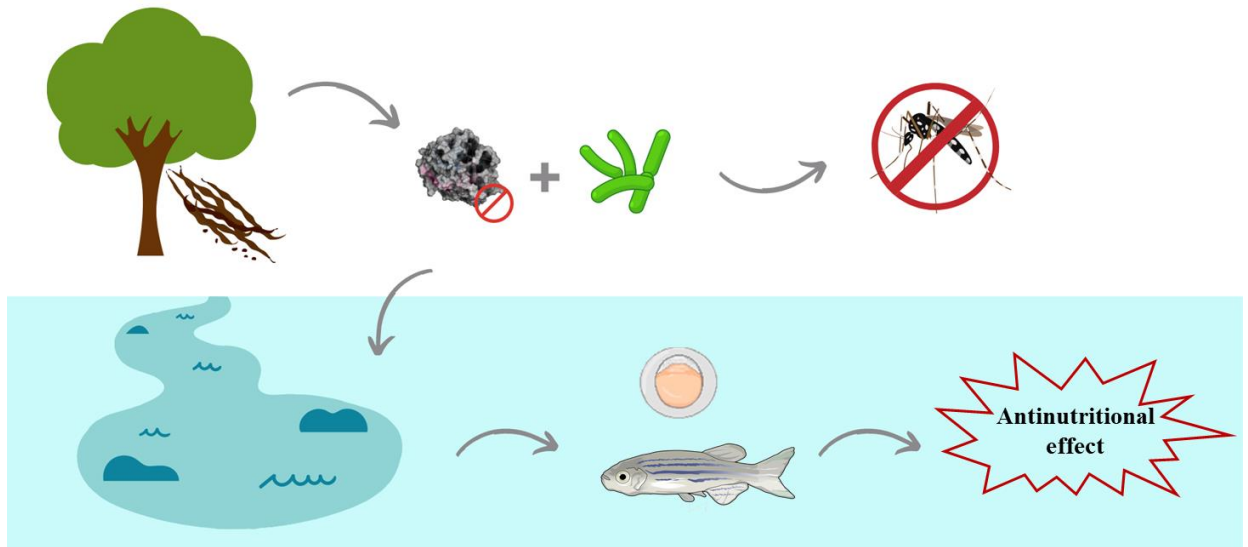
E-mail: davi@dbm.ufpb.br

Phone: +55-83-32167633

ORCID: 0000-0001-5438-1919

Highlights

- LTI and *Bt* proteins showed no acute toxicity in zebrafish embryos;
- The *in silico* interaction of zebrafish trypsin and LTI showed hydrophobic interactions;
- The specific trypsin activities of male and female zebrafish were distinct;
- LTI and its mixture with *Bt* proteins can inhibit zebrafish trypsin-like activity.

Graphical Abstract

Abstract

The *Leucaena leucocephala* trypsin inhibitor (LTI) + *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) protoxins mix has been proposed as a novel larvicide agent in order to control the vector mosquito of dengue virus, *Aedes aegypti*, in their aquatic breeding sites. However, use of this insecticide formulation has raised concerns about its impacts on aquatic biota. In this context, this work aimed to assess the effects of LTI and *Bt* protoxins, separately or in combination, in zebrafish, in regard to the evaluation of toxicity at early life stages and to the presence of LTI inhibitory effects on intestinal proteases of this fish. Results showed that LTI and *Bt* concentrations (250 mg/L, and 0.13 mg/L, respectively), and LTI + *Bt* mix (250 mg/L + 0.13 mg/L) - 10 times superior to those with insecticide action – did not cause death nor did it induce morphological changes during embryonic and larval development (3 to 144 hours post-fertilization) of zebrafish. Molecular docking analyses highlighted a possible interaction between LTI and zebrafish trypsin, especially through hydrophobic interactions. In concentrations near to those with larvicidal action, LTI (0.1 mg/mL) was able to inhibit *in vitro* intestinal extracts of trypsin in female and male fish by 83% and 85%, respectively, while LTI + *Bt* mix promoted trypsin inhibition of 69% in female fish and 65% in male ones. These data show that the larvicidal mix can potentially promote deleterious effects to nutrition and survival in non-target aquatic organisms, especially those with trypsin-like dependent protein digestion.

Keywords: trypsin inhibitor; *Leucaena leucocephala*; *Bt* toxins; biological insecticide; zebrafish.

1. Introduction

In recent years, urban insects, vectors of the main human diseases, such as malaria, filariasis, yellow fever, dengue, Chikungunya and Zika, have proven to be a serious world threat in terms of public health and a significant economic burden (Nyka *et al.*, 2013; Silva Jr. *et al.*, 2018). Among the main insects that are vectors of diseases, there are the *Aedes* genus mosquitoes, especially *Ae. aegypti*. This bug is found widely distributed around the world and has been responsible for the severe dengue, Zika and Chikungunya epidemics (WHO, 2017). It is estimated that dengue, the most predominant mosquito-borne disease, causes around 390 millions of infections every year, of which 96 millions evolve to the severe form of the disease (WHO, 2021).

In this respect, some strategies have been adopted in order to reduce these diseases. The main one is still *Ae. aegypti* mosquito control. This control can be performed through several means, which can be: physical (e.g. mosquito traps), biological (controlled release of predators), genetic (transgenic mosquitoes), environmental (reduction of artificial breeding sites and environmental education) and chemical (natural or synthetic chemicals), being this last one the most used control form (Araújo *et al.*, 2015; Baldacchino *et al.*, 2015).

However, various questions have arisen about the environmental impacts of synthetic insecticides. It is known that use of large quantities as well as indiscriminate and careless use of these insecticides have created a series of problems for many years (Gonçalves *et al.*, 2020). Thus, there are many activities of researchers on development of drugs, vaccines and new compounds, more economic and safer, with higher efficacy and duration of activity, and that are environmentally friendly (Alonso and Tanner, 2013; Ansari *et al.*, 2013).

Therefore, research about bioinsecticides, especially plant-based ones, which are more biodegradable, has grown, in order to minimize the impact on the environment and, similarly to synthetic insecticides, promote mosquito larvae mortality and prevent appearance of resistant lines (Karunamoorthi and Sabesan, 2013). An example of a potential phytoinsecticide that has been proposed for *Ae. aegypti* control is the protease inhibitor derived from the plant species *Leucaena leucocephala*, common in most of tropical areas around the world (Almeida Filho *et al.*, 2017). Results showed that the protease inhibitor from *L. leucocephala* seeds (LTI) was able to act on inhibition of *Ae. aegypti* egg hatching and inhibition of proteolytic activity present in larvae midgut by 56%, compromising development and causing high mortality rate of bugs (Almeida Filho *et al.*, 2017).

Similarly, Cry proteins obtained from gram-positive *Bacillus thuringiensis* bacteria (*Bt*) possess specific insecticidal activity against *Ae. aegypti* larvae (Pang *et al.*, 1992; Schnepf *et al.*, 1998; Tabosa *et al.*, 2020). Once ingested by bugs, *Bt* protein crystals are solubilized as protoxins in the alkaline intestine pH. Then, these released protoxins are activated by serine proteases found in larvae midgut. Active toxins bind to midgut cell membranes making pores, which leads to an osmotic disruption and subsequent bug death (Bravo *et al.*, 2011; Marcombe *et al.*, 2018 Tabosa *et al.*, 2020).

Studies also showed that the effect of cry proteins can be enhanced and have higher efficacy when associated with other compounds with insecticide action, such as protease inhibitors (Pardo-López *et al.*, 2009). The reason for Cry protein activity potentiation by protease inhibitors can be explained by exposure of bugs to small quantities of the protease inhibitors, which promotes a change in its proteolytic enzymes profile and favors activation of -produced Cry proteins, which can increase toxicity of these protoxins up to 20 times (Broadway, 1997; Pardo-López *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2013; Tabosa *et al.*, 2020). Thus, combining insecticide properties of protease inhibitors and *Bt* protoxins has been suggested as an innovative and promising approach for the development of insecticide bioproducts, with an emphasis on larvicides against *Ae. aegypti*.

Although bioinsecticides toxicity is comparatively lower than synthetic pesticides, it is still necessary the compliance of some requirements of regulatory agencies and of the consumer market during the development of these products. Therefore, several clinical trials which prove these substances meet basic requirements of efficacy and human and environmental safety are needed (ANVISA, 2019). In the case of development of insecticide formulations to be applied directly in sites with water buildup and the presence of *Ae. Ae. aegypti* larvae (Duguma *et al.*, 2017), a few stages must be fulfilled, such as attesting to the safe use through assessment of toxic effects to non-target organisms, and evaluate aquatic environment contamination risk (Ndolo *et al.*, 2019). In this aspect, fishes are good experimental models, once fish health plays an important role in aquatic biota protection and evaluation (Ishi & Patil, 2017).

Zebrafish (*Danio rerio*) has proven to be a decent model system for assessment of the effects of xenobiotics on aquatic vertebrates (Gonçalves *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2021), considering different routes of exposure (e.g. dermal exposure, intake by gills and oral absorption) of fishes to these substances (Helfrich, 2009; Adedeji e Okocha., 2012). Moreover, effects resulting from insecticide formulations might be evaluated in zebrafish by means of observation of several lethal or sublethal endpoints (Hill *et al.*, 2005), which can involve all life stages of this fish (Gonçalves *et al.*, 2020).

For instance, direct exposure of early stages (embryos and larvae) of zebrafish development to aquatic contaminants has been applied as the gold standard for tracking the presence and the effects of these substances in vertebrates (Vieira *et al.*, 2020). Hence, adverse effects that include development toxicity, teratogenicity, cardiotoxicity, among others (Von Hellfeld *et al.*, 2020), are able to be monitored via morphological changes that comprises, for example, egg coagulation, hatching delays, morphological alterations in mouth and head and tail sizes, non-detachment of tail, malformation of organs (e.g. heart), spine deformity, edemas, alteration of body pigmentation and non-development of somites (OECD, 2013; von Hellfeld *et al.*, 2020).

Another relevant exposure route to contaminants in the aquatic environment is via oral ingestion. Contaminants can act on digestion and be responsible for biochemical changes that lead to metabolic disorders, inhibition of important digestive enzymes and development impairment; therefore, their sequestration must be estimated and studied (Navfac, 2000) as means to identify this toxic effect of substances (Adedeji e Okocha., 2012). Therefore, analysis of the effects of contaminants on digestive enzymes activities is useful to highlight risk of alteration of these compounds on fish biochemical properties (Hossam Mahmoud *et al.*, 2020).

Given the above, this study aimed to assess the effects of larvicidal proteins against *Ae. aegypti*, the trypsin inhibitor from *L. leucocephala* seeds and *B. thuringiensis* protoxins, in zebrafish with regards to evaluation of toxicity to early stages of life and the presence of LTI inhibitory effects on intestinal proteases to contribute to evaluation of safe use of these compounds in aquatic environments.

2. Materials and methods

2.1. Chemical reagents

Bovine serum albumin (BSA), bovine trypsin, acrylamide, coomassie brilliant blue R-250, sodium dodecyl sulfate (SDS), TEMED (N' , N' , N' , N' - tetramethylethylenediamine), trizma-base, N,N' -Methylenebisacrylamide, 2-mercaptoethanol and the synthetic substrate BApNA (N - α -benzoyl-DL-arginine- p -nitroanilide) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Low molecular weight calibration kit for electrophoresis was acquired from GE Healthcare Life Sciences (GE®) (Pittsburgh, PA). Calcium chloride ($CaCl_2$), magnesium sulfate ($MgSO_4$), sodium bicarbonate ($NaHCO_3$), potassium chloride (KCl), azocasein, trichloroacetic acid (TCA), sodium hydroxide (NaOH) e other reagents used were all of recognized analytical grade.

2.2. Zebrafish embryos and adults

D. rerio embryos and adults from wild-type AB strain were provided by Production Unit of Unconventional Model Organisms (UniPOM), located in the Department of Molecular Biology of Federal University of Paraíba (João Pessoa, Brazil). Adult animals were kept in tanks, in a water recirculation system with physical, chemical and biological filtering, with controlled temperature of 26 ± 1 °C and 14:10h light/dark photoperiod, being each water parameter (temperature, pH, ammonia levels and nitrite) regularly monitored. Animals were fed three times a day *ad libitum*, being twice with granular fish food (ColorBits, Tetra, Germany) and once with organic spirulina (Fazenda Tamanduá, Patos, Brasil).

On the day prior to the test with embryos, adult fish were transferred to a 7 L mating device (1 female : 2 male ratio), which consisted of an acrylic tank coupled to an aerator, whose bottom is covered with a nylon net and an opening valve that allows quick and efficient collection of embryos. After spawning, embryos with one hour post fertilization (hpf) were taken out, washed and put up in an adapted E3 zebrafish embryo medium (NaCl 5.0 mM, KCl 0.17 mM, CaCl 0.33 mM and MgSO₄ 0.33 mM) and analyzed using an inverted microscope (Televal 31, Zeiss, Germany) for determining embryo development stage and selection of viable embryos. Embryos considered non-viable and remaining from the test were euthanized with eugenol (1.5 mL/L) and subsequently stored at -20 °C until were sent to incineration.

Four adult females and four adult males, all with 11-months old, were transferred for dissection and acquisition of intestines as described above. All procedures with zebrafish were approved by the Ethics Committee on Animal Use of Federal University of Paraíba (CEUA-UFPB), João Pessoa, Brazil, with certificate n° 2490250321.

2.3. Obtainment and partial biochemical characterization of LTI and *Bt* protoxins

2.3.1. LTI

Obtention of *L. leucocephala* trypsin inhibitor was executed following the methodology described by Almeida Filho *et al.* (2017). Briefly, proteins from seed flour were extracted in a 0.05M Tris-HCl pH 7.5 (1:10 w/v) buffer under constant agitation for 3 h at room temperature. Crude extract was centrifuged at $15.000 \times g$, during 15 min, a 20% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) solution was added so that extract final concentration was of 3%. Solution was centrifuged at the above-mentioned conditions, and supernatant was collected and dialyzed against distilled water for 48 h before lyophilization. The obtained fraction was solubilized in a Tris-HCl 0.05M, pH 7.5 buffer and submitted to affinity chromatography, in a column with

an anhydrous 4B sepharose matrix (4×1.5 cm) activated by cyanogen bromide (CNBr) from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA), equilibrated with the same buffer. Adsorbed proteins were eluted with a HCl 0.05 M solution. Fractions that displayed the highest absorbance values (called LTI) were combined, dialyzed against distilled water and then lyophilized.

Identity of the LTI sample obtained was confirmed through polyacrylamide (15% w/v) gel electrophoresis under denaturing conditions, in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS), also known as SDS-PAGE (Laemmli, 1970). In order to monitor electrophoresis run, molecular-weight size markers were employed, being them: phosphorylase b, 97 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa; trypsin inhibitor, 20.1 kDa; and α -lactalbumin, 14.4 kDa. Gel was stained with 0.02% (v/v) of Coomassie Brilliant Blue R-250 with 12% (v/v) of acetic acid.

2.3.2. *Bt* protoxins

B. thuringiensis protoxins, solubilized in distilled water, at the concentration of 22.3 mg/L, were provided by Prof. Dr. Ana Fontenele Urano Carvalho, from Federal University of Ceará (Fortaleza, Brazil). In short, toxins in inactive form were acquired from culture of *B. thuringiensis* var. *israelensis* strain in nutrient broth supplemented with 1% (w/v) glucose. Culture was incubated during 24h at 37 °C under constant agitation (150 rpm) for induction of sporulation. Next, media were centrifuged at 10,000 x g, for 10 min, in order to obtain granules containing spores and Cry protein crystals. These granules were re-suspended in 20 mL of phosphate 0.1 M, pH 8 buffer supplemented with 0.5 M NaCl and 0.001 M EDTA, sonicated for 5 min and later centrifuged at 10,000 x g, for 5 min. Obtained supernatant was dialyzed against distilled water and stored in a freezer at -20 °C according to protocol described by Tabosa *et al.* (2020).

2.4. Stability of larvicidal proteins to zebrafish embryotoxicity test conditions

Stability tests were performed prior to exposure of zebrafish embryos to test substances, in order to observe possible variations of concentration, either by medium degradation due to physicochemical conditions (UV light incidence, temperature) and/or via microorganism absorption (Hoyber *et al.*, 2020). For this, LTI and *Bt* protoxins, individually, were dissolved in E3 medium, both at 1 mg/mL. It was made a control group with BSA dissolved in E3 medium at the same concentration. Incubation of protein solutions was done statically (without solution renewal) for a period of 6 days, adding 0.2 mL of E3 medium containing LTI, *Bt* proteins or BSA to a 96-well microplate with the presence or not of embryos, being in total 12

wells/sample. Plates were kept in the environment where assays with zebrafish at constant temperature ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) e humidity (70%) and 14:10h photoperiod. Three 0.2 mL aliquots of each sample were collected every 24h on days 0, 2, 4 and 6 of the experiment, and then they were mixed by sample group and frozen at -20°C . Afterwards, samples were defrosted for electrophoresis profile determination (SDS-PAGE) according to previously described, soluble protein measurements and LTI trypsin-inhibitory activity.

2.4.1. Soluble proteins measurement

Soluble proteins quantification of samples resulting from the stability assay was executed following the method described by Stoscheck (1990). This method was adapted for 96-well microplate utilization in a microplate reader (Thermo Scientific Multiskan Spectrum, USA), using 220 nm wavelength and in triplicates for a same sample.

2.4.2. LTI trypsin-inhibitory activity

LTI trypsin-inhibitory activity was determined using the assay proposed by Erlanger (1961), slightly modified. At first it was prepared a trypsin (0.5 mg/mL) solution, using 1 mM HCl, and a 20% (w/v) azocasein solution with Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 buffer, for the construction of an enzyme curve with different enzyme volumes in order to establish the most adequate volume to be employed in the inhibitory activity evaluation. Trypsin enzyme was incubated with a Tris-HCl 50 mM with 20 mM CaCl_2 , pH 7.5 buffer at constant temperature (37°C). 100 μL of LTI at 1 mg/mL from stability tests with and without embryos were added to samples and to the blank samples, followed by a 15 min incubation. At the end of this period it was added to standard and test groups the substrate 2% (w/v) azocasein. Again it was performed an incubation for 15 min, and at the end of this time 20% (w/v) TCA was added so that the reaction was stopped. After that, 20% (w/v) azocasein was added to the blank replicates and LTI-promoted inhibitory activity was followed spectrophotometrically at 440 nm wavelength. Inhibitory activity calculation was performed using the following formula:

$$\text{Inhibitory activity (\%)} = (\text{Abs}_{\text{test}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) \times 100 / \text{standard Abs.}$$

Assays were performed in triplicates for each test sample.

2.5. Acute toxicity test in zebrafish embryos

Acute toxicity of LTI, *Bt* protoxins and their mixture in zebrafish embryos was done according to OECD guide n° 236 (2013), with a few modifications. LTI, *Bt* protoxins and the combination LTI + *Bt* protoxins were tested at the following concentrations, respectively: 250 mg/L (LTI); 0.13 mg/L (*Bt*) and 250 mg/L+ 0,13 mg/L (LTI + *Bt*). The reason behind the selection of these concentrations is that they are 10 times superior to those which showed the best larvicide activity against *Ae. aegypti* (data not published).

Twenty-four embryos with approximately 3 hpf were individually distributed in a 96-well microtitration plate, being 20 of them exposed to the test samples and other 4 kept only in E3 medium (internal control group). A plate with 20 embryos exposed only to E3 medium was also prepared. Embryos were monitored daily until a period of 144 hpf (6 days) with the aid of an inverted microscope (Televal 31, Zeiss, Germany), using a magnification of 50x. In the embryo, the following lethality endpoints were verified: egg coagulation, absence of somite formation; non-detachment of tail, and absence of heartbeat. Besides these, sublethal effects were also observed, which included: malformation of body spine, eyes, otoliths and mouth; body size reduction, alteration in body pigmentation, delay in egg hatching; edema in yolk sac, pericardium and head, and blood clotting alteration. Number of dead embryos and larvae was used to calculate mortality rate according to the formula:

Mortality (%) = number of dead embryos/ (total number of embryos x 100).

This test was repeated three times in an independent manner for each treatment.

2.6. *In silico* interaction between LTI and zebrafish trypsin

2.6.1. Molecular modeling and docking

Molecules here studied still do not possess an elucidated structure, nor is it stored in databases (*e.g.* Protein Data Bank, PDB. <https://www.rcsb.org/>). In face of that, LTI and zebrafish trypsin molecular modelings were performed, using sequences deposited in the UniProtKB database (<https://www.uniprot.org/>) with access codes Q8AV83 (trypsin) and P83036 (LTI), besides base models which are represented by PDB codes 5PTP (1.34 Å resolution) for trypsin and 4J2K (1.75 Å resolution) for LTI. Selection of these models was executed from their resolutions in angstroms (Å), which should be the lowest ones possible, implying good quality of atomic resolution. For visualization and preparation of these molecules, it was used the PyMOL Molecular Graphics System, 2.0 version Schrödinger, LLC

(<https://pymol.org/2/>) and the SWISS-MODEL platform (<https://swissmodel.expasy.org/>) for modeling, with the “user template” entry form.

2.6.2. Molecular docking

Molecular docking was performed in the FRODOCK platform (<http://frodock.chaconlab.org/>), using generated models with the standard settings of the website. For a better visualization of interaction between aminoacids, the software LigPlot⁺ v.2.2 (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>) was employed. Moreover, as a positive control, cristallized structure of bovine trypsin complexed to zucchini (*Cucurbita pepo*) trypsin, with 2BTC PDB code, with 1,50 Å resolution (Helland *et al.*, 1999). Thus, it was done a comparison of interaction of generated models with the interaction of a cristallized structure with a good resolution.

2.7. Acquisition of zebrafish midgut protein extract with trypsin-like activity

Intestinal protein extract with trypsin-like activity was obtained from adult zebrafish intestines. After 24 h of fasting, adult fish (4 males and 4 females) were euthanized with eugenol (1.5 mL/L) and dissected for intestine and hepatopancreas removal, separated per animal in microtubes. Midgut tissue and accessory glands homogenates were macerated with a Tris-HCl 0.05M, pH 8.0 cold buffer. Resulting extract was centrifuged at 10.000 x g, for 10 min, at 4 °C. Next, supernatant was used for determination of soluble proteins and trypsin activity.

Quantification of soluble proteins was executed following the method described by Bradford (1976), using BSA for construction of a standard curve. This method was adapted for utilization in a 96-well microplate for subsequent use of a microplate reader (Thermo Scientific Multiskan Spectrum, USA). Reading were performed at a 595 nm wavelength and in quadruplicates for a same sample.

Trypsin-like activity from the obtained crude extract was measured according to the methodology described by Azevedo *et al.* (2018), slightly adapted. For that, 8 mM BApNA dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) was prepared. Protein extract was dilluted (1:10) with 0.05 M phosphate, pH 8.0 buffer and activity was evaluated in triplicates. Resulting product, *p*-nitroaniline, was quantified at 405 nm in a microplate reader after 15 min of reaction at 25 °C. An enzyme unit was determined as the necessary quantity of enzyme for hydrolyzing 1 µmol of BApNA per minute. Specific activity was expressed as units per miligramma of protein (unit/mg of protein).

2.8. LTI trypsin inhibitory activity against trypsin-like zebrafish proteases

LTI trypsin inhibitory activity against zebrafish midgut protein extracts was conducted based on the methodology described by Freitas-Júnior *et al.* (2012). For that, 15 μ L of intestinal extract was incubated for 30 min at 25 °C for 30 min with LTI and LTI + *Bt* mix, both at the concentration of 0.1 mg/mL. Next, for each sample, it was added 140 μ L of Tris-HCl 0.1M, pH 8.0 buffer and 30 μ L of BApNA. After 15 min of reaction, samples were read in a microplate reader at a wavelength of 405 nm. Control group was composed of replacement of inhibitor by DMSO and blank samples just contained buffer and BApNA. All tests were conducted in triplicates

2.9. Statistical analysis

Data were presented as mean \pm standard deviation. Significant differences between two groups were analysed with the non-paired Student's t-test, whereas for multiple comparisons, one-way Anova, followed by post hoc Tukey HSD test and two-way anova were conducted. Values were considered significant when $p < 0.05$. For statistical analyses the software Graphpad Prism 5 was used.

3. Results and discussion

3.1 Obtainment and evaluation of stability of LTI and Bt protoxins

From the obtained electrophoretic profiles (Supplementary Figure 1), it was observed a predominant band with molecular mass around 20 kDa which corresponds to the LTI profile previously described by Almeida Filho *et al.* (2017).

In order to assess larvicide proteins stability, these were submitted to the same exposure conditions found in the acute toxicity test in zebrafish embryos during 6 days. To that end, soluble proteins content in the medium, SDS-PAGE profile and trypsin-inhibitory activity (only for LTI) were determined over exposure period. Soluble proteins content in samples deriving of exposure to LTI, *Bt* and BSA control did not change significantly ($p < 0.05$) when comparing the first and the last day of exposure, whether in the presence of embryos or not (Supplementary Figure 2A, 2B and 2C, respectively). Likewise, in relation to stability of LTI trypsin-inhibitory activity, inhibition remained stable over the days, with variation from 75 to 85% in samples without embryo, and from 67-79 % in embryo-containing samples (Supplementary Figure 2D). LTI electrophoretic profile did not change considerably along exposure (Supplementary Figure 2E), showing that in fact there is not a significant degradation of that protein in the exposure

medium that compromises its enzyme activity. *Bt* protoxins profile could not be visualized due to the utilized staining. In the light of this, there was not a variation superior to 20% in concentrations of test-solutions and in LTI activity, highlighting the stability of larvicidal proteins to FET (fish embryo toxicity) test conditions.

As a matter of fact, preliminar studies reported that LTI is quite stable to wide temperature and pH variation ranges, and also to UV degradation (Nandeesh; Prasad, 2001; Almeida-Filho *et al.*, 2017; Tabosa *et al.*, 2020). Results here obtained exclude the need for daily renewal of test solutions during exposure (OECD, 2013; Hoyberghs *et al.*, 2020). Previous stability tests are fundamental to ensuring that the embryos will be exposed to the arranged concentrations during exposure (OECD, 2013), and in the case of this study, that larvicide proteins kept themselves biologically active in order to assess, their unintentional potential effects.

3.1. Acute toxicity in zebrafish embryos

Toxicological evaluation in zebrafish embryos and larvae through FET test revealed that LTI, *Bt* and LTI + *Bt* larvicide proteins, at concentrations 10 times superior to those with insecticide activity (250 mg/L; 0.13 mg/L and 250 mg/L+ 0.13 mg/L, respectively) did not cause deaths during embryo and larval development (Figure 1A). Larvicidal proteins did not induce morphological changes in embryos and larvae even after 6 days of exposure (Figure 1B), which suggests low acute toxicity.

Available literature shows studies that describe low or no toxicity of *Bt*-derived toxins in different model aquatic organisms, including zebrafish. For instance, Glare and O'Callaghan (1998) reported that *Bt* does not affect significantly fish, even when these are exposed direct or indirectly, in laboratory or in the field. Supporting these data, Grisolia *et al.* (2009), Aldeewan (2017), Gao *et al.* (2018) and Vieira *et al.* (2021), after exposure of zebrafish at early stages to different Cry proteins, did not observe mortality or visible adverse effects, nor did they report significant developmental, biochemical and molecular changes in this organism. Concerning acute toxicity of *L. leucocephala* species, Roy *et al.* (2020) reported embryotoxicity and teratogenic effects in zebrafish embryos exposed to a chloroform extract of this plant species at the concentration of 600 µg/mL. It is noted here, as well, that until this very moment, this is the only study which assessed acute toxicity of *L. leucocephala* trypsin inhibitor in aquatic models, including zebrafish.

3.2. *In silico* interaction of LTI and zebrafish trypsin

Models constructed at SWISS-MODEL platform had sequence identities relatively high compared to the used templates. Trypsin displayed 73.83% of similarity with the PDB structure utilized as basis (5PTP), while LTI showed 59.76% of identity with the respective PDB structure (4J2K), with both of them possessing good amino acid positioning and angulation in relation to the references (Supplementary Figure 3). With respect to docking, 10 different conformations (poses) were generated, each one with a respective score indicating its quality. Distinct poses were placed along with the modeled receptor, in Pymol, for visualization and comparison of bond positioning between them with a trypsin structure bound to an inhibitor deposited at PDB (code 2BTC, Figure 2). The chosen conformation was the one that possessed the highest similarity of position with that one of the protein reference and the highest score, counting as a tiebreaker criterion.

Visualization and analysis of docking results, from LigPlot diagrams demonstrated countless hydrophobic interactions between the protease and its inhibitor, besides a hydrogen bond between LTI Arg58 and trypsin His23 (Figure 3). Hydrophobic interactions are present in LTI at Gln80, Lys81, Pro79, Arg91, Ser84, Ser89, Gln78, Glu111, Pro62, Ser90, Arg64, Gly14, Gln112, Tyr63, Asn13, Ala60, Ser108, and His88 amino acids and in trypsin at Gln174, Gly128, Trp193, Gly194, Asn123, Cys173, Tyr195, Leu81, Arg45, His40, Arg72, Tyr42, Ser129, Gln155, Gly21, Tyr22, Phe24 and Asn79 (Figure 3). However, in the positive control, it was observed, besides hydrophobic interactions, interaction of an LTI Arg58 residue with a Ser, instead of His23. Hydrogen bond and hydrophobic interactions are essential in order to occur the interaction between these two macromolecules.

Docking analyses have been widely employed to prediction of biological activities of medical, pharmacological and nutritional interests (Holton *et al.*, 2013). Despite this popularization of computational methods, there are still few studies that assess interaction between these bioactive proteins and intestinal proteases, within a perspective of inferring on possible antinutritional effects.

3.3. LTI trypsin-inhibitory activity against zebrafish midgut extracts

Zebrafish tissue analysis, like for example intestine, can be a useful tool in the evaluation of safety of compound to which fish might be exposed by oral via (Borges *et al.*, 2020). Here, fish intestines from both genders were processed and used for analyses. Midgut extracts from male and female adult zebrafish displayed a high soluble protein content of 1.05 ± 0.15 and 1.53 ± 0.42 mg/mL, respectively, besides an expressive difference between contents from both sexes. According to Thongprajukaew e colaboradores (2013), it is possible to find in cyprinids

biochemical differences in the digestive tract, in terms of protein quantity and enzyme activity, correlated with sex. These differences observed demonstrate the importance of performing studies with both sexes, which includes the scope of this study that investigate the impacts of xenobiotics on zebrafish digestive tract proteases.

Once zebrafish do not have stomach, some common peptidases from digestive organs of fishes from other species (*e.g.* pepsin) are absent. This way, one of the most important and studied proteases in this model is trypsin. This enzyme belongs to the serine protease family and is responsible for many biological processes, for example the very protein digestion, zymogen activation and mediation between food ingestion and nutrient assimilation (Freitas-Junior *et al.*, 2012; Candiotta *et al.*, 2018).

There are many works that concern isolation, characterization and evaluation of trypsin activity in several aquatic species, such as the Nile tilapia (Bezerra *et al.*, 2005), arapaima/pirarucu (Freitas-Junior *et al.*, 2012), tambaqui (Marcuschi *et al.*, 2010), salmon, (Kanno *et al.*, 2010), carp (Cohen *et al.*, 1981) and zebrafish (Mendes, 2016). In this study, it was assessed specific activity of this enzyme in intestinal extracts of zebrafish female and male, as shown in Figure 4A. Here it was found a trypsin activity in females and males, with values of 2.4 and 3.1 U/mg, respectively. Mendes (2016) found a specific trypsin activity of 3.7 U/mg after purification of midgut raw extract. However, the author does not report difference between sexes, which in this work, became evident. This distinction in trypsin enzyme activity between gender can be associated with an expressive difference concerning protein quantity presente in male and female midgut macerates, as previously reported. It can still be result of protein concentration in the diet, in the gastrointestinal structure and even of intestinal epithelium morphology of different animals (Wagner *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2020; Martínez-Llorens *et al.*, 2021).

Once found trypsin-like activity in samples of intestinal extracts and, knowing that, characterization of digestive enzymes is an important process for the understanding of digestive mechanisms, it was possible to assess the presence of LTI trypsin-inhibitory activity and its mix with *Bt* protoxins as a predictor of impacts of these molecules on protein digestion in fishes. As displayed in Figure 4B, it was observed an average inhibition of 83 and 85% and when intestinal extracts rich in trypsin activity in female and male fish, respectively, were exposed to LTI. A minor inhibition with average variation of 69 and 65% in females and males, respectively, was observed when midgut extracts were submittd to the LTI + *Bt* mix.

Some authors in their studies used plants or plant-based compounds, including protease inhibitors from the same family of LTI as soybean-derived protease inhibitors, in feeding

studies, in nutrition or in studies of toxicity in different model organisms, as for example, fishes (Nandeesh; Prasad, 2001; Dhanasiri *et al.*, 2020). Alarcón *et al.* (2001) performed tests with different plant protein sources (*e.g.* soybean, chick pea, camachile and sorghum) on digestive proteases from two species of porgies: yellow snapper (*Lutjanus argentiventris*) and Pacific dog snapper (*Lutjanus novemfasciatus*), and demonstrated a significant inhibition of intestinal proteases, including trypsin. These authors reported that this enzyme inhibition can be responsible for reductions in animal body weight and growth, in different stages of life. This is mainly due to the classical antinutritional effect that protease inhibitors promote, being this triggered as these proteases are inhibited and a reduction in digestion of important proteins to development takes place.

This found is worthy of concern, once non-target organisms might be exposed directly to LTI in its native form, and then, being target of great nutritional harms with compromise of development.

4. Conclusion

In this work, it was evaluated the effects of larvicide protein LTI and *Bt* protoxins, isolated and in combination, about aquatic vertebrates using zebrafish as model system. These proteins did not cause death nor did it induce morphological changes during embryo and larval development of zebrafish, even when tested in concentrations superior to those with insecticide activity. *In silico* simulation indicated an interaction between zebrafish trypsin and LTI from hydrophobic interactions, besides a hydrogen bond between LTI Arg58 and trypsin His23. *In vitro* investigation confirmed that LTI and its mix with *Bt* proteins were able to inhibit trypsin-like activity of intestinal extracts of zebrafish of both sexes, pointing out a potential antinutritional in concentrations next to those that show insecticide action. This way, this unintentional effect could imply directly in the nutrition and survival of non-target organisms that were exposed to the insecticide formulation LTI and *Bt*. In general, these data lead to the conclusion that, in a natural environment, this larvicide mix might present deleterious effects in aquatic organisms, especially to those with protein digestion trypsin-like enzymes dependent.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) by providing scholarship for post-graduate students, and funded by the Public Call n. 03 Produtividade em Pesquisa PROPESQ/PRPG/UFPB proposal code PVA13245-2020.

References

Alarcón, F.J., García-Carreño, F.L., Navarrete del Toro, M.A., 2001. Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. *Fish Physiol. Biochem.* 24, 179–189.

Aldeewan, A.B.T., 2017. Detection Of *Bacillus Thuringiensis* Crystal Protein Cry51aa1 Intoxication (In Vivo) Using Zebrafish Model. *Basrah Journal of Veterinary Research* 16, 26–35.

Almeida Filho, L.C., de Souza, T.M., Tabosa, P.M., Soares, N.G., Rocha-Bezerra, L.C., Vasconcelos, I.M., Carvalho, A.F., 2017. Trypsin inhibitor from *Leucaena leucocephala* seeds delays and disrupts the development of *Aedes aegypti*, a multiple-disease vector. *Pest Manag. Sci.* 73, 181–187.

Alonso, P.L., Tanner, M., 2013. Public health challenges and prospects for malaria control and elimination. *Nat. Med.* 19, 150–155.

Ansari, M.S., Moraiet, M.A., Ahmad, S., 2014. Insecticides: Impact on the Environment and Human Health, in: Malik, A., Grohmann, E., Akhtar, R. (Eds.), *Environmental Deterioration and Human Health: Natural and Anthropogenic Determinants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 99–123.

Araújo, H.R.C., Carvalho, D.O., Ioshino, R.S., Costa-da-Silva, A.L., Capurro, M.L., 2015. *Aedes aegypti* Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics. *Insects* 6, 576–594.

Baldacchino, F., Caputo, B., Chandre, F., Drago, A., della Torre, A., Montarsi, F., Rizzoli, A., 2015. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. *Pest Manag. Sci.* 71, 1471–1485.

Bao, S., Tang, W., Fang, T., 2020. Sex-dependent and organ-specific toxicity of silver nanoparticles in livers and intestines of adult zebrafish. *Chemosphere* 249, 126172.

Bezerra, R.S., Lins, E.J.F., Alencar, R.B., Paiva, P.M.G., Carvalho, L.B., 2005. Alkaline proteases from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochem.* 40, 1829–1834.

Borges, R.S., Pereira, A.C.M., de Souza, G.C., Carvalho, J.C.T., 2020. Histopathology of Zebrafish (*Danio rerio*) in Nonclinical Toxicological Studies of New Drugs, in: Bozkurt, Y.

(Ed.), Zebrafish in Biomedical Research. IntechOpen, Rijeka.

Candiotta, F.B., Freitas-Júnior, A.C.V., Neri, R.C.A., Bezerra, R.S., Rodrigues, R.V., Sampaio, L.A., Tesser, M.B., 2018. Characterization of digestive enzymes from captive Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Braz. J. Biol.* 78, 281–288.

Cohen, T., Gertler, A., Birk, Y., 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*)—II. Kinetic properties and inhibition studies of trypsin, chymotrypsin and elastase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 69, 647–653.

Kanno, G., Yamaguchi, T., Kishimura, H., Yamaha, E., Saeki, H., 2010. Purification and characteristics of trypsin from masu salmon (*Oncorhynchus masou*) cultured in fresh-water. *Fish Physiol. Biochem.* 36, 637–645.

Dhanasiri, A., Chen, X., Dahle, D., Siriyappagounder, P., Fæste, C.K., Fernandes, J.M.O., 2020. Dietary inclusion of plant ingredients induces epigenetic changes in the intestine of zebrafish. *Epigenetics* 15, 1035–1051.

Flores, E.M., Nguyen, A.T., Odem, M.A., Eisenhoffer, G.T., Krachler, A.M., 2020. The zebrafish as a model for gastrointestinal tract-microbe interactions. *Cell. Microbiol.* 22, e13152.

Freitas-Júnior, A.C.V., Costa, H.M.S., Icimoto, M.Y., Hirata, I.Y., Marcondes, M., Carvalho, L.B., Oliveira, V., Bezerra, R.S., 2012. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food Chem.* 133, 1596–1602.

Gao, Y.-J., Zhu, H.-J., Chen, Y., Li, Y.-H., Peng, Y.-F., Chen, X.-P., 2018. Safety Assessment of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins Cry1C and Cry2A with a Zebrafish Embryotoxicity Test. *J. Agric. Food Chem.* 66, 4336–4344.

Gonçalves, Í.F.S., Souza, T.M., Vieira, L.R., Marchi, F.C., Nascimento, A.P., Farias, D.F., 2020. Toxicity testing of pesticides in zebrafish—a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 27, 10185–10204.

Holton, T.A., Vijayakumar, V., Khaldi, N., 2013. Bioinformatics: Current perspectives and future directions for food and nutritional research facilitated by a Food-Wiki database. *Trends Food Sci. Technol.* 34, 5–17.

Kanno, G., Yamaguchi, T., Kishimura, H., Yamaha, E., Saeki, H., 2010. Purification and characteristics of trypsin from masu salmon (*Oncorhynchus masou*) cultured in fresh-water. *Fish Physiol. Biochem.* 36, 637–645.

Roy, (ghosh) Sumana, Lopamudra, D., Prerona, S., 2020. Embryotoxicity and Teratogenic Effect of Chloroform Extract of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Lam.) de Wit Leaf on Zebra fish (*Danio Rerio*). *Int. J. Pharma Bio Sci.* 10. <https://doi.org/10.22376/ijpbs/lpr.2020.10.5.P167-176>

Grisolia, C.K., Oliveira-Filho, E.C., Ramos, F.R., Lopes, M.C., Muniz, D.H.F., Monnerat, R.G., 2009. Acute toxicity and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* strains on fish and mouse bone marrow. *Ecotoxicology* 18, 22–26.

Guerrera, M.C., De Pasquale, F., Muglia, U., Caruso, G., 2015. Digestive enzymatic activity during ontogenetic development in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 324, 699–706.

Kanno, G., Yamaguchi, T., Kishimura, H., Yamaha, E., Saeki, H., 2010. Purification and characteristics of trypsin from masu salmon (*Oncorhynchus masou*) cultured in fresh-water. *Fish Physiol. Biochem.* 36, 637–645.

Karunamoorthi, K., Sabesan, S., 2013. Insecticide resistance in insect vectors of disease with special reference to mosquitoes: A potential threat to global public health. *Health Scope* 2, 4–18.

Kumar, V., Hossain, M.S., Ragaza, J.A., Benito, M.R., 2020. The Potential Impacts of Soy Protein on Fish Gut Health, in: *Soybean for Human Consumption and Animal Feed*. unknown, pp. 1–25.

Marcuschi, M., Espósito, T.S., Machado, M.F.M., Hirata, I.Y., Machado, M.F.M., Silva, M.V., Carvalho, L.B., Jr, Oliveira, V., Bezerra, R.S., 2010. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 667–673.

Martínez-Llorens, S., Peruzzi, S., Falk-Petersen, I.-B., Godoy-Olmos, S., Ulleberg, L.O., Tomás-Vidal, A., Puvanendran, V., Odei, D.K., Hagen, Ø., Fernandes, J.M.O., Jobling, M., 2021. Digestive tract morphology and enzyme activities of juvenile diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed fishmeal-based diets with or without fish protein hydrolysates. *PLoS One* 16, e0245216.

Mendes, C.M., 2016. *Purificação e Caracterização Físico-Química da Tripsina Do Peixe-Zebra (Danio rerio)*. Universidade Federal da Paraíba.

Nandeesh, P., Theertha Prasad, D., 2001. Characterization of Serine Proteinase Inhibitor from Subabul (*Leucaena leucocephala* Lam) Seeds. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 10. <https://doi.org/10.1007/BF03263113>

Nkya, T.E., Akhouayri, I., Kisinza, W., David, J.-P., 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 407–416.

Parichy, D.M., 2015. Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *Elife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.05635>.

Roy, (ghosh) Sumana, Lopamudra, D., Prerona, S., 2020. Embryotoxicity and Teratogenic Effect of Chloroform Extract of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Lam.) de Wit Leaf on

Zebra fish (Danio Rerio). Int. J. Pharma Bio Sci. 10.
<https://doi.org/10.22376/ijpbs/lpr.2020.10.5.P167-176>

San, B., Aben, M., Flik, G., Kamminga, L.M., 2018. Dissection of intestines from larval zebrafish for molecular analysis. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/493536>

Silva, J.V.J., Jr, Lopes, T.R.R., Oliveira-Filho, E.F. de, Oliveira, R.A.S., Durães-Carvalho, R., Gil, L.H.V.G., 2018. Current status, challenges and perspectives in the development of vaccines against yellow fever, dengue, Zika and chikungunya viruses. Acta Trop. 182, 257–263.

Souza, T.M., Cunha, A.P., Farias, D.F., Machado, L.K., Morais, S.M., Ricardo, N.M., Carvalho, A.F., 2012. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. Pest Manag. Sci. 68, 1380–1384.

Stoscheck, C.M., 1990. [6] Quantitation of protein, in: Deutscher, Murray P. (Ed.), Methods in Enzymology. Academic Press, pp. 50–68.

Tabosa, P.M.S., Almeida Filho, L.C.P., Franca, R.X., Rocha-Bezerra, L.C.B., Vasconcelos, I.M., Carvalho, A.F.U., 2020. Trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds impairs *Aedes aegypti* development and enhances the activity of *Bacillus thuringiensis* toxins. Pest Manag. Sci. 76, 3693–3701.

Thongprajukaew, K., Kovitvadi, U., Kovitvadi, S., Engkagul, A., Rungruangsak-Torrissen, K., 2013. Evaluation of growth performance and nutritional quality of diets using enzymatic markers and in vitro digestibility in Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Afr. J. Biotechnol. 12, 1689–1702.

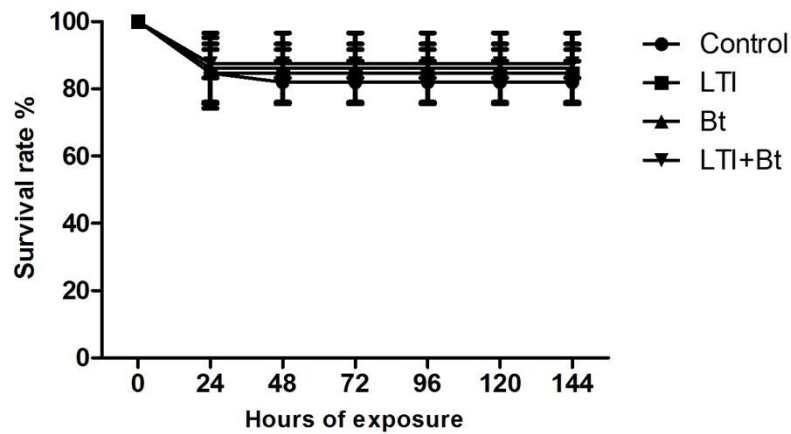
Vieira, L.R., Hissa, D.C., de Souza, T.M., Sá, C.A., Evaristo, J.A.M., Nogueira, F.C.S., Carvalho, A.F.U., Farias, D.F., 2020. Proteomics analysis of zebrafish larvae exposed to 3,4-dichloroaniline using the fish embryo acute toxicity test. Environ. Toxicol. 35, 849–860.

Wagner, C.E., McIntyre, P.B., Buels, K.S., Gilbert, D.M., Michel, E., 2009. Diets predict intestine length in Lake Tanganica's cichlid fishes. Funct. Ecol. 23, 1122–1131.

WHO | Dengue and severe dengue [WWW Document], 2021. WHO. URL <https://apps.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html> (accessed 3.10.22).

Figure 1. Taxa de sobrevivência (A) e ausência de alterações morfológicas (B) em embriões e larvas de peixe-zebra após exposição às substâncias inseticidas LTI e protoxinas *Bt*, isoladas e combinadas, e ao controle negativo meio E3 durante 6 dias (144 hours of exposure). Control = only E3 medium; LTI = 250 mg/L do inibidor de tripsina de *L. leucocephala*; *Bt* = 0,13 mg/L de protoxinas de *Bt*; e LTI + *Bt* = 250 mg/L de LTI + 0,13 mg/L de *Bt*. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão de três repetições independentes (n = 20 embryos/repetition). Para as análises estatísticas, foi utilizada ANOVA two-way para comparações múltiplas (entre grupos). * = $p < 0.05$

A



B

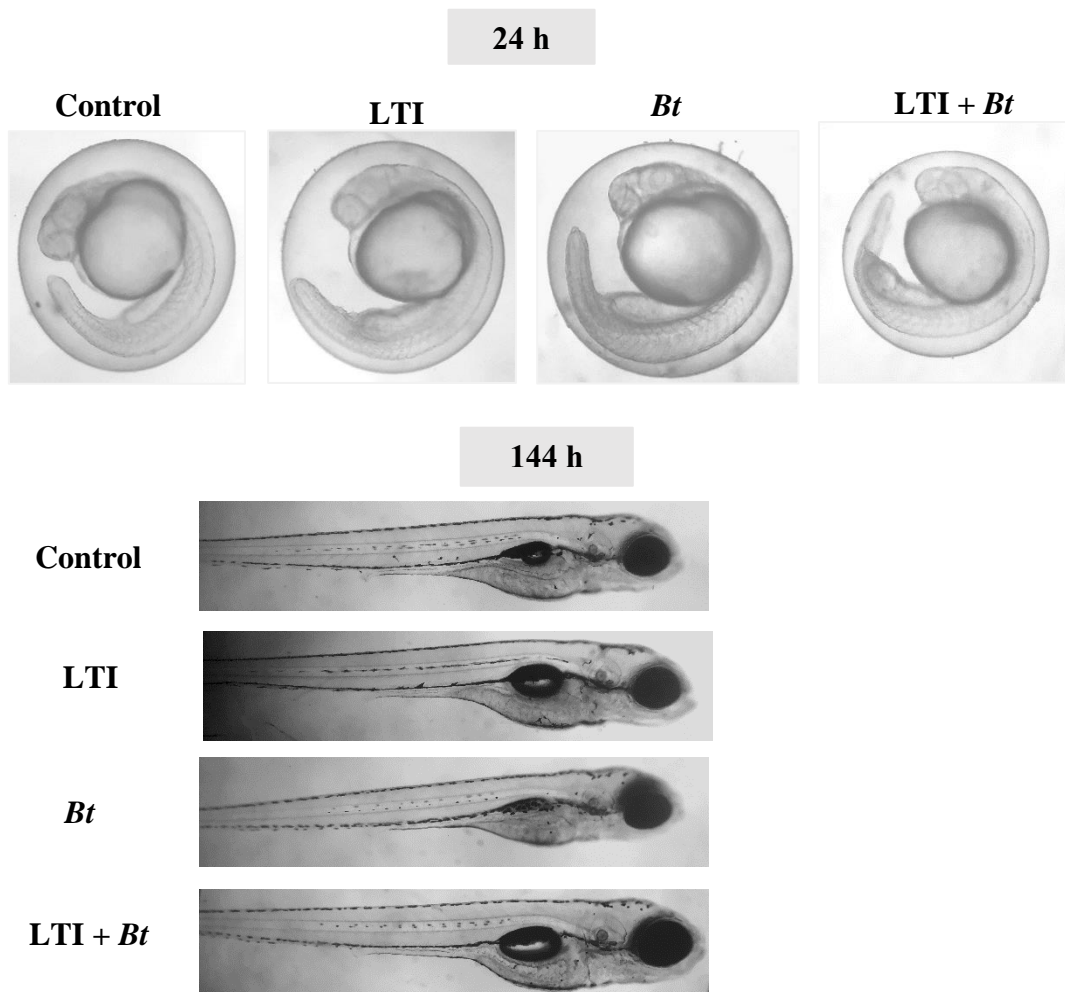


Figure 2. Interaction between bovine trypsin and a squash seed trypsin inhibitor, used as a positive control in this work. (a) Trypsin, bound to the cleaved form of the inhibitor's active site. (b) Ligplot plot highlighting the amino acid interactions of the two molecules.

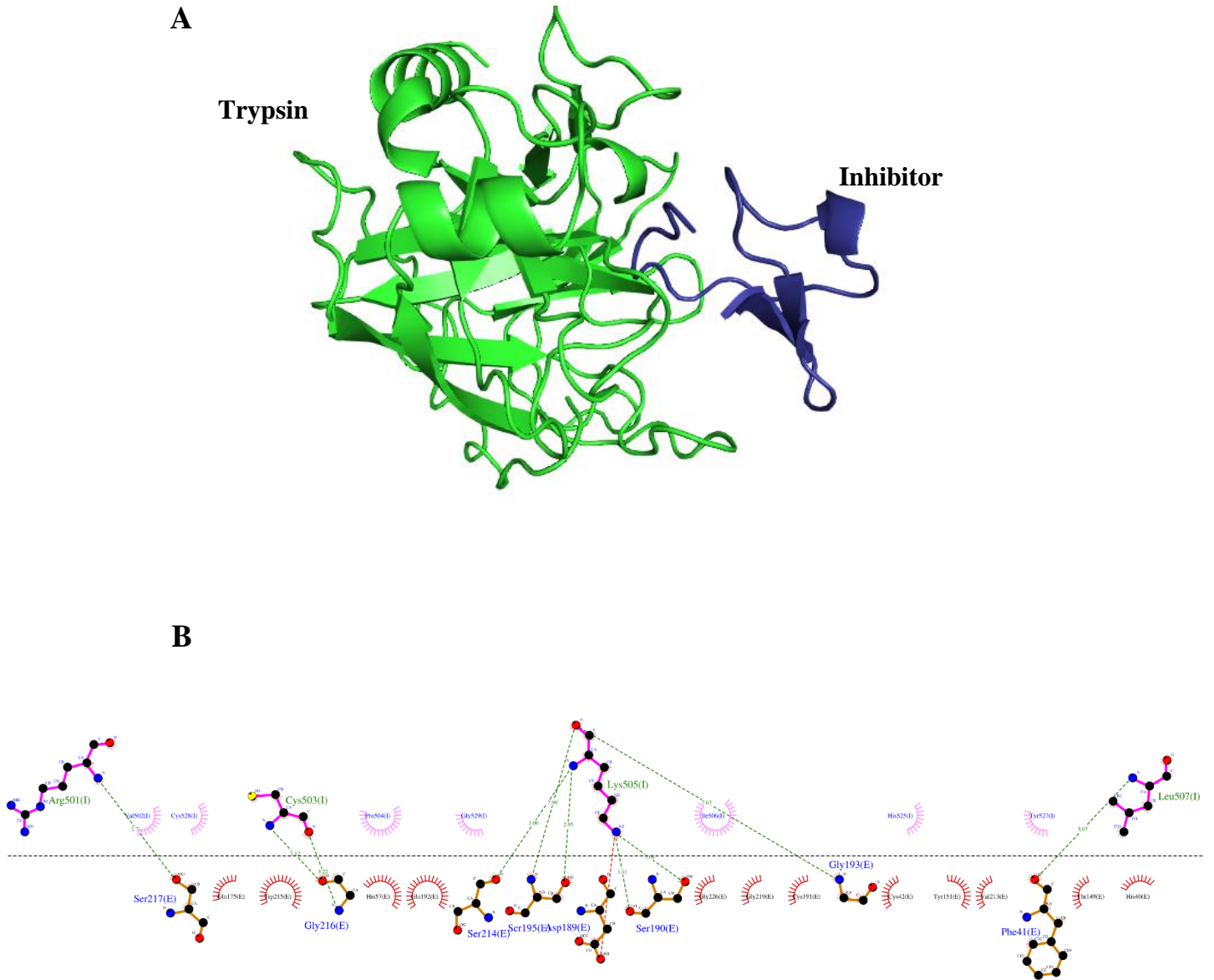


Figure 3. (a) Interaction of zebrafish trypsin and LTI models generated from molecular modeling on the SWISS-MODEL platform. (b) Ligplot plot showing the interactions between amino acids in the complex.

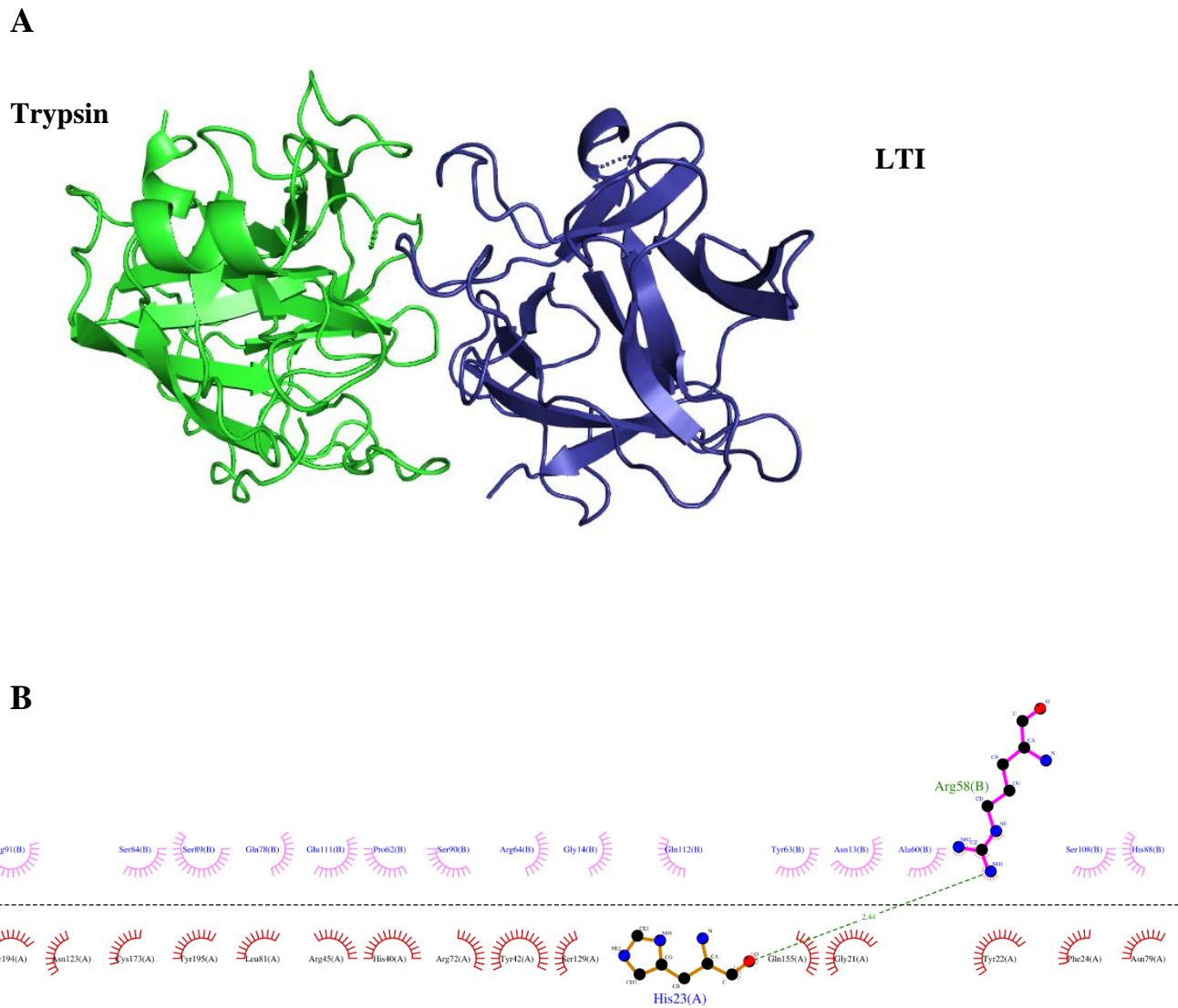
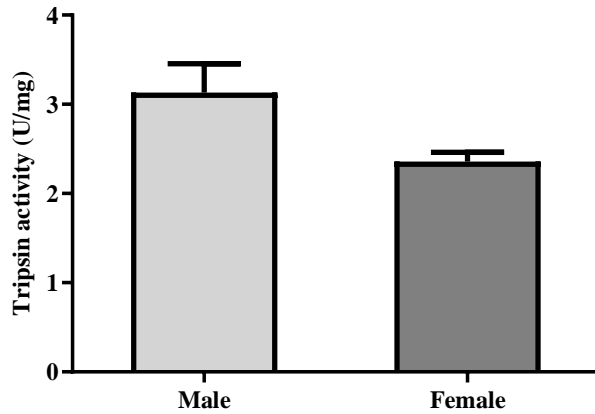
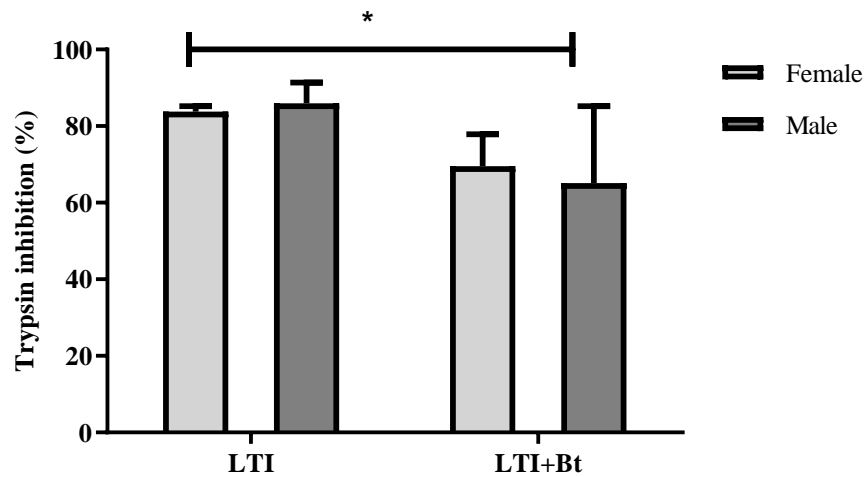


Figure 4. (A) Atividade do tipo tripsina e (B) atividade inibitória de tripsina das amostras LTI e LTI + *Bt* em extratos intestinais de machos e fêmeas de zebrafish. Os dados estão representados em média \pm desvio padrão de três repetições. Para as análises estatísticas, foi utilizado o Teste T não pareado para comparações simples no ensaio de inibição de tripsina (Male LTI vs. male LTI + *Bt* and female LTI vs. female LTI + *Bt*). * = $p < 0.05$

A

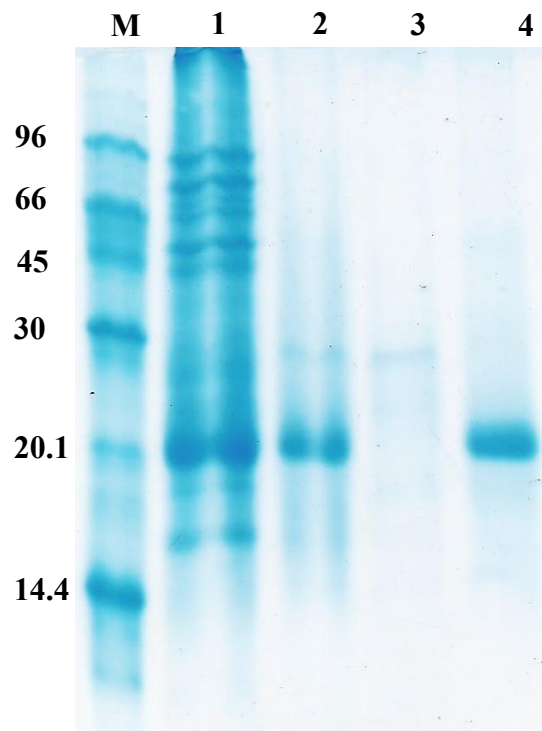


B

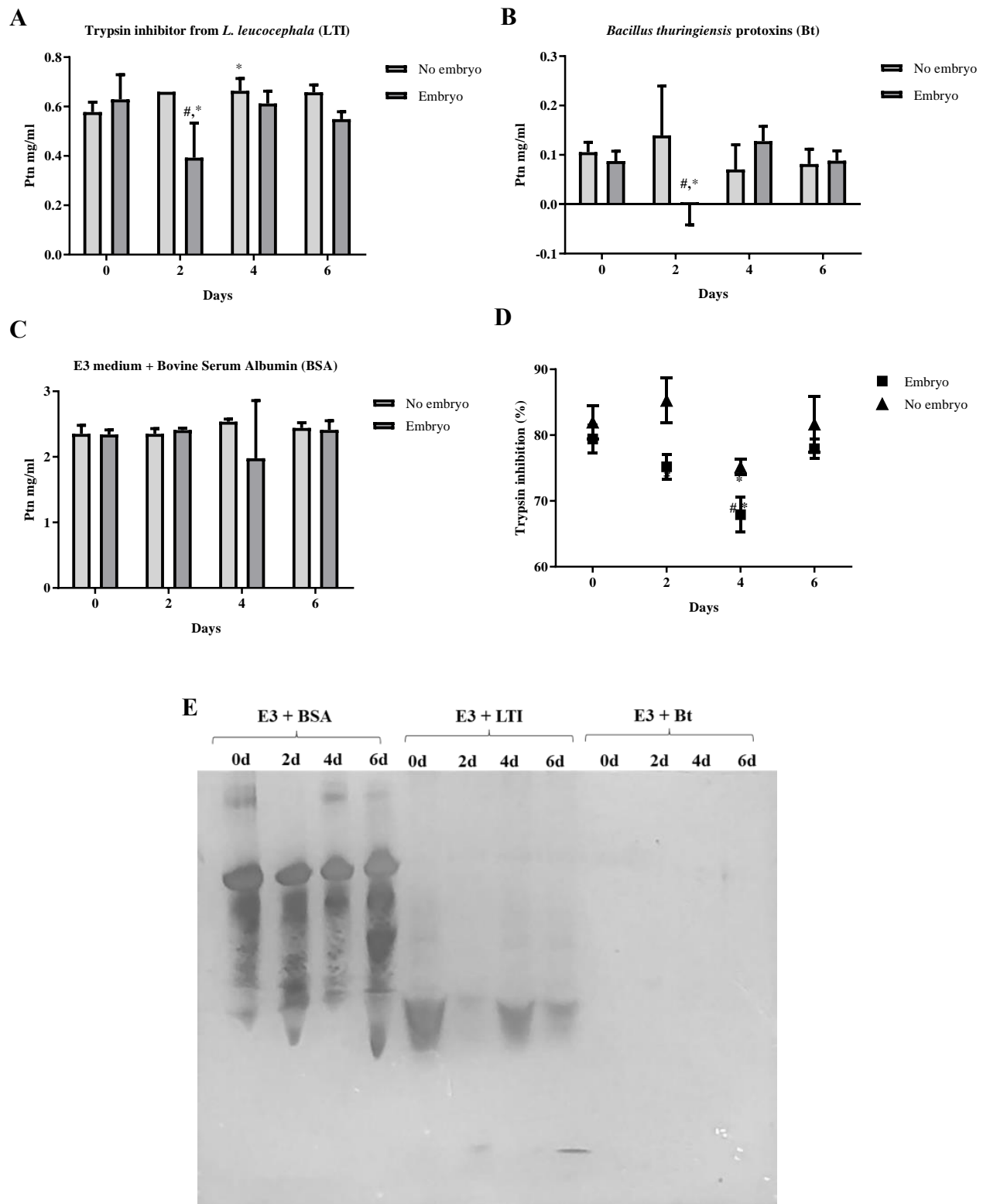


Supplementary Figures

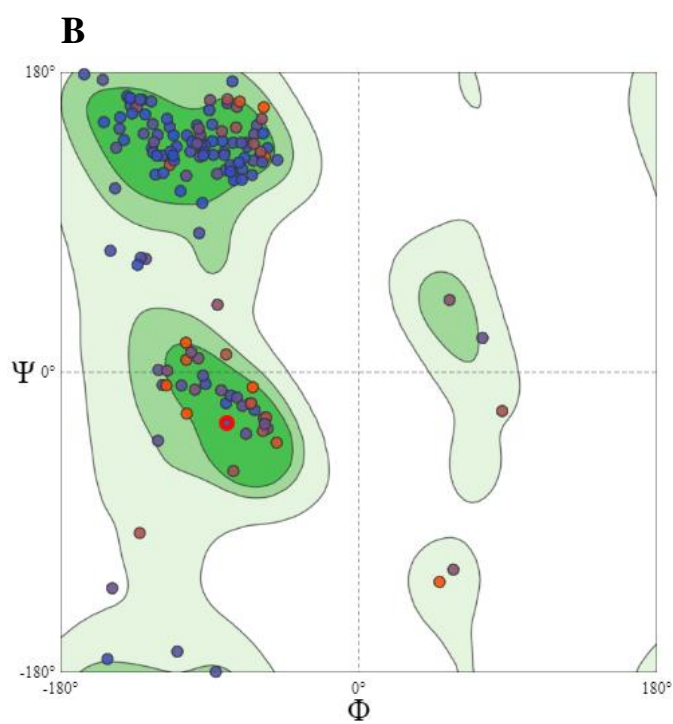
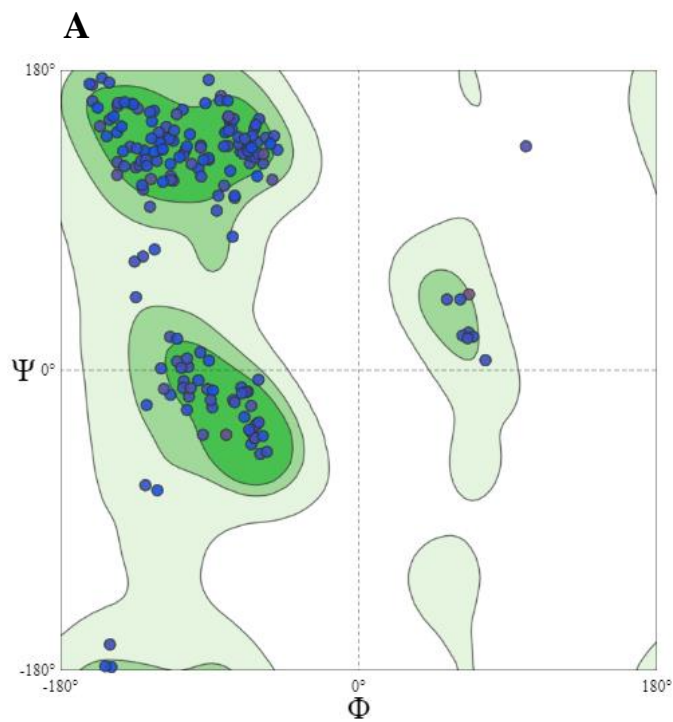
Supplementary Figure 1 - Electrophoretic profile (SDS-PAGE) of LTI purification steps. M - molecular weight markers (kDa); 1 - *Leucaena leucocephala* crude protein extract; 2 - TCA fraction (3%); 3 - Non adsorbed peak on trypsin sepharose-4B; 4 - LTI. Twenty μg of crude extract were applied and to other samples, 15 μg of protein were applied to each well and the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.



Supplementary Figure 2 - Teor de proteínas solúveis (Ptn) das amostras de LTI (A), protoxinas *Bt* (B) e BSA (C), atividade inibitória de tripsina do LTI (D) e SDS-PAGE (E) oriundas do ensaio de estabilidade das proteínas larvicidas em meio E3 às condições do teste de toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra durante 6 dias. * indica diferenças significativas em relação ao dia 0 no mesmo tratamento ($p < 0.05$) e o # indica diferenças significativas em relação à exposição sem embrião ($p < 0.05$).



Supplementary Figure 3. Ramachandran plots demonstrating amino acids positioning of the models generated in the modeling, according to favorable regions. (A) Trypsin plot with 97.7% of amino acids in favorable regions (B) and LTI plot with 90.06% of amino acids in regions considered favorable.



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em todo o mundo, tem sido crescente a utilização de produtos químicos de forma descontrolada e pouco seletiva para controle de insetos vetores tais como o *Ae. aegypti*. Esse fato tem gerado uma série de impactos negativos à saúde de humanos e animais e ao meio ambiente.

Dessa forma, o interesse de pesquisadores e órgãos regulamentadores na busca por compostos naturais com atividade inseticida, principalmente os de origem vegetal, que possuam maior biodegradabilidade e minimizem efeitos tóxicos à saúde humana e ambiental, tem crescido. Nessa perspectiva, a mistura do inibidor de protease de *L. leucocephala* (LTI) e das protoxinas de *B. thuringiensis* (*Bt*) tem sido considerada uma formulação inseticida promissora no combate ao *Ae. Aegypti*.

Neste estudo, alguns dados importantes sobre a segurança de uso desta formulação foram levantados, através da utilização da plataforma biológica peixe-zebra (*D. rerio*). Aqui foi evidenciado que ambos os compostos e sua mistura não promoveram o surgimento de efeitos letais e não letais agudos em embriões e larvas deste organismo. No entanto, estes compostos inibiram de forma significativa proteases digestivas do tipo tripsina, indicando um possível efeito antinutricional. Este efeito não intencional poderia implicar diretamente no crescimento e desenvolvimento de organismos não-alvo (com digestão proteica dependente de proteases do tipo tripsina) que fossem expostos à formulação inseticida de LTI e *Bt*.

Assim, mais estudos devem ser conduzidos com o intuito de verificar os efeitos dessa inibição num cenário realístico e para que sejam propostos mecanismos que minimizem este efeito antinutricional e desta forma, preservem a saúde ambiental.

REFERÊNCIAS

ADEDEJI, O. B.; OKOCHA, R. O. Overview of pesticide toxicity in fish. **Advances in Environmental Biology**, p. 2344+, 2012.

ALMEIDA FILHO, L.C. *et al.* First insights into insecticidal activity against *Aedes aegypti* and partial biochemical characterization of a novel low molecular mass chymotrypsin-trypsin inhibitor purified from *Lonchocarpus sericeus* seeds. **Pest Management Science**, 74(6), pp.1362-1373, 2017.

ALONSO, P. L.; TANNER, M. Public health challenges and prospects for malaria control and elimination. **Nature medicine**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 150–155, 2013.

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

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Anvisa. 2019. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=5627216&_101_type=content&_101_groupId=2. Acesso em: 10 fevereiro 2022.

ARAÚJO, H.; CARVALHO, D.; IOSHINO, R.; COSTA-DA-SILVA, A.; CAPURRO, M. *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. **Insects**, 6(2), 576-594, 2015.

ASTOLFI FILHO, S.; SILVA, C. G. N. da; BIGI, M. de F. M. A. Bioprospecção e biotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, v. 19, n. 38, p. 45–80, 2015.

BALDACCHINO, F. *et al.* Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. **Pest Management Science**, 71(11), pp.1471-1485, 2015.

BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. **Current topics in developmental biology**, v. 124, p. 331–367, 2017.

BEECH, C. K., MARTHA & MORRISON, N., ALPHEY, L. Genetically Modified Insects: Science, Use, Status and Regulation. **Collection of biosafety reviews**, v. 6, 66-124, 2012.

BRAVO, A. *et al.* *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 41(7), 423-431, 2011.

BROADWAY, R. M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, 43(9), 855-874, 1997.

BURGES, H. D. *et al.* Guidelines for safety tests and registration of bacterial pesticides. **Entomophaga**, v. 27, n. 3, p. 225–235, 1982.

CANDIOTTO, F.B. *et al.* Characterization of digestive enzymes from captive Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. **Braz. J. Biol.** 78, 281–288, 2018.

CHANDLER, D. *et al.* The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 366, n. 1573, p. 1987–1998, 2011.

CHOW, W. S.; CHAN, K. M. Acute toxicity and study of “biomarker of effects” in zebrafish embryos and larvae exposed to selected pesticides: a step towards refined risk assessment of chemical agents. In: LESSMAN, C. A.; CARVER, E. A. (Eds.). **Zebrafish : topics in reproduction, toxicology and development**. New York: Nova Science Publishers, p. 265–293, 2014.

CONNELL, D. W.; MILLER, G. J. **Chemistry and Ecotoxicology of Pollution**. [S. l.]: John Wiley & Sons, 1984. *E-book*. Disponível em: <https://play.google.com/store/books/details?id=JkxDy9K8p4C>.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p.500-506, 2011.

COSTA, C. R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

CRAVEIRO, A. A. *et al.* **Formulações à base do óleo essencial de alecrim pimenta (lippia sidoides cham.) para proteção pessoal contra o mosquito aedes aegypti linn. Patent**. [S. l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.escavador.com/patentes/388945/formulacoes-base-oleo-essencial-alecrim-pimenta-lippia-sidoides-cham-protECAo>. Acesso em: 1 mar. 2022., 1 ago. 2008.

D’COSTA, A.; SHEPHERD, I. T. Zebrafish development and genetics: introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. **Zebrafish**. v. 6, n. 2, p. 168-177. 2009.

DUGUMA, D. *et al.* Effects of a larval mosquito biopesticide and Culex larvae on a fresh water nanophytoplankton (*Selenastrum capricornatum*) under axenic conditions. **Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 51–59, 2017.

FERREIRA, F. A. DA S. *et al.* Effect of *Bacillus sphaericus* Neide on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and associated insect fauna in fish ponds in the Amazon. **Revista Brasileira de Entomologia**, 2015.

FLORES, E. M. *et al.* The zebrafish as a model for gastrointestinal tract-microbe interactions. **Cellular microbiology**, v. 22, n. 3, p. e13152, 2020.

GUERRERA, M. C. *et al.* Digestive enzymatic activity during ontogenetic development in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution**, v. 324, n. 8, p. 699–706, 2015.

NANDEESHA, P.; THEERTHA PRASAD, D. Characterization of Serine Proteinase

Inhibitor from Subabul (*Leucaena leucocephala* Lam) Seeds. **Journal of plant biochemistry and biotechnology**, v. 10, n. 1., 2001.

FREITAS-JÚNIOR, A.C.V. *et al.* Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food Chem.** 133, 1596–1602, 2012.

GONÇALVES, Í.F.S. *et al.* Toxicity testing of pesticides in zebrafish-a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.** 27, 10185–10204, 2020.

GOVERNEMENT OF INDIA. Guidance document on toxicology for registration of chemical pesticides in india, 2017.

GUERRERA, M.C. *et al.* Digestive enzymatic activity during ontogenetic development in zebrafish (*Danio rerio*). **J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.** 324, 699–706, 2015.

KARUNAMOORTHY, K., SABESAN, S. Insecticide resistance in insect vectors of disease with special reference to mosquitoes: A potential threat to global public health. **Health Scope** 2, 4–18, 2013.

HELFRICH, L.A. Pesticides and Aquatic Animals: A guide to reducing impacts on aquatic systems. Disponível em: <https://www.pubs.ext.vt.edu/420/420-013/420-013.html>. Acesso em: 2 jun. 2021, 2009.

HILL, A. J. *et al.* Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6–19, 2005.

HOWE, K., *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature** 496, 498–503, 2013.

ISHI, S. S.; PATIL, R. Acute Toxicity Bioassay of Newtech Biopesticide on Freshwater cyprinid *Danio aequipinnatus* (Ham Buch). **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 5, n. 3, p. 584–586, 2017.

JUDSON, R. S. *et al.* *In vitro* screening of environmental chemicals for targeted testing prioritization: the ToxCast project. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 4, p. 485–92, 2010.

LACEY, L. A. *Bacillus Thuringiensis* Serovariety *Israelensis* and *Bacillus Sphaericus* for Mosquito Control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 2 Suppl, p. 133–163, 2007.

LAPIED, B. *et al.* Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. **Trends in biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 190–198, 2009.

LEE, H.; HALVERSON, S.; EZINWA, N. Mosquito – Borne Diseases. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v 45 (3), p. 393 - 407, 2018.

LOBERT, V. H.; MOURADOV, D.; HEATH, J. K. Focusing the Spotlight on the Zebrafish Intestine to Illuminate Mechanisms of Colorectal Cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 916, p. 411–437, 2016.

MA, Y *et al.* Combined effects of three crystalline toxins from *Bacillus thuringiensis* with seven proteinase inhibitors on beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 105(3), 169-176, 2013.

MAHMOUD, A. H. *et al.* Fenvalerate induced toxicity in Zebra fish, *Danio rerio* and analysis of biochemical changes and insights of digestive enzymes as important markers in risk assessment *Journal of King Saud University - Science*, 2020.

MARCOMBE, S. *et al.* Alternative insecticides for larval control of the dengue vector *Aedes aegypti* in Lao PDR: insecticide resistance and semi-field trial study. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 616, 2018.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. **Agrotóxicos**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acesso em: 31 de Março de 2021.

MEYERS, J. R. Zebrafish: Development of a vertebrate model organism. **Current protocols essential laboratory techniques**, v. 16, n. 1, p. e19, 2018.

MORAES, F. D. *et al.* Acute toxicity and sublethal effects of phenol on hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* and pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Ecotoxicology and Environmental contamination**, v. 10, n. 1, p. 31–36, 10 jun. 2015.

MORETTO, L. D.; RABINOVITCH, L. Insetos transmissores de doenças -Antigos e novos desafios. **Revista UPharma**, 2016.

NANDEESHA, P., THEERTHA PRASAD, D. Characterization of Serine Proteinase Inhibitor from Subabul (*Leucaena leucocephala* Lam) Seeds. **J. Plant Biochem. Biotechnol**, 2001.

NAVFAC (Naval Facilities Engineering Command). Guide for incorporating bioavailability adjustments into human health and ecological Risk Assessments. U. S. Department of Defense Facilities. 2000. Disponível em: <https://www.itrcweb.org/contsedsbioavailability/References/bioavailability01.pdf>. Acesso em: 30 maio 2021.

NDOLO, D. *et al.* Research and Development of Biopesticides: Challenges and Prospects. **Outlooks on Pest Management**, v. 30, n. 6, p. 267–276, 2019.

OECD (2013), **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, No. 236, OECD Publishing, Paris, 2013.

OLIVA, M. L. V.; SAMPAIO, M. U. Action of Plant Proteinase Inhibitors on Enzymes of Physiopathological Importance. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 615–621, set. 2009.

PANG, Y., FRUTOS, R. & FEDERICI, B.A. Synthesis and toxicity of full length and truncated bacterial CryIVD mosquitocidal proteins expressed in lepidopteran cells a baculovirus vector.

Journal of General Virology, 1992.

PARDO-LÓPEZ, L. *et al.* Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, 2009.

PARICHY, D. M. Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. **eLife**, 2015.

PATTERSON, G. M. Looking Backward, Looking Forward: The Long, Torturous Struggle with Mosquitoes. **Insects**, 2016.

PHAM, D.-H. *et al.* Use of Zebrafish Larvae as a Multi-Endpoint Platform to Characterize the Toxicity Profile of Silica Nanoparticles. **Scientific reports**, 2016.

PONTUAL, E. V. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 2012.

SANGANYADO, E.; MUNJANJA, B.; NYAKUBAYA, V. Biopesticide residues in water. In: NOLLET, L.; RATHORE, H. (Eds.). **Biopesticides Handbook**. [s.l.] CRC Press., 2015.

SCHNEPF, H. E. *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, 1998.

SCHOLZ, S. *et al.* The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 15, n. 5, p. 394–404, 2008.

SENTHIL-NATHAN, S. A Review of Resistance Mechanisms of Synthetic Insecticides and Botanicals, Phytochemicals, and Essential Oils as Alternative Larvicidal Agents Against Mosquitoes. **Frontiers in physiology**, 2019.

SIMONICH, M. T.; FRANZOSA, J. A.; TANGUAY, R. L. In vivo approaches to predictive toxicology using zebrafish. In: WILSON, A. G. E. (Ed.). **New horizons in predictive toxicology: current status and application**. [s.l.] Royal Society of Chemistry, 2012.

SOUZA, T. M. *et al.* Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. **Pest management science**, v. 68, n. 10, p. 1380–1384, 2012.

SOUZA-PINTO, J.C. *et al.* Effect of a serine proteinase inhibitor from *Leucaena leucocephala* on plasma kallikrein and plasmin. **Immunopharmacology**, 1996.

SPARKS, J. T.; BOHBOT, J. D.; DICKENS, J. C. Olfactory disruption: toward controlling important insect vectors of disease. **Progress in molecular biology and translational science**, 2015.

TABOSA, P. M. S. *et al.* Trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds impairs *Aedes aegypti* development and enhances the activity of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Pest management science**, 2020.

TAVARES, B.; SANTOS LOPES, S. The Importance of Zebrafish in Biomedical Research. **Acta Medica Portuguesa**, v. 26, n. 5, p. 583–592, set. 2013.

TEHRI, K.; SINGH, N. The role of botanicals as green pesticides in integrated mosquito management-A review. **International Journal of Mosquito Research**, 2015.

TRIPATHI, A. K. *et al.* A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, 2009.

VONTAS, J. *et al.* Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 104(2), 126-131, 2012.

VIEIRA, L. R. *et al.* Proteomics analysis of zebrafish larvae exposed to 3,4-dichloroaniline using the fish embryo acute toxicity test. **Environmental toxicology**, 2020.

WHO; FAO. **Guidelines for the registration of microbial, botanical and semio chemical pest control agents for plant protection and public health uses**, 2017. Disponível em: https://www.who.int/whopes/resources/WHO_HTM_NTD_WHOPES_2017.05/en/. Acesso em: 10 fevereiro 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Washington DC, 2017. **Dengue media centre: Dengue and Haemorrhagic Fever**. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/>. Acesso em: 10 fevereiro 2022.