



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

MARIANA SILVA REBOUÇAS

**POTENCIALIZAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE PROTEÍNAS TÓXICAS
DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE *Aedes aegypti* PELO INIBIDOR DE PROTEASES DE
SEMENTES DE *Lonchocarpus sericeus* (POIR) KUNTH EX DC.**

FORTALEZA

2024

MARIANA SILVA REBOUÇAS

**POTENCIALIZAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE PROTEÍNAS
TÓXICAS DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE *Aedes aegypti* PELO INIBIDOR DE
PROTEASES DE SEMENTES DE *Lonchocarpus sericeus* (POIR) KUNTH EX DC.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Ciências Biológicas do Centro de
Ciências da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Erika Freitas Mota.

Co-orientador: Dr. Luiz Carlos Pereira Almeida Filho.

FORTALEZA

2024

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)

- R241p Rebouças, Mariana Silva.
Potencialização da atividade larvívora de proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* sobre *Aedes aegypti* pelo inibidor de proteases de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (Poir) Kunth ex DC / Mariana Silva Rebouças. – 2024.
47 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Erika Freitas Mota.
Coorientação: Prof. Dr. Luiz Carlos Pereira Almeida Filho.
1. Infecções por arbovírus. 2. Sinergismo farmacológico. 3. Inibidores de proteases. 4. *Aedes aegypti*. 5. Ingá bravo. I. Título.
-

MARIANA SILVA REBOUÇAS

**POTENCIALIZAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE PROTEÍNAS
TÓXICAS DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE *Aedes aegypti* PELO INIBIDOR DE
PROTEASES DE SEMENTES DE *Lonchocarpus sericeus* (POIR) KUNTH EX DC.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Ciências Biológicas do
Centro de Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 31/07/2024

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Erika Freitas Mota. (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Luiz Carlos Pereira Almeida Filho. (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Dr. Pedro Matheus Souza Tabosa.
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e a **Nossa Senhora**.

Aos meus pais, **Luiz Lourdiniz Rebouças** e **Maria Denise Silva Rebouças** e irmão **Pedro Diniz Rebouças** grandes incentivadores de toda minha graduação, sendo peças fundamentais nessa conquista.

A **Beatriz Cândido Vieira**, meu ponto de equilíbrio ao caos dos meus dias, agradeço a escuta, convivência, força e amor depositados em mim durante toda a graduação. Por não ter me deixado desistir.

As minhas amigas de infância e adolescência, **Natália Saraiva** e **Isadora Colaço**, que mesmo sendo de outra área, perguntavam nos nossos encontros da minha pesquisa e dos meus mosquitinhos.

Aos membros do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais
BIOPROSPEC:

A **Profa. Dra. Erika Freitas Mota**, pela orientação, direcionamento, conselhos e acolhimento em todos os momentos, sempre feliz com minhas conquistas e buscando sempre me ajudar em tudo.

Ao **Dr. Luiz Carlos Pereira Almeida Filho** por ser tão parceiro durante todo esse processo, pelas palavras de encorajamento, motivação, momentos que demandava paciência e pelas cobranças sempre tentando me convencer da minha capacidade de ser melhor sempre.

A **Profa. Dra. Marina Lobo** pelas palavras de conforto aos meus nervosismos, as conversas descontraídas e por ser a pessoa mais reluzente do BIOPROSPEC.

Ao **Prof. Carlos Eduardo Tolussi**, mesmo que recém-chegado e de breve convivência, teve colaborações válidas para a minha construção acadêmica.

Aos meus grandes amigos **Miquelvia Ribeiro**, **Larissa Rocha**, **Raimundo Victor Costa** e **Vinícius Souza**, por todos os dias que foram mais leves na companhia de vocês, todas as risadas, brincadeiras, palavras cruzadas e partidas de minigolfe no plato foram essenciais. O orgulho que tenho de ver o sucesso de vocês é inexplicável. Obrigada por não desistirem da minha amizade e me fazer presente mesmo ausente em vários momentos.

Ao **Dr. Pedro Matheus Souza Tabosa**, por compor a banca da minha defesa, pelas brincadeiras e incentivos nos breves momentos de visita no laboratório.

E a todos que de alguma forma fizeram parte diretamente ou indiretamente deste trabalho.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”. (George Bernard Shaw).

RESUMO

Doenças transmitidas por vetores constituem um problema de saúde pública mundial. No Brasil, o principal vetor de preocupação é o *Aedes aegypti*, responsável por transmitir arboviroses como dengue, febre Zika e chikungunya. O principal método de prevenção é o combate à proliferação do vetor. Para isso, na maioria das vezes são usados compostos químicos sintéticos, o que pode causar desequilíbrios ambientais e o surgimento de populações de vetores resistentes. Dessa forma, estudos com bioinseticidas surgem como uma alternativa sustentável e que possivelmente consiga diminuir o aparecimento de populações resistentes. Entre os bioinseticidas mais pesquisados estão compostos bioativos extraídos de plantas, como os inibidores de proteases. Outra classe de bioativos são as proteínas *Cry* de *Bacillus thuringiensis*, que causam mudanças no organismo através da formação de poros na membrana intestinal de alguns insetos, como nas larvas de *Ae. aegypti*. Dessa forma, os objetivos deste trabalho se concentraram em avaliar a potencialização da atividade larvicida das proteínas *Cry* proveniente de *B. thuringiensis* através do sinergismo com inibidores de proteases de *Lonchocarpus sericeus* (LsCTI). O inibidor foi obtido através de cromatografia de afinidade à tripsina. A concentração letal para 20% das larvas (CL_{20}) foi encontrada a partir da exposição de larvas de *Ae. aegypti* a diferentes concentrações de toxina *Cry*. Os ensaios sinérgicos foram conduzidos com diferentes concentrações de LsCTI, observando a atividade larvicida para cada combinação com a concentração da CL_{20} fixa. O sinergismo de LsCTI com proteínas *Cry* produziu bons resultados, observando-se mortalidade de 80% combinado à CL_{20} em concentrações tão baixas quanto $12,5 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Análise histológica revelou um adelgaçamento avançado do epitélio intestinal médio larval, indicando efetividade na combinação dos dois compostos. Os resultados mostram que a combinação de LsCTI e proteínas *Cry* possui eficácia como larvicida, sugerindo um potencial uso para o controle desses vetores com menor impacto em organismos não-alvo.

Palavras-chave: Arboviroses, sinergismo, ingá-bravo.

ABSTRACT

Vector-borne diseases constitute a global public health problem. In Brazil, the primary vector of concern is *Aedes aegypti*, responsible for transmitting arboviruses such as dengue, Zika fever, and chikungunya. The main prevention method is combating the proliferation of the vector. To achieve this, synthetic chemical compounds are often used, which can cause environmental imbalances and lead to the emergence of resistant vector populations. Therefore, studies on bioinsecticides emerge as a sustainable alternative that may reduce the occurrence of resistant populations. Among the most researched bioinsecticides are bioactive compounds extracted from plants, such as protease inhibitors. Another class of bioactives are the *Cry* proteins from *Bacillus thuringiensis*, which cause changes in the organism by forming pores in the intestinal membrane of some insects, such as *Ae. aegypti* larvae. Thus, the objectives of this work focused on evaluating the enhancement of the larvicidal activity of *Cry* proteins from *B. thuringiensis* through synergism with protease inhibitors from *Lonchocarpus sericeus* (LsCTI). The inhibitor was obtained through trypsin affinity chromatography. The lethal concentration for 20% of the larvae (LC₂₀) was determined by exposing *Ae. aegypti* larvae to different concentrations of *Cry* toxin. Synergistic assays were conducted with different concentrations of LsCTI, observing the larvicidal activity for each combination with the fixed LC₂₀ concentration. The synergism of LsCTI with *Cry* proteins produced good results, with 80% mortality observed when combined with LC₂₀ at concentrations as low as 12.5 µg/mL⁻¹. Histological analysis revealed significant thinning of the larval midgut epithelium, indicating the effectiveness of the combination of the two compounds. The results show that the combination of LsCTI and *Cry* proteins is effective as a larvicide, suggesting potential use for controlling these vectors with reduced impact on non-target organisms.

Keywords: Arbovirus; synergism, ingá-bravo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Distribuição da taxa de incidência de Dengue, Chikungunya e febre Zika por município, Brasil,2022.....	15
Figura 2	- Número de casos até março de 2024 de Dengue por município, Brasil, 2024.....	17
Figura 3	- Ciclo de vida <i>Aedes aegypti</i>	20
Figura 4	- Análise eletroforética por SDS-PAGE 15%.....	32
Figura 5	- Morfologia interna das larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de incubação nos tratamentos.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 -Perfil cromatográfico da fração proteica de sementes de *Lonchocarpus sericeus* extraído em TCA 5% (LsF5) solubilizada em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 e aplicada em coluna de matriz de Sepharose 4B com tripsina acoplada. Fração retida eluída com adição de HCl 0,05 M. 1: pico não-retido; 2: pico retido.
..... 30
- Gráfico 2 Inibição de LsCTI sobre o macerado dos intestinos médios das larvas e sobre o substrato estoque. (A) Atividade residual de LsCTI em diferentes microgramas no bioensaio específico para quimotripsina onde CRA(*chymotripsin residual activity*) com substrato estoque e CLRA (*chymotripsin like residual activity*) do macerado das larvas (B) Atividade residual de LsCTI em diferentes microgramas no bioensaio específico de tripsina onde TRA(*tripsin residual activity*) e TLRA(*tripsina like residual activity*) sobre os mesmos parâmetros do bioensaio anterior..... 33
- Gráfico 3 - Taxa de sobrevivência quando em sinergismo entre as moléculas, expostas a água, toxinas *Bt* e LsCTI separadamente por 24 h
..... 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
TCA	Ácido tricloroatcético
BSA	Albumina sérica bovina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
BApNa	Benzoil arginina nitroanilida
BTpNA	Benzoil tirosina paranitroanilida
DENV	Vírus da Dengue
ZIKV	Vírus da Zika
CHIKV	Vírus da Chikungunya

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Insetos vetores de doenças.....	13
2.2 Arboviroses.....	14
2.2.1 Dengue	15
2.2.2 Zika Vírus	17
2.2.3 Chikungunya.....	18
2.3 <i>Aedes sp.</i> e seu ciclo de vida.....	18
2.4 Controle de vetores	20
2.4.1 Inseticidas químicos	21
2.4.2 Bioinseticidas.....	21
2.5 Proteínas vegetais com potencial inseticida	23
2.5.1 Inibidores de proteases	24
2.6 <i>Lonchocarpus sericeus</i>	25
3. OBJETIVO	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. METODOLOGIA	26
4.1 Obtenção do inibidor de proteases da semente de <i>L. sericeus</i>	26
4.2 Dosagem de proteínas solúveis.....	27
4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	27
4.4 Cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> e obtenção de proteínas <i>Cry</i>	28
5. BIOENSAIOS.....	28
5.1 Atividade inibitória <i>in vitro</i> do inibidor de protease contra as proteases intestinais de larvas de <i>Ae. aegypti</i>	28
5.2 Avaliação do sinergismo entre as proteínas <i>Cry</i> e LsCTI.....	29
5.3 Análise histológica das larvas de <i>Ae. aegypti</i>	29
5.4 Análises estatísticas.....	30

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
6.1 Purificação do LsCTI	30
6.2 Eletroforese.....	31
6.3 Bioensaios.....	32
6.3.1 Determinação da atividade enzimática.....	32
6.4 Determinação da Concentração Letal em 20%.....	34
6.5 Avaliação do sinergismo entre as proteínas <i>Cry</i> e LsCTI.....	34
6.6 Análise histológica	36
7.CONCLUSÃO	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

Os artrópodes que carregam e disseminam agentes patogênicos, conhecidos como insetos vetores de doenças, representam uma séria ameaça à saúde humana na atualidade. Estatísticas indicam que aproximadamente 700.000 óbitos ocorrem anualmente em todo o globo devido às doenças transmitidas por vetores (DTV) (OMS, 2020). Dentre as doenças mais destacadas transmitidas por esses insetos estão a malária, a dengue, a febre Zika, a febre amarela e a febre chikungunya, frequentemente categorizadas como "doenças tropicais negligenciadas" (Hortez, 2016; Tidman; Abela-Ridder; De Castañeda, 2021).

Os mosquitos (Culicidae) são os principais vetores de doenças, encontrados sobretudo em regiões subtropicais e tropicais pelo mundo (Kraemer *et al.*, 2015). Destaca-se entre eles o *Aedes aegypti*, um mosquito com fêmeas antropofílicas e hematófagas que carrega consigo quatro dos arbovírus distintos: Dengue, febre Zika, Chikungunya e Febre Amarela (Muktar, 2016; Souza-Neto, 2019). A dengue é a arbovirose mais prevalente globalmente, afetando cerca de 100 milhões de pessoas anualmente (Bhatt, 2013).

Por conta do processo inicial do desenvolvimento e testagem de vacinas, inexistência de antivirais específicos e medidas de prevenção eficazes, o controle do mosquito emerge como a principal estratégia para lidar com essas doenças (Pontual *et al.*, 2014). Dentre as diversas abordagens de controle de vetores, destaca-se o uso de inseticidas químicos sintéticos, como piretróides, organofosforados e organoclorados, que têm sido amplamente empregados por cerca de oito décadas (Maharaj, 2011).

O uso excessivo e constante desses produtos muitas vezes resulta no desenvolvimento de resistência nos mosquitos e na contaminação de organismos não-alvo (Van Den Berg *et al.*, 2021). Como resultado, há um crescente interesse na pesquisa de alternativas mais sustentáveis (Pontual *et al.*, 2012; Sarwar, 2014). Entre essas alternativas, destacam-se os bioinseticidas, que podem ser compostos por organismos vivos ou moléculas derivadas de processos metabólicos como as cepas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), bactérias gram-positivas, que produzem toxinas proteicas inseticidas, tais como as proteínas *Cyt* e *Cry*, nocivas para muitas larvas de insetos, mas inofensivas para espécies não-alvo (Muñoz-Garay, 2009; Palma *et al.*, 2014).

Embora os biosinseticidas sejam umas das melhores opções para o controle desses vetores, o uso inadequado do mesmo pode acarretar a formação de populações resistentes, as quais em poucas dezenas de gerações expostas à toxina não se observa relevância quanto à mortalidade larval (Tetreau *et al.*, 2012) caracterizando populações resistentes. Com isso,

fazem-se necessárias combinações com outros bioinseticidas, principalmente aquelas com moléculas bioativas de metabolismo primário e secundário das plantas como as lectinas e inibidores de proteases (De Virgilio *et al.*, 2010; Dang; Van Damme, 2015).

Nesse contexto, os inibidores de protease são reconhecidos por sua atividade potencial como inseticidas (Tabosa *et al.*, 2020). Eles ligam firmemente às proteases encontradas no intestino médio dos insetos, resultando em um aumento na expressão dessas proteases pelo organismo como uma resposta à inibição. Esse aumento pode potencialmente intensificar a ativação das toxinas Bt e, conseqüentemente, sua atividade inseticida (Pardo-Lopez *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2013). LsCTI, um inibidor de tripsina-quimotripsina obtido das sementes de *Lonchocarpus sericeus* (Poir) Kunth ex DC, foi identificado como um notável agente larvicida contra *Ae. aegypti*, demonstrando a capacidade de retardar o desenvolvimento larval e aumentar a taxa de mortalidade (Almeida Filho *et al.*, 2018).

Um bioinseticida proveniente da extração de um inibidor de protease existente nas sementes de *Lonchocarpus sericeus* é capaz de potencializar a ação larvicida das proteínas *cry* produzidas durante a esporulação de *Bacillus thuringiensis*?

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Insetos vetores de doenças

Para que um determinado patógeno seja transmitido para um hospedeiro, pode ser necessário um veículo de transmissão, denominado vetor. Existem 2 tipos distintos de vetores, o vetor biológico, que é o agente etiológico (o causador da doença) e o vetor mecânico um organismo que transmite um agente patogênico de um hospedeiro para outro, mas não é necessário para o desenvolvimento ou multiplicação do patógeno (Santos, 2023). Doenças transmitidas por vetores biológicos são uma preocupação global, pois ao serem inoculadas por artrópodes, esses são responsáveis por 17% das doenças infecciosas que resultam em mortalidade anualmente (OMS, 2020).

Existem vetores de diversas espécies que transmitem uma diversidade de doenças como, mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes*, *Culicini* e *Anopheles* ambos respectivamente vetores de doenças como Dengue, Encefalite japonesa e Malária,

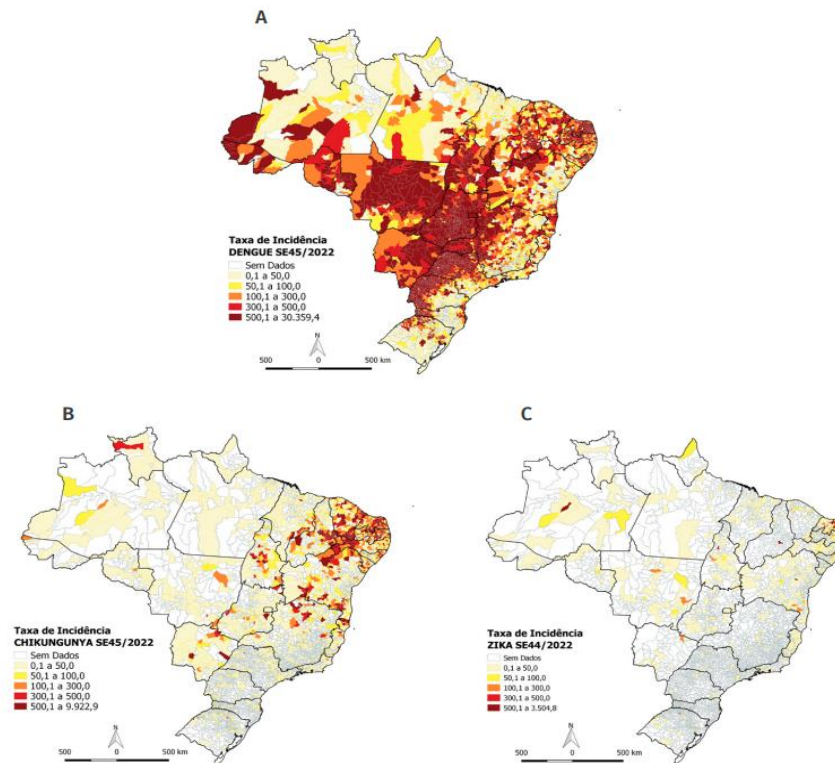
2.2 Arboviroses

O termo arbovírus do inglês “*Arthropod borne virus*” ao qual não tem significado filogenético ou de classificação. Este termo descreve o mecanismo pelo qual esses vírus são transmitidos e mantidos na natureza: através da picada de um artrópode hematófago. No Brasil, os mosquitos da família Culicidae, pertencentes ao gênero *Aedes*, do subgênero *Stegomyia* são os responsáveis isolados pela proliferação de Dengue, Chikungunya e febre Zika. Devido aos seus vetores, as arboviroses geralmente se manifestam de acordo com o vírus envolvido na transmissão e em função da temperatura ambiental podendo assim ocorrer durante todo o ano nos trópicos (Roehrig, 2009).

Nos últimos anos, a incidência de doenças causadas por arbovírus apresentou um aumento global relevante que está correlacionado a fatores como dispersão geograficamente mais extensiva e rápida dos vírus em razão do crescimento intensivo dos sistemas de transporte globais, adaptação dos vetores à urbanização crescente, incapacidade de conter a população de mosquitos e alterações em fatores ambientais (Gould *et al.*, 2017).

No Brasil, atualmente, os arbovírus de maior circulação e importância epidemiológica pertencem aos gêneros Flavivirus (Dengue, Zika) e Alphavirus (Chikungunya) como mostram dados do ministério da saúde na Figura 1, de 2022. Considerando que as arboviroses urbanas são Doenças Relacionadas ao Saneamento Ambiental Inadequado (DRSAI) (Funasa, 2010) as medidas de controle devem envolver, prioritariamente, o manejo adequado das águas e dos resíduos nos domicílios e o combate de seus vetores.

Figura 1- Distribuição da taxa de incidência de dengue, chikungunya e Zika, por município, Brasil,2022.



Fonte: Ministério da saúde

2.2.1 Dengue

A Dengue é uma arbovirose transmitida ao homem pela picada do mosquito fêmea infectado de *Ae. aegypti*. Ocorre repentinamente e tem uma alta taxa de incidência, causando surtos em grande escala que levam a graves emergências de saúde pública (OMS, 2009). Segundo Tayal, Kabra e Lohda (2023), o vírus da dengue possui 4 sorotipos: DENV 1, 2, 3, 4 e 5 (Mustafa *et al.*, 2015) podendo ou não ter duas infecções simultânea.

A manifestação com um sorotipo torna o infectado imune ao mesmo, no entanto, a reinfeção com diferentes sorotipos podem ocorrer aumentando o risco de desenvolver uma série de sintomas que caracterizam um estado da doença mais acentuado. É uma doença febril aguda, caracterizada por manifestações clínicas, que variam de casos assintomáticos, sintomáticos e hemorrágicos.

A doença progride geralmente por três fases distintas: febril, crítica e de recuperação. Embora a maioria dos pacientes tenha uma evolução clínica compassiva e se recupere

completamente durante o curso da doença, uma proporção pode desenvolver formas graves, inclusive óbito (Brasil, 2024).

São fatores de risco para casos graves: a cepa do sorotipo do vírus infectante, o estado imunitário e genético do paciente, a concomitância com outras doenças e a infecção prévia por outro sorotipo viral da doença (Figueiredo; Fonseca, 1996). Infelizmente existe variação no atendimento clínico e a dengue tem alta morbidade e mortalidade em muitos países endêmicos (Kalayanarooj; Rothman; Srikiatkachorn, 2017). Atualmente, nenhum anti-DENV é aprovado para uso (Kaptein *et al.*, 2021).

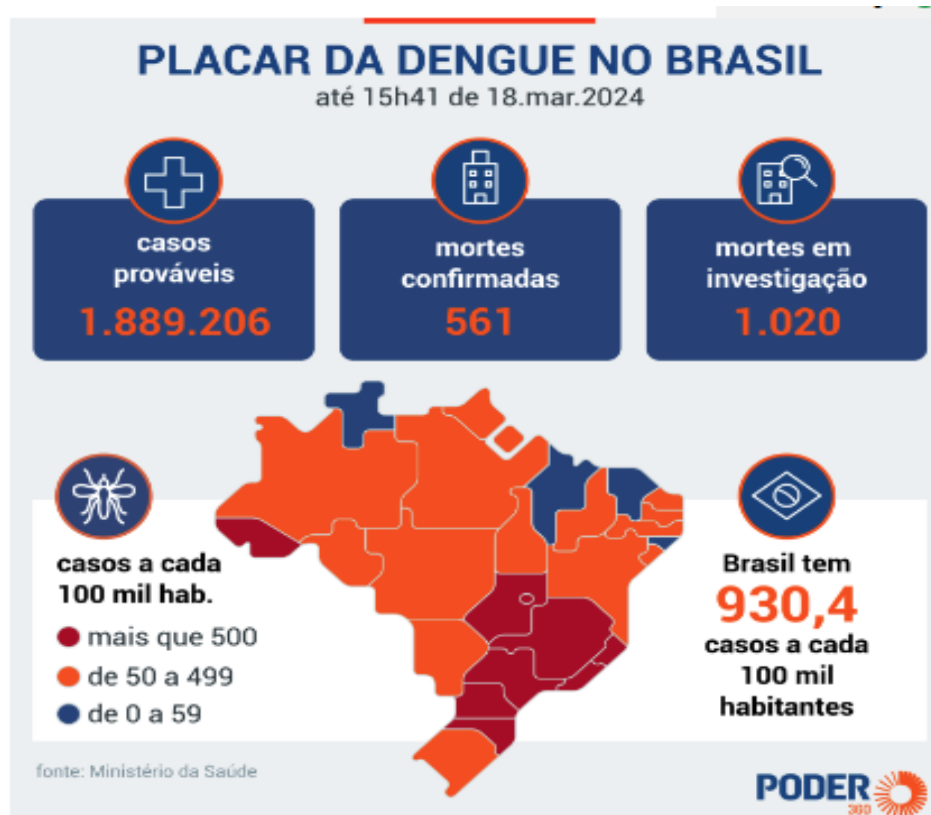
Os casos notificados de dengue aumentaram drasticamente (em mais de 300% desde 2009) e hoje 3,9 bilhões as pessoas estão em risco em 128 países aos quais mais de 100 são endêmicos para dengue com populações afetadas vivendo na África, Ásia e América Latina (Messina *et al.*, 2019). De acordo com a sua incidência e taxa de mortalidade, a dengue é classificada como a segunda doença transmitida por vetores mais grave em todo o mundo, depois da malária (OMS, 2024).

Em 2019, o Brasil foi responsável por 70% dos 3 milhões de casos notificados na América Latina por conta de a urbanização acelerada, mal uso de controles químicos, não utilização correta de políticas públicas voltadas ao combate a esses mosquitos e uma temperatura favorável para a proliferação dos mesmos, com uma média de 1.038 mortes por DENV por 100.000 pessoas (Martins *et al.*, 2020). No país, o Ceará apresenta alta incidência de infecção por DENV, sendo responsável por cerca de 20% dos casos entre 2016 e 2020, superado somente pela região Sudeste com 51% (Assis; Do Amaral; De Mendonça, 2014).

Já em 2024, o Brasil possui até março quase 2 milhões de casos suspeitos da doença, com 561 mortes pela mesma já confirmadas, em análise estatística, certa de 1000 casos por 100.000 habitantes mostrando que, a doença está disseminada por completo no país tendo como regiões mais comuns o Sudeste e parte do Nordeste (Figura 2).

Figura 2-Número de casos até março de Dengue por município, Brasil, 2024.

Fonte: Ministério da Saúde



2.2.2 Zika Vírus

A infecção Zika está associada à febre zika, uma doença emergente do século 21 com impacto significativo na saúde pública, principalmente nas Américas (Kazmi *et al.*, 2020). O vírus Zika (ZIKV) é um vírus de RNA não segmentado, envelopado, de fita simples, que pertence à família Flaviviridae. Esse vírus pode ser transmitido por mosquitos (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) (Gutierrez-Bugallo *et al.*, 2019), contato sexual humano (Pletnev *et al.*, 2021), bem como verticalmente atrás de puérperas infectadas que transmite a doença aos seus embriões (Miner, 2017) podendo causar morte fetal, encefalites, mielites e neurite óptica (Paixão *et al.*, 2016).

Segundo o Ministério da Saúde, duas implicações neurológicas graves estão associadas a enfermidade: Síndrome de Guillain-Barré (SGB) condição rara em que o sistema imunológico do indivíduo ataca os nervos periféricos (De Souza Lima *et al.*, 2019) e microcefalia, manifestação mais grave de um espectro de defeitos congênitos (Síndrome congênita associada à infecção pelo Zika vírus).

Medidas de proteção individual para evitar picadas, principalmente para grávidas,

devem ser adotadas por viajantes e residentes em áreas de transmissão: uso de repelente, uso de calça e blusas de manga cumprida para proteção de áreas alvo do mosquito e ao dormir, utilização de véus popularmente chamados de mosquiteiros.

2.2.3 Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHIKV) causa uma enfermidade reemergente que pertence à família dos Alphavírus, também transmitido por *Ae. aegypti* tem toda uma atenção quanto a preocupação sanitária (Pialoux *et al.*, 2007). A infecção por CHIKV é geralmente caracterizada por um quadro agudo início de febre, erupção cutânea e artralgias, e é frequentemente acompanhado por dor de cabeça, inchaço nas articulações e conjuntivite. Em contrapartida ao vírus da dengue (DENV), a infecção por CHIKV está associada a poliartralgias e poliartrites recorrentes e altas taxas de infecções assintomáticas (Viasus *et al.*, 2015).

A transmissão de CHIKV mais comumente relatada está associada a populações periurbanas e urbanas de *Ae. aegypti*, mas, nas últimas décadas, *Ae. albopictus*, originalmente um zoofílico (preferindo não humanos, sangue animal) tornou-se cada vez mais importante como vetor do CHIKV (Longbottom *et al.*, 2023)

No Brasil, a partir de dados retirados no portal do Ministério da Saúde, em 2014 foram registrados 3.192 e em 2023 cerca de 154.800 divididos em todas as regiões do país, tendo como região de predominância de casos a região nordeste com aproximadamente 67%.

2.3 *Aedes sp.* e seu ciclo de vida

O *Ae. aegypti* é um mosquito cosmopolita extremamente adaptado aos ambientes domésticos, atuando como vetor urbano de alguns arbovírus importantes para o homem, como DENV, ZIKV, CHIKV e o vírus da febre amarela (YFV) (Kraemer *et al.*, 2015). A urbanização de populações humanas em áreas tropicais sem saneamento básico e infraestrutura aumentou a gama de arboviroses transmitidas por *Ae. aegypti* devido à sua ocorrência em áreas antes livres de doenças transmitidas por esse mosquito (Carvalho; Moreira, 2017).

Ao contrário de outros mosquitos da mesma família, as fêmeas do *Ae. aegypti* se alimentam durante o dia, que preferencialmente, sua coleta de sangue, ocorre no início da manhã e/ou antes do anoitecer. Uma vez que o sangue infectado é absorvido pelo mosquito, o vírus passa por um período de incubação, que pode variar de alguns poucos dias até uma

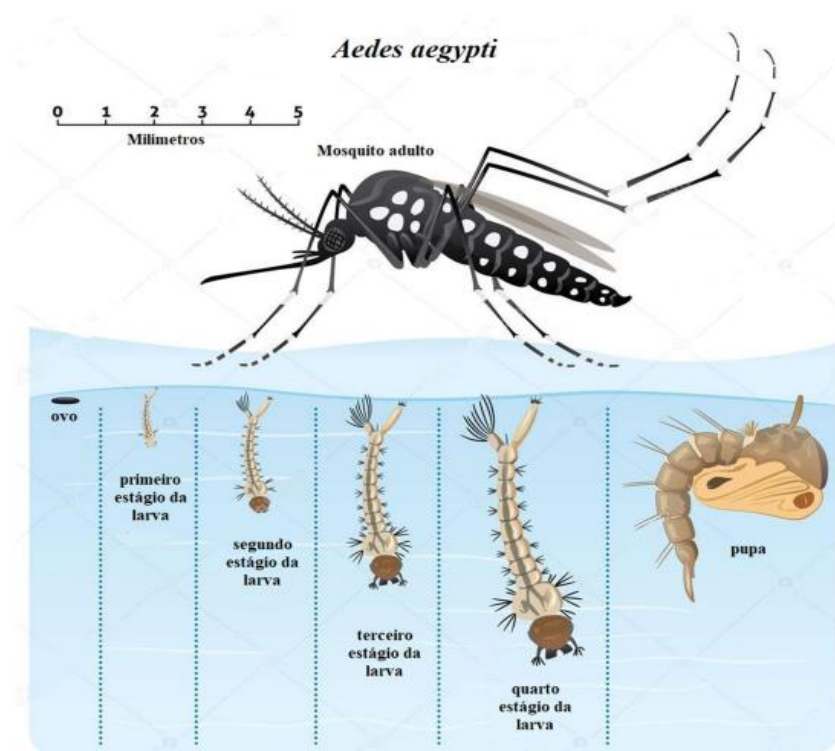
semana, a depender de fatores como a população de mosquitos e a cepa viral localizada principalmente nas glândulas salivares onde é liberada junto com a saliva durante a hematofagia (Fernandes *et al.*, 2020).

Seu ciclo de vida é classificado como holometábolo, com desenvolvimento indireto em 4 estágios distintos: Os ovos são depositados pelas fêmeas em água parada para desenvolvimento em larvas de 4 estágios diferentes, se alimentando de micro-organismos até o próximo estágio de pupa, considerado intermediário, no qual o mosquito se desenvolve dentro de uma casca protetora impossibilitando sua alimentação até o final do ciclo com o indivíduo adulto emergindo da água para alçar seus primeiros voos (Figura 3). Esse ciclo pode ocorrer em menos de uma semana e por isso sua proliferação é preocupante justificando o incentivo ao combate dos mosquitos ainda nos estágios iniciais.

Esses ovos são resistentes à dessecação, uma vez que podem permanecer viáveis por dias, meses e até anos caso ambiente favorável, sendo esse fenômeno denominado de quiescência (Faull; Williams, 2015). Por ser um mosquito generalista, preferem colonizar locais com retenção de água, tanto em reservatórios suspensos quanto ao nível do solo, contrastando ou não com a luz, mas preferindo a existência de sombra.

Os principais surtos de proliferação nos centros urbanos são encontrados em reservatórios de água para consumo humano e em objetos descartados indevidamente que acumulam água em períodos de chuva (Abílio *et al.*, 2018). Por esta razão, tratar ambientes aquáticos para eliminar formas imaturas de mosquito também é essencial para reduzir efetivamente os níveis populacionais no campo.

Figura 3- Ciclo de vida *Aedes aegypti*



Fonte: Adaptado de CARVALHO, 2012

2.4 Controle de vetores

O controle dos vetores *Aedes* é a principal forma de prevenir a transmissão de arboviroses. A remoção dos locais de reprodução dos mosquitos pode ser eficaz, mas não é facilmente aplicável onde os habitats das larvas dos mosquitos são pequenos, dispersos e de difícil acesso. Inseticidas podem ser empregados quando adicionados aos criadouros do mosquito ou por meio de aplicações contra mosquitos adultos, incluindo sprays residuais (Vontas *et al.*, 2012). O controle eficiente desses mosquitos tem sido desafiador pela forma de reprodução e disseminação dos mosquitos que, com o avanço das megalópoles, e sua adaptação a ambientes mais insalubres, fazem com o que ocorra uma emergência endêmica.

Dado o surgimento recente da vacina tetravalente para a dengue (Qdenga), administrada em duas doses, existem discussões sobre o futuro da doença. Desenvolvida pela farmacêutica TAKEDA, aprovada em 2021, é composta pelo vírus atenuado enfraquecido que abrange os 4 sorotipos e demonstra uma eficácia global de quase 80% contra a infecção e sobre a prevenção, podendo chegar a 90%. Mesmo com suas contraindicações, o seu uso é recomendado para pessoas de 4 a 60 anos (Kirmse *et al.*, 2014). Essa vacina está disponível no SUS e outra, dessa

vez desenvolvida pelo Instituto Butantan em São Paulo, está sendo desenvolvida como vacina para dose única.

Embora esses avanços laboratoriais, o uso de medidas mitigadoras preventivas para a não proliferação do vetor ainda é uma das formas mais acessíveis e populares de combate ao mesmo.

2.4.1 Inseticidas químicos

O controle químico, com inseticidas de origem orgânica ou inorgânica, é uma das metodologias mais adotadas como parte do manejo sustentável e integrado para a mortalidade de vetores em saúde pública (Rose, 2001). O primeiro inseticida de efeito prolongado, ou propriedade residual, foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), um organoclorado desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial, que ao ser aplicado em paredes e tetos de casas permanecia ativo contra os insetos por vários meses (Rozendaal, 1997). O DDT atua nos canais de sódio, ocasionando o desequilíbrio osmótico sódio-potássio, seu efeito é inversamente proporcional à temperatura, logo quanto mais baixa for a temperatura, mais tóxico será para os insetos (Ware; Whitacre, 2004).

Resistências em populações expostas têm sido detectadas para todas as classes de inseticidas, afetando direta e profundamente, a reemergência de doenças transmitidas por vetores (Brogdon *et al.*, 1998), pois, apesar dos importantes avanços alcançados no desenvolvimento de métodos alternativos, os inseticidas químicos continuam sendo uma importante ferramenta dos programas integrados de controle (Rose, 2001).

Para evitar estas questões, o progresso em estudos e a implementação concreta de outras opções para o combate aos vetores são os bioinseticidas, moléculas com uma abordagem sustentável e amigavelmente alinhada ao meio ambiente.

2.4.2 Bioinseticidas

Vários fatores indicam que os bioinseticidas são excelentes alternativas aos inseticidas sintéticos. Eles são altamente eficazes, específicos para um alvo e têm menos riscos ambientais. Esses inseticidas podem ser derivados de várias partes das plantas, como folhas, caules, sementes ou raízes, de óleos essenciais, com a citronela ou substâncias minerais contendo

produtos químicos naturais que são tóxicos para pragas específicas (Chengala; Nandita, 2017; Lengai *et al.*, 2020).

Os bioinseticidas permitem uma abordagem sustentável para melhoria da produção agrícola, o que deverá aumentar o seu uso e popularidade nos próximos anos (Mishra *et al.*, 2015). Além da derivação vegetal, alguns deles são obtidos através da extração de fungos entomopatogênicos e bactérias. Dentre os micoinseticidas existentes, os que apresentam conídios do fungo *Beauveria bassiana* como ingrediente ativo, sendo muito utilizados e eficientes para o combate de diversas pragas (Senar/SP; Faesp, 2007). Para os bioinseticidas bacterianos, a indústria já estuda de forma repetida o uso de *Bacillus thuringiensis* como principal bioinseticida comerciável. A eficácia dos bioinseticidas pode ser melhorada quando são utilizados em combinação com outros métodos de controle de pragas, tais como o controle biológico como predadores, parasitoides e patógenos naturais (Hoesain *et al.*, 2023)

2.4.2.1 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é o bioinseticida microbiano utilizado para o combate de pragas na agricultura. São bactérias entomopatogênicas, gram positivas aeróbicas encontradas no solo (Bobrowski *et al.*, 2003) caracterizadas pela produção, durante a esporulação, de endotoxinas, que se acumulam e formam um corpo de inclusão cristalina, as quais nas condições alcalinas do intestino médio do inseto interagem resultando na solubilização dos cristais, clivando-os em fragmentos centrais tóxicos liberando as proteínas *Cry* ou *Cyt* que normalmente provocam poros na membrana do intestino médio ligando-se aos receptores localizados no epitélio do órgão (Bravo *et al.*, 2011), causando septicemia e consequente morte do indivíduo (Neto; Batista, 2006; Sansinenea, 2019).

Essa bactéria tem sido utilizada como um bioinseticida, sendo considerada uma alternativa para substituir a aplicação de inseticidas químicos sintéticos na agricultura comercial, no manejo florestal e no controle de mosquitos vetores de uma variedade de doenças humanas e animais principalmente lepidópteros (lagartas), dípteros (mosquitos e insetos), e coleóptera (larvas de besouros) (Sanchis, 2010).

A busca de linhagens de *Bt* com alta atividade tóxica e diferentes especificidades a insetos é de extrema importância tanto para a produção de novos biopesticidas como para a utilização destas linhagens como fonte de genes para a obtenção de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos, por isso o enfoque mais profundo no funcionamento dessas toxinas (Bobrowski *et al.*, 2003).

2.4.1.1. Proteínas *Cry*

Na natureza, as toxinas *Cry*, ao serem produzidas na fase de esporulação da bactéria, são encontradas em sua forma inativa inicialmente, conhecidas como protoxinas (130 kDa). Quando ingeridas pela praga, essas toxinas são clivadas com remoção de aminoácidos, estimuladas pelo pH alcalino no intestino médio, das extremidades das suas moléculas liberando a toxina *Cry*, que por sua vez é clivada por proteases (tripsinas ou quimotripsinas) deixando um fragmento ativo de aproximadamente 60-70 kDa como descrito por Bravo *et al.* (2011).

A ação primária das toxinas consiste na lise das células epiteliais do intestino médio dos hospedeiros com a formação de poros na membrana apical das microvilosidades. As toxinas *Cry* passam a inclusões de oligômeros inseridos na membrana causando extravasamento de íons e morte celular, esse comportamento classificam-nas como toxinas formadoras de poros (Pore-forming toxins) (Parker; Feil, 2005).

2.5 Proteínas vegetais com potencial inseticida

O manuseio de extratos de plantas que apresentam potencial inseticida e o uso de suas substâncias como modelo para a obtenção de compostos sintéticos vem se tornando alvo de estudos que têm como objetivo principal desenvolver alternativas mais seletivas e menos prejudiciais ao meio ambiente (Silva, 2010). Os fitoinseticidas são produtos derivados de plantas utilizados para o controle de insetos, cujo uso tem crescido globalmente. Esse aumento se deve ao fato de que os inseticidas vegetais contêm moléculas biodegradáveis, são menos tóxicos em sua forma natural e são potencialmente adequados para o controle de pragas (Krinski, 2014).

Os inseticidas vegetais são obtidos por meio da extração de substâncias resultantes do metabolismo secundário das plantas que, de acordo com estudos químicos e ecológicos, exercem um importante papel de proteção nas interações dos insetos com as plantas (Viglianco *et al.*, 2008). Essas atividades podem ser geradas através de estratégias que envolvem contato, ingestão ou por ação fulminante (Cespedes *et al.*, 2013; Borges *et al.*, 2019).

Existem algumas famílias de proteínas tóxicas bem conhecidas, como as lectinas, as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs do inglês Ribosome Inactivating Proteins), inibidores de α -amilases, os inibidores de proteases, entre outras (SALES *et al.*, 2000).

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, são proteínas multifuncionais e as mais estudadas são as da família das leguminosas, da tribo Diocleinae (Peumans; Damme, 1998). Foi observado que as lectinas específicas são capazes de se ligarem ao açúcar presente no epitélio do intestino médio de insetos, causando a desnutrição da larva por impedir a absorção de nutrientes.

As RIPs são N-glicosidases específicas para rRNAs, vistas como capazes de inativar a síntese proteica de células animais e que podem também atuar na defesa de plantas contra a herbivoria (Sharma *et al.*, 2004). Os inibidores de α -amilases são capazes de inibir de forma não competitiva a ação da α -amilase por bloquear o acesso ao sítio ativo da enzima, atuando na inibição da digestão do amido, a qual se faz de extrema importância para a digestão e desenvolvimento do indivíduo (Lajolo; Genovese; Menezes, 1996).

2.5.1 Inibidores de proteases

Inibidores de proteases em plantas podem ser capazes de suprimir a atividade enzimática de microrganismos fitopatogênicos. Esses inibidores são proteínas de ampla distribuição no reino vegetal, capazes de inibir as atividades da tripsina, quimotripsina, glucosidase e carboxipeptidase (Bender, 1987; Xavier-Filho; Campos, 1989). De acordo com o modo de ação, os inibidores podem ser enquadrados em dois grupos: inibidores sítio-específicos, que danificam irreversivelmente um aminoácido do sítio ativo, e aqueles que ocorrem naturalmente, os quais podem atuar como pseudosubstratos. Tanto os inibidores sintéticos quanto os naturais imitam o substrato, competindo com ele na ligação com o sítio ativo das proteases.

Esses inibidores ainda podem ser classificados de acordo com o tipo de protease que inibem aos quais são denominados pelos aminoácidos específicos presente no sítio ativo da enzima essenciais para a atividade catalítica (serinas, cisteína, arpartato, treonina e melatoproteases): inibidores de proteases serínicas (regulação da digestão proteica), cisteínicas (regulação do catabolismo de proteínas intracelulares), aspárticas (processamento de peptídeos hormonais), treonínicas (regulação da degradação de proteínas danificadas) e metaloproteases (degradam componentes da matriz extracelular). É importante chamar atenção sobre o fato das proteases serínicas serem as mais abundantes e as mais bem estudadas enzimas proteolíticas da natureza; conseqüentemente seus inibidores também são (Silva-Lopez, 2009).

Em plantas, esses inibidores se acumulam em grandes quantidades nas sementes, mas podem também estar presentes em órgãos de reserva de plantas como tubérculos, onde podem

atuar como agentes regulatórios de proteases endógenas, como proteínas de reserva e mecanismo de proteção direto contra proteases de insetos e/ou de microrganismos patogênicos (De Souza Cândido *et al.*, 2011).

A utilização desses inibidores contra insetos é pertinente, pois as proteases intestinais dos insetos são imprescindíveis aos processos de digestão e absorção de nutrientes (Chapman, 2013). O que acontece é o alimento contendo o inibidor chega ao intestino do inseto e faz com que aconteça a junção do complexo inibidor-protease que desativa a ação catalíticas para o processo digestivo resultando na inibição delas tendo como consequência a má absorção, diminuindo o desenvolvimento corporal e larval e causando a morte por déficit nutricional (Macedo *et al.*, 2015).

Plantas parecem ter desenvolvido inibidores com extraordinárias propriedades contra proteases de insetos. São extremamente resistentes à proteólise e permanecem ativos sob diversas condições de pH, podendo inibir a maioria das classes de proteases conhecidas (Christeller *et al.*, 1994)

2.6 *Lonchocarpus sericeus*

A família Fabaceae inclui cerca de 650 gêneros e 18 mil espécies, o que a coloca como a segunda maior família de leguminosas e a principal quando considerado seu valor econômico. Composta por três subfamílias: Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae, esse conglomerado de indivíduos estão espalhados em todos os continentes.

Lonchocarpus sericeus, pertence a subfamília Faboideae, pode ser encontrado em todos os biomas brasileiros, ocorrendo na caatinga e é conhecido como ingá-bravo, cabelouro da caatinga. A planta contém uma série de compostos químicos, incluindo alcalóides, flavonóides e saponinas. É conhecida por suas propriedades medicinais. A casca e as sementes da planta são frequentemente usadas na medicina tradicional para tratar uma variedade de condições analgésicas, antirreumáticas, no tratamento para epilepsia, como laxante e estimulador de apetite (Cunha *et al.*, 2003).

Por ser uma boa fonte de metabólitos secundários, *L. sericeus* também é uma boa fonte de lipídios e proteínas, pois suas sementes contêm cerca de 30 a 40% desses macronutrientes, respectivamente, onde dessas proteínas detectadas, existem os inibidores de proteases já descritos (Carvalho *et al.*, 2011). Tendo em vista que as sementes de *L. sericeus* possuem 3 classes de proteínas biotivas que podem desempenhar atividade inseticida (Almeida Filho *et al.*, 2018) vale então a busca por melhores entendimentos desses inibidores presentes nessa

espécie no que se diz respeito a interação dos mesmos combinados a outras moléculas bioinseticidas potencializando seu uso.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência sinérgica do inibidor de protease isolado de *Lonchocarpus sericeus* como um bioinseticida contra as larvas de *Aedes aegypti* sobre o êxito na ação das proteínas Cry presentes nos *Bacillus thuringiensis*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o sinergismo na atividade larvicida sobre *Ae. aegypti* entre o inibidor de *L. sericeus* e as proteínas tóxicas;
- Proceder avaliação histológica das larvas de *Ae. aegypti* tratadas com o inibidor de protease de *L. sericeus* e suas combinações com as toxinas.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção do inibidor de proteases da semente de *L. sericeus*

A obtenção do inibidor de *L. sericeus* foi realizada a partir da metodologia descrita por Almeida Filho *et al.* (2018), com algumas modificações. As sementes foram retiradas de suas vagens e moídas em moinho de café. Em seguida, a farinha foi peneirada em malha de 1,0 mm e posta em estufa a 45 °C por 72 h para retirada de um material mais homogêneo e livre de umidade. A farinha foi desengordurada através de extração por n-hexano na proporção de 1:3 (p/v), livre de gorduras, esse macerado sementes de *L. sericeus* foi submetida a extração em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, na proporção 1:10 (p/v) e mantida sob agitação constante por 3 h, à temperatura ambiente. O material foi filtrado em tecido de nylon e em seguida submetido à centrifugação a 10.000 x g, por 30 min, a 4 °C. Ao sobrenadante foi adicionada solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% de modo a atingir a concentração final de 5% (LsF5). A fração foi dialisada contra água destilada e, posteriormente, liofilizada. Em seguida, a LsF5 liofilizada foi ressolubilizada em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 e aplicada em uma coluna cromatográfica de afinidade que é um processo físico de separação, no qual os componentes a serem separados

distribuem-se em duas fases: fase estacionária e fase móvel.

Esta separação resulta das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel devido às diferentes interações com a fase estacionária e suas eluições (Peres, 2002) em que nesta coluna está contida tripsina acoplada a Sepharose 4B, na qual as proteínas não retidas foram eluídas com tampão de equilíbrio da coluna (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5).

Já o material adsorvido, LsCTI, foi eluído pela adição de solução de ácido clorídrico (HCl) 0,05 M a coluna. O processo cromatográfico foi acompanhado pela medida da absorbância a 280 nm por espectrofotômetro.

4.2 Dosagem de proteínas solúveis

Para a determinação da concentração de proteínas presentes no inibidor, foi utilizada a metodologia descrita por Bradford (1976) a qual usa-se o reagente para aferir colorimetricamente essas concentrações baseadas na interação da substância a ser estudada com um corante, Brilliant Blue G e a Albumina Sérica Bovina, que já se tem uma absorbância pré-definida assim constatando sua veracidade e utilização padrão. Para tanto foram utilizados 100 µL da amostra aos quais foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. As misturas foram levemente agitadas e após cinco minutos foram feitas as leituras das absorbâncias a 595 nm. A quantidade de proteínas foi estimada utilizando-se Albumina Sérica Bovina (BSA) como proteína padrão na curva de calibração do reagente.

4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese é uma técnica laboratorial simples que utiliza a corrente elétrica para promover a separação de moléculas carregadas, como proteínas e ácidos nucleicos. A migração das partículas ocorre por diferença de carga elétrica e por peso molecular, de forma que moléculas menores migram mais rapidamente que as maiores (Oliveira *et al.*, 2015). O perfil proteico da substância estudada foi analisado em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes, e conduzida de acordo com a técnica descrita por Laemmli (1970), adaptada para o uso de géis de separação em placa com marcadores de massa molecular GE Lifesciences™; fosforilase b (97 kDa); albumina bovina (66 kDa); ovalbumina (45kDa); anidrase carbônica bovina (30 kDa); tripsina do inibidor de soja (20,1 kDa); α -lactalbumina bovina (14,4 kDa) e a fração obtida por precipitação com TCA, e o pool das bactérias foram dissolvidas em tampão

Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1 % e comassie brilliant blue G-250 (para a marcação da frente de corrida eletroforética, a 0,02 %). Em todas as eletroforeses foram utilizados géis de aplicação contendo 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 1% e os géis de separação contendo 15% de poliacrilamida por se tratar de uma molécula de baixo peso molecular em uma solução tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,9 e SDS 1%.

4.4 Cultivo de *Bacillus thuringiensis* e obtenção de proteínas *Cry*

A cepa de *B. thuringiensis* produtora de proteínas *Cry* com atividade dipterocida foi obtida junto a Embrapa Recursos Naturais (Brasília – DF). As bactérias foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 0,5 L contendo 0,1 L de caldo nutritivo suplementado com 0,004 L de solução 25% m/v de glucose. A cultura foi incubada a 37 °C sob agitação (150 rpm) em incubadora tipo shaker. Após a esporulação (48h), o meio foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min para obtenção de *pellets* contendo esporos e cristais de proteínas *Cry*. Os *pellets* obtidos foram ressuspensos em 0,02 L de tampão fosfato 0,1 M pH 8, suplementado com 0,3 M de NaCl e 0,01 M de EDTA e sonicados por 5 min e então centrifugados a 10.000 rpm por 5 min, os sobrenadantes obtidos foram dialisados contra água destilada. A concentração de proteínas totais das soluções obtidas foi determinada pelo ensaio de Bradford.

5. BIOENSAIOS

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

A inibição das proteases digestivas de larvas de *Ae. aegypti* foi feita a partir do homogenato dos intestinos de larvas de 4º estágio, fonte das proteases. Os sistemas digestórios de cerca de 250 larvas foram dissecados em banho de gelo e transferidos para microtubos contendo tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Em seguida, os intestinos foram macerados e centrifugados a 10.000 x g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi retirado e armazenado a -20 °C para posterior uso.

Para o ensaio utilizando o BApNA, substrato específico para a tripsina, uma alíquota de 40 µL (solução enzimática) do homogenato foi incubada, por 5 min a 37 °C, com o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 contendo CaCl₂ 20 mM, em diferentes volumes e de LsCTI em µL

nas mesmas condições volumétricas. Após 60 min, a reação foi interrompida adicionando 50 µL de solução ácido acético. Ao final, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g, por 10 min e o sobrenadante foi alcalinizado com NaOH 2 M na proporção 1:1 (v/v) e foram realizadas as leituras das absorbâncias a 440 nm em espectrofotômetro de microplacas.

Para o BTPNA, substrato específico para a quimotripsina, uma alíquota de 50 µL (solução enzimática) do homogenato foi incubada, por 5 min a 37 °C, com o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 contendo CaCl₂ 20 mM e diferentes volumes com LsCTI em µL com as variações semelhantes e analisadas sobre mesma absorbância.

5.2 Avaliação do sinergismo entre as proteínas *Cry* e LsCTI.

Para avaliar o sinergismo da atividade larvicida sobre *Ae. aegypti* entre as proteínas *Cry* e o inibidor de proteases de *L. sericeus* esses foram submetidos a diferentes combinações. Primeiramente, as larvas foram incubadas em diferentes concentrações das toxinas *Cry* por 24 h para determinar as concentrações letal para 20% (LC₂₀) para larvas de 4ºestádio de *Ae. aegypti*. Após determinar essa concentração letal, novas larvas foram incubadas em tubos contendo combinações dessa concentração com diferentes concentrações de LsCTI (50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL), na ausência de inibidor e em água destilada para determinação do branco, por 24 h. Após esse período foi contabilizada a taxa de mortalidade das larvas. Os ensaios foram conduzidos em sextuplicada e para cada repetição foram utilizadas 10 larvas.

5.3 Análise histológica das larvas de *Ae. aegypti*

As alterações morfológicas nas células epiteliais intestinais das larvas dos insetos foram realizadas de acordo com Viana *et al.* (2019) com algumas modificações. As larvas foram examinadas após a exposição das formulações de LsCTI e toxinas com 24h. Individualmente, as larvas foram coletadas e colocadas em tubos estéreis de 1,5 mL contendo fixador de paraformaldeído a 4% e armazenados à temperatura ambiente. As larvas vivas foram selecionadas, preferencialmente, com exceção das formulações que resultarem em 100% de mortalidade em durante o experimento.

Após isso, o material biológico foi incubado em álcool a 70% por 8 h. Em seguida, as larvas foram desidratadas em série utilizando etanol (70 a 100%), infiltradas em historesina em série (50, 75 e 100%), por fim emblocadas em historesina. Após a formação dos blocos, um micrótomo foi utilizado para realizar cortes histológicos de 4 mm, que foram dispostos em

lâmina de vidro, corados com Azul de toluidina e montados com Entellan®. As lâminas foram visualizadas e analisadas pelo microscópio óptico com ampliação.

5.4 Análises estatísticas

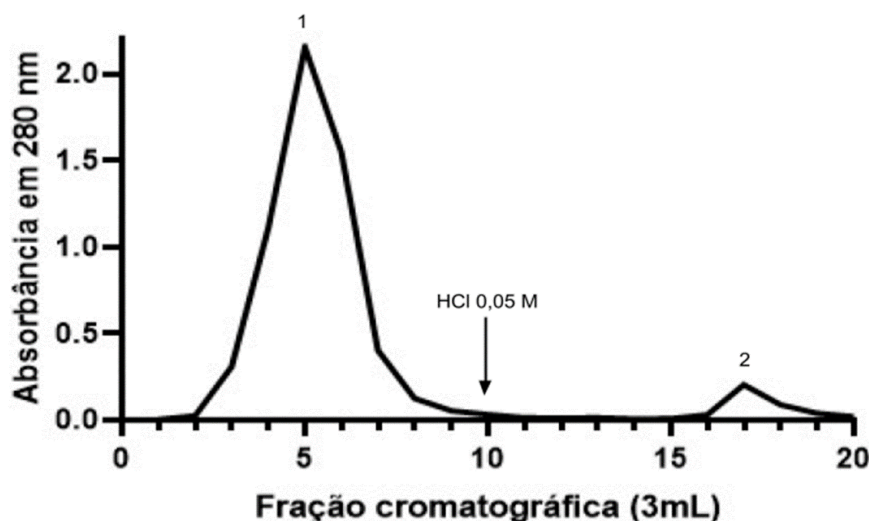
As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando ANOVA, seguida do teste de Student-Newman-Keuls ou Tukey, por comparação múltipla, quando apropriado, com valores de $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Purificação do LsCTI

Considerando que o LsCTI é um importante inibidor de proteases semelhantes ao inibidor de Bowman-Birk (BBI) (Almeida Filho *et al.*, 2018), a enzima foi purificada utilizando cromatografia de afinidade com tripsina acoplada a Sepharose 4B. Podemos, de acordo com o gráfico 1, observar dois picos relevantes, o primeiro entre os tubos 3 e 7 e o segundo entre os tubos 16 e 19. Como existem substâncias que não se aderem na coluna, há um primeiro pico no qual essas substâncias não alvo do presente trabalho estão concentradas. Já no segundo pico, a substância alvo que interagiu com a coluna foi eluída pelo ácido.

Gráfico 1 - Perfil cromatográfico da fração proteica de sementes de *Lonchocarpus sericeus* extraído em ácido tricloroacético (TCA) 5% (LsF5) solubilizada em tampão Tris-HCl



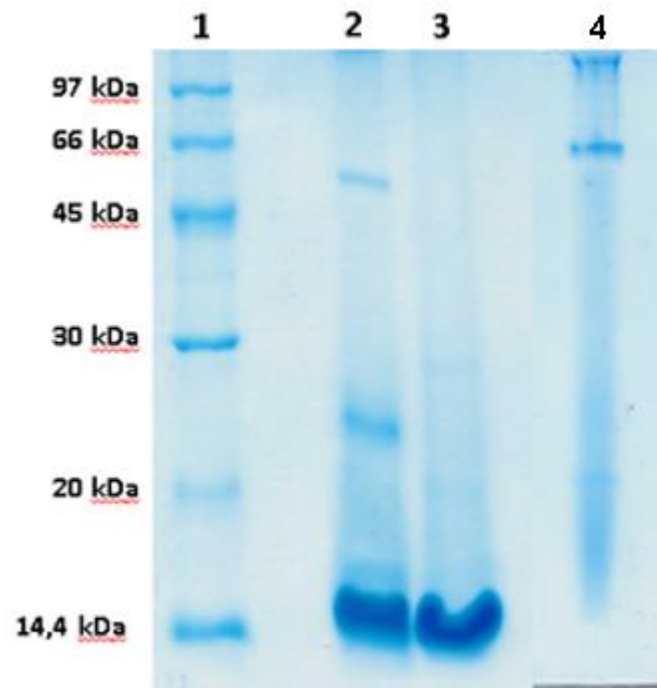
0,05 M pH 7,5 e aplicada em coluna de matriz de Sepharose 4B com tripsina acoplada. Fração retida eluída com adição de HCl 0,05 M. 1: pico não-retido; 2: pico retido.

6.2 Eletroforese

Como mencionado, o LsCTI é semelhante ao Bowman-Birk (BB), capaz de inibir quimotripsina e tripsina. Esta classe de inibidores de proteases de origem vegetal, conhecida por sua baixa massa molecular (5-16 kDa) pode ser encontrado em diversas famílias de plantas principalmente Fabaceae, Solanaceae e Poaceae. A análise eletroforética se faz necessária para a identificação do IP e constatação para utilização em posteriores ensaios. A eletroforese de LsCTI mostrou uma banda proteica de baixa massa molecular em torno de 14,4 kDa (Figura 4).

Juntamente com a eletroforese da fração, foi colocado o homogenato do cultivo das bactérias em fase de esporulação, para obter a determinação do pool de proteínas *Cry* após análise de de proteínas de Bradford (1976).

Figura 4 - Análise eletroforética por SDS-PAGE 15%. 1- Marcadores de massa molecular (kDa); 2- Extrato proteico de *L. sericeus*; 3- Fração TCA 5% (LsF5); 4- Pico de toxinas *Cry* proveniente de *Bt*.



Fonte: autora

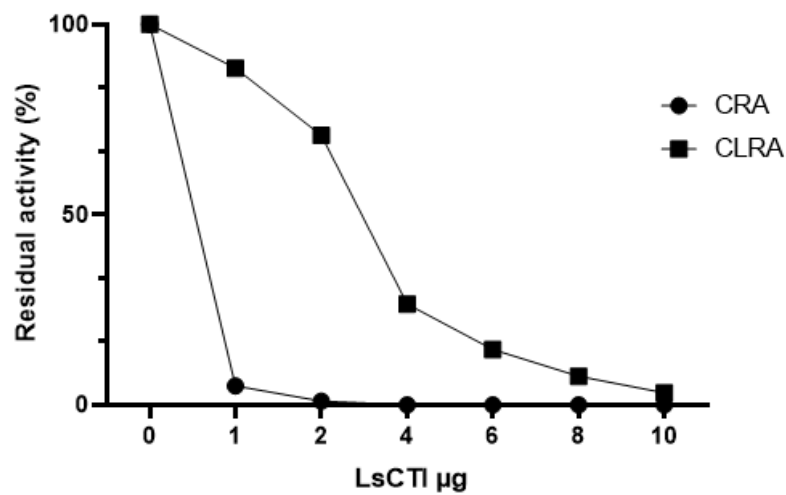
6.3 Bioensaios

6.3.1 Determinação da atividade enzimática

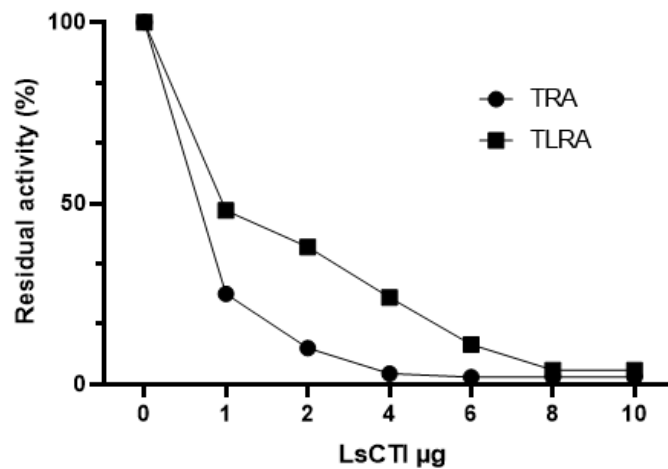
Os inibidores de protease têm a capacidade de interferir na atividade enzimática no intestino dos insetos ao se ligarem às proteases intestinais, reduzindo a absorção de aminoácidos e afetando o metabolismo e o subsequente desenvolvimento do organismo (Shamsi *et al.*, 2018). A composição do *pool* de proteases no intestino médio larval de *Aedes aegypti* já foi determinado por Rascón *et al.* (2011) e incluem as proteases como a tripsina, quimotripsina, aminopeptidases e carboxipeptidases. Além disso, sabe-se que as proteases serínicas desempenham um papel na digestão do repasto sanguíneo do mosquito (Brackney, 2008). Portanto, foi investigado o potencial *in vitro* do LsCTI em bloquear as proteases intestinais das larvas de *Ae. aegypti* como um indicativo de sua atividade inseticida inibitória. Os resultados demonstraram uma forte capacidade do LsCTI em inibir essas proteases (Gráfico 2). Resultados semelhantes foram obtidos por Almeida Filho *et al.* (2018) no qual observou as medidas cinéticas (K_i) da inibição sobre as proteases submetidas dos bioensaios e teve como coeficiente para quimotripsina de $8,24 \times 10^{-8}$ M e tripsina de $7,61 \times 10^{-7}$ M, o que se mostra um melhor desempenhos dos inibidores quando expostos a quimotripsina.

Gráfico 2 – Inibição de LsCTI sobre o macerado dos intestinos médios das larvas e sobre o substrato estoque. (A) Atividade residual de LsCTI específico para quimotripsina entre a enzima pura estoque (*chymotripsin Residual Activity*) e da inibição presente no intestino médio de larvas (*chymotripsin Like Residual Activity*) em diferentes e (B) Atividade residual de LsCTI em diferentes microgramas no bioensaio específico de tripsina onde TRA(*tripsin residual activity*) e TLRA(*tripsina like residual activity*) sobre os mesmos parâmetros do bioensaio anterior.

(A)



(B)



Fonte: autora.

Para a quimotripsina, uma redução significativa da atividade enzimática com uma queda observada de 2 para 4 µg e, para tripsina se observa uma redução compassada até se exaurir por completo.

Resultados semelhantes foram descritos por Leite, Jacobowski e Lígia (2022) mostrando que as atividades de tripsina e quimotripsina foram significativamente reduzidas no lúmen do intestino médio de larvas de 4º estágio de *A. kuehniella* (lepidoptera) após exposição ao extrato proteico proveniente das sementes purificadas de *Anadenanthera macrocarpa* conhecida popularmente de angico-vermelho, sugerindo que o efeito larvicida é devido à inibição dessas enzimas fundamentais.

6.4 Determinação da Concentração Letal em 20%.

Para a determinação CL₂₀ da toxina presente em *Bt* foram utilizadas diluições seriadas a partir do pool das bactérias (Tabela 1) a qual as larvas foram colocadas por 24 h, e que teve concentração aproximada de letalidade em 20% de 1:1280 ou CL₂₀= 0,01101 µg/mL.

Tabela 1- Diluições para a determinação da CL₂₀ de *Bacillus thurnigiensis*

Diluições	Número de larvas vivas	Porcentagem de larvas vivas
1:5120	27	90%
1:2560	20	60%
1:1280	3	10%
1:640	0	100%

Fonte: autora.

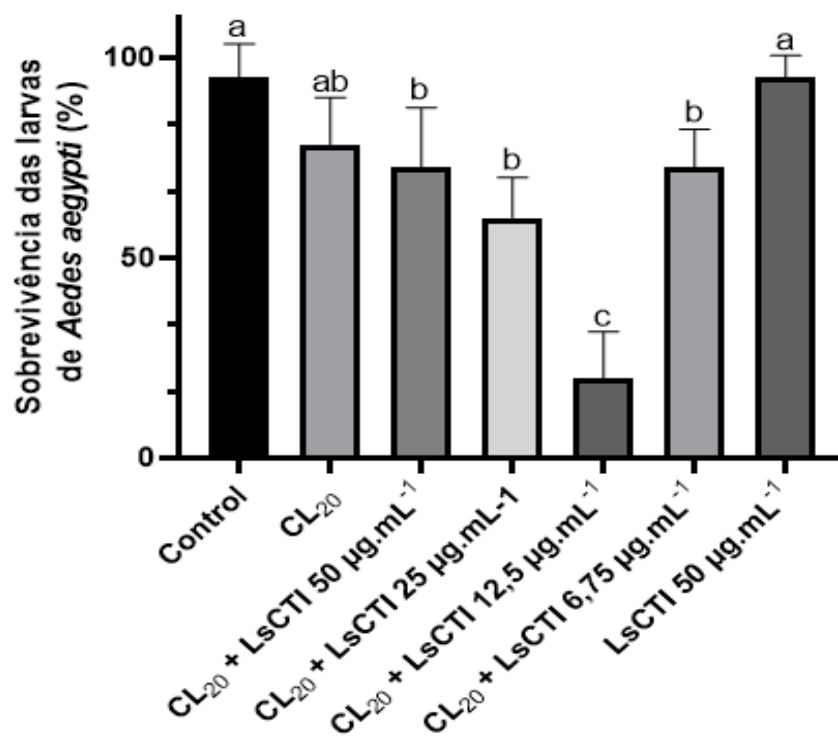
6.5 Avaliação do sinergismo entre as proteínas *Cry* e *LsCTI*.

O mecanismo pelo qual os inibidores de protease aumentam a atividade das toxinas *Bt* não é bem compreendido (Pardo-Lopez *et al.*, 2009), porém o conhecimento sobre o funcionamento das toxinas *Bt* está bem estabelecido e detalhado.

A partir da identificação do inibidor, purificação do mesmo, determinação da letalidade em 20% das toxinas, realizam-se então testes aos quais foram combinadas com a CL₂₀ das

toxinas de *B. thuringiensis* em diferentes concentrações de LsCTI em 4 tratamentos combinados, tendo a água destilada como controle negativo em 1, apenas o LsCTI em concentração estoque de 0,2 mg/mL e a CL₂₀ da bactéria como controles individuais para avaliar se existe realmente uma potencialização quando combinados. Com o conhecimento desses dados, foi construído um gráfico (Gráfico 3) a fim de realizar uma análise estatística em múltiplas comparações ao qual podemos observar que existiu uma diferença estatística expressiva no tratamento de CL₂₀ + 12,5 µg. mL⁻¹ de LsCTI na sobrevivência das larvas aumentando em pelo menos 60 % a ação das proteínas *cry* o que não foi observado nos demais tratamentos.

Gráfico 3 – Taxa de sobrevivência de larvas de *Aedes*, após exposição a diferentes substâncias (água, toxinas *Bt* e LsCTI) separadamente por 24 h.



Fonte: autora.

Legenda: Control: Larvas expostas a água destilada, CL₂₀:larvas expostas a concentração letal e m 20% das toxinas *Cry*; CL₂₀+LsCTI 50 µg.mL⁻¹ à CL₂₀ + LsCTI 6,75µg.,mL⁻¹: Larvas expostas ao sinergismo entre CL₂₀ e LsCTI em diferentes volumes do inibidor com CL₂₀ fixa; LsCTI 50µg.,mL⁻¹: larvas expostas apenas pelo inibidor purificado. Letras diferentes acima das barras representam diferença significativa (p < 0,05) entre os grupos determinada por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparações de Tukey (p < 0,05)

Cada tratamento sinérgico testado foi capaz de reduzir a taxa de sobrevivência das larvas

em comparação com as toxinas sem acompanhante, indicando um resultado positivo dessa interação entre esses dois bioinseticidas.

Concentrações mais altas de LsCTI não mostraram diferença estatisticamente significativa em relação à CL₂₀, assim como a menor concentração do inibidor (6,75 µg. mL⁻¹). No entanto, a combinação das toxinas *Bt* acompanhadas de 12,5 µg.mL⁻¹ de LsCTI aumentaram significativamente a mortalidade larval. Portanto, sugere-se que concentrações específicas de LsCTI são capazes de potencializar a atividade tóxica dos cristais de *Bt*.

Uma possível explicação para a ineficácia do LsCTI em concentrações mais altas (50 µg. mL⁻¹) pode ser o efeito de inibir excessivamente as proteases serínicas no intestino médio das larvas. Como as toxinas precisam ser clivadas para se tornarem ativas, altas concentrações de inibidores podem impedir esse processo. Para a concentração mais baixa, pode-se considerar que os níveis de LsCTI no organismo não foram suficientes para aumentar a toxicidade.

Já existe na literatura relatos de resultados semelhantes para EcTI sobre larvas de *Ae. aegypti* ao qual se mostrou um melhoramento no desempenho inseticida dos cristais de *Bt* (Tabosa *et al.*, 2020), enquanto Ma *et al.* (2013) demonstraram que a atividade sinérgica de vários inibidores de protease com três toxinas *Cry* para superar a resistência de *Spodoptera exigua* e que a utilização de inibidores de proteases em baixas concentrações pode levar a um aumento ou até mesmo a uma mudança no perfil de produção de proteases, que são essenciais para a ativação das toxinas *Bt*. Outra hipótese para a atividade aumentada das toxinas *Bt* na presença de IP é que essas moléculas inibem proteases relacionadas a mecanismos de defesa.

6.6 Análise histológica

A análise histológica de larvas de *Ae. aegypti* expostas a bioinseticidas é pouco comum na literatura. Silva *et al.* (2008) descreveram mudanças na forma e na estrutura dos tecidos do intestino médio de larvas de *Ae. albopictus* tratadas com toxinas de *Bacillus thuringiensis* usando microscopia eletrônica de transmissão.

Em relação à ação das toxinas *Bt*, Silva *et al.* (2008) relataram uma significativa vacuolização das células epiteliais e muita desorganização tecidual apenas uma hora após a exposição. Essas mudanças podem ser atribuídas ao desequilíbrio osmótico causado pela ligação das toxinas *Cry* hidrolisadas aos receptores na membrana apical das células intestinais, interferindo no transporte celular de íons e água e resultando na lise e desintegração das células (Knowles, 1994; Silva *et al.*, 2008). A severidade do dano observado no intestino médio posterior pode estar correlacionada com a maior densidade desses receptores nessa região, o

que foi previamente associado à ação específica do *Cry11Bb* (Ruiz *et al.*, 2004). Esses achados são consistentes com a hipótese de uma alta taxa metabólica na região posterior do intestino médio, conforme sugerido por Clark *et al.* (2005).

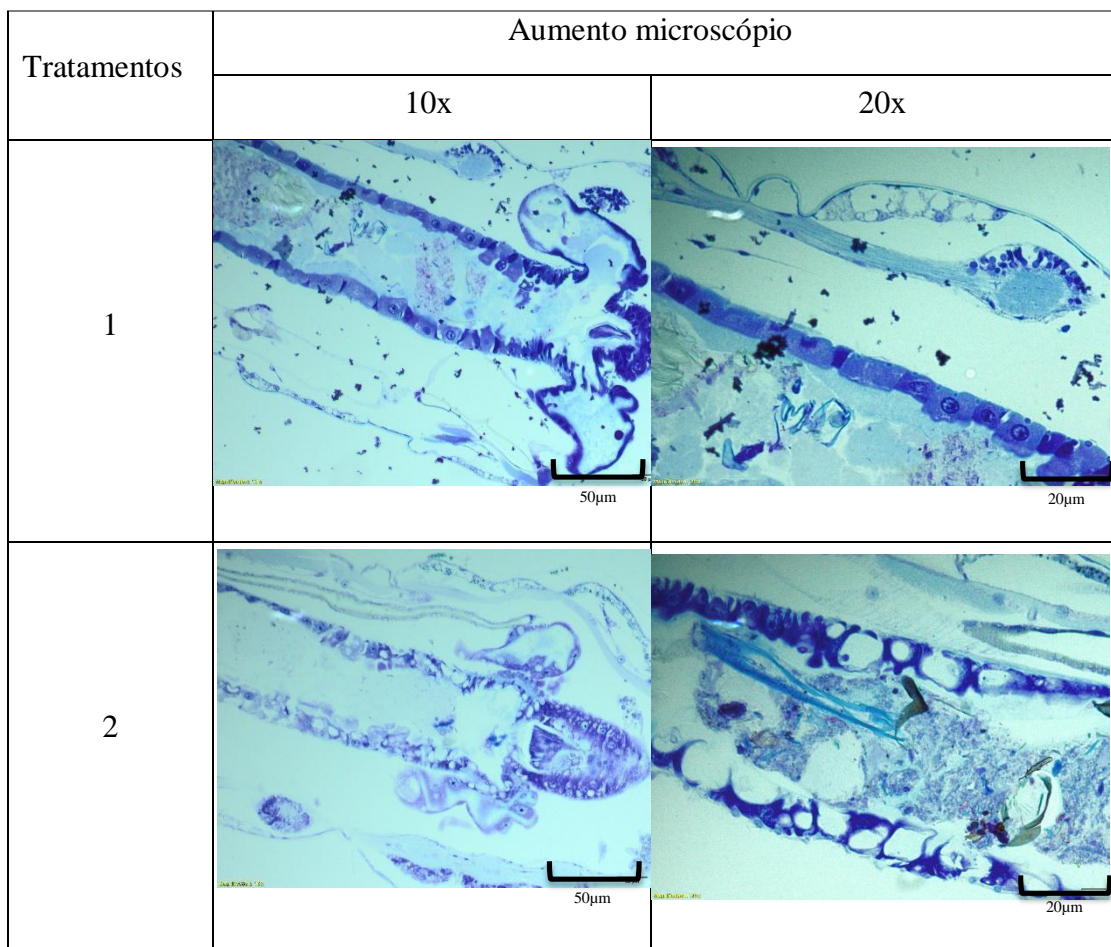
A observação por microscopia óptica revelou graves danos epiteliais no intestino médio de larvas expostas a toxinas e combinações de LsCTI, principalmente no intestino posterior. Comparado ao grupo controle, as larvas expostas a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de LsCTI mostraram afinamento da parede epitelial, indicando possíveis efeitos nutricionais comprometidos e subdesenvolvimento devido à inibição de proteases serínicas (Figura 5). O grupo tratado apenas com toxinas *Bt* mostrou múltiplos poros na membrana plasmática, possivelmente relacionados à ação direta da toxina *Bt* (Tetreau *et al.*, 2012). Análises das larvas expostas à combinação que mostraram diferenças significativas revelaram efeitos combinados dos dois bioinseticidas no epitélio do intestino médio (Figura 5).

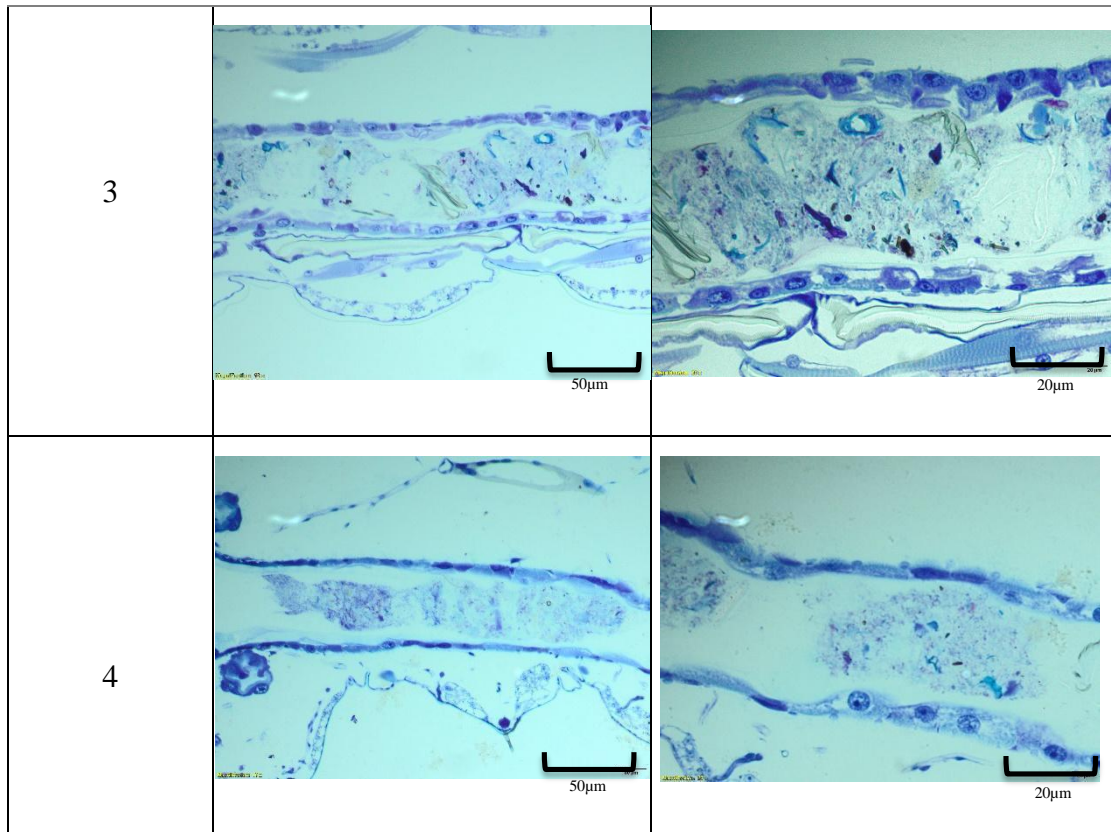
Nas larvas expostas à água, não houve nenhuma alteração anatômica, já naquelas tratadas com CL₂₀ podemos observar a vacuolização anteriormente mencionada, nas larvas expostas a LsCTI observamos o desenvolvimento de poros epiteliais e naquelas larvas com a combinação adequada das substâncias, uma junção desses acontecimentos bons como a adelgaçamento da parede do intestino, mostrando a fragilização do tecido ao longo da incubação.

As modificações vistas nas larvas tratadas com LsCTI e suas combinações com toxinas *Bt* seguem padrões compatíveis com o que foi relatado na literatura. No entanto, são necessárias investigações mais detalhadas utilizando microscopia de alta resolução para uma compreensão completa dos mecanismos de ação e das alterações estruturais.

Na figura 5, é observada a comparação morfológica analisada nos tratamentos controles e tratamento específico com melhor resultado estatístico em microscópio com aumentos em lentes de 10 e 20 vezes o tamanho a olho nu, o que nos permite observar todas as alterações sofridas do epitélio das larvas.

Figura 5 - Morfologia interna das larvas de *Aedes aegypti* após 24 horas de incubação nos tratamentos.





Legenda:(1) Água destilada ; (2) CL de proteínas cry ;(3) LsCTI [0,2 mg/mL]; (4) CL₂₀ + LsCTI 12,5 µg.mL⁻¹.

7.CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a combinação das proteínas *cry* e os inibidores presentes nas sementes de *L. sericeus* (LsCTI) mostram um potencial como uma possibilidade no manejo de vetores. O aumento das taxas de mortalidade quando relacionados ao sinergismo dessas biomoléculas foram corroborados como uma ferramenta eficaz como larvicida de *Ae. aegypti*, possibilitando a não formação de indivíduos resistentes.

Dessa forma, o uso dessa combinação possui um forte potencial biotecnológico no combate das doenças e controle dos artrópodes responsáveis. Mesmo com esses resultados, se fazem necessários estudos mais avançados buscando compreender as mudanças em níveis moleculares provocadas por essa junção de moléculas bem como testes mais aprofundados com espécies alvo e não alvo para observar suas interações se malélicas ou benéficas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÍLIO, A. P.; ABUDASSE, G.; KAMPANGO, A.; CANDRINHO, B.; SITOI, S.; LUCIANO, J.; TEMBISSE, D.; SIBINDY, S.; DE ALMEIDA, A. P. G.; GARCIA, G. A.; DAVID, M. R.; MACIEL-DE-FREITAS, R.; GUDO, E. S. Distribution and breeding sites of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in 32 urban/peri-urban districts of Mozambique:

implication for assessing the risk of arbovirus outbreaks. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 9, p. e0006692, 2018.

ALMEIDA FILHO, L. C.; TABOSA, P. M.; HISSA, D. C.; VASCONCELOS, I. M.; CARVALHO, A. F. 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**, v. 74, n. 6, p. 1362-1373, 2018.

ASSIS, V. C.; DO AMARAL, M. D. P. H.; DE MENDONÇA, A. E. Análise da qualidade das notificações de dengue informadas no sistema de informação de agravos de notificação, na epidemia de 2010, em uma cidade polo da zona da mata do estado de Minas Gerais. **Revista de APS**, v. 17, n. 4, p. 469-478, 2014.

BENDER, A. E. Effects on nutritional balance: antinutrients. In: WATSON, D. H. Natural toxicants in food: progress and prospects. **ELLIS HORWOOD SERIES IN FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY**. p. 110-124, 1987.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WILLIAM WINT, G. R.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.

BOBROWSKI, V. L. *et al.* Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v. 33, p. 843-850, 2003.

BORGES, J. C. M. *et al.* Mosquitocidal and repellent potential of formulations containing wood residue extracts of a Neotropical plant, *Tabebuia heptaphylla*. **Industrial Crops & Products**, v. 129, p. 424-433, 2019.

BRACKNEY, D. E.; FOY, B. D.; OLSON, K. E. The Effects of Midgut Serine Proteases on Dengue Virus Type 2 Infectivity of *Aedes aegypti*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 2, p. 267-274, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Especializada à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção Primária à Saúde. Diretrizes para a organização dos serviços de atenção à saúde em situação de aumento de casos ou de epidemia por arboviroses. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022.

BRAVO, A; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.

BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 605-613, 1998.

DE SOUZA CÂNDIDO, E.; PINTO, M. F. S.; PELEGRINI, P. B.; LIMA, T. B.; SILVA, O. N.; POGUE, R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; FRANCO, O. L. Plant storage proteins with

antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **FASEB J.**, v. 25, p. 3290-3302, 2011.

CARVALHO, F. D. C.; MOREIRA, L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species?. **Neotropical entomology**, v. 46, n. 3, p. 243-255, 2017.

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

CESPEDES, C. L.; MOLINA, S. C.; MUNOZ, E.; LAMILLA, C.; ALARCON, J.; PALACIOS, S. M.; CARPINELLA, M. C.; AVILA, J. G. The insecticidal, molting disruption and insect growth inhibitory activity of extracts from *Condalia microphylla* Cav. (Rhamnaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 78-86, 2013.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 5. ed. Cambridge university press, 1998.

CHENGALA, L.; SINGH, N. Botanical pesticides – a major alternative to chemical pesticides: A review. **International Journal of Life Sciences**, v. 5, n. 4, p. 722-729, 2017.

CLARK, T. M.; HUTCHINSON, M. J.; HUEGEL, K. L.; MOFFETT, S. B.; MOFFETT, D. F. Additional morphological and physiological heterogeneity within the midgut of larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) revealed by histology, electrophysiology, and effects of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. **Tissue and Cell**, v. 37, n. 6, p. 457-468, 2005.

CUNHA, G. M. D. A.; Fontenele, J. B.; Nobre Júnior, H. V.; DE SOUSA, F. C.; SILVEIRA, E. R.; NOGUEIRA, N. A.; DE MORAES, M. O.; VIANA, G. S. B.; COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* Cytotoxic Activity of Chalcones Isolated from *Lonchocarpus sericeus* (Pocr.) Kunth. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 2, p. 155-159, 2003.

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

DE SOUSA LIMA, M. E.; BACHUR, T. P. R.; ARAGÃO, G. F. Guillain-Barre syndrome and its correlation with dengue, Zika and chikungunya viruses infection based on a literature review of reported cases in Brazil. **Acta tropica**, v. 197, p. 105064, 2019.

DE VIRGILIO, M.; LOMBARDI, A.; CALIANDRO, R.; FABBRINI, M. S. Ribosome-inactivating proteins: from plant defense to tumor attack. **Toxins**, v. 2, n. 11, p. 2699-2737, 2010.

FAULL, K. J.; WILLIAMS, C. R. Intraspecific variation in desiccation survival time of *Aedes aegypti* (L.) mosquito eggs of Australian origin. **Journal of Vector Ecology**, v. 40, n. 2, p. 292-300, 2015.

FERNANDES, R. S.; O'CONNOR, O.; BERSOT, M. I. L.; GIRAULT, D.; DOKUNENGO, M. R.; POCQUET, N.; DUPONT-ROUZEYROL, M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Brazil and New Caledonia for Three Zika Virus Lineages. **Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 575, 2020.

FIGUEIREDO, L. T. M.; FONSECA, B. A. L. Dengue. In: VERONESI, R.; FOCACIA, R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu. p. 201-214, 1966.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Impactos na saúde e no sistema único de saúde decorrentes de agravos relacionados a um saneamento ambiental inadequado. Brasília: FUNASA, 2010.

GOULD, E.; PETTERSSON, J.; HIGGS, S.; CHARREL, R.; DE LAMBALLERIE, X. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, p. 1–13, 2017.

GUTIERREZ-BUGALLO, G.; PIEDRA, L. A.; RODRIGUEZ, M.; BISSET, J. A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N.; VEGA-RÚA, A. Vectorborne transmission and evolution of Zika virus. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, p. 561-569, 2019.

HOTEZ, P. J.; PECOUL, B.; RIJAL, S.; BOEHME, C.; AKSOY, S.; MALECELA, M.; TAPIA-CONYER, R.; REEDER, J. C. Eliminating the Neglected Tropical Diseases: Translational Science and New Technologies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0003895, 2016.

HOESAIN, M.; SUHARTO, PRASTOWO, S.; PRADANA, A. P.; ALFARISY, F. K.; ADIWENA, M. Investigating the plant metabolite potential as botanical insecticides against *Spodoptera litura* with different application methods. **Cogent Food & Agriculture**, v. 9, n. 1, 2023.

KALAYANAROOJ, S.; ROTHMAN, A. L.; SRIKIATKHACHORN, A. Case management of dengue: lessons learned. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, p. S79-S88, 2017.

KAPTEIN, S. J. F.; GOETHALS, O.; KIEMEL, D.; MARCHAND, A.; KESTELEYN, B.; BONFANTI, J. F.; BARDIOT, D.; STOOPS, B.; JONCKERS, T. H. M.; DALLMEIER, K.; GELUYKENS, P.; THYS, K.; CRABBE, M.; CHATEL-CHAIX, L.; MÜNSTER, M.; QUERAT, G.; TOURET, F.; DE LAMBALLERIE, X.; RABOISSON, P.; SIMMEN, K.; CHALTIN, P.; BARTENSCHLAGER, R.; VAN LOOCK, M.; NEYTS, J. A pan-serotype dengue virus inhibitor targeting the NS3-NS4B interaction. **Nature**, v. 598, p. 504-509, 2021.

KAZMI, S. S.; ALI, W.; BIBI, N.; NOUROZ, F. A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**, v. 27, p. 5, 2020.

KIRMSE, I.; SEJÓPOLES, A. D.; SARTO E SILVA, J. C.; TAFURI, L. R.; QUADROS, S. F. P. Vacinas da Dengue. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 3, p. e69852–e69852, 2024.

KNOWLES, B. H. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal δ -Endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, v. 24, p. 275-308, 1994.

- KRAEMER, M. U. G.; SINKA, M. E.; DUDA, K. A.; MYLNE, A.; SHEARER, F. M.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; BARKER, C. M.; MOORE, C. G.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E.; BORTEL, W. V.; HENDRICKX, G.; SCHAFFNER, F.; WINT, G. R. W.; ELYAZAR, I, R, F.; TENG, H.; HAY, S. I. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. **Scientific Data**, v. 2, n. 1, p. 7, 2015.
- KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, p. 224-243, 2014.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 659-680, 1970.
- LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; MENEZES, E. W. Qualidade nutricional. In: ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996.
- LEITE, W.; JACOBOWSKI, A. C.; LÍGIA, M. Insecticide activity of a peptidase inhibitor isolated from *Anadenanthera macrocarpa* seeds against *Anagasta kuehniella*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 46, 1 jan. 2022.
- LENGAI, G. M. W.; MUTHOMI, J. W.; MBEGA, E. R. Phytochemical activity and role of botanical pesticides in pest management for sustainable agricultural crop production. **Scientific African**, v. 7, p. e00239, 2020.
- LONGBOTTOM, J.; WALEKHWA, A. W.; MWINGIRA, V.; KIJANGA, O.; MRAMBA, F.; LORD, J. S. *Aedes albopictus* invasion across Africa: the time is now for cross-country collaboration and control. **The Lancet Global Health**, v. 11, n. 4, p. e623-e628, 2023.
- MA, Y.; ZHANG, Y.; CHEN, R. R.; REN, X. L.; WAN, P. J.; MU, L. L.; LI, G. Q. 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**. 2013.
- MACEDO, M. L. R.; DE OLIVEIRA, F.R. C.; COSTA, P. M.; CASTELHANO, E. C.; SILVA-FILHO, M. C. Adaptive Mechanisms of Insect Pests Against Plant Protease Inhibitors and Future Prospects Related to Crop Protection: A Review. **Protein & Peptide Letters**, v. 22, n. 2, p. 149–163, 2015.
- MAHARAJ, R. Global trends in insecticide resistance and impact on disease vector control measures. **Open Access Insect Physiology**, p. 27-33, 2011.
- MARTINS, A. B. S.; CORREIA, F. G. S.; CAVALCANTI, L. P. D. G.; ALENCAR, C. H. Dengue in northeastern Brazil: a spatial and temporal perspective. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. e20200435, 2020.
- MINER, J. J. Congenital Zika virus infection: more than just microcephaly. **Science translational medicine**, v. 9, n. 393, p. eaan8195, 2017.

MUKTAR, Y.; TAMERAT, N.; SHEWAFERA, A. *Aedes aegypti* as a Vector of Flavivirus. **J Trop Dis**, v. 4, n. 223, p. 2, 2016.

MUSTAFA, M. S.; RASOTGI, V.; JAIN, S.; GUPTA, V. J. M. J. A. F. I. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67–70, 2015.

NETO, V.; BATISTA, J. **Revisão dos métodos de controle e dos mecanismos de resistência do Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2006.

OLIVEIRA, E.; TRENTIN, T.; CAMARGO, F.; PINTO, Y. D.; MARTINS, D. Eletroforese: conceitos e aplicações. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Dengue and severe dengue. World Health Organization. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. World Health Organization. 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Vector-borne diseases. World Health Organization. 2020.

PAIXÃO, E. S.; BARRETO, F.; DA GLÓRIA TEIXEIRA, M.; DA CONCEIÇÃO N. C., M.; RODRIGUES, L. C. History, epidemiology, and clinical manifestations of Zika: a systematic review. **American journal of public health**, v. 106, n. 4, p. 606-612, 2016.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 2014.

PARDO-LOPEZ, L.; MUNOZ-GARAY, C.; PORTA, H.; RODRÍGUEZ-ALMAZÁN, C.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, v. 30, n. 3, p. 589-595, 2009.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico, São Paulo**, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

PEUMANS, W. J.; DAMME, E. J. V. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, n. 1, p. 199-228, 1998.

PIALOUX, G.; GAÜZÈRE, B. A.; JAURÉGUIBERRY, S.; STROBEL, M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 5, p. 319-327, 2007.

PLETNEV, A. G.; MAXIMOVA, O. A.; LIU, G.; KENNEY, H.; NAGATA, B. M.; ZAGORODNYAYA, T.; MOORE, I.; CHUMAKOV, K.; TSETSARKIN, K. A. Epididymal epithelium propels early sexual transmission of Zika virus in the absence of interferon signaling. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 2469, 2021.

PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; DIAS DE ASSIS, C. R.; DE SOUZA BEZERRA, R.; XAVIER, H. S.; NAVARRO, D. M. D. A. F.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, n. 79, v. 3, p. 135-152. 2012.

PONTUAL, E. V.; DE LIMA SANTOS, N. D.; DE MOURA, M. C.; COELHO, L. C. B. B.; DO AMARAL FERRAZ NAVARRO, D. M.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. **Parasitology research**, v. 113, p. 727-733, 2014.

RASCÓN, A. A.; GEARIN, J.; ISOE, J.; MIESFELD, R. L. In vitro activation and enzyme kinetic analysis of recombinant midgut serine proteases from the Dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. **BMC biochemistry**, v. 12, p. 1-10, 2011.

ROEHRIG, J. T.; LANCIOTTI, R. S. Arboviruses. **Clinical virology manual**, p. 387-407, 2009.

ROSE, R. I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 1, p. 17, 2001.

ROZENDAAL, J. A. **Vector control methods for use by individuals and communities**. World Health Organization, 1997.

RUIZ, M. L.; SEGURA, C.; TRUJILLO, J.; ORDUZ, S. In vivo binding of the Cry11bB toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 1, p. 73-79, 2004.

SALES, M. P.; GERHARDT, I. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; XAVIER-FILHO, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids?. **Plant physiology**, v. 124, n. 2, p. 515-522, 2000.

SANCHIS, V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 31, n. 1, p. 217–231, 2010.

SANSINENEA, E. Applications and Patents of *Bacillus* spp. in Agriculture. In: Singh, H., Keswani, C., Singh, S. (eds) **Intellectual Property Issues in Microbiology**. Springer, Singapore. 2019.

SANTOS, L.H.O; SILVA, R. R. D. S. Análise do perfil epidemiológico das arboviroses (dengue, zika e chikungunya) de 2020-2022 no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 9, p. e6912943229-e6912943229, 2023

SARWAR, M. Proposals for the control of principal dengue fever virus transmitter *Aedes aegypti* (Linnaeus) mosquito (Diptera: Culicidae). **Journal of Ecology and Environmental Sciences**, v. 2, n. 2, p. 24-28, 2014.

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM RURAL NO ESTADO DE SÃO PAULO; FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Produtos microbianos na agricultura orgânica. In: SEMINÁRIO REGIONAL DE AGRICULTURA ORGÂNICA, 4., 2007.

SHAMSI, T. N.; PARVEEN, R.; AHMAD, A.; SAMAL, R. R.; KUMAR, S.; FATIMA, S. Inhibition of gut proteases and development of dengue vector, *Aedes aegypti* by *Allium sativum* protease inhibitor. **Acta Ecologica Sinica**, v. 38, n. 5, p. 325–328, 2018.

SHARMA, N.; PARK, S. W.; VEPACHEDU, R.; BARBIERI, L.; CIANI, M.; STIRPE, F.; SAVARY, B. J.; VIVANCO, J. M. Isolation and Characterization of an RIP (Ribosome Inactivating Protein) -Like Protein from Tobacco with Dual Enzymatic Activity. **Plant Physiology**, v. 134, p. 171–181, 2004.

SILVA, E. P. Potencial inseticida de extrativos de três espécies vegetais da Amazônia em *Cryptotermes brevis* Walker, 1853 (Isoptera: Kalotermitidae). 2010. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**, Manaus, 2010.

SILVA, V. C.; PINHEIRO, N. L.; SCHERER, P. O.; FALCÃO, S. S.; RIBEIRO, V. R.; MENDES, R. M. M.; CHAGAS, R.; CARDOZO-DE-ALMEIDA, M.; DOS SANTOS-MALLET, J. R. Histology and ultrastructure of *Aedes albopictus* larval midgut infected with *Bacillus thuringiensis var. israelensis*. **Microscopy Research and Technique**, v. 71, n. 9, p. 663–668, 2008.

SILVA-LOPEZ, R. E. D. Inibidores de Proteases Oriundas de Plantas: Uma Abordagem Útil para o Desenvolvimento de Novos Fármacos. 2009.

TABOSA, P. M.; ALMEIDA FILHO, L. C.; FRANCA, R. X.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; VASCONCELOS, I. M.; CARVALHO, A. F. Trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds impairs *Aedes aegypti* development and enhances the activity of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Pest Management Science**, v. 76, n. 11, p. 3693-3701, 2020.

TAYAL, A.; KABRA, S. K.; LODHA, R. Management of dengue: An updated review. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 90, n. 2, p. 168-177, 2023.

TETREAU, G.; BAYYAREDDY, K.; JONES, C. M.; STALINSKI, R.; RIAZ, M. A.; PARIS, M.; DAVID, J.; ADANG, M. J.; DESPRÉS, L. Larval midgut modifications associated with Bti resistance in the yellow fever mosquito using proteomic and transcriptomic approaches. **BMC genomics**, v. 13, p. 1-15, 2012.

TIDMAN, R.; ABELA-RIDDER, B.; DE CASTAÑEDA, R. R. The impact of climate change on neglected tropical diseases: a systematic review. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 115, n. 2, p. 147-168, 2021.

VAN DEN BERG, H.; DA SILVA BEZERRA, H. S.; AL-ERYANI, S.; CHANDA, E.; NAGPAL, B. N.; KNOX, T. B.; VELAYUDHAN, R.; YADAV, R. S. Recent trends in global insecticide use for disease vector control and potential implications for resistance management. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 23867, 2021.

VIASUS, D.; ORTIZ-QUINTERO, W.; CASTRO-SALAZAR, D. A.; BAYONA, B.; DEVIA-MANCHOLA, D. Mortalidad asociada a infección por el virus de Chikungunya. **Revista Salud Uninorte**, v. 31, n. 3, p. 665-670, 2015.

VIGLIANCO, A. I.; NOVO, R.; CRAGNNOLINI, C.; NASSETTA, M.; CAVALLO, A. Antifeedant and repellent effects of extracts of three plants from Córdoba (Argentina) against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). **BioAssay**, v. 3, n. 4, p. 1-6, 2008.

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

WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. An introduction to insecticides. **The pesticide book**, v. 6, 2004.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F. A. P. Proteinase inhibitors. In: CHEEK, P. R. **Toxicants of plant origin**. Boca Raton: CRC Press. v.3: p.1-27, 1989.