



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

PEDRO MATHEUS SOUSA TABOSA

POTENCIALIZAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DAS TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* PELO INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE *Albizia lebbek* CONTRA LARVAS DO GÊNERO *Aedes*

FORTALEZA

2023

PEDRO MATHEUS SOUSA TABOSA

POTENCIALIZAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DAS TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* PELO INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE *Albizia lebbek* CONTRA LARVAS DO GÊNERO *Aedes*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

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

FORTALEZA

2023

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)

- T117p Tabosa, Pedro Matheus Sousa.
Potencialização da atividade larvicida das toxinas de *Bacillus thuringiensis* pelos inibidores de tripsina de sementes de *Bacillus thuringiensis* contra larvas do gênero *Aedes* / Pedro Matheus Sousa Tabosa. – 2023.
75 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho.
1. inibidor de protease. 2. proteínas Cry. 3. larvicida. 4. arboviroses. I. Título.

CDD 572

PEDRO MATHEUS SOUSA TABOSA

POTENCIALIZAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DAS TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* PELO INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE *Albizia lebbek* CONTRA LARVAS DO GÊNERO *Aedes*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em 03/03/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Profa. Dra. Marina Duarte Pinto Lobo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Thiago Silva de Almeida
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE)

Aos meus pais, Ednaldo e Vanderlucia, e irmão,
Arthur.

Para minha esposa, Thaís.

Sempre por vocês.

Com muito amor.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Além disso, este estudo foi financiado pelo Programa de Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde - PPSUS. Decit/SCTIE/MS, pelo intermédio do CNPq, o apoio do Funcap e SESA. Número de concessão 3896340/2017. Agradeço à Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Departamento de Biologia. Agradeço ao Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais, onde foi realizada a maioria dos experimentos. Agradeço também aos alunos, amigos e professores do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia, Laboratório de Toxinas Vegetais/UFC, Laboratório de Espectrometria de Massa e Proteômica/UFC e ao Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias/UFPB.

Não existe começar esses agradecimentos sem pensar mais uma vez naqueles que me deram tudo desde que nasci. Eu agradeço e dedico toda a minha caminhada aos meus pais: **Ednaldo** e **Maria Vanderlucia**, e ao meu irmão, **Pedro Arthur**. Eu agradeço a **Deus** por ter colocado vocês na minha vida. Vocês são a base de tudo o que foi traçado. Não existe como não dizer obrigado por tudo que vocês fizeram, fazem e são para mim. Durante toda essa caminhada, tirei forças de vocês, as pessoas que mais amo nesse mundo, para que sintam orgulho de mim assim como eu sinto de ser o primeiro “Doutô” da família.

À minha bebéia, minha nega, minha eterna namorada e, agora, minha esposa **Thais Borges**. Meu amor, muito obrigado por tudo que você fez e faz por nós. Muitos dias ao longo deste ciclo de quatro anos, eu pensei em desistir, mas você segurava minha mão e dizia que tudo daria certo e que iríamos conseguir. Com a pandemia, tudo ficou ainda mais difícil, contudo, continuamos. E se eu não desisti dessa jornada, foi graças a você também. Sempre espero ser pelo menos metade do que você representa para mim. Eu amo muito você.

Neste parágrafo dedico todo o meu agradecimento à professora **Ana de Fátima Fontenele U. Carvalho**. A senhora não sabe o quanto mudou minha vida por receber aquele aluno de graduação de ciências biológicas há mais de 10 anos. A senhora foi e é a fonte de inspiração e admiração, não só para mim, mas por todos os alunos que conheceram a senhora. Suas palavras, na maioria das vezes poéticas, foram usadas para educar, aconselhar, criticar e apresentar o mundo da ciência para nós. Muito obrigado, Profa. Ana!

Para meu amigo e coorientador, também desde a graduação, **Luiz Carlos Filho**, posso dizer que mais uma vez completamos uma nova metamorfose na nossa vida holometábola. Você é uma pessoa maravilhosa que me guiou nos caminhos da bioquímica e sempre vou desejar o mundo de maravilhas para você. Nesse ciclo do laboratório que encerra (ou pelo menos por enquanto), vou sentir falta das nossas conversas, fofocas, de apertar tuas costelas e da nossa farofa de alho. Muito obrigado por tudo, Lczinho.

Aos amigos que fiz no Bioprospec, minha segunda casa, à **Profª Erika Mota, Thiago Almeida, Berenice Alves, Davi Farias, Martônio Viana, Joaquim Lopes, Emanuel Francelino e Felipe de Castro, Leonardo Vieira, Rute Xavier, Lady Clarissa Rocha, Profª Marina Lobo, Seu Valdenor**. Muito obrigado pelo tempo de vocês e por terem feito parte deste sonho de muito trabalho. Além deles, pelos meus amigos, **Ênio Victor, Jorge Thé, Iago Oliveira, Luna Vasconcelos, Marianny Kellen, Marcos Vieira** que sempre aparecem no momento certo para perguntar “onde vai ser rolê?”. Vocês são maravilhosos.

Um agradecimento especial ao meu professor de ciências **Nonato** que me inspirou quando criança em todas as suas aulas teóricas e dentro do pequeno Laboratório de Ciências do Colégio Andrade e Silva. Consegui graças a ele e todos os meus amigos e agregados do CAS, **Hildalyce, Aline, Daniel, Annah, Alexandra, Regiane, Thays, Amilcar e Andressa** que me proporcionaram momentos inesquecíveis nos nossos encontros. Quero continuar ao lado de vocês sempre.

Por último, mas não menos importante, gostaria de usar as palavras do rapper Snoop Dogg e agradecer a **mim mesmo**. Não foram poucos os momentos difíceis, sejam nas noites adentro com estudos, experimentos longos e que não davam certo, as incertezas do futuro, os problemas pessoais, mas continuei e continuei. Isso é uma vitória gigantesca para mim e foi fruto de muito esforço. E caso você leia isso daqui a muitos anos e tenha alguma dúvida sobre seu potencial, vá em frente. **VOCÊ CONSEGUE!**

RESUMO

Os mosquitos como *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* têm chamado a atenção mundial por serem responsáveis pela transmissão de vários vírus, como a dengue, chikungunya e Zika. Existem diversos programas e estratégias para evitar o aumento e tentar diminuir o número de casos dessas doenças, sendo a principal aquela por meio do combate aos vetores. Dentre as formas de controle, as moléculas naturais como os inibidores de tripsina podem ser utilizadas para redução das populações desses insetos, sendo estas de baixa toxicidade aos organismos não-alvos e de maior biodegradabilidade. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a potencialização das toxinas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) por um inibidor de tripsina de sementes de *Albizia lebbbeck* (L.) Benth sobre o desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*, bem como avaliar a toxicidade sobre náuplios de *Artemia* sp. e embriões de *Danio rerio*. O inibidor de tripsina AlsTI purificado das sementes de *A. lebbbeck* foi capaz de inibir a tripsina e as proteases intestinais das larvas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. O AlsTI foi confirmado em uma única banda em condições não redutoras no SDS-PAGE com uma massa molecular aproximada de 20 kDa e os dados do sequenciamento parcial mostraram que este inibidor pertence ao grupo do tipo Kunitz. Além disso, o inibidor de tripsina apresentou resistência quando submetido a diferentes condições de temperatura, pH e a condições redutoras. As toxinas de *Bt* demonstraram toxicidade (CL₅₀ e CL₂₀) às larvas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, onde os danos no intestino médio foram confirmados pelas análises histológicas. Somado a isso, o AlsTI foi capaz de aumentar a mortalidade das larvas de *Ae. aegypti* quando combinado com as proteínas tóxicas do *Bt* cerca de duas a três vezes, mas o mesmo não aconteceu para as da espécie *Ae. albopictus*. Em organismos não-alvo, a toxicidade destas moléculas não foi observada quando testadas combinadas ou separadas contra náuplios de *Artemia* sp. Contudo, 20% de mortalidade em embriões de *Danio rerio* foi observada, tanto com as toxinas do *Bt* quanto em combinação com o inibidor. Os resultados encontrados neste trabalho podem ser utilizados na produção de novos bioinseticidas contra insetos transmissores de doenças do gênero *Aedes*.

Palavras-chave: inibidor de protease; proteínas Cry; larvicida; arbovíroses.

ABSTRACT

Aedes aegypti and *Ae. albopictus* have attracted worldwide attention because they are responsible for the transmission of several viruses, such as dengue fever, chikungunya and Zika. There are several programs and strategies to avoid the increase in number of cases of these diseases, such as by combating vectors. Natural molecules, such trypsin inhibitors, with no or low toxicity to non-target organisms and greater biodegradability can be used to reduce the populations of these insects. Thus, the objective of this work is to evaluate the potentiation of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxins by a trypsin inhibitor from *Albizia lebbbeck* (L.) Benth seeds on the development of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, as well as to evaluate the toxicity on non-target organisms. The trypsin inhibitor AlsTI purified from *A. lebbbeck* seeds was able to inhibit trypsin and intestinal proteases of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* larvae. The AlsTI was confirmed as a single band on SDS-PAGE under non-reducing conditions with an approximate molecular mass of 20 kDa and partial sequencing data showed that this inhibitor belongs to the Kunitz-type group. In addition, the trypsin inhibitor showed resistance when subjected to different conditions of temperature, pH and reducing conditions. *Bt* toxins demonstrated toxicity (LC₅₀ and LC₂₀) against the larvae of both species and the midgut damage was confirmed by histological analyses. In parallel, AlsTI was able to increase the mortality of *Ae. aegypti* larvae when combined with the *Bt* toxins about two to three times, but the same did not happen for the *Ae. albopictus*. In non-target organisms, the toxicity of these molecules was not observed when tested combined or separately against *Artemia* sp. nauplii. However, a 20% mortality in *Danio rerio* embryos both in *Bt* toxins and in combination with the inhibitor was observed. The results obtained in this work may be used in the production of new bioinsecticides against insects that transmit diseases of the genus *Aedes*.

Keywords: protease inhibitor; protoxins; larvicidal; arbovirus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Nível de suscetibilidade global das espécies <i>Aedes aegypti</i> e <i>Ae. Albopictus</i>	13
Figura 2 - Representação esquemática do ciclo de vida dos insetos do gênero <i>Aedes</i>	15
Figura 3 - Diferentes padrões de coloração branca dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>	16
Figura 4 - Representação esquemática do mecanismo de ação das proteínas Cry em larvas de lepidópteras.....	21
Figura 5 - Esquema de potencialização da ação das proteínas Cry dos <i>Bacillus thuringiensis</i> pelos inibidores de protease.....	25
Figura 6 - Aspectos gerais da planta <i>Albizia lebbek</i> (L.) Benth e suas estruturas.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BApNA	Benzoil-arginina-p-nitroanilina
BBIs	Inibidores de Bowman-Birk
BCA	Ácido bicinchonínico
BSA	Albumina sérica bovina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Comissão Nacional de Bem-Estar Animal
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGI-Dengue	Estratégia de gestão integrada para a prevenção e controle da dengue
IgM	Imunoglobulina M
IP	Inibidor de protease
OP	Organofosforados
PNCD	Plano Nacional de Controle da Dengue
RIP	Proteína inativadora de ribossomo
SISBIO	Sistema de Autorização e Informações sobre Biodiversidade
SisGen	Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Genéticos e Conhecimento Tradicional Associado
TCA	Ácido tricloacético
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	11
1.1	Insetos.....	11
1.2	Insetos vetores de doenças.....	12
1.3	Gênero <i>Aedes</i>.....	12
1.3.1	<i>Os mosquitos do gênero Aedes e seu ciclo de vida.....</i>	12
1.3.2	<i>Doenças transmitidas por Aedes sp.....</i>	16
1.4	Controle do <i>Aedes sp</i>.....	17
1.4.1	<i>Inseticidas químicos sintéticos.....</i>	18
1.4.2	<i>Moléculas naturais com potencial inseticida.....</i>	19
1.4.2.1	<i>Proteínas Cry oriundas de Bacillus thuringiensis (Bt).....</i>	20
1.4.2.2	<i>Moléculas vegetais com potencial inseticida.....</i>	21
1.5	A planta <i>Albizia lebbek</i>.....	24
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Objetivo geral.....	28
2.2	Objetivos específicos.....	28
3	PERMISSÕES LEGAIS.....	29
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
	REFERÊNCIAS.....	31
	APÊNDICE A - ARTIGO.....	40

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Insetos

Os insetos são encontrados praticamente em todos os lugares do mundo e fazem parte de nossas vidas, sendo facilmente visualizados no dia a dia, como abelhas, borboletas, mosquitos, formigas, entre outras. Esses animais possuem tamanhos variados, podendo ir do diminuto 1 mm até 20 cm de comprimento. Em sua história evolutiva, esses animais foram considerados os primeiros a desenvolver o voo para sua dispersão e se diversificaram na maioria dos continentes (EGGLETON, 2020).

Dentre as principais características desse grupo estão o corpo dividido em cabeça, tórax e abdome, presença de antenas, olhos, dois pares de asas, exceto nas ordens Diptera e Strepsiptera que têm um par de asas, sendo que alguns insetos podem não apresentar. A respiração é traqueal, ou seja, dar-se através de túbulos finos e ramificados que possuem abertura para o contato com o ar atmosférico e, para a reprodução, no segmento abdominal podem ser encontrado os órgãos reprodutivos. Além disso, devido à grande diversidade desse grupo, esses animais podem ser classificados de diversas maneiras tais como predadores, decompositores e parasitas, mas acredita-se que a herbivoria foi a principal responsável por o processo de coevolução, resultando assim, na grande diversidade desses animais. (EICKWORT, 1997; STAHL; HILFIKER; REYMOND, 2018).

Inserido no filo Artropoda, a classe Insecta possui 43 ordens com mais de 1 milhão de espécies já identificadas, contudo estima-se que o número de espécies vivas seja bem maior. Essas espécies de insetos também podem ser classificadas quanto a seu desenvolvimento, estando divididas em: 1. Holometábolos que apresentam uma metamorfose completa durante o seu ciclo de vida (larva, pupa, adulto), sendo essa classificação a que agrupa grande parte das ordens, como Coleoptera, Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera; 2. Hemimetábolos são aqueles que possuem a metamorfose incompleta, ou seja, os jovens apresentam semelhanças com a fase adulta e não apresentam o estágio intermediário de pupa, como os Orthoptera; e 3. Ametábolos que são os insetos que não possuem distinção entre larvas e adultos, como espécies da ordem Thysanura. (CATALOGUE OF LIFE, 2019; JINDRA, 2019).

Devido essas e outras características, é evidente que os insetos apresentam uma enorme diversidade e mostram sua importância para a manutenção da vida no planeta, pois servem de fonte de alimento para outros animais e até mesmo para os humanos, polinizam as plantas, alimentam-se dos restos de outros seres vivos, atuando como “limpadores” do meio

ambiente, dentre outras atividades (RAHEEM *et al.*, 2019). Contudo, os insetos ainda são considerados grandes obstáculos para o desenvolvimento humano, uma vez que podem ser responsáveis por perdas na agricultura devido a sua herbivoria, como também por serem vetores de inúmeras doenças (LOUNIBOS, 2002; LETA *et al.*, 2018).

1.2 Insetos vetores de doenças

Muitas das zoonoses transmitidas para humanos são causadas, principalmente, por artrópodes. Estes atuam como vetores de diversos patógenos que acarretam prejuízos à economia e à saúde humana (CUTLER *et al.*, 2010; BLOOM; CADARETTE, 2019). Dentre as doenças infecciosas no mundo, as que são transmitidas por insetos representam 17% e estima-se que 80% da população mundial encontra-se em áreas de risco, sendo contabilizadas mais de 700 mil mortes anualmente (WHO, 2020). Isso ocorre porque as mudanças socioambientais, como urbanização, mudanças climáticas, expansão e intensificação agrícola, desmatamento, exploração de recursos naturais e movimento populacional facilitam a transmissão dessas doenças (HALBACH *et al.*, 2017; WILSON *et al.*, 2020).

Para os insetos transmissores, os mosquitos são os principais representantes na transmissão de doenças como malária, febre amarela, encefalite japonesa, dengue, chikungunya e Zika, aos humanos (RÜCKERT; EBEL, 2018; CARVALHO; LONG, 2021). Dentre esses, os principais gêneros de mosquitos transmissores descritos atualmente são do grupo *Anopheles*, *Mansonia*, *Haemagogus*, *Aedes* e *Culex* (FRANKLINOS *et al.*, 2020).

Durante as últimas décadas, os estudos ecológicos e evolutivos dos insetos transmissores de doenças e dos patógenos foram os responsáveis pelo avanço no desenvolvimento de novas estratégias para o combate desses vetores, ou seja, mosquitos (*Anopheles*, *Aedes* ou *Culex*), moscas (*Glossina* e flebotomíneos) ou triatomíneos (*Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*) (GUBLER, 1998; WILSON *et al.*, 2020). E apesar de existir diversas maneiras de combate, grande parte do controle epidemiológico dessas doenças em seres humanos é feita através do controle químico e biológico das populações de insetos (SHAW; CATTERUCCIA, 2019).

1.3 Gênero *Aedes*

1.3.1 Os mosquitos do gênero *Aedes* e seu ciclo de vida