



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

WELTON AARON DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO SALINO DE FOLHAS DE *Plectranthus barbatus*
SOBRE A MORFOFISIOLOGIA INTESTINAL DE LARVAS DE *Aedes aegypti***

Recife

2019

WELTON AARON DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DO EXTRATO SALINO DE FOLHAS DE *Plectranthus barbatus* SOBRE A MORFOFISIOLOGIA INTESTINAL DE LARVAS DE *Aedes aegypti*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual

Coorientadora: Profa. Dra. Lidiane Pereira de Albuquerque

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Almeida, Welton Aaron de

Avaliação do extrato salino de folhas de *Plectranthus barbatus* sobre a morfofisiologia intestinal de larvas de *Aedes aegypti* / Welton Aaron de Almeida - 2019.

78 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Emmanuel Viana Pontual

Coorientadora: Lidiane Pereira de Albuquerque

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Vetor da dengue 2. Falso-boldo 3. Efeito larvicida

I. Pontual, Emmanuel Viana (Orientador) II. Albuquerque, Lidiane Pereira de (Coorientadora) III. Título

616.91852

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-071

WELTON AARON DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DO EXTRATO SALINO DE FOLHAS DE *Plectranthus barbatus* SOBRE A
MORFOFISIOLOGIA INTESTINAL DE LARVAS DE *Aedes aegypti*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Bioquímica e
Fisiologia da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia.

Aprovado em: 01 / 03 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Maiara Celine de Moura (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Glaucilane dos Santos Cruz (Examinadora Externa)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

À minha “Vó”, minha
mulher maravilha, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir e abençoar a minha caminhada.

Ao meu pai Alex Almeida (*In memoriam*) que apesar de não estar mais comigo, deixou seu exemplo de força e coragem, sempre acreditando no meu potencial;

A minha querida mãe Maria das Graças, pelo amor e por ser sempre incansável em me ajudar e ser tão presente em toda a minha vida. Agradeço também pelo incentivo e motivação para eu nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu irmão Wallace Esron por ser um grande parceiro de vida.

À minha querida e amada Vó Maria dos Anjos por toda sua alegria de viver.

A todos meus familiares que, perto ou longe, sempre me apoiaram, com sentimentos, palavras e pensamentos.

Ao meu orientador Professor Emmanuel Pontual por me aceitar como orientando desde a iniciação científica e por ter contribuído muito para essa minha conquista. Obrigado pelos conselhos, por ser presente, por dividir seus conhecimentos e principalmente pela amizade durante esses cinco anos que nos conhecemos.

À minha coorientadora Lidianne Pereira pela ajuda, apoio e principalmente pela atenção dedicada nesta etapa da minha formação.

Ao Dr. Afonso Agra-Neto pela disponibilidade de me receber no Jardim Botânico e pela realização da coleta do material botânico.

A todos meus amigos da “Equipe do Controle”: Isabella, Camila, Erasmo, Pedro, Renatta, Fran e Elaine pela ajuda nos experimentos e pelas experiências compartilhadas.

A todos que fazem parte do LABTEC da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

A todos que compõe o Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Universidade Federal de Pernambuco.

A Doutora Maiara Celine pela simpatia, competência e paciência em tirar todas as minhas dúvidas quando era necessário. Pela realização das investigações com a microbiota comensal de *Aedes aegypti*.

Ao Professor Thiago Napoleão por todo o auxílio na realização dos experimentos e pela disposição em ensinar.

A Professora Patricia Paiva por me receber sempre com um carinho imenso no Laboratório de Bioquímica de Proteínas.

A Dra. Daniela Navarro e a Jessica do Laboratório de Ecologia Química do DQF pelas contribuições e por terem cedido os insetos para a realização dos experimentos desta dissertação.

Aos Professores Valéria e Álvaro por ter “aberto as portas” do laboratório de Fisiologia de Insetos (LAFI) para a concretização dos experimentos de histologia e histoquímica.

A Doutora Glaucilane e a Hilton pelos ensinamentos, pelo apoio e auxílio durante a interpretação dos dados revelados nas análises histológicas.

A minhas amigas Bruna e Amanda que desde o início da graduação até aqui vem me acompanhando no meu processo acadêmico, agradeço por todo incentivo e conselhos compartilhados.

Ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, a todos os professores pelo ensinamento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro fundamental para a realização deste mestrado.

Enfim, a todos aqueles não citados, que contribuíram direta e indiretamente para que eu vencesse mais esta importante etapa de minha vida.

*“Mesmo quando tudo parecer desabar, cabe
a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar
desistir ou lutar, porque descobrir, no
caminho incerto da vida, que o mais
importante é o decidir.”*

Cora Coralina

RESUMO

A picada de fêmeas de *Aedes aegypti* pode transmitir arboviroses como dengue, chikungunya, zika e febre amarela. O controle populacional deste vetor é a principal estratégia para o controle das doenças. No presente trabalho, extrato salino (ES), decocto e infusão de folhas de *Plectranthus barbatus* foram estudados quanto ao efeito sobre larvas de *Ae. aegypti* no terceiro instar (L₃), bem como à presença de lectinas e inibidores de tripsina. O efeito do ES sobre a atividade das proteases digestivas, permeabilidade da membrana peritrófica e morfofisiologia do intestino médio de L₃ foi relatado. Além disso, o crescimento da microbiota intestinal e a melanogênese das larvas tratadas com o ES foram investigados. ES matou L₃ (CL₅₀ de 0,48%, p/v) e revelou a presença de uma lectina ligadora de ribose/galactose e de atividade inibidora de tripsina. O decocto e a infusão não interferiram na sobrevivência das larvas. SDS-PAGE para ES revelou a presença de bandas peptídicas de 66, 63 e 34 kDa, que resistiram à hidrólise pelas proteases do intestino de L₃ (27,2 U/mg). As atividades de lectina e inibidor de tripsina em ES resistiram à hidrólise por proteases intestinais de L₃, e a atividade dessas enzimas foi abolida por ele. A permeabilidade da membrana peritrófica de L₃ foi aumentada pelo ES na concentração de 0,48%, o que pode ter impedido que as larvas alcançassem o quarto ínstar. A morfologia do intestino médio larval não foi afetada por ES, mas o conteúdo de polissacarídeos neutros nas células epiteliais foi reduzido. ES estimulou, *in vitro*, a superproliferação da microbiota do intestino médio de L₃ e a produção de melanina. O aquecimento (100° C, 5h) do ES resultou em aumento das suas atividades, incluindo a toxicidade para as larvas. Os resultados aqui relatados apontam ES como agente larvicida contra L₃ de *Ae. aegypti*. Este efeito pode estar ligado às atividades de lectina e inibidor de tripsina e envolve a inibição de proteases digestivas, danos à fisiologia larval e disbiose.

Palavras-chave: Vetor da dengue. Falso-boldo. Efeito larvicida. Microbiota intestinal. Melanogênese.

ABSTRACT

The bite of *Aedes aegypti* females can transmit arboviruses such as dengue, chikungunya, zika and yellow fever. The population control of this vector is the main strategy for control of these diseases. In the present work, saline extract (SE), decoction and infusion of *Plectranthus barbatus* leaves were studied for their effect on *Ae. aegypti* third instar larvae (L₃), as well as the presence of lectins and trypsin inhibitors. The effect of SE on digestive protease activity, peritrophic membrane permeability and midgut morphophysiology of L₃ has been reported. In addition, the growth of the gut microbiota and the melanogenesis of larvae treated with SE were investigated. SE killed L₃ (LC₅₀ 0.48%, w/v) and revealed the presence of a ribose/galactose binding lectin and trypsin inhibitory activity. Decoction and infusion did not interfere in the L₃ survival. SDS-PAGE for SE revealed the presence of peptide bands of 66, 63 and 34 kDa, which resisted to hydrolysis by L₃ gut proteases (27.2 U/mg). The lectin and trypsin inhibitory activities of SE resisted to hydrolysis by L₃ gut proteases, and the activity of these enzymes was abolished by it. The permeability of the L₃ peritrophic membrane was increased by SE at concentration of 0.48%, which may have prevented the larvae from passing into the fourth instar. The morphology of larval midgut was not affected by SE, but the content of neutral polysaccharides in epithelial cells was reduced. SE stimulated, *in vitro*, the overproliferation of the L₃ midgut microbiota and the production of melanin. The heating (100° C, 5h) of the SE resulted in an increase in its activities, including the toxicity to the larvae. The results reported here indicate SE as a larvicidal agent against *Ae. Aegypti* L₃. This effect may be linked to the activities of lectin and trypsin inhibitor and involves the inhibition of digestive proteases, damage to larval physiology and dysbiosis.

Keywords: Dengue vector. Indian coleus. Larvicidal effect. Gut microbiota. Melanogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Fundamentação teórica

Figura 1 - Distribuição mundial da população de <i>Aedes aegypti</i>	17
Figura 2 - Ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i>	18
Figura 3 - Distribuição geográfica da ocorrência de Dengue em todo o planeta.....	19
Figura 4 - Distribuição geográfica do vírus zika em todo o planeta.....	21
Figura 5 - Distribuição geográfica da febre chikungunya em todo o planeta.....	22
Figura 6 - Distribuição geográfica mundial da febre amarela.....	23
Figura 7 - Esquema representando inibidores de proteases competitivos (A) e alostéricos (B).....	31
Figura 8 - Representação da tríade catalítica do sítio ativo das serinoproteases.....	32
Figura 9 - Esquema representativo da ligação cruzada entre lectinas e eritrócitos, formando uma malha de hemaglutinação.....	34
Figura 10 - Mecanismo de ação inseticida proposto para lectinas ao nível do intestino médio de insetos. (A) As lectinas podem interagir com (1) a quitina ou glicoproteínas da membrana peritrófica, (2) moléculas na superfície das células epiteliais do intestino, (3) enzimas digestivas, (4) componentes da dieta. (B) No epitélio do intestino médio, as lectinas podem interagir com proteínas de membrana, glicosiladas (1) ou não (2), que podem ter a função de transporte (3), e acarretar na endocitose das lectinas (4). (C) Ligação da lectina a receptores de membrana com ativação de morte celular apoptótica ao nível da mitocôndria (1). A apoptose acarreta no encolhimento celular, formação de bolhas nas membranas e condensação da cromatina (2), que evolui para fragmentação do núcleo, protrusões de membrana extensas e vazamento de conteúdo citoplasmático (3). Finalmente, o fragmento de células resulta em corpos apoptóticos e detritos que se acumulam no lúmen do intestino(4).....	35
Figura 11 - <i>Plectranthus barbatus</i>	37

Artigo

Figure 1 - (A) Investigation of SE from <i>P. barbatus</i> leaves for the presence of peptides resistant to hydrolysis by trypsin. SDS-PAGE of SE (1), and SE after incubation with the commercial trypsin (2) or with the <i>Ae. aegypti</i> L ₃ gut extract (3). (B) Effect of SE on the ability of proteases from L ₃ gut extract to hydrolyse azocasein. The concentrations of SE was expressed in dry weight/volume.....	60
--	----

Figure 2 - Effect of SE from *P. barbatus* leaves on the peritrophic membrane of *Ae. aegypti* L₃. (A1) Larva treated with the control solution (0.15 M NaCl). (A2) Dissected gut of control larva. (B1) Larva treated with SE at 0.48% (w/v). (B2) Dissected gut of larva treated with SE. (C1) Larva treated with SE at 0.48% (w/v) after heating (100 °C, 5h). (C2) Dissected gut of larva treated with the SE at 0.48% (w/v) after heating. All larvae were fed with activated charcoal (0.01%) by 48 h. A total of twenty larvae from each group were observed after 24 h from the start of the experiment. The images were visualized in a magnification stereoscopic microscope with increase of 6.8 x..... 60

Figure 3 - Effect of SE from *P. barbatus* leaves on morphology of *Ae. aegypti* L₃ midgut. Photomicrography of the midgut of L₃ midgut from control (A and B), and treated with SE (C and D) or heated SE (E and F). Ep: epithelium; black arrow: nucleus; black seta dashed: brush border; red arrow: peritrophic membrane; L: Lumen. Staining: toluidine Blue. 61

Figure 4 - Effect of SE from *P. barbatus* leaves on total protein content in *Ae. aegypti* L₃ midgut. Photomicrography of L₃ midgut: A (control), B (SE), C (heated SE) and D (Pixels). L: Lumen. Staining: Ponceau xylydine..... 62

Figure 5 - Effect of SE from *P. barbatus* leaves on neutral polysaccharides in *Ae. aegypti* L₃ midgut. Photomicrography of the midgut of L₃ midgut. A (control), B (SE), C (heated SE) and D (Pixels). L: Lumen. Staining: Periodic Acid Schiff (PAS)..... 63

Figure 6 - Effect of SE (heated or not) from *P. barbatus* leaves on the *in vitro* growth of microbiota from midgut and melanin production of *Ae. aegypti* L₃..... 63

LISTA DE TABELAS

Fundamentação teórica

Tabela 1 - Classes de inseticidas sintéticos e seus respectivos mecanismos de ação.....	29
--	----

Artigo

Table 1 - Larvicidal activity of saline extract of <i>P. barbaus</i> leaves against <i>Ae. aegypti</i> L ₃ ...	64
Table 2 - Characterization of the SE, decoction and infusion from <i>P. barbatus</i> leaves for protein concentration, ability of hemagglutination and trypsin inhibitor activity.....	64
Table 3 - Inhibition of the hemagglutinating ability of SE from <i>P. barbatus</i> leaves by monosaccharides.....	65
Table 4 - Hemagglutinating and trypsin inhibitory activities of saline extract of <i>P. barbatus</i> leaves after incubation with the <i>Ae. aegypti</i> L ₃ gut extracts	66
Table 5 - Comparison between the lectin, trypsin inhibitor and larvicidal activities, as well as inhibitory effect on L ₃ proteases for the SE before and after heating at 100° C during 5 h.....	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo geral	16
1.1.2 Objetivos específicos	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 <i>AEDES AEGYPTI</i>	17
2.1.1 Morfofisiologia intestinal de <i>Ae. aegypti</i>	23
2.2 CONTROLE POPULACIONAL DE <i>AE. AEGYPTI</i>	25
2.2.1 Controle Biológico	26
2.2.2 Controle mecânico	27
2.2.3 Controle químico	28
2.3 PROTEÍNAS COMO BIOINSETICIDAS	30
2.3.1 Inibidores de proteases	30
2.3.2 Lectinas	33
2.4 <i>PLECTRANTHUS BARBATUS</i>	37
3 RESULTADO.....	39
3.1 ARTIGO: <i>Plectranthus barbatus</i> LEAF EXTRACT CONTAINING LECTIN AND TRYPIN INHIBITOR AFFECTS THE MORPHOPHYSIOLOGY OF <i>Aedes aegypti</i> LARVAE	39
4 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	69

INTRODUÇÃO

Arboviroses são doenças causadas pelos arbovírus, ou seja, são vírus transmitidos por artrópodes, incluindo os insetos. A dengue, a chikungunya, a febre Zika e a febre amarela são exemplos de importantes arboviroses endêmicas de regiões tropicais que compartilham o principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti* (OMS, 2018a). O ciclo de vida de *Ae. aegypti* compreende fases aquáticas (ovo, quatro instares larvais e pupa) e uma fase aérea que corresponde ao estágio sexualmente maduro (MURRAY et al., 2013; GUAGLIARDO et al., 2015). Por estarem confinadas no ambiente aquático, as fases de ovo e larva apresentam a maior vulnerabilidade às estratégias de controle populacional (PONTUAL et al., 2012).

Uma vez que ainda não existem vacinas contra chikungunya e febre zika, e que a vacina disponível para imunização contra dengue apresenta sérias restrições, o controle de populações do vetor ainda permanece sendo a principal e a mais eficiente estratégia para erradicar as arboviroses (ZARA et al., 2016; OMS, 2018b). Em adição, apesar de existir uma eficiente vacina contra febre amarela, o caráter periodicamente reemergente da doença contribui para a necessidade de manter controlada a densidade populacional de *Ae. aegypti* (OMS, 2018b).

O controle convencional de *Ae. aegypti* é realizado com agentes químicos, os quais têm contribuído para a seleção de insetos resistentes (ZARA et al., 2016). Nesse sentido, inseticidas de origem natural, incluindo extratos vegetais, inibidores de proteases e lectinas têm sido considerados promissores. Os extratos vegetais possuem vantagem por serem misturas complexas, contendo geralmente mais de um princípio ativo cuja ação envolve mecanismos diversos (PONTUAL et al., 2012). Por exemplo, os inibidores de proteases, quando ingeridos por insetos, acarretam prejuízos ao processo de digestão, diminuição da biodisponibilidade de aminoácidos e dificuldade na absorção de nutrientes, o que leva o inseto à morte por inanição (RAMOS et al., 2009; PONTUAL et al., 2014). As lectinas também podem apresentar propriedade inseticida através da ligação a componentes da membrana peritrófica, às células do epitélio intestinal dos insetos, a enzimas digestivas ou ainda a partículas de alimento ingerido, impedindo sua digestão ou absorção (PAIVA et al., 2012; NAPOLEÃO et al., 2018).

Além dos alvos para ação de lectinas e inibidores de proteases citados acima, o intestino de *Ae. aegypti* contém uma microbiota simbiote representada pelos gêneros bacterianos de *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Acinetobacter* e *Aeromonas*. Essa microbiota atua na síntese de nutrientes essenciais e na proteção contra patógenos colonizadores, além de estar relacionada com a susceptibilidade do

vetor nas fases larval e adulta à infecção pelo arbovírus causador da dengue (DONG et al., 2009; APTE-DESHPANDE et al., 2012; FINNEY et al., 2015). Nesse sentido, danos a essa microbiota podem prejudicar a viabilidade do inseto por desnutrição ou por disbiose ou ainda, impedir que ele seja reservatório do vírus da dengue (AZAMBUJA et al., 2005; DILLON et al., 2005; DONG et al., 2009).

Plectrantus barbatus (família Lamiaceae) é popularmente conhecida como falso-boldo, malva-santa e boldo silvestre. Na medicina popular, suas folhas são utilizadas como infusão contra má digestão, gastrite, afecções do fígado, bronquite e pneumonia, dentre outras patologias (LUKHOBBA et al., 2006). Foi previamente reportado que metabólitos secundários de folhas de *P. barbatus* foram tóxicos para larvas de *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus* e *Culex tritaeniorhynchus* (GOVINDARAJAN et al., 2016). Este relato motivou a hipótese de que preparações de folhas de *P. barbatus* podem causar mortalidade de larvas de *Ae. aegypti*. No presente trabalho, o extrato salino, a infusão e o decocto de folhas de *P. barbatus* foram caracterizados quanto à presença de inibidores de tripsina e lectinas. Em seguida, as três preparações foram avaliadas quanto ao potencial larvicida contra *Ae. aegypti*. O efeito do extrato na permeabilidade da membrana peritrófica, na morfologia e histoquímica do intestino, bem como no crescimento da microbiota intestinal e na melanogênese das larvas (terceiro instar) foi determinado na tentativa de fornecer *insights* sobre o mecanismo da ação larvicida detectada.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Avaliar o extrato salino de folhas de *Plectranthus barbatus* sobre a morfofisiologia intestinal de larvas de *Aedes aegypti* no terceiro instar.

1.1.2 Específicos

- Obter preparações (extrato salino (ES), infusão e decocto) de folhas de *P. barbatus*.
- Analisar ES, infusão e decocto quanto à atividade larvicida contra *Ae. aegypti* e quanto a presença de lectinas e inibidores de tripsina.
- Investigar o envolvimento das atividades de lectina e inibidor de tripsina no efeito larvicida.
- Caracterizar a preparação mais ativa (ES) quanto ao perfil peptídico sob condições desnaturantes.
- Estudar a resistência dos polipeptídeos de ES à hidrólise por tripsina comercial e por proteases do intestino de L₃, assim como determinar o efeito de ES sobre a atividade dessas enzimas.
- Avaliar o efeito de ES sobre a permeabilidade da membrana peritrófica de L₃.
- Determinar o efeito de ES sobre a morfologia do intestino médio de L₃, bem como sobre o conteúdo de proteínas totais e polissacarídeos neutros no corpo das larvas.
- Investigar os efeitos de ES sobre o crescimento *in vitro* da microbiota comensal presente no intestino médio de L₃ e sobre a produção de melanina pelas larvas.
- Determinar o efeito do aquecimento exaustivo de ES nas atividades de lectina e inibidor de tripsina, bem como na toxicidade para L₃ de *Ae. aegypti*.

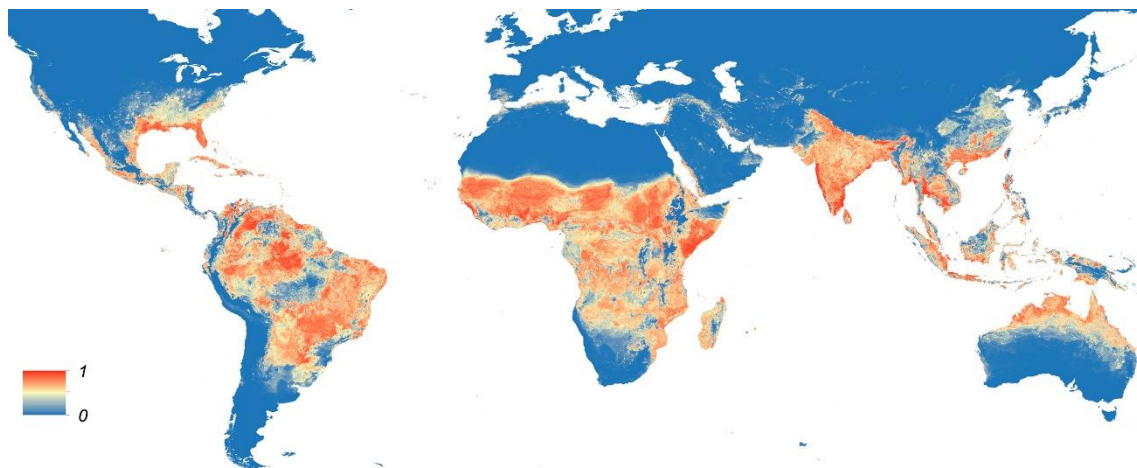
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. *Aedes aegypti*

Aedes aegypti (Ordem Diptera, Família Culicidae) é o nome científico atribuído por Linnaeus (1762) ao popularmente conhecido “mosquito da dengue”. É um inseto extremamente sinantrópico, devido a sua característica antropofílica e necessidades alimentar e reprodutiva específicas. O mosquito mede menos de 1 cm e uma característica que auxilia na identificação da espécie é a presença de manchas brancas distribuídas pelo corpo e pernas (LAMBRECHTS e FAILLOUX, 2012).

O *Ae. aegypti* teve sua ocorrência ampliada pela ação humana que foi responsável pelo transporte principalmente dos ovos, mas também das larvas e do mosquito adulto em navios, aviões e veículos terrestres. Esse transporte foi responsável pela fixação de *Ae. aegypti* nas regiões tropicais, onde o mosquito encontrou fatores ambientais (chuva, temperatura e umidade relativa) que favoreceram seu ciclo de vida. No mapa (Figura 1) indica a probabilidade de ocorrência de *Ae. aegypti*. O grau de incidência varia de 0, em azul, para 1, em vermelho, em uma resolução espacial de 5 km x 5 km. (EISEN et al., 2014; FRANCIS e ALEXANDER, 2014).

Figura1. Distribuição mundial da população de *Aedes aegypti*.

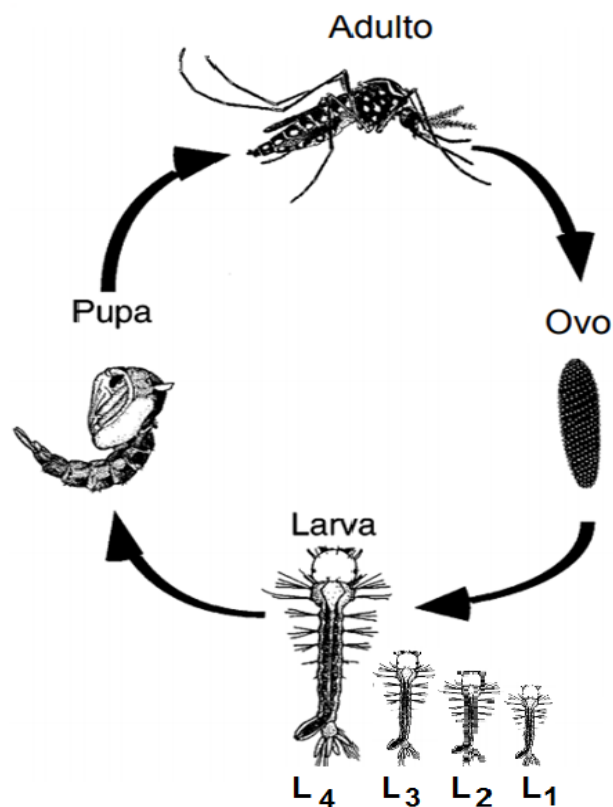


Fonte: <http://www.comunitor.com.br/> (publicado em 29/06/2016)

O ciclo de vida de *Ae. aegypti* se dá através da metamorfose completa, ou seja, a espécie apresenta desenvolvimento holometábólico. Uma boa parte deste ciclo é representada por formas aquáticas: ovo, fase larval (dividida em quatro instares) e pupa (Figura 2). A fase

adulta é aérea e corresponde ao estágio mais preocupante, devido à sua alta taxa de dispersão e por ser um inseto em constante processo de expansão geográfica, tanto em áreas urbanas quanto em áreas rurais (MURRAY et al., 2013; GUAGLIARDO et al., 2015). As fêmeas de *Ae. aegypti* possuem estratégias para ovipositar em diferentes criadouros, evitando a superlotação e competição entre as larvas por espaço e alimento, contribuindo para o sucesso de sua adaptação pantropical (TSUNODA et al., 2014).

Figura 2. Ciclo biológico de *Aedes aegypti*



(Fonte: suportegeografico77.blogspot.com/2017/10/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti.html)

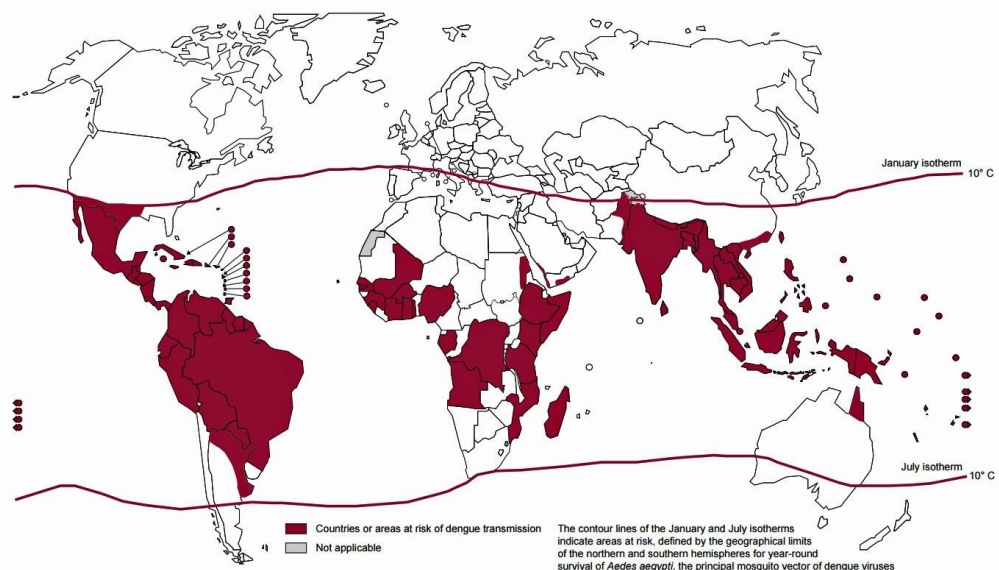
Sobre o hábito alimentar de *Ae. aegypti*, somente as fêmeas são hematófagas. Seu aparelho bucal é mais alongado (tipo picador sugador) e está adaptado estrutural e fisiologicamente para este hábito alimentar. O repasto sanguíneo é essencial às fêmeas, pois o sangue contém proteínas necessárias ao desenvolvimento dos embriões dentro dos ovos. Por outro lado, os machos apresentam um aparelho bucal reduzido, sem potencial para romper a integridade da pele. Sua alimentação é composta por néctar e seiva oriundas de plantas (SILVA e ANGERAMI, 2008; MOREIRA et al., 2009).

Tem sido relatado que fatores abióticos afetam diretamente a dinâmica populacional do *Ae. aegypti* e, conseqüentemente, interferem na transmissão das doenças (YANG et al., 2014). Segundo Pliego et al. (2017), a ação conjunta da precipitação sazonal e da temperatura pode potencializar um surto de crescimento populacional de *Ae. Aegypti*, causando um problema de saúde pública por ser o principal transmissor de quatro arboviroses em humanos.

Arboviroses são doenças causadas por arbovírus, ou seja, vírus que são transmitidos por artrópodes (insetos e aracnídeos). Esse grupo de doenças vem se tornando um crescente problema de saúde pública no mundo principalmente pelo seu potencial de dispersão, pela capacidade de adaptação a novos ambientes e hospedeiros (vertebrados ou invertebrados), pela possibilidade de causar epidemias extensas e pela ocorrência de grande número de casos graves, com acometimentos neurológico, articular e hemorrágico (DONALISIO et al., 2017). As arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti* são a dengue, a chikungunya, a febre Zika e a febre amarela (OMS, 2018a).

A dengue é transmitida pela picada de fêmeas de *Ae. aegypti* e em menor extensão pelo *Aedes albopictus*, os quais se espalharam rapidamente pelos trópicos. É interessante notar a semelhança entre a distribuição geográfica da dengue (Figura 3) e aquela apresentada para o *Ae. aegypti* (Figura 1). De modo semelhante ao mosquito, a dengue é difundida em todos os trópicos, com variações locais de risco influenciadas pela precipitação, temperatura e urbanização rápida e não planejada (OMS, 2015).

Figura 3. Distribuição geográfica da ocorrência de dengue em todo o planeta.



Fonte: OMS (2015)

O agente etiológico da dengue é um arbovirus pertencente ao gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*) que ocorre em quatro sorotipos distintos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4). A circulação e os frequentes surtos de dengue representam novos desafios para a saúde pública (PAIXÃO et al., 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o ano de 2016 foi caracterizado por grandes surtos de dengue em todo o mundo. A Região das Américas registrou mais de 2,38 milhões de casos em 2016, onde o Brasil contribuiu com pouco menos de 1,5 milhão de casos, aproximadamente 3 vezes mais do que em 2014. Mais de mil mortes pela dengue também foram registradas na região das Américas (OMS, 2016). Em 2017, houve uma redução de 73% no número de casos de dengue nas Américas. Panamá, Peru e Aruba foram os únicos países que registraram aumento nos casos em 2017 (OMS, 2017). No primeiro trimestre de 2018, uma redução de 27% dos casos foi observada (OMS, 2018a).

Pacientes com dengue apresentam sintomas clínicos iniciais muito semelhantes aos de uma gripe, tais como febre alta, dor de cabeça, náusea, erupção cutânea, dor no corpo. A doença resulta em aproximadamente 500.000 hospitalizações anuais, com riscos aumentados de dengue hemorrágica durante infecções secundárias (OMS, 2018).

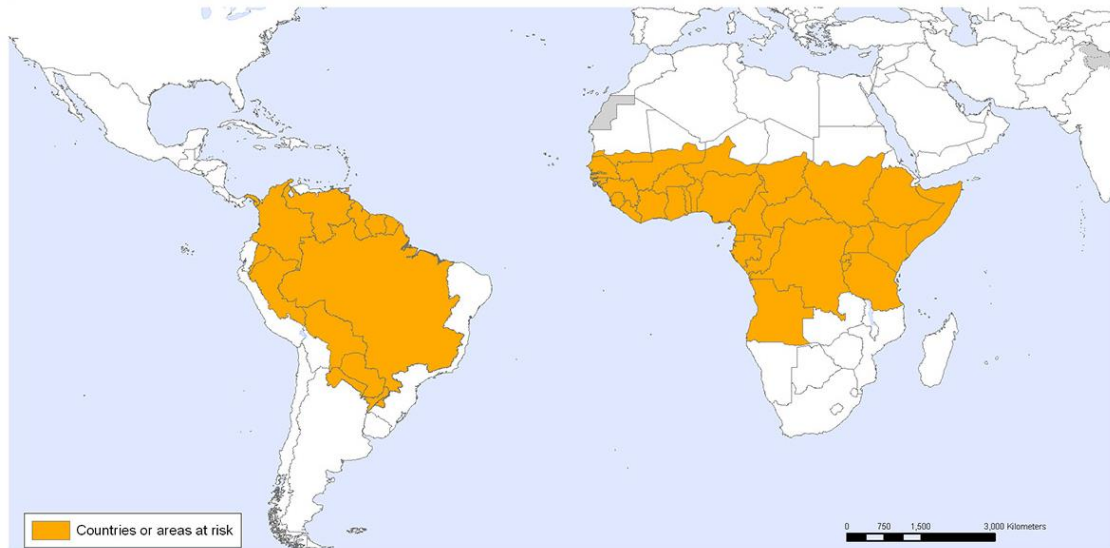
Outra arbovirose transmitida pelo mosquito *Ae. aegypti* é a febre zika, a qual foi inicialmente relatada na África tropical, no sudeste da Ásia, e nas ilhas do Pacífico, contudo, atualmente ocorre também na América do Sul e nos Estados Unidos (Figura 4). O vírus zika (ZIKV) também se tornou uma preocupação em saúde pública no cenário mundial devido à sua rápida expansão geográfica em 2015. O Ministério da Saúde do Brasil notificou à OMS sobre um aumento significativo de casos de microcefalia congênita no nordeste do Brasil, em associação com a epidemia de infecção pelo vírus zika na região (MDSD, 2015; RAJAH et al., 2016). Em 2016, a OMS declarou a associação do ZIKV aos casos de microcefalia, o que se tornou uma emergência de saúde pública de interesse internacional (OMS, 2016).

A transmissão do ZIKV também ocorre geralmente devido ao repasto sanguíneo pelas fêmeas do *Ae. aegypti*. Outras hipóteses de transmissão já foram descritas, incluindo a via sexual, a transmissão congênita, transfusão sanguínea, transplantes e acidentes em laboratórios (IOOS et al., 2014; MUSSO et al., 2015; HENNESSEY et al., 2016).

As manifestações clínicas pelo ZIKV são geralmente assintomáticas e autolimitadas, porém ao surgirem os sintomas, as manifestações assemelham-se às da dengue, onde a febre, artrite ou artralgia e conjuntivite são as mais comuns. Outros sintomas podem ser detectados na infecção pelo vírus zika, como vômito, edema nas extremidades, mialgia e aparecimento

hemorrágica, durante a qual episódios de hematêmese, melena, petéquias, equimoses e outras manifestações hemorrágicas são comuns (KERR, 1951; MONATH, 2001; VASCONCELOS, 2003).

Figura 6. Distribuição geográfica mundial da febre amarela.



Fonte: OMS, 2008

O controle de populações de *Ae. aegypti* ainda representa a principal e mais eficiente forma de controle da chikungunya, da febre zika, e da dengue. Isso porque ainda não existem vacinas contra as duas primeiras e apesar de existir vacina para imunização contra o vírus da dengue, ela é contraindicada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para pessoas que nunca tiveram contato com nenhum dos quatro sorotipos. A contraindicação resultou de estudos conduzidos pelo laboratório produtor que apontaram o risco de pessoas que nunca tiveram a doença desenvolverem formas mais graves de dengue caso sejam infectadas (OMS, 2018b). Uma vacina segura e eficaz contra febre amarela está disponível há mais de 80 anos, tendo sido esta doença erradicada em muitos países. Contudo, no Brasil, tem sido registrada desde dezembro de 2016, a sua reemergência pela transmissão de febre amarela silvestre (CAVALCANTE e TAUIL, 2017). Segundo o Boletim Epidemiológico nº27/2018, no período de monitoramento julho/2017 a junho/2018 foram confirmados 1376 casos humanos e 483 óbitos.

2.1.1 Morfofisiologia intestinal de *Ae. aegypti*

O tubo digestivo dos insetos é dividido em intestinos anterior, médio e posterior e essa divisão é baseada na origem embrionária e função fisiológica de cada porção (CHAPMAN, 1985; DOW, 1987). Enquanto o intestino anterior apresenta reduzida capacidade de absorção, o intestino posterior é o mais permeável e, portanto, é o responsável por certo grau de absorção de substâncias importantes para a nutrição do inseto. Apesar do intestino anterior não possibilitar a absorção, ele representa um importante sítio para digestão mecânica e química, envolvendo enzimas salivares e/ou digestivas regurgitadas do intestino médio (GULLAN e CRANSTON, 2014; CAMAROTI et al., 2017).

Entre os intestinos anterior e posterior, há o intestino médio, onde ocorre a maior parte da digestão, a absorção de nutrientes e a secreção das enzimas digestivas (HECKER, 1977). Na fase larval do *Ae. aegypti*, o intestino médio é composto por um tubo ligeiramente mais largo em sua região posterior, quando comparado à anterior. Na fase adulta, a região anterior do intestino é mais delgada e a posterior tem a forma adaptada para acomodar o sangue após o repasto. Tanto as larvas quanto os adultos têm seus intestinos compostos por uma única camada epitelial multifuncional revestida externamente por fibras musculares (JAGADESHWARAN et al., 2010). No intestino médio, o epitélio é constituído por três tipos celulares: as células epiteliais, as regenerativas e as calciformes (BILLINGSLEY, 1990).

As células epiteliais contêm várias redes de retículo endoplasmático, sendo a região onde acontece uma grande produção de enzimas digestivas e a absorção da maioria dos nutrientes no lúmen intestinal (LEHANE e BILLINGSLEY, 2012; CHAPMAN, 2013). Entre as células epiteliais encontram-se pequenas células regenerativas que são fundamentais para a renovação do epitélio digestivo e podem se diferenciar tanto em células digestivas quanto em endócrinas (CHAPMAN, 1985; HAKIM et al., 2001). As células calciformes regulam as funções do epitélio digestivo e secretam hormônios peptídicos em resposta ao estado alimentar do lúmen. (BROWN et al., 1985; YAMAGISHI et al., 2018).

Devido à ausência da camada cuticular, o intestino médio é frequentemente exposto à abrasão pelos alimentos. No entanto, na maioria dos insetos, as células do intestino médio produzem uma matriz extracelular chamada membrana peritrófica (HEGEDUS et al., 2009). As várias proteínas que suprem essa matriz são denominadas peritrofinas e possuem domínio de ligação a moléculas de quitina (DINGLASAN et al., 2009). Proteínas e precursores de quitina são secretados por células digestivas do intestino médio, e a matriz peritrófica se organiza por intercalação de fibrilas de quitina e peritrofinas (ROSE et al, 2014).

A membrana peritrófica divide o lúmen do intestino médio em duas regiões, a ectoperitrófica (onde ocorre a digestão intermediária que contém o alimento parcialmente

digerido) e a endoperitrófica em contato com o epitélio, onde ocorre a fase da digestão inicial (TERRA, 1988). Diversas funções foram atribuídas à membrana peritrófica, onde ela é capaz de limitar a entrada de potenciais patógenos, atuar como uma barreira seletiva para as enzimas digestivas e os produtos da digestão, além de desempenhar um papel importante no mecanismo de conservação ao compartimentalizar as enzimas no espaço ectoperitrófico (HEGEDUS et al., 2009; NAPOLEÃO et al., 2013).

Enzimas digestivas foram identificadas e caracterizadas em adultos de *Ae. aegypti*, incluindo tripsina (GE et al., 2012), quimotripsina (JIANG e KANOST, 1997), aminopeptidase (MORLAIS et al., 2003) e carboxipeptidases (ISOE et al., 2009). Nas larvas, atividades semelhantes, incluindo a presença de tripsina e quimotripsina, também foram descritas. A concentração de tripsina é duas vezes maior que a de quimotripsina nas larvas do quarto instar de *Ae. aegypti* (BOROVSKY e MEOLA, 2004; MESQUITA-RODRIGUES et al., 2011).

A microbiota intestinal do *Aedes* é composta por uma grande variedade de bactérias. *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Acinetobacter* e *Aeromonas* foram detectados no intestino médio dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (GUSMÃO, 2010; ZOUACHE et al., 2011; YADAV et al., 2015; DAVID et al., 2016). Bactérias do intestino médio do *Ae. aegypti* desempenham um papel significativo de associação simbiótica. Essa simbiose contribui com funções fisiológicas importantes para o hospedeiro, incluindo a síntese de nutrientes essenciais, a resistência a patógenos colonizadores, a estimulação do sistema imunológico, a alteração nas interações patógeno-hospedeiro e a competência vetorial, influenciando significativamente o potencial de transmissão da doença (AZAMBUJA et al., 2005; DILLON et al., 2005; DONG et al., 2009; FINNEY et al., 2015). Por outro lado, foi observado que a exposição larval a determinados tipos de bactérias também pode reduzir a competência vetorial do inseto adulto, como a presença de bactérias do gênero *Enterobacter* na composição da microbiota intestinal de larvas de *Ae. aegypti* (DICKSON et al., 2018).

2.2 Controle populacional de *Ae. aegypti*

O controle do *Ae. aegypti* tem constituído um importante desafio, especialmente nos países em desenvolvimento e, embora os recursos destinados ao controle deste vetor tenham como objetivo principal a implementação de programas, muitas vezes estes não têm alcançado sucesso. Aspectos relacionados a problemas de infraestrutura das cidades e a ocorrência de

populações de insetos resistentes a alguns inseticidas químicos convencionais são fatores que comprometem a efetividade dos métodos tradicionais de controle (ZARA et al., 2016). Nesse sentido, a OMS propôs a estratégia de Manejo Integrado de Vetores (MIV) que integra diversas abordagens como os controles biológicos, mecânico e químico, na tentativa de alcançar uma maior eficiência na redução da abundância do vetor e na contenção das doenças relacionadas (OMS, 2012).

2.2.1 Controle Biológico

O controle biológico para o *Ae. aegypti* consiste na utilização de predadores naturais, como peixes, que se alimentam de larvas e pupas. Fungos, bactérias e parasitas também podem ser eficientes na redução da densidade populacional do vetor (CORDEAU et al., 2016). No Brasil, o controle biológico vem assumindo grande importância, tanto pelos resultados demonstrados em pesquisas, quanto pela necessidade de redução de agroquímicos tóxicos no ambiente (EMBRAPA, 2012).

Pesticidas biológicos, relacionados a microrganismos entomopatogênicos, representam uma estratégia ecologicamente correta e eficaz para controlar insetos vetores de doenças ou pragas agrícolas. Esse tipo de controle apresenta vantagens específicas, pois são menos danosos ao meio ambiente, afetam apenas organismos alvo, tem uma elevada eficácia em pequenas quantidades e decomposição rápida, além de minimizam o uso de pesticidas químicos (MALAIKOZHUNDAN e VINODHINI, 2018).

Um exemplo de pesticida biológico é o *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma bactéria geneticamente modificada para expressar proteínas inseticidas. Dentre estas proteínas, as mais conhecidas são as proteínas cristal (Cry), produzidas durante a fase de esporulação. Soares-da-Costa et al. (2010) e Silva et al. (2015) identificaram isolados de Bt de solos brasileiros como agentes biológicos para o controle de *Ae. aegypti*, onde a alta toxicidade desses isolados para o inseto pode ser consequência da ação conjunta de toxinas do grupo Cry. As proteínas Cry contidas no cristal, quando ingeridas pelos insetos são solubilizadas pelo pH alcalino no intestino das larvas e liberadas como pró-toxinas que serão ativadas por serino-proteases, formando toxinas ativas que se ligarão a receptores das microvilosidades intestinais. Após a ligação, as toxinas se inserem na membrana formando poros e desestabilizando o gradiente osmótico levando à morte por septicemia (SCHNEPF et al., 1998; BUENO et al., 2012; VACHON et al., 2012).

Coelho et al. (2017) avaliaram o controle de larvas de *Ae. aegypti* utilizando camarões naturais (gênero: *Macrobrachium*) do rio Tietê, em São Paulo, onde foram capazes de consumir grandes quantidades de larvas em um curto espaço de tempo, constituindo-se em uma importante ferramenta de controle biológico desses parasitas vetores no ambiente.

2.2.2 Controle mecânico

O controle mecânico está relacionado à adoção de práticas capazes de eliminar o vetor e os criadouros, além de reduzir o contato do mosquito com o homem. As principais atividades de controle mecânico envolvem a proteção, a destruição ou a destinação adequada de criadouros (BRAGA e VALLE, 2007).

A armadilha de oviposição, conhecida nacionalmente como “ovitrampa” é uma das técnicas de controle mecânico mais utilizada onde, em um recipiente de cor escura, adere-se um material áspero que permite a fixação dos ovos depositados. Fay e Perry (1965) iniciaram o uso das ovitrampas para a vigilância das populações adultas de *Ae. aegypti*. No ano seguinte, ficou demonstrada a superioridade dessas armadilhas em relação à pesquisa larvária para verificação da ocorrência do vetor. As ovitrampas fornecem dados úteis sobre distribuição espacial e temporal (sazonal). Dados obtidos com essa metodologia também foram usados para monitorar o impacto de vários tipos de medidas de controle que envolvem a redução de populações do vetor com inseticidas. Embora as ovitrampas sejam muito úteis para verificação da presença e distribuição de fêmeas do vetor, não devem ser usadas como ferramenta única para estimativa do risco de dengue (RESENDE et al., 2013).

A impregnação de inseticidas em roupas é um outro exemplo de controle mecânico. O tratamento das roupas é feito com inseticidas piretróides (permetrina) que atuam como repelentes, prejudicando intensamente as habilidades motoras do inseto. Este grupo de inseticidas age nos canais de sódio dependentes de voltagem, resultando em movimentos penosos seguidos de espasmos e morte, quando passam muito tempo em contato com os tecidos impregnados (ORSBORNE et al., 2016). A grande desvantagem desse método é que, a cada lavagem, as roupas vão reduzindo sua proteção. Kittayapong et al. (2017) sugeriram a utilização de técnicas incluindo o micro-encapsulamento, como solução para este problema. Neste caso, seria possível uma ligação mais profunda do inseticida com as fibras do tecido, aumentando a duração da proteção fornecida. Portanto, a utilização dessa ferramenta poderia se tornar uma intervenção prática e econômica capaz de conferir proteção contra as doenças transmitidas pelo inseto.

2.2.3 Controle químico

O uso de inseticidas químicos vem sendo um dos métodos mais frequentemente utilizados. O primeiro inseticida de efeito prolongado foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), foi desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial, sendo um dos principais inseticidas sintéticos da classe dos organoclorados (ROZENDAAL, 1997; BRAGA e VALLE, 2007). Outras classes de inseticidas químicos foram investigadas com o intuito de apresentarem resultados semelhantes aos organoclorados. É o caso dos organofosforados, carbamatos e piretróides (BELLINATO et al., 2016). O mecanismo de ação de cada classe inseticida é apresentado na Tabela 1.

Apesar de serem eficientes, o uso exagerado e indevido desses compostos químicos acarreta em um desbalanço no ecossistema, em efeitos indesejados a organismos não-alvo e na seleção de insetos resistentes (SANTOS et al., 2013). Neste contexto, vem sendo estimulada a busca por novos métodos alternativos de controle químicos utilizando plantas, por exemplo (ARAÚJO et al., 2018).

As plantas possuem mecanismos de defesa contra insetos que envolvem síntese, degradação e transformação de agentes químicos, os quais são divididos em metabólitos primários e secundários (SIMÕES et al., 2010). Ambos têm sido investigados como possíveis estratégias de controle, podendo agir como toxinas inseticidas (WAKSMUNDZKA et al., 2008; UKEH e MORDUE et al., 2009; NAPOLEÃO et al., 2013).

Carboidratos, lipídeos e proteínas e ácidos nucleicos são definidos como integrantes do metabolismo primário. Os metabólitos primários estão envolvidos em processos químicos que intervêm diretamente na sobrevivência, no crescimento e na reprodução das plantas. Caracterizam-se por exercerem uma função metabólica direta e por serem compostos essenciais como intermediários nas vias catabólicas e anabólicas dos vegetais (GROENIGEN et al., 2015).

Tabela 1. Classes de inseticidas sintéticos e seus respectivos mecanismos de ação.

Inseticidas		
Classe	Exemplo	Mecanismo de ação
Organoclorados	Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT)	Atuam sobre os canais iônicos dependentes de voltagem, mantendo-os abertos continuamente, levando a um desequilíbrio dos íons sódio e potássio nos axônios, interferindo na transmissão normal dos impulsos nervosos.
Organofosforados	Temephos Malation Pirimifós-Metil Fenitrothion	Atuam inibindo a Acetilcolinesterase (AChE). A inibição de AChE resulta no acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas (ou sinapses), o que impede a interrupção da propagação do impulso elétrico.
Carbamatos	Propoxur Bendiocarbe	Inibem a AChE, onde a reação envolvida é a carbamilação. A inibição da enzima neste caso ocorre de maneira reversível, tendo a chance do seu uso não causar a morte do vetor caso seja administrado em baixas doses.
Piretróides	Deltametrina Lambda-Cialotrina Cipermetrina Ciflutrina Permetrina	Atuam mantendo abertos os canais de sódio das membranas dos neurônios. Podem atuar de dois diferentes tipos: 1) aqueles que, entre outras respostas fisiológicas, têm um coeficiente de temperatura negativo; 2) e os que apresentam coeficiente de temperatura positivo.

Fonte: STINE e BROWN, (1996); SODERLUND e BLOOMQUIST, (1989); LARINI, (1999); TOMLIN, (2000).

Metabólitos secundários são substâncias produzidas em pequenas quantidades e geralmente possuem uma estrutura complexa de baixo peso molecular e desempenham importantes atividades biológicas, como por exemplo, a função de defesa. São geralmente diferentes entre os grupos de plantas e sua ocorrência está associada a um padrão sazonal (COUTINHO, 2013). Além disso, são sintetizados em tipos celulares especializados e em distintos estágios de desenvolvimento, tornando seu isolamento e purificação mais trabalhosos. Os metabólitos secundários apresentam diversos constituintes químicos, dentre eles os compostos fenólicos, os terpenos e os alcaloides. Cada família, gênero, e espécie de plantas produz um ou uma mistura desses constituintes químicos, cuja presença pode ser utilizada como caracteres taxonômicos na classificação dos vegetais (TAIZ e ZEIGER, 2009).

2.3 Proteínas como bioinseticidas

2.3.1 Inibidores de proteases

Proteases são enzimas amplamente distribuídas nos sistemas vivos e representam cerca de 2 a 4% dos produtos codificados por genes. Atuam na digestão, na coagulação sanguínea, na defesa contra patógenos, na replicação viral, na cicatrização de feridas, dentre outros processos. Devido ao caráter irreversível da função de uma protease (a catálise da hidrólise irreversível de uma ligação peptídica), esta enzima precisa ser firme e finamente controlada, evitando prejuízos à homeostasia (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011).

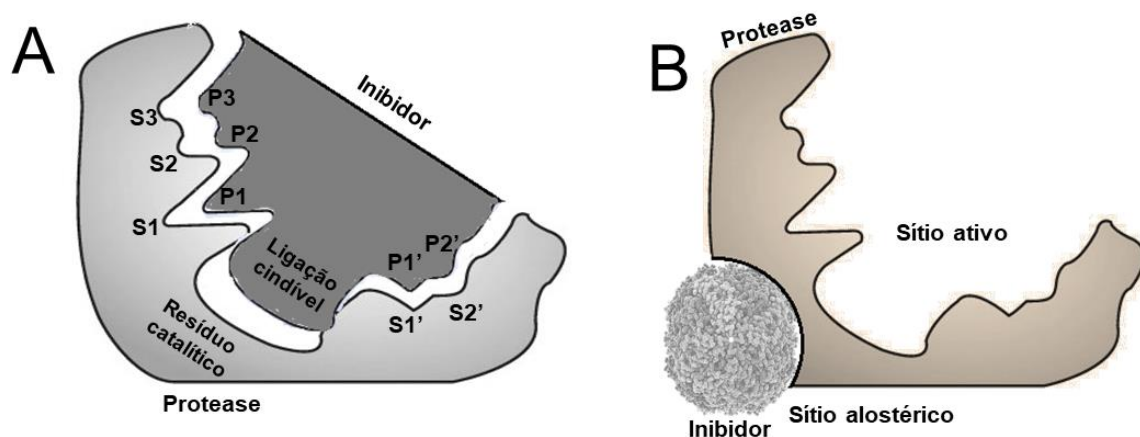
Em todos os seres vivos, a atividade proteolítica endógena é controlada por estratégias como a regulação espacial e temporal, a ativação de zimogênios e, em especial, a síntese de macromoléculas com atividade inibidora de proteases (FARADY e CRAIK, 2010). Em plantas, os inibidores da atividade proteolítica endógena podem ser produzidos por células em tecidos de armazenamento, incluindo as sementes e os tubérculos, mas também podem ser encontrados em folhas, flores e frutos (CALDERON et al., 2010; KRISHNAN et al., 2015).

Os inibidores de proteases são proteínas ou peptídeos que bloqueiam a atividade de enzimas proteolíticas, formando complexos estequiométricos cuja ausência ou redução na atividade catalítica pode resultar em um bloqueio (inibição competitiva) ou em alguma alteração (inibição alostérica) na conformação do sítio ativo da protease (VOLPICELLA et al., 2011; DIAS et al., 2017). A grande maioria dos inibidores de protease são competitivos (Figura 7A). Os inibidores competitivos se ligam à enzima alvo seguindo um modelo chave-fechadura, de maneira similar ao substrato. Esse mecanismo padrão envolve a inserção de

uma alça reativa no sítio ativo da enzima, sendo esta complementar à região de especificidade para o substrato na protease alvo. Uma vez ligada à protease, a “ligação cindível” dos inibidores, diferentemente daquela dos substratos, é hidrolisada de maneira muito lenta, de modo que os produtos da hidrólise não são liberados e ligação do tipo amida (ligação peptídica) pode ser refeita (FARADY e CRAIK, 2010).

Os inibidores alostéricos (Figura 7B), por sua vez, levam a enzima alvo a um estado inativo, fechado ou similar a um zimogênio, impedindo a ligação entre a enzima e o seu substrato. Um inibidor alostérico é complementar a pelo menos um dos múltiplos sítios da enzima que regulam a sua atividade. Devido a estes sítios apresentarem sequências menos conservadas do que a de um sítio ativo de uma protease, é esperado que os inibidores alostéricos mostrem um maior grau de especificidade (FARADY e CRAIK, 2010).

Figura 7. Esquema representando inibidores de proteases competitivos (A) e alostéricos (B).



Fonte: O autor

Os inibidores de proteases podem ser classificados de acordo com a classe da protease à qual eles têm afinidade. Nesse aspecto, podem ser classificados como inibidores de serinoproteases (ex. inibidores de tripsina e de quimiotripsina), inibidores de cisteíno proteases (ex. inibidores de catepsinas como a cruzipaina), inibidores de aspártico proteases (ex. inibidores de pepsina e quimosina), inibidores de metalo proteases (ex. inibidores teciduais de metaloproteínases, os TIMPS) e inibidores de treonina proteases (ex. inibidores do proteossoma 20S) (LUCENA, 2010).

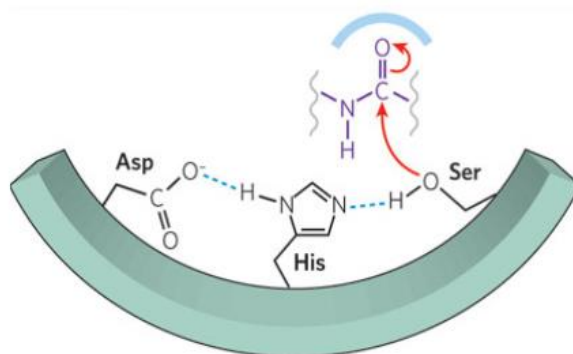
Os inibidores de serinoproteases são os mais estudados. Há diversos inibidores de serinoproteases (de origem vegetal) conhecidos e parcialmente caracterizados que inibem a atividade de enzimas proteolíticas, exercendo um papel chave nos processos digestivos em

insetos, como é o caso da tripsina (AGHAALI et al., 2013). A importância e a distribuição dessa enzima nos diferentes grupos taxonômicos têm estimulado a busca por inibidores de tripsina para o controle de populações de insetos-praga de importância agrícola ou médica (PONTUAL et al., 2017; SINGH et al., 2018).

Uma vez que o sítio ativo das proteases é fortemente conservado ao longo da evolução, os inibidores produzidos por grupos taxonômicos distantes com o objetivo de controlar a atividade proteolítica endógena são muitas vezes complementares a alguma sequência no sítio ativo de enzimas expressas por outros grupos taxonômicos (FARADY e CRAIK, 2010). Por exemplo, quando ingeridos por insetos, os inibidores de proteases exógenos se ligam ao sítio ativo de enzimas proteolíticas endóge nas inibindo a interação com os substratos e acarretando em perda da função proteolítica ao nível do intestino. Como resultado, podem ocorrer efeitos deletérios severos que incluem prejuízos ao processo de digestão, diminuição da biodisponibilidade de aminoácidos e dificuldade na absorção de nutrientes, o que geralmente leva o inseto à morte por inanição (RAMOS et al., 2009; PONTUAL et al., 2014).

Tripsina é uma serinoprotease, ou seja, apresenta no seu sítio ativo a tríade catalítica (representada pela serina, histidina e aspartato) (Figura 8), a qual se destaca pela distribuição ubíqua nos seres vivos. Proteases com atividade tripsina-símile são expressas por vegetais, por microrganismos e por animais, incluindo os insetos; Essa distribuição ubíqua é responsável pela toxicidade dos inibidores de tripsina para microrganismo e, em especial, para insetos (BHATTACHARYYA et al., 2007; KHANGEMBAM & CHAKRABARTI, 2015).

Figura 8. Representação da tríade catalítica do sítio ativo das serinoproteases



Fonte: EREZ, FASS e BIBI, 2009

A atividade inseticida de inibidores de proteases tem sido relatada em vários estudos. Larvas de *Hyphantria cunea*, praga que causa sérios danos a árvores ornamentais e amoreiras,

tiveram seus intestinos removidos e utilizados como fontes de atividade enzimática. As preparações contendo atividade proteolítica foram incubadas com inibidor de protease de sementes de *Lathyrus sativus* L. (ervilha), o qual foi capaz de inibir em 34,72% e 100% das atividades de proteases totais e tripsina-símile, respectivamente (AGHAALI et al., 2013).

O inibidor de proteases extraído de bulbo de alho (*Allium sativum*) inibiu proteases digestivas do intestino médio de larvas de 3º instar de *Ae. aegypti* e causou atraso no desenvolvimento ou levou as larvas à morte ($CL_{50}=50,827 \mu\text{g} / \text{mL}$) (SHAMSI et al., 2018). Similarmente, Dias et al. (2017) mostraram que o inibidor de tripsina de sementes de *Cassia readndra* (Cl TI) promoveu toxicidade aguda nas larvas de 3º instar de *Ae. aegypti*, com uma CL_{50} de $2,28 \times 10^{-2} \text{ M}$ e também causou um atraso no desenvolvimento larval.

O tratamento com inibidores de tripsina isolados de sementes de *Inga vera* e de *Clitoriafair childiana* reduziu a taxa de sobreviventes de *Anagasta kuehniella*, ou acarretou em retardo no crescimento/desenvolvimento e na emergência de indivíduos malformados. (DANTZGER et al., 2015; BEZERRA et al., 2016).

Pontual et al. (2012) demonstraram que extrato aquoso de flores de *Moringa oleifera*, contendo inibidor de tripsina (MoFTI), apresentou atividade larvicida contra *Ae. aegypti* no segundo, terceiro e quarto instares larvais, bem como reduziu a atividade de tripsina no intestino das larvas. Quando isolado, MoFTI promoveu mortalidade das larvas recém-eclodidas, com CL_{50} de 0,3 mg/mL e inibiu o crescimento (CMI de 0,031 mg/mL) ou eliminou (CMB de 1,0 mg/mL) simbiontes do intestino das larvas (PONTUAL et al., 2014).

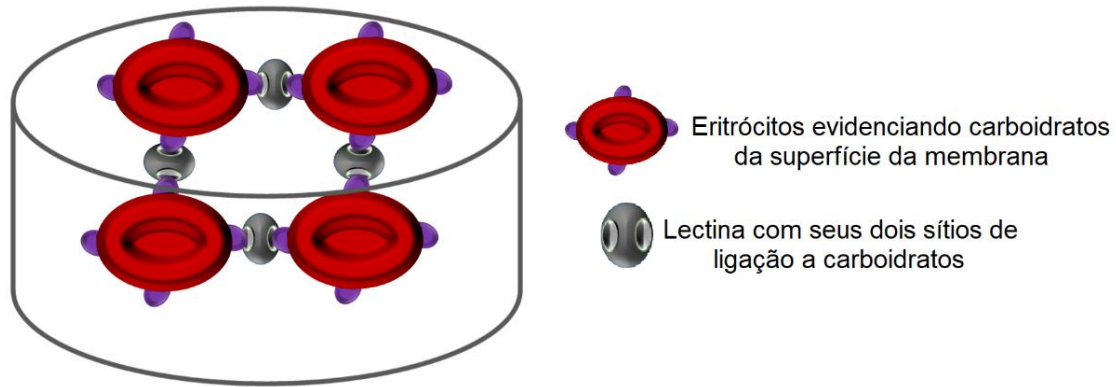
2.3.2 Lectinas

O termo lectina vem do latim “legere” que significa escolher, selecionar; uma referência à especificidade de seus domínios ativos. Essas proteínas, que podem conter uma porção glicídica ou não, possuem pelo menos dois domínios não catalíticos de ligação reversível e específica a carboidratos. Essa ligação envolve interações fracas, incluindo pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas (LAM e NG, 2011; PROCÓPIO et al., 2017). As lectinas, mesmo quando estão envolvidas com a atividade imune, não são produzidas em resposta ao contato com antígenos, o que as distingue dos anticorpos (COELHO et al., 2017).

A capacidade de reconhecer carboidratos permite às lectinas estabelecerem ligações com glicoconjugados presentes na superfície de diferentes tipos celulares, causando a aglutinação das células através de uma ligação cruzada. Quando essa ligação cruzada acontece

entre lectinas e eritrócitos, é formado um padrão conhecido como malha de hemaglutinação (Figura 9) (LIMA et al., 2018).

Figura 9. Esquema representativo da ligação cruzada entre lectinas e eritrócitos, formando uma malha de hemaglutinação.

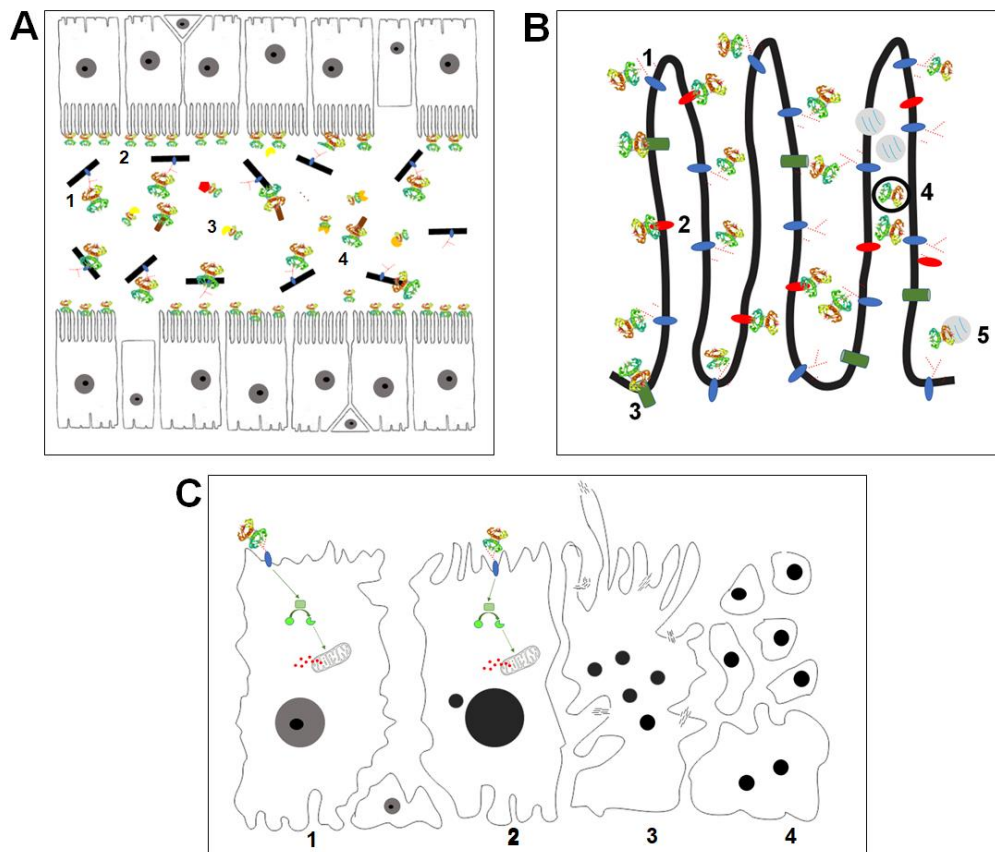


Adaptada de Lima et al. (2018)

Amplamente distribuídas na natureza, as lectinas são expressas por células vegetais, animais e microrganismos, e têm sido descritas como agentes citotóxicos, antitumorais, imunomoduladores, antimicrobianos, antiparasitários e inseticidas (ALBUQUERQUE et al., 2014; LIMA et al., 2018; MEDEIROS et al., 2018; PROCÓPIO et al., 2018; SILVA et al., 2018; RAMOS et al., 2019).

A atividade inseticida de lectinas (Figura 10A) tem sido atribuída: (1) à resistência à atividade proteolítica no intestino dos insetos; (2) à interação com componentes da membrana peritrófica, alterando as suas propriedades; (3) à ligação entre as lectinas e células do epitélio intestinal dos insetos, danificando o potencial transmembrana e prejudicando a absorção de nutrientes; (4) à complexação com o alimento ingerido impedindo sua digestão e absorção e (5) à ligação com moléculas de enzimas digestivas dos insetos, causando desbalanço da sua atividade (PAIVA et al., 2012; NAPOLEÃO et al., 2018).

Figura 10. Mecanismo de ação inseticida proposto para lectinas ao nível do intestino médio de insetos. (A) As lectinas podem interagir com (1) a quitina ou glicoproteínas da membrana peritrófica, (2) moléculas na superfície das células epiteliais do intestino, (3) enzimas digestivas, (4) componentes da dieta. (B) No epitélio do intestino médio, as lectinas podem interagir com proteínas de membrana, glicosiladas (1) ou não (2), que podem ter a função de transporte (3), e acarretar na endocitose das lectinas (4). (C) Ligação da lectina a receptores de membrana com ativação de morte celular apoptótica ao nível da mitocôndria (1). A apoptose acarreta no encolhimento celular, formação de bolhas nas membranas e condensação da cromatina (2), que evolui para fragmentação do núcleo, protrusões de membrana extensas e vazamento de conteúdo citoplasmático (3). Finalmente, o fragmento de células resulta em corpos apoptóticos e detritos que se acumulam no lúmen do intestino (4).



Fonte: Napoleão et al. (2018)

Ao atravessar a membrana peritrófica e atingir o epitélio do intestino médio dos insetos, as lectinas podem interagir com proteínas de membrana que sejam glicosiladas ou não glicosiladas (Figura 10B). Esta associação pode acarretar em respostas intracelulares que envolvem alterações na secreção de enzimas e de hormônios, ou na modificação da expressão de outros genes, por exemplo. Ainda, as lectinas podem se ligar a proteínas transportadoras de membrana, alterando a permeabilidade celular e a absorção de nutrientes, ou serem endocitadas. Além disso, as lectinas podem se ligar a receptores de membrana desencadeando cascatas de reação que irão ativar a mitocôndria, levando à morte celular por apoptose. Este processo pode levar ao encolhimento das células do epitélio, na formação de bolhas nas membranas e na condensação da cromatina, podendo o dano evoluir para a presença de

fragmentação nuclear, de protrusões na membrana e de extravasamento de conteúdo citoplasmático. Os fragmentos de células podem promover na formação de corpos apoptóticos e de muitos detritos que vão se acumulando no lúmen intestinal (Figura 10C). Esse conjunto de mecanismos envolvidos com a atividade inseticida das lectinas, pode acarretar em prejuízos aos processos de digestão, absorção de nutrientes, sinalização celular e transporte (NAPOLEÃO et al., 2018).

Uma lectina (MuLL), purificada a partir do extrato salino de folhas de *Miracrodruon urundeuva*, apesar de não causar a mortalidade de adultos de *Sitophilus zeamais*, exerceu forte efeito deterrente alimentar e prejudicou a nutrição destes insetos, o que foi refletido pela perda de biomassa. MuLL foi ainda capaz de interferir na atividade de enzimas digestivas, reduzindo a atividade de proteases totais, tripsina, fosfatases e amilases (NAPOLEÃO et al., 2013).

A lectina isolada da casca de *Crataeva tapia* (CrataBL) causou redução de 39% na atividade de cisteíno proteinases do intestino de larvas de *Callosobruchus maculatus*, importante praga do feijão-caupi. Também foi observada pela conjugação CrataBL-FITC (Isotiocianato de fluoresceína) a sua capacidade de ligação a glicoproteínas do intestino das larvas. Os autores concluíram que essa ligação afeta o metabolismo larval, devido ao complexo CrataBL-FITC ter sido encontrado no corpo gorduroso, nos túbulos de Malpighi e nas fezes das larvas tratadas, demonstrando assim o potencial desta proteína para controlar populações de *C. maculatus* (NUNES et al., 2015).

A lectina solúvel em água de sementes de *M. oleifera* (WSMoL) foi agente larvicida contra *Ae. aegypti*. A atividade larvicida da WSMoL está provavelmente relacionada com sua ligação a glicoconjugados presentes na matriz peritrófica e no epitélio intestinal das larvas (COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2012). Agra-Neto et al. (2014) demonstraram que WSMoL causou desbalanço na atividade de enzimas digestivas e detoxificantes de L₄ de *Ae. aegypti*. Santos et al. (2018) avaliaram a influência da irradiação gama na atividade da WSMoL contra *Ae. aegypti*, e concluíram que uma dose baixa de irradiação gama (10 mGy) pode ser usada para melhorar os efeitos deletérios de WSMoL para larvas e embriões de *Ae. aegypti*, enquanto que uma dose mais alta (10 Gy) prejudica a atividade inseticida da lectina.

2.4 *Plectranthus barbatus*

Plectranthus barbatus (família Lamiaceae), é uma espécie distribuída pela África, Ásia, Austrália e América do Sul, sendo uma das espécies mais comumente utilizadas do gênero *Plectranthus*, que conta com mais de 300 espécies (LUKHOBÁ et al., 2006). No Brasil é popularmente conhecida como falso-boldo, malva-santa e boldo silvestre. Trata-se de um arbusto aromático perene que pode chegar até 2 m de altura. Suas folhas são aveludadas, simples, opostas, de bordas dentadas, medindo de 5 cm a 8 cm. Caule amarelo-acinzentado bastante rugoso, pouco ramificado, com ramos quadrangulares. As flores apresentam coloração azulada e crescem em racemos (espigas) que surgem na estação chuvosa (Figura 11) (LORENZI e MATOS, 2002).

Figura 11 - *Plectranthus barbatus*



Fonte: LORENZI e MATOS, 2002

Na medicina popular, é utilizada a infusão e decocto de suas folhas para o tratamento de diversas doenças. As infusões aquosas de folhas de *P. barbatus* contêm muitos compostos antioxidantes e apresentam atividades antiinflamatórias, antimicrobianas e antifúngicas; enquanto as decocções de folhas apresentam uma elevada atividade inibidora de acetilcolinesterase (LUKHOBÁ et al., 2006)

Diversos tipos de compostos já foram isolados de diferentes partes da planta de *P. barbatus*, onde encontram-se diterpenóides, óleos essenciais, flavonoides, saponinas, antraquinonas e taninos (LUKHOBÁ et al., 2006). Albuquerque et al. (2007) isolaram a barbatusina um importante diterpenóide que está em maior quantidade nas folhas da planta e que tem atividade antitumoral comprovada. Ainda entre os diterpenóides, forskolin (encontrados nas raízes de *P. barbatus*) é uma substância que ganhou grande interesse na indústria farmacêutica, devido às suas propriedades biológicas, tais como: hipotensiva, antimetástase e broncodilatador. No entanto, sua natureza insolúvel em água limita sua utilidade clínica (ALASBAHI e MELZIG, 2010). Além disso, outros metabólitos secundários com atividades biológicas foram registrados. Kerntopf et al., (2002) isolaram o constituinte químico (α -pineno) a partir de folhas frescas de *P. barbatus*. Resultado semelhante foi descrito por Govindarajan et al, (2016) que destacaram o potencial do α -pineno, do eugenol e do β -cariofileno em folhas frescas de *P. barbatus* como agentes larvicidas contra *Anopheles subpictus*, *Ae. albopictus* e *Culex tritaeniorhynchus*.

3. RESULTADOS

3.1 ARTIGO: *Plectranthus barbatus* LEAF EXTRACT CONTAINING LECTIN AND TRYPSIN INHIBITOR AFFECTS THE MORPHOPHYSIOLOGY OF *Aedes aegypti* LARVAE

Ecotoxicology and Environmental Safety



Impact Factor: 4.527

***Plectranthus barbatus* leaf extract containing lectin and trypsin inhibitor affects the morphophysiology of *Aedes aegypti* larvae**

Welton Aaron de Almeida^a, Isabella Coimbra Vila Nova^a, Jéssica da Silva Nascimento^b, Maiara Celine de Moura^a, Afonso Cordeiro Agra-Neto^c, Hilton Nobre da Costa^d, Glaucilane dos Santos Cruz^d, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira^d, Valéria Wanderley-Teixeira^d, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Lidiane Pereira de Albuquerque^e, Emmanuel Viana Pontual^{d,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^c*Jardim Botânico do Recife, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^d*Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil.*

^e*Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Recife, Pernambuco, Brazil.*

*Corresponding author. E-mail address: emmanuelpontual@yahoo.com.br

Abstract

The bite of *Aedes aegypti* females can transmit arboviruses including dengue, chikungunya, zika and yellow fever. The population control of this vector is the main strategy for reduce the spreading of these diseases. In the present work, The *Plectranthus barbatus* leaf saline extract (SE), decoction and infusion were studied for their effects on the survival of *Ae. aegypti* third instar larvae (L₃), as well as for the presence of lectins and trypsin inhibitors. The effect of SE on digestive proteases, peritrophic membrane, morphophysiology and histochemistry of L₃ midgut are reported. In addition, the *in vitro* growth of the gut microbiota and the melanogenesis of larvae treated with SE were investigated. SE killed L₃ (LC₅₀ of 0.48%, w/v), as well as contained a ribose/galactose binding lectin and trypsin inhibitory activity. The decoction and infusion did not interfere in L₃ survival. SDS-PAGE revealed the presence of three polypeptide bands (34, 63 and 66 kDa), which resisted to the hydrolysis by L₃ gut proteases (27.2 U/mg). The incubation of SE with L₃ gut proteases did not alter the activities of lectin and trypsin inhibitor, but inhibited the larval enzymes. The permeability of L₃ peritrophic membrane was increased by SE at the concentration of 0.48%, which may have prevented the larvae from passing into the fourth instar. The morphology of larval midgut was not affected by SE, but the content of neutral polysaccharides in epithelial cells was reduced. SE stimulated the *in vitro* overproliferation of the L₃ midgut microbiota, and increased the production of melanin by the larvae. The heating (100° C, 5h) of SE resulted in an increase in its activities, including the toxicity to L₃. In conclusion, the larvicidal activity of SE may be linked to the activities of lectin and trypsin inhibitor and can involves the inhibition of digestive proteases, damage to larval physiology and dysbiosis. The findings reported here points SE as a larvicidal agent against *Ae. Aegypti* L₃.

Keywords: Dengue vector, indian coleus, larvicidal effect, gut microbiota, melanogenesis.

1. Introduction

Aedes aegypti females have an aggressive and daytime hematophagous behavior, and their bites can transmit arboviruses such as dengue, chikungunya, zika and yellow fever (WHO, 2018a). The biological cycle of *A. aegypti* comprises the stages of eggs, four larval instars, pupa and adult (Murray et al., 2013; Tsunoda et al., 2014). The absence of vaccines against chikungunya and zika fever, and the serious restrictions of the vaccine against dengue points the population control of *Ae. aegypti* as the main strategy to eradicate these arboviruses (Aguiar et al., 2017; WHO, 2017, 2018b).

The conventional control of *Ae. aegypti* uses synthetic compounds, such as temephos, which have contributed to the selection of resistant insect populations (Zara et al., 2016). In this sense, natural products, including plant extracts have been considered promising, because they are complex mixtures whose action involves different mechanisms, preventing the emergence of resistance; in addition, plant extracts usually show a higher degree of biodegradability and are less toxicity to non-target species (Pontual et al., 2012).

Plectranthus barbatus (Lamiaceae) is popularly known as *falso-boldo* in Portuguese, *Forskohlii* in English, *Cóleo* in Spanish, *Coléus à Forskoline* in French. In folk medicine, its leaves are used as an infusion against digestive disorders, gastritis, liver disease, bronchitis and pneumonia, among other pathologies (Lukhoba et al., 2006). It was previously reported that secondary metabolites of *P. barbatus* leaves were toxic to larvae of *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Govindarajan et al., 2016). An extract of *P. barbatus* leaves in distilled water was toxic to *Ae. aegypti* L₄ (LC₅₀ of 0.61 mg/mL), but no insights into the mechanisms involved in this action is provided (Musau et al., 2016). These reports motivated the experimental design described in the presente work.

Here, SE, infusion and decoction of *P. barbatus* leaves were studied for larvicidal effect against *Ae. aegypti* third instar larvae (L₃), as well as for the presence of lectins and trypsin inhibitors. Then, the most active preparation (SE) was investigated for the effect on digestive proteases, permeability of peritrophic membrane, morphophysiology and histochemistry of midgut, growth of commensal microbiota and melanogenesis of L₃.

2. Materials and methods

2.1 Preparation of SE, decoction and infusion of *P. barbatus* leaves

Leaves of *P. barbatus* were collected in the *Jardim Botânico do Recife* (Pernambuco, Brazil) under the registry AF99882 from the *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado* (SisGen). The leaves were detached from their petioles and immediately used in the extraction procedures described below.

In order to obtain SE, *P. barbatus* leaves were air dried (28° C for 15 days). Following, the leaves were powdered a blender (Philco, PH900), and the powder (10 g) was mixed with 0.15 M NaCl (100 mL) for 16 h at 28° C under magnetic stirring. The mixture was filtered through gauze and centrifuged (3000 *g*, 28 °C, 15 min) aiming to remove debris from leaf tissue and suspended material. The clear supernatant was collected and corresponded to SE.

For preparation of the decoction, fresh leaves (10 g) were added in boiling (100° C) distilled water (100 ml) and the mixture was cooked during 15 min. After filtration and centrifugation (3000 *g*, 28° C, 15 min), the collected supernatant corresponded to the decoction.

To prepare the infusion, 100 mL of distilled water was boiled. Immediately after the end of the heating, the fresh leaves (10 g) of *P. barbatus* were deeped in the hot (100 °C) distilled water and maintained at rest in a glass vessel during 24 h at 25 °C. Next, the mixture was filtered and centrifuged (3000 *g*, 28° C, 15 min) and the supernatant corresponded to the infusion.

SE was dialysed (6 h) against distilled water and lyophilized (-45° C; vacuum of 300 µmHg below atmospheric pressure) to dryness for 24 h in a LIOTOP freeze-dryer model L101 (Liobras, São Carlos, Brazil). Next, SE was resuspended in 0.15 M NaCl to the concentration of 1.36% (dry weight/volume). Decoction and infusion were also lyophilized as described for SE and resuspended in distilled water to concentrations of 1,1% or 1.8% (w/v), respectively. Next, all samples were stored at -4° C before being used for the next investigations.

2.2 Larvicidal activity of *P. barbatus* leaf preparations against *Ae. aegypti* L₃

The breeding of *Ae. aegypti* mosquitoes was maintained at the *Laboratório de Ecologia Química* of the *Departamento de Química Fundamental* from the *Universidade Federal de Pernambuco* (Recife, Brazil). *Ae. aegypti* eggs were immersed in tap water at 25 ± 2° C. After hatching, the larvae were reared with cat food (Whiskas®) and the third instar larvae (L₃) were used in the bioassays.

The larvicidal activity of SE, decoction and infusion at concentrations ranging from 0.39 to 1.3% (w/v) was investigated following the procedure described by Navarro et al. (2003). Twenty L₃ were placed into 50 mL glass beakers containing 20 mL of the samples and the assay was maintained for 48 h at $27 \pm 2^\circ \text{C}$ under a 12–12 (light–dark) photoperiod. SE (0.48%, w/v) was also investigated for larvicidal activity after heating at 100°C during 5 h (heated SE). 0.15 M NaCl or distilled water were used as control solutions. Three independent experiments run in quadruplicates and the mortality rate (%) was recorded after 48 h.

The data were expressed as a mean of replicates $\pm$ standard deviations. Significant differences between the treatments were analyzed by Student's t-test (significance at $p < 0.05$) using the Origin 6.0 program. The lethal concentrations of SE required to kill 20% (LC₂₀), 50% (LC₅₀), and 90% (LC₉₀) of L₃ in 48 h were determined by probit analysis with a reliability interval of 95% using the computer software MedCalc version 17.9.7 (MedCalc Software bvba, Belgium).

2.3 Characterization of *P. barbatus* leaf preparations for protein concentration and hemagglutinating and trypsin inhibitory activities

The protein content was quantified according to the procedure described by Lowry et al. (1951), using a curve of bovine serum albumin (31.25–500 $\mu\text{g/mL}$) as standard.

The presence of lectins was investigated through the hemagglutinating assay carried out in 96-well V-bottom microplates (TPP-Techno Plastic Products) as described by Napoleão et al. (2012). Erythrocytes were collected from rabbits using a method approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the *Universidade Federal de Pernambuco* (process 23076.033782/2015-70). The erythrocyte suspension was treated with glutaraldehyde according to Bing et al. (1967). Fifty μL of the samples (SE, decoction or infusion) were serially two-fold diluted in 0.15 M NaCl (50 μL) and then incubated with the suspension of rabbit erythrocytes. One hemagglutination unit (HU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the sample that promotes full agglutination of erythrocytes. Specific hemagglutinating activity (SHA) was determined by the ratio between the HU and the total protein content (mg) in the assay. The inhibition of hemagglutinating activity was investigated using the monosaccharides fructose, N-acetylglucosamine, glucose, glucopyranose, mannose, ribose and galactose at the concentration of 0.2 M.

The presence of trypsin inhibitor activity was assayed in 96-well microtiter plates (TPP-Techno Plastic Products) according to Pontual et al. (2014). A bovine trypsin solution (5 μL , 0.1 mg/mL) in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.02 M CaCl_2 was incubated (5 min,

37 °C) with SE (0.02-0.2%, w/v, 10-50 µL), decoction (0.02-0.18%, w/v, 10-50 µL) or infusion (0.05-0.3%, w/v, 10-50 µL) in Tris-HCl pH 8.0. Then, the synthetic substrate N- α -Benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide hydrochloride (8.0 mM BApNA), diluted in dimethyl sulfoxide, was added (5µL) and the mixture was incubated (30 min, 37 °C). The substrate hydrolysis was followed by measurement of absorbance at 405 nm. Blank reactions were performed under the same conditions, in absence of the substrate or the enzyme. One unit of trypsin inhibitor activity was defined as the amount of inhibitor that decreases the absorbance in 0.01 after 30 min at 37 °C, regarding the control (Pontual et al., 2014). The sample concentrations able to cause a 50% reduction in the enzyme activity regarding the control (IC₅₀) were determined by probit analysis with a reliability interval of 95% using the computer software MedCalc version 17.9.7 (MedCalc Software bvba, Belgium). The sample with the highest hemagglutinating and trypsin inhibitor activities (SE) was selected for the conduction of the ensuing assays. The heated SE was also investigated for protein concentration, hemagglutinating and trypsin inhibitor activities.

2.4 Obtaining the *Ae. aegypti* L₃ gut extracts

Ae. aegypti L₃ (n = 100) were immobilized by hypothermia (4° C, 10 min) and their midguts were removed using a needle and immediately homogenized with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 (1.0 mL) with a tissue homogenizer. The mixture was centrifuged (9,000 ×g, 4° C, 15 min) and the supernatant corresponded to the L₃ gut extract, which was used as a source of L₃ digestive enzymes.

2.5 Investigation of the proteolytic activity of L₃ gut extract

The measuring of proteolytic activity was performed according to Pontual et al. (2012). The L₃ gut extract (250 µg of protein) was added to 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.5 (300 µL), 0.6 % (w/v) azocasein (50 µL) and 0.1 % (v/v) Triton X-100 (100 µL). After incubation (37 °C, 3 h), the reaction was stopped with 10 % (v/v) trichloroacetic acid (200 µL) and the assay was incubated (4 °C, 30 min). Next, the mixture was centrifuged (9,000 g, 10 min) and the absorbance (366 nm) of the supernatant was determined. One unit of protease activity corresponded to the amount of enzyme that gave an increase of 0.01 in absorbance.

2.6 Investigation of SE for the presence of polypeptides resistant to hydrolysis by L₃ digestive enzymes

The proteins present in SE and its resistance to hydrolysis by commercial trypsin and proteases from L₃ gut were investigated. SE (500 µg of protein) was incubated (37° C) or not with the L₃ gut extract (100 µg of protein) by 40 min, 24 h and 48 h. After each incubation time, the mixtures were heated (100° C, 20 min) aiming to inactivate the proteolytic activity of L₃ gut extract. The control received the saline extract and Tris-HCl buffer in absence of L₃ gut extract. These reaction mixtures were investigated for the electrophoresis profile, hemagglutinating ability and trypsin inhibitory activity.

Aliquots from the reaction mixtures (20 µL) were analyzed in a 10% polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) according to Laemmli (1970). After migration, the gel was stained with Coomassie brilliant blue in acetic acid 10% (0.02%, v/v). Molecular mass markers ranging from 12 to 225 kDa were used to obtain a standard curve relating the molecular mass and the migration (cm) in the gel.

Aliquots (50 µL) of each reaction mixture were also separated to investigate the hemagglutinating ability as described in 2.3 section. The trypsin inhibitory activity was evaluated using 20 µL of each mixture (corresponding to SE at IC₅₀), as described above.

The effect of SE and heated SE on the total proteolytic activity from L₃ gut extract was measured by adding the samples (100 µL) at 0.5, 0.8 or 1% (w/v) to the reaction mixture as described in the 2.5 section.

2.7 Effect of SE on the permeability of peritrophic membrane of *Ae. aegypti* L₃

The effect of SE and heated SE on the permeability of L₃ peritrophic membrane was evaluated according adaptations from Edwards and Jacobs-Lorena (2000). Groups of L₃ (n = 80) were treated as described in 2.2 section with the samples at 1.36% (w/v) or with the control solution (0.15 M NaCl) and fed with activated charcoal (0.01%, w/v in distilled water). After 48 h incubation, the larvae were removed from the test and washed with distilled water. Next, the larval guts were dissected and carefully removed with the help of a needle (8 mm length; 0.3 mm caliber), placed in sodium phosphate buffer (5 mL) (0.1 M pH 7.0, containing 0.15 M NaCl) and immediately photographed using a 6.8 x magnification stereomicroscope (Leica MZ6). Only the larvae that remained alive were used in this experiment.

2.8 Histological and histochemical analyses

Ae. aegypti L₃ (20 for each treatment) were incubated in SE or heated SE at 0.48% or in control solution (0.15 M NaCl) as described in 2.2 section for the larvicidal assay. After 48

h of exposure, the L₃ guts were dissected by pulling on the last abdominal segment using a needle (8.0 mm long, 0.3 mm caliber) and immediately fixed in 10% (v/v) buffered formalin by 24 h. Next, the midguts were preserved in 70% (v/v) ethanol and afterwards separated, dehydrated in an increasing series of ethanol (70-100%, for 10 min each) soaked in ethanol/histoiresin (1:1) for 24 h, and later included in pure Leica histoiresin for further 24 h. Then, 5.0-µm thick sections were obtained using a Leica RM 2035 semiautomatic microtome.

In histochemical analysis, the detection of neutral polysaccharides and total protein content were performed using the Schiff-periodic Acid (PAS) and Ponceau XylidineB, respectively. The histological and histochemical analysis were both performed using an light microscope (OLYMPUS BX-49), and photographed with a photomicroscope (Leica® DM500 and OLYMPUS BX 51). Next, the images were analysed using the program GIMP® 2.8 image editor (GNU Image Manipulation Program) aiming to estimate the amount of neutral polysaccharides and proteins. This program converts digital images to a gray scale (black and white) allowing the measurement of the pixel values in tissue marked (Solomon 2009). The results expressing the protein and neutral polysaccharides were submitted to the normality and homogeneity test. For each treatment, 3 slides of different individuals were analysed, 4 fields of each slide were measured, totaling 12 fields per group. The statistical treatment was performed using the SAS program (SAS Institute 2002). The data assumed were submitted to ANOVA and the averages were compared using the Tukey test ($P < 0.5$).

2.9 Effect of SE on the growth of microbiota of *Ae. aegypti* L₃ midgut

The culture of microbiota from midgut of *Ae. aegypti* L₃ was performed as described by Pontual et al. (2014). Groups of L₃ (10 larvae) were immersed (5 s) in a 70 % ethanol solution (5 mL) for sterilization of their surface. Next, the guts were dissected and homogenized in sterile 0.1 M phosphate buffer (0.1 mL) pH 7.4. The homogenates were added to 100 mL Mueller Hinton (MHB) in an Erlenmeyer. The mixture was shaken (200 rpm) at 37 °C during 24 h. All this procedure was carried out in a biosafety cabinet. After, the culture optical density was adjusted turbidimetrically at a wavelength of 600 nm (OD₆₀₀) to 10⁶ colony forming units (CFU)/ml, compared with a 0.5 McFarland turbidity standard. The bacterial suspension used in antibacterial assay was prepared by diluting (1/1,000) a 10⁶ colony forming units (CFU) overnight culture in NB.

To investigate the effect on microbiota from L₃ gut, SE or heated SE (100 µL, 0.008–16.7 mg/mL) were mixed with the suspension (80 µL) of L₃ gut microbiota. Next, the microtiter plates were maintained at 37 °C during 24 h. After the incubation time, the OD₆₀₀

was measured using a microplate spectrophotometer. In control groups, the bacterial suspension was incubated with 100 μ L of a 0.15 M NaCl solution. The minimum inhibitory concentration (MIC) corresponded to the lowest sample concentration at which there was a $\geq$ 50% reduction in OD₆₀₀ regarding the control (Amsterdam 1996). Three independent assays were conducted in triplicate.

2.10 Melanization

The effect of SE in the production of melanin due to a possible dysbiosis was measured according to the procedure previously described by Scorzoni et al (2013) with modifications. Groups of L₃ (n=20) were immersed in a SE or heated SE solution (0.48%) before and after heating, or in control solution (0.15M NaCl) for 48 h as described in the 2.2 section. After this time, the whole larvae were homogenized with 1 mL of Phosphate buffered saline (0.1 M, pH 7.5) containing Phosphate buffered saline, glutathione (L- g glutamyl-L-cysteinyl-glycine, GSH) (1.0 mM) to inhibit melanization due to larval manipulation. The mixture was centrifuged (9,000 $\times g$, 4 °C, 15 min) and the absorbance (405 nm) of the collected supernatant was determined to measure the melanin content. Melanin content in treated larvae was expressed as percentage in regards to the control group (L₃ unexposed to the leaf extract).

3. Results and discussion

The investigations reported in this work were encouraged by the involvement of *Ae. aegypti* as a vector of important American tropical endemics and by the need for new insecticidal preparations for use in rotation schemes, preventing the emergence of resistant insect populations (Donalisio et al., 2017; WHO, 2018).

Here, we have tested the hypothesis that the preparations of *P. barbatus* leaves may be toxic to *Ae. aegypti* larvae and that this effect can be linked to the presence of insecticidal proteins (lectins and trypsin inhibitors). To test this hypothesis, the sensitivity of the third instar *Ae. aegypti* larvae (L₃) to SE, decoction and infusion of *P. barbatus* leaves was investigated.

The larvicidal assay showed that no mortality of L₃ was detected after 24-h incubation with the preparations of *P. barbatus* leaves. On the other hand, L₃ died after 48 h exposure to SE, but their survival was not affected by the treatment with the decoction or infusion. The SE concentrations that kill 20, 50 and 90% of L₃ are shown in Table 1.

It was previously reported that other preparations of *P. barbatus* leaves were toxic to culicid larvae. For example, the essential oil of *P. barbatus* leaves, whose the major constituents were eugenol (31.12%), α -pinene (19.38%) and β -caryophyllene (18.42%), killed third instar larvae of *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Govindarajan et al, 2016). These authors showed that eugenol, α -pinene and β -caryophyllene were the larvicidal principles in the essential oil, since were able to kill the larvae when isolated.

It is known that apolar compounds accumulate in the adipose tissues of living organisms due to their slow partitioning in lipids, resulting in a longer body retention time. Instead, polar compounds tend not to accumulate in the biota due to their low lipoaffinity (Walker et al., 2008; Santana et al., 2016). From this point of view, the water solubility of compounds in SE represents an advantage in comparison with the nonpolar synthetic insecticides.

Once SE was performed in water, we wonder if proteins could have been extracted, and among them lectins and trypsin inhibitors, which were reported to be toxic to insect larvae (Pontual et al., 2014; Oliveira et al., 2017). SE was able to agglutinate rabbit erythrocytes (Table 2) and this activity was reduced when the assay was performed in the presence of the monosaccharides fructose, N-acetylglucosamine, glucose, glucopyranose and mannose (Table 3). Additionally, in the presence of ribose and galactose, the hemagglutinating activity of SE was abolished. Together, these data indicate that SE contains one or more ribose/galactose specific lectin whose activity was affected by the interaction between their carbohydrate-binding sites and monosaccharides (Almeida et al., 2020). The presence of trypsin inhibitory activity was also detected in SE (Table 2). To the best of our knowledge, this is the first report of the expression of lectins and trypsin inhibitors in *P. barbatus* leaves.

Since SE killed L₃ and contained lectins and trypsin inhibitors, we wondered whether these proteins would be involved in the larvicidal effect reported here. Aiming to answer this question the presence of lectins and trypsin inhibitors in the non-larvicidal decoction and infusion was evaluated. Curiously, the lectin activity was absent in both preparations, but the activity of the commercial trypsin was inhibited by them (Table 2). Despite this, SE was the most active, as may be noted by the lower IC₅₀ value (Table 2).

The polypeptide profile of SE in SDS-PAGE was assayed and two main peptide bands with a molecular masses of approximately 66 and 63 kDa, and another band much less intense with about 34 kDa were detected (Figure 1A, lane 1). In an attempt to indicate which one correspond to the trypsin inhibitor, SE was submitted to SDS-PAGE after incubation with

commercial trypsin and, interestingly, the polypeptide profile of SE remained unchanged (Figure 1A, lane 2). This result suggest that polypeptides of SE are proteinaceous trypsin inhibitors where at least one of them have lectin activity, or that they represent three subunits from a protein with carbohydrate-binding and trypsin inhibitor domains.

It is well reported that lectins can modulate the activity of proteases, including trypsins from insects (Napoleão et al., 2018). The water soluble *Moringa oleifera* lectin (WSMoL) stimulated the activity of total proteases and trypsin-like enzymes from gut of *A. aegypti* organophosphate-susceptible larvae, while the coagulant *M. oleifera* lectin (cMoL) was able to inhibit both the activities (Agra-Neto et al., 2014). The lectin from *Schinus terebinthifolia* leaves (SteLL) inhibited the proteolytic activity from the midgut of maize weevil (*Sitophilus zeamais*) (Camaroti et al., 2018). These reports stimulated us to investigate if the trypsin inhibitory activity of SE could be able to inhibit the trypsin activity from the midgut of *Ae. aegypti* L₃.

The L₃ gut extract was obtained with proteolytic activity of 27.2 U/mg, which was inhibited by SE (Figure 1B). In order to confirm this datum, the polypeptide profile of SE was analyzed through SDS-PAGE after incubation with the L₃ gut extract. This analyze demonstrated that SE polypeptides resisted to hydrolysis by L₃ gut proteases (Figure 1A, lane 3). Therefore, this datum suggest that the inhibition of larval digestive proteases may be involved in larvicidal mechanism of SE.

Since there was no damage to the primary structures of SE polypeptides after incubation with the L₃ gut extract, the hemagglutinating and trypsin inhibitor activities were evaluated. Both activities were not affected after 40 min, 24 h and 48 h under the presence of the larval digestive proteases (Table 4). This datum may indicates that the carbohydrate-binding and trypsin inhibitor domains of SE polypeptides may remain active upon reaching the midgut of L₃.

Aiming to investigate the involvement of SE proteins in the mortality and inhibition of L₃ gut proteases, the heated SE was evaluated for hemagglutinating, trypsin inhibitor and larvicidal activities, as well as for the effect on the activity of proteases from larval gut. The results can be seen in Table 5 and revealed that the lectin and trypsin inhibitor activities were potentiated in SE after heating. Similarly, the larvicidal activity of heated SE at 0.48% (LC₅₀ for the unheated extract) killed 70% of larvae, indicating that the heating increased the toxicity of SE. Finally, the inhibitory activity of L₃ proteases was also highest for the heated SE (Table 5). Interestingly, the activity of lectin and the toxicity to L₃ were both 1.4 times higher in the heated SE than in the non-heated extract. These results may be an indicative that

the larvicidal effect of SE and the inhibition of larval proteases involves the activity of lectin and trypsin inhibitor.

When subjected to heating, proteins can undergo structural modifications that can inactivate them or improve their activities (Pesoti et al., 2015; Silva et al., 2018). The heating of the lectin from SE may have altered the conformation of its carbohydrate recognition domain, improving its activity. In the same way, the heating may have altered the structure of the trypsin inhibitor domain, improving its affinity to the enzyme. The next investigations described in this work were performed with the extract before and after heating.

Since insecticidal lectins can interact with components from the peritrophic membrane of insects, and that N-acetylglucosamine (an important component of this membrane) inhibited the lectin activity of SE (Table 3), the effect of this preparation on permeability of the L₃ peritrophic membrane was assessed. SE at 0.48% increased the permeability of L₃ peritrophic membrane (Figure 2B1), since the activated charcoal overflowed to outside the endoperitrophic space. The permanence of the activated charcoal inside the gut of control larva ensures that the test conditions were adequate for this evaluation (Figure 2A1). Since only live larvae were observed, we can infer that this result was due to the action of SE, and not because the larvae were dying.

Surprisingly, heated SE did not affect the L₃ peritrophic membrane permeability and this datum stimulated us to evaluate the effect of the monosaccharides ribose and galactose (which abolished the lectin activity of saline extract), as well as of N-acetylglucosamine (monomer of chitin, which forms the peritrophic membrane) in the hemagglutinating activity of heated SE.

The lectin activity of the heated SE was lower (SHA = 65.12) in the presence of ribose and galactose than in the absence of them (SHA = 260.86), but was not affected by the presence of N-acetylglucosamine. This result suggests that the heating of SE resulted in a modification of the lectin carbohydrate binding site, preventing its interaction with the monosaccharide N-acetylglucosamine, and corroborates with the loss of the effect on the permeability of the peritrophic membrane after heating of SE.

A more careful analysis of the Figure 2 allows to perceive that the ratio between the perimeter of the larval head and the length of their body in the group treated with SE (heated or not) was lower than in the control larvae. It can be also observed that the amount of bristles in the segments of the larvae treated with the SE, before or after heating, was lower than that of the larvae maintained in 0.15 M NaCl.

In *Ae. aegypti* development, the passage from the third to the fourth larval instar is characterized by an increase in the head size and the number of bristles along the body of the larvae (Christophers, 1960). Thus, this result may suggest that the larvae treated with SE had their development delayed, remaining in the L₃ instar, while in control, the larvae reached the L₄. However, a morphometric analysis and the counting of the exact number of bristles in the larval body are necessary to confirm this finding. Additionally, an accumulation of matter in the thoracic region of the larvae treated with SE (heated or not) can be observed in Figure 2, differently from the control larvae.

Considering the set of damages caused by treatment with SE, we wondered if this preparation could affect the morphology and physiology of L₃ midgut. In this sense, the histological and histochemical analyses were performed. The analysis of the control larvae (Figure 3A and 3B) revealed the presence of a preserved gut epithelium (Ep) where cells with intact nuclei can be seen (black arrows). Digestive and regenerative cells can be identified and the lumen (L) was defined and surrounded by an intact peritrophic membrane (red arrows).

Despite the mortality detected in L₃ treated with SE, no morphological alterations were identified at the level of the midgut, although the epithelium appears more intensely stained (Figure 3C and 3D). In addition, the histological analysis showed that the peritrophic membrane was not disrupted. However, it must be remembered that although apparently intact, this membrane had its permeability affected by treatment with SE, as shown in Figure 2.

Interestingly, the analysis of L₃ treated with the heated SE showed that, in addition to the more intense staining of the epithelium (Figure 3E), the brush border was more evident in comparison with the control (Figure 3E and 3F). As expected, the larval peritrophic membrane was intact. The presence of secretory vesicles along the entire length of the epithelium (apocrine secretion) with the appearance of expelling towards the gut lumen can also be visualized. Similarly to these reactions, it was described that *Ae. aegypti* larvae treated with a diterpene isolated from the oil-resin of *Copaifera reticulata* (Leguminosae) or with a tannin fraction from *Magonia pubescens* (Sapindaceae) stem (Valotto et al. 2011) had the brush border altered and the secretion of apocrine vesicles stimulated. The authors stated that this formation of secretory vesicles in the apical portion of the epithelial cells in the larval gut may indicate that the cytoplasmic content was being exocytosed into the gut lumen in an attempt to defend larval body against toxic compounds. The detection of the gut epithelial response only when the larvae were treated with the heated SE corroborates with the increased toxicity detected to this preparation in the larvicidal assay.

Indeed, the peritrophic membrane prevents the contact of the gut content with epithelial cells by involving the food bolus (Napoleão et al., 2018). However, Agrawal et al. (2014) demonstrated that the exclusion of molecules based on the size promoted by this structure progressively decreases from >2MDa to <4kDa from the anterior to the posterior region of the gut of insects. In this sense, toxic components of the heated SE may have crossed the peritrophic membrane at some point in its extension and stimulated the epithelium of larval gut to respond with the brush border alteration and the vesicle secretion. Another possibility is that the retention of the components of SE in the endoperitrophic space may stimulated these reactions.

Several insecticidal compounds can act by damaging the metabolism of insects. Proteins and carbohydrates are biomolecules that serve as precursors for the metabolism of various substances, and whose reduction in the insect body can result in undesirable effects (Oliveira and Cruz-ladim, 2003). In order to investigate if the treatments used in this work interfered with the metabolism of larvae, a histochemical analysis was performed and the contents of total proteins and neutral polysaccharides in gut epithelial cells were quantified. All groups analyzed showed a positive staining for Ponceau xylydine (Figure 4A, B and C), however, in the group treated with the heated SE (Figure 4B), the area where the epithelium stratification occurs reacted more intensely, and it was possible to detect intensely stained nuclei. However, the comparison between the control and treated groups showed that the SE (heated or not) was not able to affect the amount of proteins in the midgut of L₃ regarding to control (Figure 4D).

Otherwise, the midgut epithelial cells of the *Ae. aegypti* larvae from control group (Figure 5A) and from groups treated with SE (Figure 5B) or heated SE (Figure 5C) showed a positive reaction for the Periodic Acid of Schiff (PAS). In other words, neutral polysaccharides were detected in all treatments, but glycogen granules in the cytoplasm of epithelial cells were absent. In comparison with the control group, larvae treated with SE (heated or not) showed reduced amount of neutral polysaccharides, indicating disruption of carbohydrate metabolism (Figure 5D). This data may indicate that there was an intense use of carbohydrates by the larvae as an energy source in an attempt to mitigate some disturbance at the gut.

Carbohydrates are required for several metabolic processes, functioning as the main energetic source for insects (Souza and Fontanetti 2011; Scudeler et al., 2014), besides being responsible for innumerable metabolic and structural functions, such as acting in the formation of chitin, through of long N-acetylglucosamine chains and participate of amino acid

synthesis (Chapman, 2013). The reduced carbohydrate content in the larval gut treated with SE (heated or not) may be linked to their permanence in L₃ instar showed in figure 2.

The effect of SE (heated or not) in the *in vitro* growth of L₃ gut microbiota was evaluated and the assay showed that this preparation stimulated the overproliferation of these microorganisms (Figure 6) in comparison with the control. It has been reported that the insect gut microbiota and the immune system act together to maintain the balance in amount of commensal microorganisms, limiting their exacerbated proliferation (Wei et al., 2017). In this sense, the overproliferation of L₃ gut microbiota reported here suggests that SE may have caused its unbalance. This finding may have happened because the extract did not cause the death of all species of microorganisms in microbiota, reducing competition and, allowing only a few of the survivors to rapidly proliferate, causing dysbiosis.

Since the melanization represents an important defense response of *Ae. aegypti* against pathogens and tissue damages (Zou et al., 2010), we assessed the effect of SE in melanogenesis by L₃ (Figure 6). As expected, SE (heated or not) stimulated intense melanin production by L₃ regarding the control, which may occurred due to the overproliferation of microorganisms or directly due to the toxic action of the extract.

In summary, SE polypeptides (lectins and trypsin inhibitors), wich resisted to the hydrolysis by *Ae. aegypti* L₃ digestive proteases, may have inhibited the activity of these enzymes and crossed the peritrophic membrane and gut epithelium, reaching the hemolymph and the larval tissues, where it impaired the metabolism of carbohydrates. In addition, still at the midgut, the lectin may have affected the microbiota, causing dysbiosis and contributing to the death of larvae.

4. Conclusion

The saline extract of *P. barbatus* leaves is toxic to *Ae. aegypti* L₃ and this effect appears to be linked to lectin and trypsin inhibitor activities. The inhibition of digestive proteases, the damages to morphophysiology at the midgut of larvae, and the action on the gut microbiota are mechanisms of the larvicidal activity of the extract.

5. Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; 408789/2016-6) for research grants and fellowships (PMGP and THN) as well as to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco*

(FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15) for financial support. WAA would like to thank CNPq for graduate scholarship.

6. References

- Agra-Neto, A. C., Napoleão, T. H., Pontual, E. V., de Lima Santos, N. D., de Andrade Luz, L., de Oliveira, C. M. F., ... Paiva, P. M. G. (2014). Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. *Parasitology research*, 113(1), 175-184.
- Agrawal, S., Kelkenberg, M., Begum, K., Steinfeld, L., Williams, C. E., Kramer, K. J., ... Merzendorfer, H. (2014). Two essential peritrophic matrix proteins mediate matrix barrier functions in the insect midgut. *Insect biochemistry and molecular biology*, 49, 24-34.
- Bing, D. H., Weyand, J. G. M., Stavitsky, A. B. (1967). Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 124(4), 1166-1170.
- Camaroti, J. R. S. L., de Almeida, W. A., do Rego Belmonte, B., de Oliveira, A. P. S., de Albuquerque Lima, T., Ferreira, M. R. A., ... & Napoleão, T. H. (2018). *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). *Industrial crops and products*, 116, 81-89.
- Chapman, R.F. The insects: structure and function. Cambridge, Cambridge University Press, p.929. 2013.
- Christophers, S. (1960). *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. *Aedes aegypti* (L.) the Yellow Fever Mosquito: its Life History, Bionomics and Structure.
- Donalisio, M. R., Freitas, A. R. R., & Von Zuben, A. P. B. (2017). Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. *Revista de Saúde Pública*, 51, 1-6.
- Edwards, M. J., & Jacobs-Lorena, M. (2000). Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *Journal of Insect Physiology*, 46(9), 1313-1320.
- Govindarajan, M., Rajeswary, M., Hoti, S. L., Bhattacharyya, A., & Benelli, G. (2016). Eugenol, α -pinene and β -caryophyllene from *Plectranthus barbatus* essential oil as eco-friendly larvicides against malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. *Parasitology research*, 115(2), 807-815.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
- Lukhoba, C. W., Simmonds, M. S., & Paton, A. J. (2006). *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. *Journal of ethnopharmacology*, 103(1), 1-24.
- Murray, N. E. A., Quam, M. B., & Wilder-Smith, A. (2013). Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clinical epidemiology*, 5, 299.
- Musau, J. K., Mbaria, J. M., Nguta, J. M., Mathiu, M., & Kiama, S. G. (2016). Phytochemical composition and larvicidal properties of plants used for mosquito control in Kwale County, Kenya. *International Journal of Mosquito Research*, 3, 12-17.
- Napoleão, T. H., Pontual, E. V., de Albuquerque Lima, T., de Lima Santos, N. D., Sá, R. A., Coelho, L. C. B. B., ... & Paiva, P. M. G. (2012). Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitology research*, 110(2), 609-616.
- Napoleão, T. H., Albuquerque, L. P., Santos, N. D., Nova, I. C., Lima, T. A., Paiva, P. M., & Pontual, E. V. (2018). Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. *Pest management science*.
- Oliveira, A. P. S., de Santana Silva, L. L., de Albuquerque Lima, T., Pontual, E. V., de Lima Santos, N. D., Coelho, L. C. B. B., ... & Paiva, P. M. G. (2016). Biotechnological value of *Moringa oleifera* seed cake as source of insecticidal lectin against *Aedes aegypti*. *Process Biochemistry*, 51(10), 1683-1690.
- Oliveira, V. P., & Cruz-Landim, C. (2003). Morphology and function of insect fat body cells: a review. *Biociências*, 11, 195-205.
- Paiva, P. M., Pontual, E. V., Napoleão, T. H., & Coelho, L. C. B. B. (2012). Effects of plant lectins and trypsin inhibitors on development, morphology and biochemistry of insect larvae. *Larvae: Morphology, Biology and Life Cycle*, 1, 37-55.
- Pesoti, A. R., Oliveira, B. M. D., Oliveira, A. C. D., Pompeu, D. G., Gonçalves, D. B., Marangoni, S., ... & Granjeiro, P. A. (2015). Extraction, purification and characterization of inhibitor of trypsin from *Chenopodium quinoa* seeds. *Food Science and Technology*, 35(4), 588-597.
- Pontual, E. V., de Lima Santos, N. D., de Moura, M. C., Coelho, L. C. B. B., Navarro, D. M. D. A. F., Napoleão, T. H., & Paiva, P. M. G. (2014). Trypsin inhibitor from *Moringa*

- oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. Parasitology research, 113(2), 727-733.
- Santana, M., Borges, L. M., & Cavalcante, R. M. (2016). Transformações Metabólicas de Agrotóxicos em Peixes: Uma Revisão. Orbital: The Electronic Journal of Chemistry, 8(4).
- Scorzoni, L., de Lucas, M. P., Mesa-Arango, A. C., Fusco-Almeida, A. M., Lozano, E., Cuenca-Estrella, M., ... & Zaragoza, O. (2013). Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. PloS one, 8(3), e60047.
- Scudeler, E. L., & dos Santos, D. C. (2013). Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911)(Neuroptera: Chrysopidae). Micron, 44, 125-132.
- Silva, J. V., Balakrishnan, G., Schmitt, C., Chassenieux, C., & Nicolai, T. (2018). Heat-induced gelation of aqueous micellar casein suspensions as affected by globular protein addition. Food Hydrocolloids, 82, 258-267.
- Souza, T.S, & Fontanetti, C. S. (2011). Morphological biomarkers in the *Rhinocricus padbergi* midgut exposed to contaminated soil. Ecotoxicology and environmental safety, 74(1), 10-18.
- Tsunoda, T., Cuong, T. C., Dong, T. D., Yen, N. T., Le, N. H., Phong, T. V., & Minakawa, N. (2014). Winter refuge for *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes in Hanoi during Winter. PloS one, 9(4), e95606.
- Valotto, C. F. B., Silva, H. H. G. D., Cavasin, G., Geris, R., Rodrigues-Filho, E., & Silva, I. G. D. (2011). Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae), e à uma fração rica em taninos de *Magonia pubescens* (Sapindaceae). Rev. Soc. Bras. Med. Trop, 44(2).
- Walker, P. A., Kille, P., Hurley, A., Bury, N. R., & Hogstrand, C. (2008). An in vitro method to assess toxicity of waterborne metals to fish. Toxicology and applied pharmacology, 230(1), 67-77.
- Wei, G., Lai, Y., Wang, G., Chen, H., Li, F., & Wang, S. (2017). Insect pathogenic fungus interacts with the gut microbiota to accelerate mosquito mortality. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(23), 5994-5999.
- World Health Organization. Dengue and severe dengue. Fact-sheets, 2018a
- World Health Organization. Immunization, Vaccines and Biologicals. Fact sheets, 2018b.
- World Health Organization. Chikungunya. Fact-sheets, 2017.

- Zara, A. L. D. S. A., Santos, S. M. D., Fernandes-Oliveira, E. S., Carvalho, R. G., & Coelho, G. E. (2016). Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25, 391-404.
- Zou, Z., Shin, S. W., Alvarez, K. S., Kokoza, V., & Raikhel, A. S. (2010). Distinct melanization pathways in the mosquito *Aedes aegypti*. *Immunity*, 32(1), 41-53.

7. Figure captions

Figure 1. (A) Investigation of SE from *P. barbatus* leaves for the presence of peptides resistant to hydrolysis by trypsin. SDS-PAGE of SE (1), and SE after incubation with the commercial trypsin (2) or with the *Ae. aegypti* L₃ gut extract (3). (B) Effect of SE on the ability of proteases from L₃ gut extract to hydrolyse azocasein. The concentrations of SE was expressed in dry weight/volume.

Figure 2. Effect of SE from *P. barbatus* leaves on the peritrophic membrane of *Ae. aegypti* L₃. (A1) Larva treated with the control solution (0.15 M NaCl). (A2) Dissected gut of control larva. (B1) Larva treated with SE at 0.48% (w/v). (B2) Dissected gut of larva treated with SE. (C1) Larva treated with SE at 0.48% (w/v) after heating (100 °C, 5h). (C2) Dissected gut of larva treated with the SE at 0.48% (w/v) after heating. All larvae were fed with activated charcoal (0.01%) by 48 h. A total of twenty larvae from each group were observed after 24 h from the start of the experiment. The images were visualized in a magnification stereoscopic microscope with increase of 6.8 x.

Figure 3. Effect of SE from *P. barbatus* leaves on morphology of *Ae. aegypti* L₃ midgut. Photomicrography of the midgut of L₃ midgut from control (A and B), and treated with SE (C and D) or heated SE (E and F). Ep: epithelium; black arrow: nucleus; black seta dashed: brush border; red arrow: peritrophic membrane; L: Lumen. Staining: toluidine Blue.

Figure 4. Effect of SE from *P. barbatus* leaves on total protein content in *Ae. aegypti* L₃ midgut. Photomicrography of L₃ midgut: A (control), B (SE), C (heated SE) and D (Pixels). L: Lumen. Staining: Ponceau xyloidine.

Figure 5. Effect of SE from *P. barbatus* leaves on neutral polysaccharides in *Ae. aegypti* L₃ midgut. Photomicrography of the midgut of L₃ midgut. A (control), B (SE), C (heated SE) and D (Pixels). L: Lumen. Staining: Periodic Acid Schiff (PAS).

Figure 6. Effect of SE (heated or not) from *P. barbatus* leaves on the *in vitro* growth of microbiota from midgut and melanin production of *Ae. aegypti* L₃.

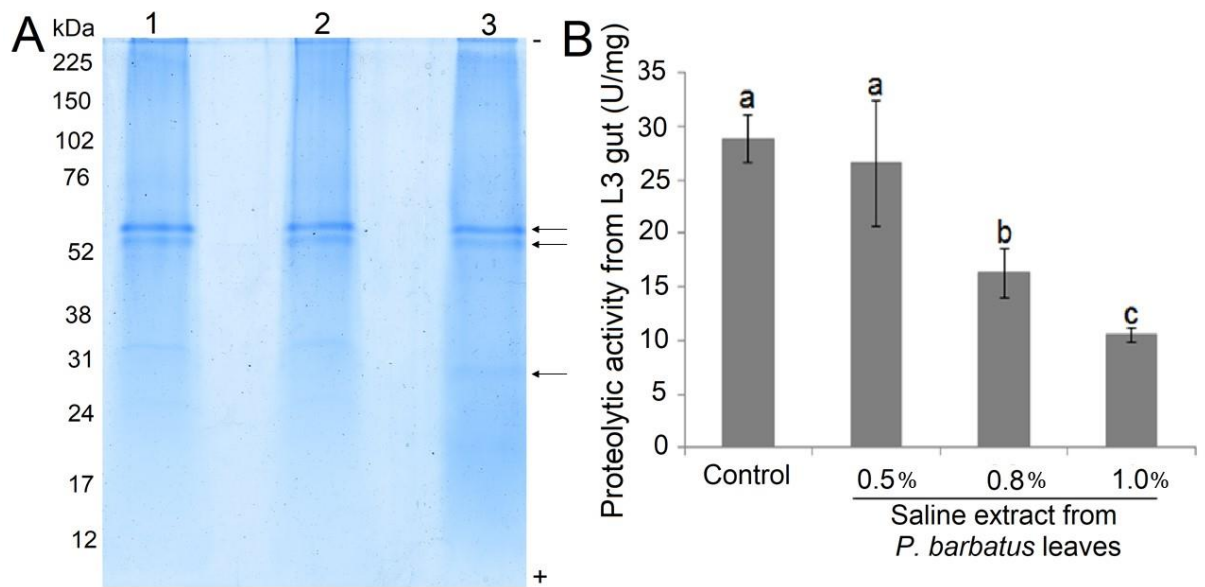
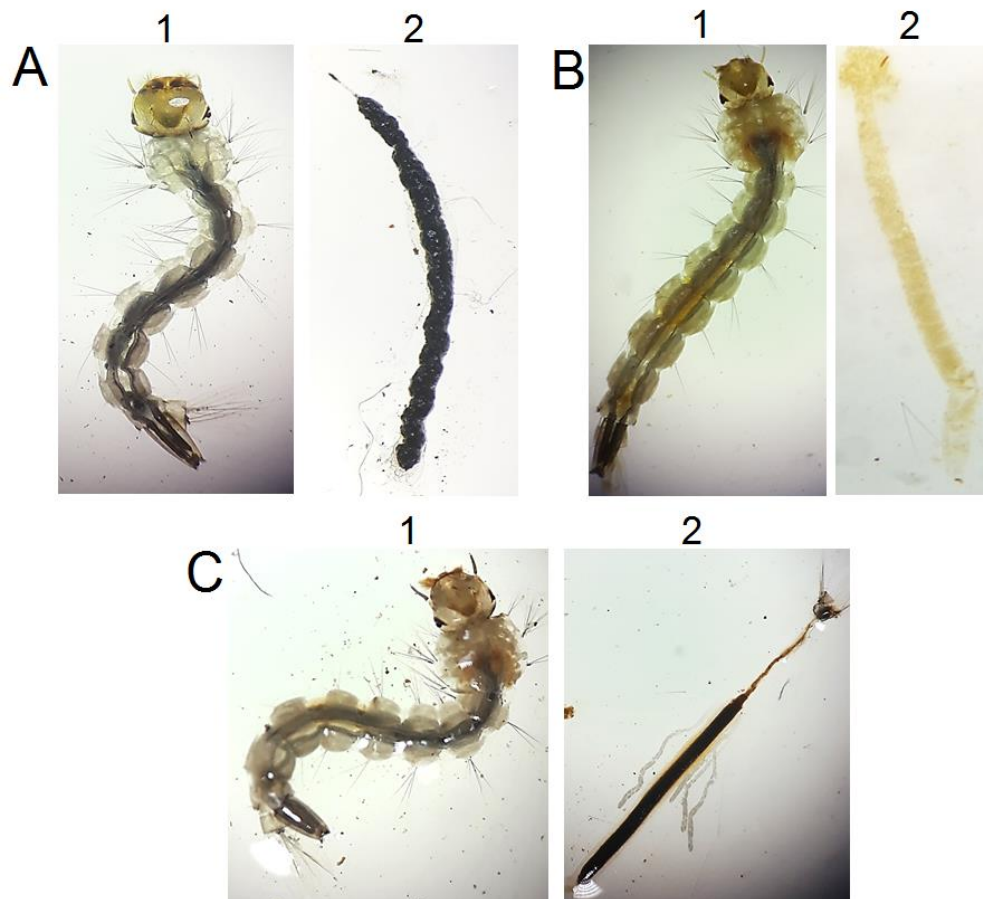
Figure 1**Figure 2**

Figure 3

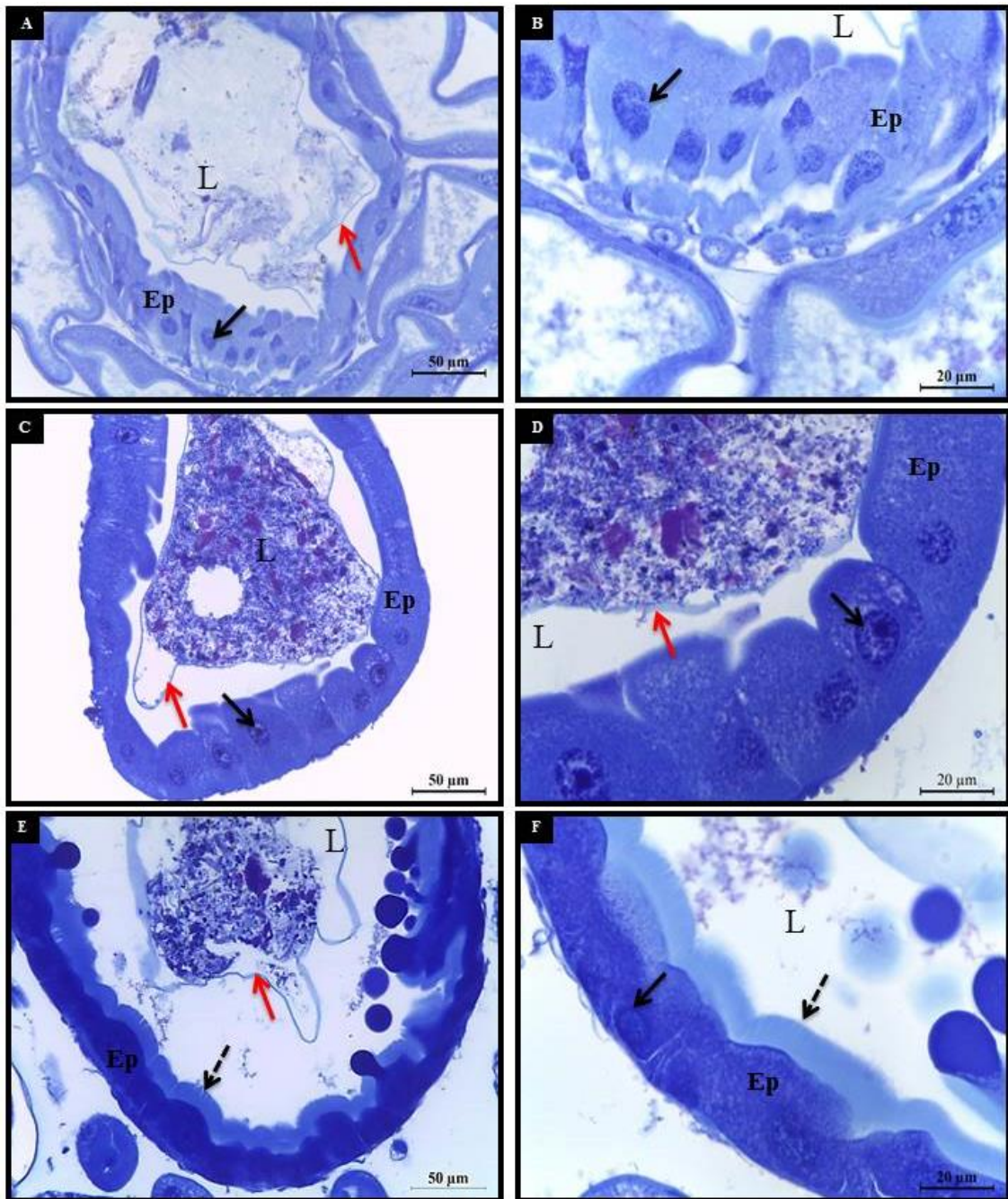


Figure 4

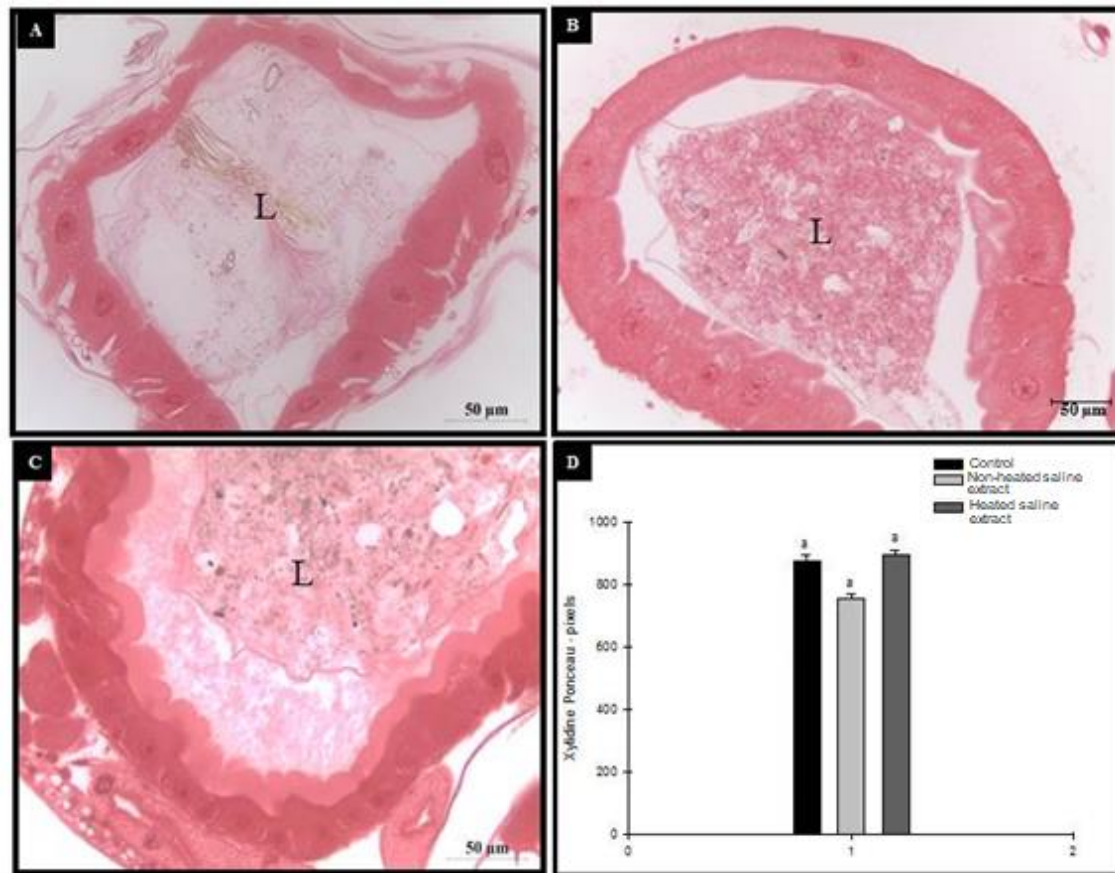


Figure 5

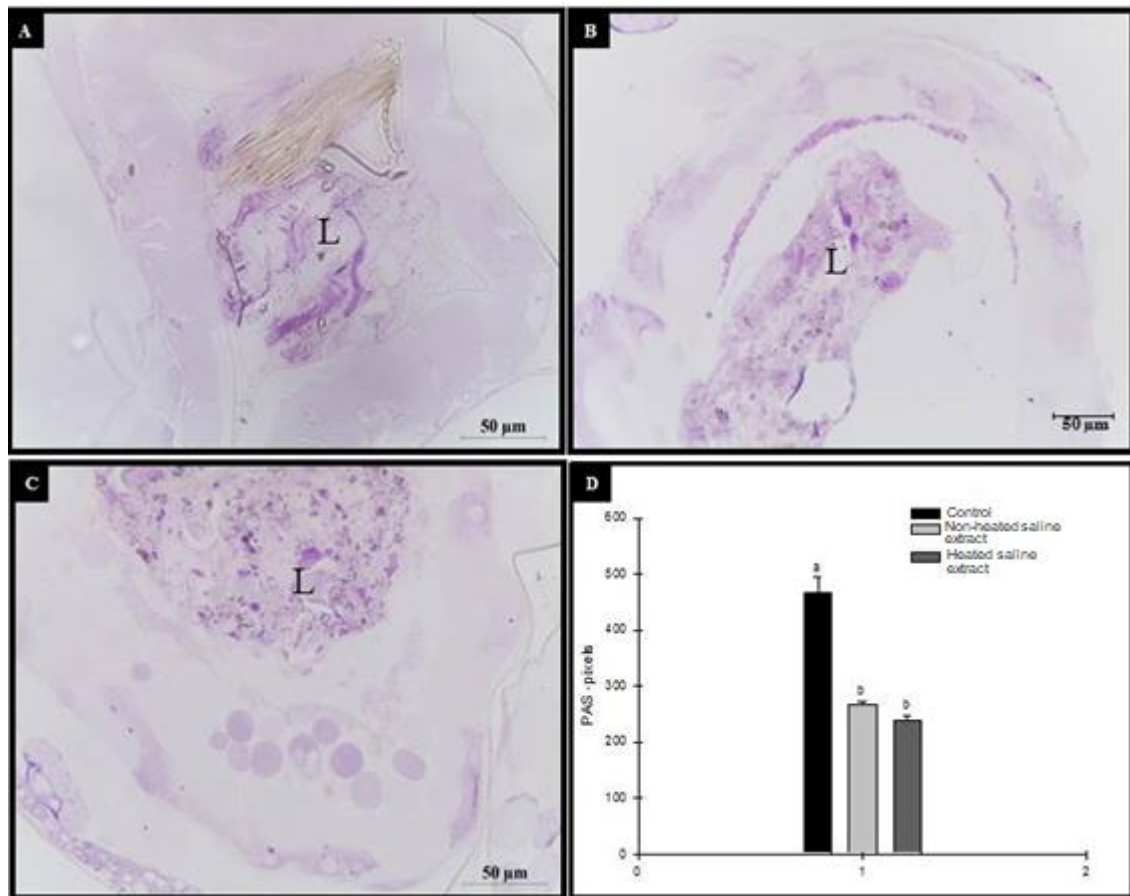


Figure 6

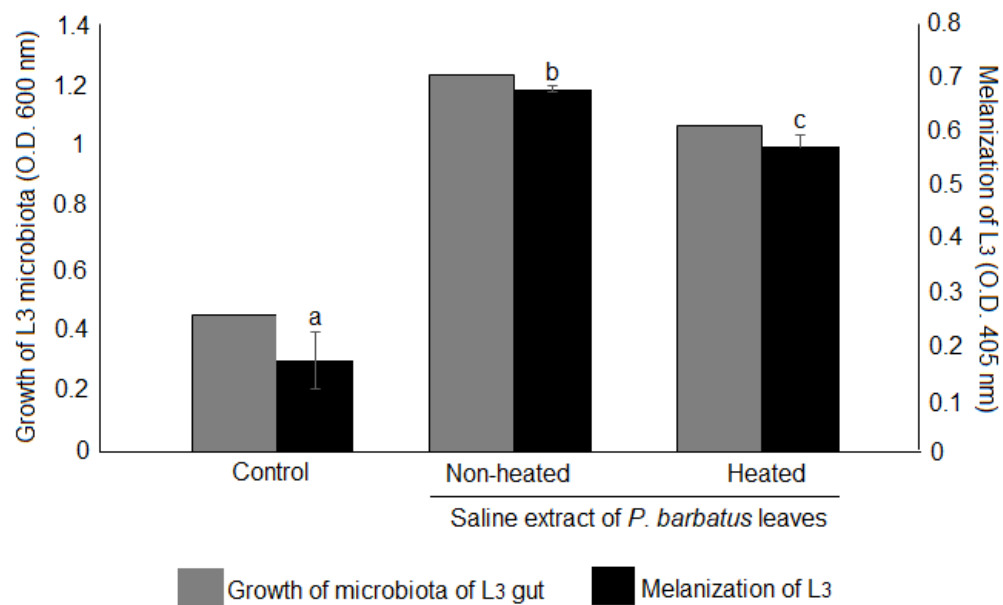


Table 1. Larvicidal activity of saline extract of *P. barbaeus* leaves against *Ae. aegypti* L₃.

Sample	Lethal concentrations (% w/v)**		
	LC ₂₀	LC ₅₀	LC ₉₀
SE*	0.19 [0.017-0.36]	0.48 [0.30-0.65]	0.92 [0.74-1.10]

*Saline extract. **The lethal concentrations that kill 20% (LC₂₀), 50% (LC₅₀) and 90% (LC₉₀) are expressed in dry weigh/100 mL of solution (g/100mL). The p value was < 0.0001.

Table 2. Characterization of the SE, decoction and infusion from *P. barbatus* leaves for protein concentration, ability of hemagglutination and trypsin inhibitor activity.

Preparations	Protein concentration (mg/mL)	Hemagglutinating activity (SHA**)	Trypsin inhibitory activity (IC ₅₀ ***)
SE*	1.83	177.78	0.05%
Decoction	4.73	ND	0.08%
Infusion	0.19	ND	0.13%

*Saline extract. **One unit of hemagglutination (HU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the sample that promotes full hemagglutination. The Specific hemagglutinating activity (SHA) corresponded to the ratio between the hemagglutination unit (HU) and the total protein content (mg) in the assay. ***IC₅₀ was defined as the concentrations (w/v) of sample that cause a 50% reduction in the activity of trypsin regarding the control. ND: Not detected

Table 3. Inhibition of the hemagglutinating hability of SE from *P. barbatus* leaves by monosaccharides.

Monosaccharide (0.2 M)	Hemagglutinating activity (SHA*)
Fructose	44.44
Glucopyranose	44.44
N-acetylglucosamine	44.44
Glucose	44.44
Ribose	----
Galactose	----
Mannose	44.44

*One unit of hemagglutination (HU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the sample that promotes full hemagglutination. The Specific hemagglutinating activity (SHA) corresponded to the ratio between the hemagglutination unit (HU) and the total protein content (mg) in the assay. (----) absence of hemagglutinating activity. SHA of SE in absence of carbohydrates was 177.78.

Table 4. Hemagglutinating and trypsin inhibitory activities of saline extract of *P. barbatus* leaves after incubation with the *Ae. aegypti* L₃ gut extracts.

Incubation time	Hemagglutinating activity (SHA*)	Trypsin inhibitory activity (U/mg**)
0 min	177.78	76,667
40 min	177.78	76,667
24 h	177.78	76,667
48 h	177.78	76,667

*One unit of hemagglutination (HU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the sample that promotes full hemagglutination. The Specific hemagglutinating activity (SHA) corresponded to the ratio between the hemagglutination unit (HU) and the total protein content (mg) in the assay. **One unit of trypsin inhibitor activity was defined as the amount of inhibitor that decreases the absorbance in 0.01 after 30 min at 37 °C, regarding the control.

Table 5. Comparison between the lectin, trypsin inhibitor and larvicidal activities, as well as inhibitory effect on L₃ proteases for the SE before and after heating at 100° C during 5 h.

Activity	SE		Heated extract activity/non heated extract activity
	Non heated	Heated	
Hemagglutinating activity (SHA*)	177.18	260.86	1.4
Trypsin inhibitory activity (U/mg**)	76.66	318.84	4.1
Larval mortality at 0.48 % (w/v)	50%	70%	1.4
Inhibitory effect on L ₃ proteases (U/mg**)	27.2	---	ND

*One unit of hemagglutination (HU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the sample that promotes full hemagglutination. The Specific hemagglutinating activity (SHA) corresponded to the ratio between the hemagglutination unit (HU) and the total protein content (mg) in the assay. **One unit of trypsin and protease inhibitory activities were defined as the amount of inhibitor that decreases the absorbance in 0.01 after 30 min at 37 °C regarding the control. (---) The activity was abolished. ND: Not determined.

4. CONCLUSÕES

- O extrato salino de folhas de *P. barbatus* (ES) é um novo agente larvicida contra L₃ de *Ae. aegypti* e contém lectinas e inibidores de tripsina.
- ES contém peptídeos resistentes à hidrólise por proteases digestivas de L₃ e inibe a atividade dessas enzimas.
- A permeabilidade da membrana peritrófica de L₃ foi alterada quando as larvas foram tratadas com ES, contudo este efeito não foi essencial para a mortalidade das larvas.
- O tratamento com o ES não afetou a morfologia do intestino médio de L₃, bem como não afetou o conteúdo de proteínas totais no epitélio do intestino das larvas.
- ES reduziu a quantidade de polissacarídeos neutros no epitélio intestinal de L₃, o que pode ter ocorrido em resposta ao estresse causado pelo extrato ou na tentativa de mitigar perturbações no intestino médio.
- A redução no conteúdo de carboidratos em resposta ao tratamento com ES pode estar relacionada à permanência das larvas no estágio L₃.
- O aumento no crescimento da microbiota comensal do intestino de L₃, juntamente com a maior produção de melanina em resposta ao tratamento com ES, pode ter causado disbiose, contribuindo para o efeito agudo do extrato.
- O aumento das atividades larvicida, hemaglutinante e inibidora de tripsina, bem como o efeito mais pronunciado ao nível de intestino médio de L₃ quando ES foi aquecido, indicam que a lectina e o inibidor de tripsina das folhas de *P. barbatus* podem estar envolvidos no mecanismo de ação larvicida.

REFERÊNCIAS

- AGAWAL, K.C.; PARKS JR, R.E.; Synergistic inhibition of platelet aggregation by forskolin plus pge1 or 2-fluoroadenosine: effects of 2',5'- dideoxyadenosine and 5'-methylthioadenosine. **Biochemical Pharmacology**, v.31, p.3713–3716. 1982.
- AGHAALI, N.; GHADAMYARI, M.; HOSSEININAVEH, V.; RISEH, N. S. Protease inhibitor from the crude extract of plant seeds affects the digestive proteases in *Hyphantria cunea* (Lep.: Arctiidae). **Journal of plant protection research**, v.53, n.4, p.338-346. 2013.
- AGRA-NETO, A. C. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitology research**, v.113, n.1, p.175-184. 2014.
- ALASBAHI, R.; MELZIG, M.; *Plectranthus barbatus*: A Review of Phytochemistry, Ethnobotanical Uses and Pharmacology – Part 2. **Planta Medica**, v.76, n.7, p. 653–661, 2010
- ALBUQUERQUE, L. P. et al. Antifungal activity of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on genetically distinct *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici races. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.172, n.2, p.1098-1105. 2014.
- ALBUQUERQUE, R. L. et al. Diterpenos tipo abietano isolados de *Plectranthus barbatus* Andrews. **Química Nova**, v.30, n.8, p.1882-1886. 2007.
- APTE-DESHPANDE, A. et al. *Serratia odorifera* a midgut inhabitant of *Aedes aegypti* mosquito enhances its susceptibility to dengue-2 virus. **PLoS One**, v.7, p.7, p.e40401. 2012.
- ARAÚJO, I. F. et al. Larvicidal effect of hydroethanolic extract from the leaves of *Acmella oleracea* LRK Jansen in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **South African journal of botany**, v. 117, p. 134-140, 2018.
- AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A.; Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. **Trends in parasitology**, v.21, n.12, p.568-572. 2005.
- BHATTACHARYYA, A.; LEIGHTON, S.M.; BABU, C.R.; Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. **Comparative Biochemistry & Physiology C**, v.145, p.669–677. 2007.
- BELLINATO, D. F. et al. Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* populations. **BioMed research international**, v.2016. 2016.
- BERG, J. M. T.; LUBERT, J.; Bioquímica. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.545. 2008.
- BEZERRA, C. S. et al. Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: a multifunctional Kunitz inhibitor. **Process Biochemistry**, v.51, n.6, p. 792-803. 2016.

BHAT, S.V. et al. The antihypertensive and positive inotropic diterpene forskolin: effects of structural modifications on its activity. **Journal of medicinal chemistry**, v.26, n.4, p.486-492. 1983.

BILLINGSLEY P.F; The midgut ultrastructure of hematophagous insects. **Annual Review of Entomology**, v.35, p.219-48. 1990.

BOROVSKY, D.; MEOLA, S.M.; Biochemical and cytoimmunological evidence for the control of *Aedes aegypti* larval trypsin with Aea-TMOF. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v.55, n.3, p.124-139. 2004.

BRAGA, I. A. et al. *Aedes aegypti* Resistance to Temephos during 2001 in Several Municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n.2, p.199-203. 2004.

BRAGA, I. A.; VALLE, D.; *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** v.16, n.4, p.279-293. 2007.

BROWN, M.R.; RAIKHEL, A.S.; AND LEA, A.O.; Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. **Tissue and Cell**, v.17, n. 5, p.709-721. 1985.

BUENO, A. de F. et al. Inimigos naturais das pragas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. (Ed.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Embrapa, p.493-629. 2012.

BURT, F. J. et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v.17, n.4, p.107-117. 2017.

CALDERON, L.A. et al. Purification and structural stability of a trypsin inhibitor from Amazon *Inga cylindrica* [Vell.] Mart. seeds. **Brazilian Society of Plant Physiology**, v. 22, p.73-79, 2010.

CAMAROTI, J. R. S. L. et al. Phytoinsecticides for controlling pests and mosquito vectors of diseases. *Biocontrol agents: types, applications and research insights*. **Nova Science Publishers Inc**. New York, p. 147-188. 2017.

CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P. L.; Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 26, 617-620. 2017.

Center of Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em:
<<https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/>>

CHAPMAN, R. F.; Alimentary canal, digestion and absorption in The insects: structure and function (Eds Simpson, S. J. & Douglas, A. E.) p.72-73. 2013.

CHAVES FILHO, J. I. G. et al. Revisão da literatura: a relação entre Zika Vírus e Síndrome de Guillain-Barré. **Revista Ciência e Estudos Acadêmicos de Medicina**, v.1, n.05. 2016.

COELHO, W. M. D. et al. Biological control of *Anopheles darlingi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae using shrimps. **Parasite epidemiology and control**, v.2, n.3, p.91-96. 2017.

COELHO, L.C.B.B. et al. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological / pharmacological and therapeutic applications. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. 2017.

COELHO, J. S. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v.77, n.7, p.934-938. 2009.

CORDEAU, S. et al. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. **Crop protection**, v.87, p.44-49. 2016.

COUTINHO, M.R. Extração de tanino em folhas, sementes e frutos verdes de cinamomo (*Melia azedarach* L.) com diferentes tipos de solventes. [monografia]. Curitiba (PR): **Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde**; 2013.

CRUZ, A. C. et al. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from Catanduva (*Piptadenia moniliformis*) seeds. **Plant physiology and biochemistry**, v.70, p.61-68. 2013.

DA COSTA, J. R. et al. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v.39, n.5, p.757-766. 2010.

DANTZGER, M. et al. Bowman–Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: isolation, biochemical properties and insecticidal potential. **Phytochemistry**, v.118, p.224-235. 2015.

DAVID, M. R. et al. Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.111, n.9, p.577-587. 2016.

DIAS, L. P. et al. A trypsin inhibitor purified from *Cassia leiandra* seeds has insecticidal activity against *Aedes aegypti*. **Process Biochemistry**, v.57, p.228-238. 2017.

DICKSON, L. B. et al. Diverse laboratory colonies of *Aedes aegypti* harbor the same adult midgut bacterial microbiome. **Parasites & vectors**, v.11, n.1, p.207. 2018.

DILLON, R. J. et al. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. **Ecology Letters**, v.8, n.12, p.1291-1298. 2005.

DINGLASAN, R.R. et al. The *Anopheles gambiae* adult midgut peritrophic matrix proteome. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.39, p.125-134. 2009.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; VON ZUBEN, A. P. B.; Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, v.51, p.1-6. 2017.

DONG, Y.; MANFREDINI, F.; DIMOPOULOS, G.; Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. **PLoS pathogens**, v.5, n.5, p.e1000423. 2009.

DOW, J.A.T. Insect midgut function. In: **Advances in insect physiology**. Academic Press, p. 187-328. 1987.

EISEN, L. et al. The impact of temperature on the bionomics of *Aedes (Stegomyia) aegypti*, with special reference to the cool geographic range margins. **Journal of medical entomology**, v.51, n.3, p.496-516. 2014.

EREZ, E.; FASS, D.; BIBI, E.; How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. **Nature**, v.459, n.7245, p.371. 2009.

FARADY, C. J.; CRAIK, C. S.; Mechanisms of macromolecular protease inhibitors. **Chembiochem**, v.11, n.17, p.2341-2346. 2010.

FAY, R. W.; PERRY, A. S.; Laboratory Studies of Ovipositional Preferences of *Aedes aegypti*. **Mosquito News**, v.25, n.3, p.276-81. 1965.

FINNEY, C. A.; KAMHAWI, S.; WASMUTH, J. D.; Does the arthropod microbiota impact the establishment of vector-borne diseases in mammalian hosts?. **PLoS pathogens**, v.11, n.4, e1004646. 2015.

FRANCIS S.; ALEXANDER M.; Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. **The Lancet Infectious Diseases**, v.14, n.12, p.1271–1280. 2014.

GE, Z. Y.; WAN, P. J.; HAN, Z. J.; Cloning and characterization of trypsin-and chymotrypsin-like genes in the striped rice stem borer, *Chilo suppressalis*. **Genome**, v.55, n.4, p.281-288. 2012.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N. et al. Production of plant proteases in vivo and in vitro - a review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p.983–996. 2011.

GOVINDARAJAN, M. et al. Eugenol, α -pinene and β -caryophyllene from *Plectranthus barbatus* essential oil as eco-friendly larvicides against malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. **Parasitology research**, v. 115, n.2, p.807-815. 2016.

GROENIGEN, J.V. et al. The soil N cycle: new insights and key challenges. **Soil**, v.1, n.1, p.235-256. 2015.

GUAGLIARDO, S. A. et al. River boats contribute to the regional spread of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Peruvian Amazon. **PLoS neglected tropical diseases**, v.9, n.4, e. 0003648. 2015.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S.; *Os insetos: um esboço de entomologia* . **John Wiley & Sons**. 2014.

GUSMÃO, D. S. et al. A Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)(L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. **Acta tropica**, v.115, n. 3, p.275-281. 2010.

HAKIM, R.S.; BALDWIN, K.M.; LOEB, M.; The role of stem cells in midgut growth and regeneration. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v.37, n.6, p.338-342. 2001.

HECKER, H.; Structure and function of midgut epithelial cells in *Culicidae* mosquitoes (Insecta, Diptera). **Cell and tissue research**, v.184, n.3, p.321-341. 1977.

HEGEDUS, D. et al. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annual Review of Entomology**, v.54, p.285-302. 2009.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E.; Zika virus spreads to new áreas region of the Americas, May 2015–January 2016. **American Journal of Transplantation**, v.16, n.3, p.1031-1034. 2016.

IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine et maladies infectieuses**, v.44, n.7, p.302-307. 2014.

ISOE, J.; ZAMORA, J.; MIESFELD, R. L.; Molecular analysis of the *Aedes aegypti* carboxypeptidase gene family. **Insect biochemistry and molecular biology**, v.39, n.1, p.68-73. 2009.

JAGADESHWARAN, U. et al. Cellular mechanisms of acid secretion in the posterior midgut of the larval mosquito (*Aedes aegypti*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 295-300. 2010.

JIANG, H.; KANOST, M.R.; Characterization and functional analysis of 12 naturally occurring reactive site variants of serpin-1 from *Manduca sexta*. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.2, p.1082-1087. 1997.

KERNTOPF, M. R. et al. Essential oils from leaves, stems and roots of *Plectranthus barbatus* Andr.(Labiatae) grown in Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.14, n.2, p.101-102. 2002.

KERR, J.A.; The clinical aspects and diagnosis of yellow fever. **In Yellow fever**, p.385-425. 1951.

KHANGEMBAM, B. K.; CHAKRABARTI, R.; Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: Purification, characterization and its potential application, **Food Chemistry**, v.175, p.386–394. , 2015.

KITTAYAPONG, P. et al. Mitigating diseases transmitted by *Aedes* mosquitoes: a cluster-randomised trial of permethrin-impregnated school uniforms. **PLoS neglected tropical diseases**, v.11, n.1, e0005197. 2017.

KRISHNAN, V. M.; MURUGAN, K. Purification, characterization and kinetics of protease inhibitor from fruits of *Solanum aculeatissimum* Jacq. **Food Science and Human Wellness**, v.4, n.3, p.97-107. 2015.

LAM S. K.; NG T. B.; Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89, p.45-55. 2011.

LAMBRECHTS, L.; FAILLOUX, A.B.; Vector biology prospects in dengue research. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, n.8, p.1080-1082. 2012.

LARINI, L.; Toxicidade dos praguicidas. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Manole, p. 9-18. 1999.

LEHANE, M.; BILLINGSLEY, P.; Biology of the insect midgut. **Springer Science & Business Media**, 2012.

LIMA, T. A. et al. Binding targets of termiticidal lectins from the bark and leaf of *Myracrodruon urundeuva* in the gut of *Nasutitermes corniger* workers. **Pest management science**, v.74, n.7, p.1593-1599. 2018.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A.; Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, p.512. 2002.

LUCENA, S. V.; Purificação, caracterização e avaliação da atividade antiproliferativa de um inibidor de quimotripsina tipo kunitz de semente de *Erythrina velutina*. Dissertação apresentada a Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal 2010.

LUKHOB, C.W.; SIMMONDS, M.S.J.; PATON, A.J.; *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. **Journal Of Ethnopharmacology**, v.103, n.1, p.1-24. 2006.

MALAIKOZHUNDAN, B., VINODHINI, J.; Biological control of the Pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* in stored grains using the entomopathogenic bacteria, *Bacillus thuringiensis*. **Microbial pathogenesis**, v.114, p.139-146. 2018.

MDSD, Brasil. Situação epidemiológica de ocorrência de microcefalias no Brasil. **Boletim Epidemiológico**, v.46, p.1-3. 2015.

MESQUITA-RODRIGUES, C. et al. Expression of trypsin-like serine peptidases in pre-imaginal stages of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Archives of insect biochemistry and physiology**, v.76, n.4, p.223-235. 2011.

MLAKAR, J. et al. Zika virus associated with microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v.374, n.10, p.951-958. 2016.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F.; Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v.64, p.160-173. 2015.

MONATH, T.P.; Yellow fever: an update. **The Lancet infectious diseases**, v.1, n.1, p.11-20. 2001.

MOREIRA, L. A. et al. A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1268–1278, dez. 2009.

MORLAIS, I. et al. A targeted approach to the identification of candidate genes determining susceptibility to *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes aegypti*. **Molecular Genetics and Genomics**, v.269, n.6, p.753-764. 2003.

MURRAY N.E.A.; QUAM M.B.; WILDER SMITH A.; Epidemiology of dengue: past, present, and future prospects. **Clinical Epidemiology**, v.5, p.299-309. 2013.

MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerging infectious diseases**, v.21, n.2, p.359. 2015.

NAPOLEÃO, T.H. et al. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**. v.4, p.26-33. 2013.

NAPOLEÃO, T. H. et al. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. **Pest management Science**, p. 1-10. 2018.

NUNES, N. N. et al. Potential of the lectin/inhibitor isolated from *Crataeva tapia* bark (CrataBL) for controlling *Callosobruchus maculatus* larva development. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.63, n.48, p.10431-10436. 2015.

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome—case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, v.19, n.9, p.20720. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue and severe dengue**. Fact-sheets, 2018a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. **Saudi Medical Journal**, v.37, n. 3, p.332-333. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Handbook for integrated vector management**. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44768/1/9789241502801_eng.pdf [acesso em 2019 Jan 20]; v.24, n.3, p.1-78. 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Vector control: Methods for use by individuals and communities**. Fact-sheets, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Chikungunya**. Fact-sheets, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Immunization, Vaccines and Biologicals**. Fact-sheets, 2018b.

ORSBORNE, J et al. Personal protection of permethrin-treated clothing against *Aedes aegypti*, the vector of dengue and Zika virus, in the laboratory. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0152805, 2016.

PAIVA, P. M.G. et al. Effects of plant lectins and trypsin inhibitors on development, morphology and biochemistry of insect larvae. **Larvae: Morphology, Biology and Life Cycle**, v.1, p.37-55. 2012.

PAIXÃO, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C.; Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. **BMJ global health**, v.3, n.1, e000530. 2018.

PLIEGO, E. P.; VELÁZQUEZ-CASTRO, J.; COLLAR, A. F.; Seasonality on the life cycle of *Aedes aegypti* mosquito and its statistical relation with dengue outbreaks. **Applied Mathematical Modelling**, v.50, p.484-496. 2017.

PONTUAL, E. V. et al. A trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flower extract is cytotoxic to *Trypanosoma cruzi* with high selectivity over mammalian cells. **Natural product research**, p.1-5. 2017.

PONTUAL, E.V. et al. 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.

PONTUAL, E. V. et al. Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.79, n.3, p.135-152. 2012.

PROCÓPIO, T. F. et al. *Calliandra surinamensis* lectin (CasuL) does not impair the functionality of mice splenocytes, promoting cell signaling and cytokine production. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.107, p.650-655. 2018.

PROCÓPIO, T. F. et al. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International journal of biological macromolecules**, v.98, p.419-429. 2017.

RAJAH, M. M. et al. Zika virus: emergence, phylogenetics, challenges, and opportunities. **ACS infectious diseases**, v.2, n.11, p.763-772. 2016.

RAMOS, D. B. M. et al. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **Journal of ethnopharmacology**, v.233, p.148-157. 2019.

RAMOS, V.S. et al. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.152, p.255–261. 2009.

RESENDE, M. C. D. et al. A comparison of larval, ovitrap and MosquiTRAP surveillance for *Aedes (Stegomyia) aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.108, n.8, p.1024-1030. 2013.

ROSE, C. et al. An investigation into the protein composition of the teneral *Glossina morsitans morsitans* peritrophic matrix. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.8, e2691. 2014.

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

SANTOS, N. D. L. et al. Effect of gamma irradiation of *Moringa oleifera* seed lectin on its larvicidal, ovicidal, and oviposition-stimulant activities against *Aedes aegypti*. **South African Journal of Botany**. 2018.

SANTOS, N. D.L. et al. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v.7, n.9, p.e44840. 2012.

SANTOS, M. R. A. et al. Composição química e atividade inseticida do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) Ferrari. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 757-762, 2013.

SCHNEPF, H.E. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review** v.62, p.775–806. 1998.

SHAMSI, T. N. et al. 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.

SILVA, L. J.; ANGERAMI, R. N. Viroses emergentes no Brasil. [s.l.] **SciELO - Editora FIOCRUZ**, 2008.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: p.1102. 2010.

SINGH, S. et al. Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. **Insect science**. 2018.

SOARES-DA-SILVA, J. et al. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.59, n.1, p.1-6. 2015.

SODERLUND, D. M.; BLOOMQUIST, J. R.; Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. **Annual review of entomology**, v.34, n.1, p.77-96. 1989.

STINE, K.; BROWN, T.; Principles of Toxicology; **Lewis Publishers**, 1996

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2009

TERRA, W. R.; Physiology and biochemistry of insect digestion. An evolutionary perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.21, p.675- 734. 1988.

TOMLIN, C. D. S.; The Pesticide Manual. **British Crop Protection Council**, Hampshire, UK. 2000.

TSUNODA, T. et al. Winter refuge for *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes in Hanoi during Winter. **PLoS ONE** v.9, p.e95606. 2014.

- UKEH, D. A.; MORDUE, A. J; Plant based repellents for the control of stored product insect pests. **Biopesticides International**, v.5, n.1, p.1-23. 2009.
- VACHON, V.; LAPRADE, R.; SCHWARTZ, J. L.; Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. **Journal of invertebrate pathology**, v.111, n.1, p.1-12. 2012.
- VASCONCELOS, P.F.D.C.; Yellow fever. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.2, p.275-293. 2003.
- VIJAYAN, V.; SUKUMARAN, S.; Chikungunya virus disease: an emerging challenge for the rheumatologist. **JCR: Journal of Clinical Rheumatology**, v.22, n.4, p.203-211. 2016.
- VOLPICELLA, M. et al. Cystatins, serpins and other families of protease inhibitors in plants. **Current Protein and Peptide Science**, v.12, n.5, p.386-398. 2011.
- WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T.; Thin layer chromatography in phitochemistry. **Chromatographic Science Series**. v. 99. 2008.
- YADAV, K. K. et al. Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. **Parasites & vectors**, v.8, n.1, p.641. 2015.
- YAMAGISHI, T. et al. Glucose, some amino acids and a plant secondary metabolite, chlorogenic acid induce the secretion of a regulatory hormone, tachykinin-related peptide, from the silkworm midgut. **Peptides**. 2018.
- YANG, H.M. et al. Efeitos abióticos na dinâmica populacional de mosquitos e sua influência na transmissão da Dengue. **Modelagem Ecológica Aplicada à Entomologia**, p. 39-79. 2014.
- ZARA, A. L. D. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.25, p.391-404. 2016.
- ZOUACHE, K. et al. Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. **FEMS microbiology ecology**, v.75, n.3, p.377-389. 2011.