



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LIVIA LAIS DE SANTANA SILVA BARBOSA

PREPARAÇÕES LECTÍNICAS DE SEMENTES DE *Moringa oleifera*
CONTRA *Aedes aegypti*: EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO E
FECUNDIDADE, INVESTIGAÇÃO DE MECANISMO ESTIMULANTE
DE OVIPOSIÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO

RECIFE

2020

LIVIA LAIS DE SANTANA SILVA BARBOSA

**PREPARAÇÕES LECTÍNICAS DE SEMENTES DE *Moringa oleifera*
CONTRA *Aedes aegypti*: EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO E
FECUNDIDADE, INVESTIGAÇÃO DE MECANISMO ESTIMULANTE
DE OVIPOSIÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

RECIFE

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

de Santana Silva Barbosa, Livia Lais .

PREPARAÇÕES LECTÍNICAS DE SEMENTES DE Moringa oleifera
CONTRA Aedes aegypti: EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO E
FECUNDIDADE, INVESTIGAÇÃO DE MECANISMO ESTIMULANTE DE
OVIPOSIÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO / Livia Lais de
Santana Silva Barbosa. - Recife, 2020.

56 p. : il., tab.

Orientador(a): Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador(a): Thiago Henrique Napoleão

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de
Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020.

Inclui referências.

1. Preparações inseticidas . 2. Interferências no ciclo de vida do Aedes
aegypti . 3. desenvolvimento de formulações com ação inseticida . I. Guedes
Paiva, Patrícia Maria . (Orientação). II. Napoleão, Thiago Henrique .
(Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

LIVIA LAIS DE SANTANA SILVA BARBOSA

PREPARAÇÕES LECTÍNICAS DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* CONTRA *Aedes aegypti*: EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO E FECUNDIDADE, INVESTIGAÇÃO DE MECANISMO ESTIMULANTE DE OVIPOSIÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dra. Luana Cassandra Breitbach Barroso Coelho (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Nataly Diniz de Lima Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Ana Patrícia Silva de Oliveira (Examinado Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Data: 14 / 02 / 2020

Dedico este trabalho a Deus, porque sei que Ele sempre esteve comigo em todos os momentos, e à minha família pelo constante apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por não me desamparar nos momentos em que mais preciso, me dando força e perseverança para atingir meus objetivos, me guiando sempre pelo melhor caminho e me proporcionando grandes vitórias.

Aos meus pais, Carlos e Rosângela, que sempre priorizaram meus estudos, e se esforçam até hoje para proporcionar a mim e ao meu irmão as melhores coisas possíveis, muitas vezes renunciando de suas próprias vontades para realizar nossos sonhos. Esse apoio foi incomparável e fundamental para o meu crescimento. Amo vocês!!

Ao meu querido irmão Lucas que, apesar da diferença de idade, inconscientemente me ajudou muito para que eu chegasse aqui hoje, pois sempre quis ser uma referência pra ele e por isso me esforcei para fazer tudo da melhor forma, para que ele pudesse se espelhar em mim de alguma maneira. Além disso, a sua alegria contagiante, que deixa qualquer ambiente mais agradável, me ajudou bastante a passar por vários momentos de angústia. Te amo, coisinha da minha vida!

Ao meu marido, mais um Lucas que foi colocado por Deus na minha vida, e não foi em vão. Sempre me incentivando na hora dos estudos e me dando forças nos momentos de estresse em que pensei desistir de tudo. Foi uma pessoa muito importante nessa trajetória e só tenho a agradecer e dizer que amo muito você, amor!

À professora Patrícia Paiva, minha orientadora, por ter me acolhido desde o primeiro ano de Graduação, confiando e acreditando em mim para realização de muitos trabalhos. Muito obrigada pela orientação, pela dedicação, pela alegria e pelo entusiasmo contagiante que a diferencia de muitos. Sou extremamente grata!

Ao professor Thiago Henrique, que sempre esteve presente nos meus quatro anos de Graduação, dois anos de Mestrado e agora nesses quatro anos de Doutorado. Mais que um professor, é um amigo que nunca mediu esforços para me ajudar e que já me salvou de muitas “furadas”. Uma pessoa humilde, alegre, descontraída e que sempre “tem um jeitinho” para tudo, além de ter um coração enorme, enfim, uma pessoa admirável. Muito obrigada, professor! Um dia eu quero ser igual ao senhor.

Ao Laboratório de Ecologia Química, em especial à Jessica e Júlio, pela disponibilidade, ajuda e descontração durante todos os bioensaios.

Aos grandes amigos que junto comigo fazem parte da “família BioProt” e fazem com que cada minuto de trabalho seja muito produtivo e divertido: Pollyanna, Dayvid, Thamara, Poliana, Bob, Caio, Nathália, Suéllen, Robson, Jainaldo, Wenio e Matheus, que sempre alegraram meus dias no laboratório. Em especial a Stella, que me acompanhou durante quase todo o período do Doutorado, e a Nataly e Ana Patrícia que contribuíram muito cientificamente para realização desse trabalho.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica.

Obrigada a todos!

“A sabedoria é a coisa principal; adquiere, pois, a sabedoria, emprega tudo o que possuis na aquisição de entendimento.”

(Provérbios 4:7)

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é vetor dos vírus causadores da dengue, chikungunya, febre amarela e doença pelo vírus Zika. O controle desse vetor é um dos pontos-chaves na profilaxia dessas doenças. WSMoL (lectina solúvel em água de sementes de *Moringa oleifera*) é uma proteína com ações larvicida, ovicida e estimulante de oviposição sobre *A. aegypti*. A presente tese teve como objetivos: analisar o efeito de preparações (extrato e fração lectínica) contendo WSMoL no desenvolvimento e fecundidade de *A. aegypti*; investigar possíveis receptores de WSMoL presentes nas patas de fêmeas e que possam estar envolvidos na ação estimulante de oviposição; e desenvolver formulação (tipo comprimido) inseticida contendo a fração. Para alcançar o primeiro objetivo, indivíduos de *A. aegypti* foram expostos por 24 h durante o terceiro instar larval ao extrato (0,1–1,0 mg/mL de proteínas) ou fração (0,05–0,6 mg/mL de proteínas) e a sobrevivência e o desenvolvimento foram seguidos por 9 dias após a exposição. A capacidade de alimentação de fêmeas adultas que se desenvolveram a partir das larvas tratadas e a eclosão dos ovos depositados por elas também foram avaliados. Além disso, alterações na histologia do intestino médio de larvas no quarto estágio, pupas e adultos derivados dos indivíduos tratados foi investigada. Na segunda etapa, extrato de proteínas de membrana das patas de *A. aegypti* obtido utilizando o detergente Triton X-100 foi aplicado em coluna contendo a matriz WSMoL-Sepharose e as proteínas adsorvidas foram eluídas com ácido acético 0,1 M e avaliadas quanto ao perfil em cromatografia de gel filtração e em eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). A similaridade das proteínas adsorvidas com sequências depositadas em bancos de dados foi investigada. Por fim, comprimidos contendo a fração lectínica foram desenvolvidos e avaliados quanto aos efeitos larvicida, ovicida e moduladora de oviposição. O extrato e a fração induziram a morte de larvas de *A. aegypti* ao longo do período pós-exposição. Ambas as preparações também atrasaram o ciclo de desenvolvimento. O intestino médio das larvas e pupas tratadas mostrou desorganização e vacuolização epitelial, enquanto nos adultos tratados, o epitélio foi subdesenvolvido em comparação ao controle. As fêmeas adultas que se desenvolveram a partir de larvas tratadas com a fração ganharam menos peso após o repasto sanguíneo e depositaram menor quantidade de ovos, que também apresentaram menor taxa de eclosão. A matriz WSMoL-Sepharose foi capaz de reter proteínas presentes no extrato de patas. O pico proteico continha proteínas com massa molecular de aproximadamente 20 kDa, detectadas duas bandas polipeptídicas (17,0 e 23,7 kDa) em SDS-PAGE. Análise por MS/MS indicou similaridade com transportadores ABC, que são amplamente distribuídos em insetos e

têm sido relacionados com o efluxo de inseticidas. Os comprimidos contendo a fração a 10% e 15% promoveram mortalidade de 42,5% e 95% das larvas após 48 h, respectivamente. Os comprimidos a 5%, 10% e 15% inibiram (36 a 74%) a eclosão dos ovos após 72 h de exposição. Ainda, o comprimido a 15% apresentou efeito repelente de oviposição. A partir da presente tese, pode-se concluir que: a) a exposição de larvas de *A. aegypti* a extrato aquoso e fração contendo WSMoL resultou no desenvolvimento de fêmeas com epitélio intestinal subdesenvolvido, ingurgitamento reduzido após repasto sanguíneo e consequente comprometimento de sua fertilidade e fecundidade; b) WSMoL é capaz de se ligar a proteína(s) de membrana presentes nas patas de fêmeas, o que pode estar relacionado com a atividade estimulante de oviposição; c) preparação enriquecida de WSMoL apresentou atividade inseticida contra *A. aegypti* quando incorporada em comprimidos.

Palavras-chave: Fração proteica. Lectina. *Aedes aegypti*. Comprimido inseticida. Receptor de oviposição.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is the vector of the viruses that cause dengue, chikungunya, yellow fever and Zika virus disease. The control of this vector is one of the key points in the prophylaxis of these diseases. WSMoL (water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds) is a protein with larvicidal, ovicidal and oviposition-stimulant activities on *A. aegypti*. The present thesis aimed: to analyze the effect of preparations (extract and lectin-rich fraction) containing WSMoL on the development and fecundity of *A. aegypti*; to investigate possible WSMoL receptors present in the legs of females and that may be involved in the oviposition-stimulant action; and to develop an insecticide formulation (tablets) containing the fraction. To reach the first objective, individuals of *A. aegypti* were exposed for 24 h during the third larval instar to the extract (0.1–1.0 mg/mL of protein) or fraction (0.05–0.6 mg/mL of protein) and survival and development were followed for 9 days post-exposure. The feeding capacity of adult females that developed from the treated larvae and the hatching of the eggs deposited by them were also evaluated. In addition, changes in the histology of the midgut of larvae in the fourth stage, pupae and adults derived from the treated individuals was investigated. In the second step, extract of membrane proteins from the legs of *A. aegypti*, obtained using the detergent Triton X-100, was applied to a column containing a WSMoL-Sepharose matrix and the adsorbed proteins were eluted with 0.1 M acetic acid and evaluated for profile in gel filtration chromatography and electrophoresis in polyacrylamide gel under denaturing conditions (SDS-PAGE). The similarity of the adsorbed proteins with sequences deposited in databases was investigated. Finally, tablets containing the lectin-rich fraction were developed and evaluated for larvicidal, ovicidal and oviposition-modulatory effects. The extract and the fraction induced the death of *A. aegypti* larvae throughout the post-exposure period. Both preparations also delayed the development cycle. The midgut of treated larvae and pupae showed disorganization and epithelial vacuolization, while in treated adults, the epithelium was underdeveloped compared to the control. Adult females that developed from larvae treated with the fraction gained less weight after blood meal and deposited fewer eggs, which also had a lower hatching rate. The WSMoL-Sepharose matrix was able to retain proteins present in the legs extract. The protein peak contained proteins with a molecular mass of approximately 20 kDa, being two polypeptide bands (17.0 and 23.7 kDa) detected on SDS-PAGE. Analysis by MS/MS indicated similarity with ABC transporters, which are widely distributed in insects and have been related to the efflux of insecticides. The tablets containing

the fraction at 10% and 15% promoted mortality of 42.5% and 95% of the larvae after 48 h, respectively. The 5%, 10% and 15% tablets inhibited (36 to 74%) the hatching of the eggs after 72 h of exposure. In addition, the 15% tablet had an oviposition repellent effect. From this thesis, it can be concluded that: a) the exposure of *A. aegypti* larvae to aqueous extract and fraction containing WSMoL resulted in the development of females with underdeveloped intestinal epithelium, reduced engorgement after blood meal and consequent impaired fertility and fertility; b) WSMoL is able to bind to the membrane protein(s) present in the legs of females, which may be related to the oviposition-stimulant activity; c) preparation enriched in WSMoL showed insecticidal activity against *A. aegypti* when incorporated into tablets.

Keywords: Protein fraction. Lectin. *Aedes aegypti*. Insecticidal table. Oviposition receptor.

.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1 –	Distribuição geográfica de populações de <i>Aedes aegypti</i>	20
Figura 2 –	Representações esquemáticas do escudo (A), patas (B) e abdômen (C) de adulto de <i>Aedes aegypti</i> .	22
Figura 3 –	Árvore de <i>Moringa oleifera</i>	34
Figura 4 –	Classificação estrutural de lectinas (Fonte: TEIXEIRA, 2012). Esquema representando as merolectinas (Heveína;PDB: 1Q9B), hololectinas (ConM; PDB: 2OW4), quimerolectinas (Ricina; PDB: 2R2X) e superlectinas, estas últimas sem representantes com estrutura tridimensional elucidadas.	37
Figura 5 –	Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos por lectina e aspecto da rede de aglutinação em placa de microtitulação	49

ARTIGO 1

Figura 1 –	Evaluation of the post-exposure survival of <i>A. aegypti</i> individuals that were in contact for 24 h at the third larval instar with the water extract (A and B) and lectin-rich fraction (C and D) from <i>M. oleifera</i> seeds. Survival (A, C) and Kaplan-Meier (B, D) curves are presented. The survival log-rank test indicated there was a significant reduction in mean survival times in extract treatments compared with those in the control. The extract and fraction were tested at different protein concentrations (mg/mL)	51
Figura 2 –	Effects of the water extract and lectin-rich fraction of <i>M.</i> <i>oleifera</i> seeds on the development of <i>A. aegypti</i> . Individuals were exposed to the preparations at the third larval instar for 24 h, and then followed for 9 days of post-exposure recovery. Each bar represents the percentage of the total number of individuals evaluated in each treatment that was at each developmental stage. The sample concentrations shown correspond to units of	52

	mg/mL of protein.	
Figura 3 –	Longitudinal histological sections of the midguts of <i>A. aegypti</i> larvae, pupae, and adults from the control and treatments. The <i>A. aegypti</i> individuals were exposed at the third larval instar for 24 h to the water extract (0.1 mg/mL of protein) or lectin-rich fraction (0.05 mg/mL of protein) of <i>M. oleifera</i> seeds, followed for 9 days of post-exposure recovery. The larvae were collected 24 h after exposure. Female pupae were collected 48 h after pupation, and female adults 3–5 days after emergence. In the midguts of treated larvae and pupae, a remarkable degree of disorganization and epithelial vacuolization was observed, whereas in treated adults, the epithelium appeared to be less fully developed compared to that in control adults, with cubic digestive cells present and striated borders absent. Scale bars: 20 μ m.	53
Figura 4 –	Representative histological sections (A) of the midguts of <i>A. aegypti</i> larvae, pupae, and adults from the control and treatments as well as number of phosphohistone H3-positive (PH3) cells (B) in the midguts. Bars present mean and error bars present standard deviations.	53
Figura 5 –	Evaluation of the feeding ability of <i>A. aegypti</i> females that developed from individuals exposed to the water extract and lectin-rich fraction of <i>M. oleifera</i> seeds (treatments), followed for 9 days of postexposure recovery, or not exposed (control), at the third larval instar for 24 h. (A) The weights of females were determined before and after a blood meal. Bars present mean and error bars present standard deviations. Different lowercase (weight before feeding) or uppercase (weight after feeding) letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments. (B) The feeding ability was evaluated by determining the weight gain after the blood meal. Bars present mean and error bars present standard deviations. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among	54

treatments.

- Figura 6 – . Evaluation of the fertility and fecundity of *A. aegypti* females that developed from individuals exposed to the water extract and lectin-rich fraction of *M. oleifera* seeds (treatments), followed for 9 days of post-exposure recovery, or not exposed (control), at the third larval instar for 24 h. Fertility (A) was evaluated by determining the number of eggs laid. The hatching success (B) was determined as the percentage of eggs laid that hatched. Bars present mean and error bars present standard deviations. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments. 54

ARTIGO 2

- Figura 1 – Concentração proteica em extratos de proteínas de membrana de patas de *Aedes aegypti* obtidos utilizando diferentes detergentes: desoxicolato de sódio, digitonina, sulfato sódico de dodecila (SDS), Triton X-100 e Tween 20. 63

- Figura 2 – Investigação da interação entre WSMoL e proteínas das patas de fêmeas de *A. aegypti*. (A) Cromatografia de afinidade do extrato de patas em suporte WSMoL-Sepharose, equilibrada com fosfato de potássio 100 mM pH 7,6 contendo Triton X-100 0,1% (v/v). O material não adsorvido foi removido utilizando a solução de equilíbrio. Proteínas adsorvidas foram eluídas com ácido acético 0,1 M. (B) Cromatografia de gel filtração (%) do pico de proteínas adsorvidas à matriz. (C) SDS-PAGE (15%) do pico de proteínas adsorvidas à matriz (1), WSMoL (2) e mistura de padrões de massa molecular. 64

ARTIGO 3

- Figura 1 – Avaliação por termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC) de alterações provocadas pelo aquecimento na composição da fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de *Moringa oleifera*. Na curva TG é possível 83

distinguir três eventos que evidenciam desidratação (1), decomposição relacionada com volatilização de fragmentos de proteínas (2) e decomposição completa (3). Na curva DSC são evidenciados um pico endotérmico (A) e um pico exotérmico (B), que estão relacionados com os eventos 1 e 2 da curva TG.

- Figura 2— Avaliação por calorimetria diferencial exploratória (DSC) da compatibilidade entre a fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de *Moringa oleifera* e os excipientes utilizados na produção dos comprimidos. Estão apresentadas as curvas da fração e das seguintes misturas binárias (MB): MB1 - fração + celulose microcristalina; MB2: - fração + croscarmelose de sódio; MB3 - fração + estearato de magnésio; MB4 - fração + dióxido de titânio. Os picos A e B característicos da fração podem ser observados em todas as curvas, sem nenhuma antecipação, demonstrando a compatibilidade entre os componentes da formulação e a fração 84
- Figura 3— Análise da composição da fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de *Moringa oleifera* por espectrometria de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Estão indicadas na figura as bandas relacionadas com componentes proteicos presentes na fração. 85
- Figura 4 — Análise por espectrometria de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das misturas binárias entre a fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de *Moringa oleifera* e os excipientes utilizados na obtenção de comprimidos. As curvas em preto correspondem ao espectro da fração sozinha, enquanto as curvas em vermelho do excipiente sozinho. Já em azul estão apresentadas as curvas das misturas (A) fração + croscarmelose de sódio, (B) fração + celulose microcristalina, (C) fração + dióxido de titânio, e (D) fração + estearato de magnésio. Estão indicadas na figura as bandas 86

relacionadas com componentes proteicos presentes na fração.

Figura 5

85

Atividade de acetilcolinesterase em extratos de larvas de *Aedes aegypti* incubadas com comprimidos contendo fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de *Moringa oleifera* (5%, 10% e 15%). Larvas incubadas com comprimidos placebo ou somente em água destilada (controle) também foram avaliadas. (*) indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Figura 6

88

Atividade das enzimas digestivas amilase (A) e tripsina (B) em extratos de intestino de larvas de *Aedes aegypti* incubados ou não com suspensões derivadas da adição em água destilada de comprimidos placebo ou contendo fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de *Moringa oleifera*. (*) indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Figura 7

89

Avaliação do efeito de comprimidos placebo (A) ou contendo fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de *Moringa oleifera* (B, C e D) sobre a oviposição de *Aedes aegypti*. As barras representam o número médio de ovos depositado no papel filtro colocado em recipiente contendo somente água destilada (controle) ou 1 comprimido adicionado à água destilada. (*) indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 –	Mean survival times in the treatments with the water extract and lectin-rich fraction from <i>Moringa oleifera</i> and in control	52
------------	---	----

ARTIGO 2

Tabela 1 –	Similaridades detectadas entre peptídeos derivados de proteínas de patas de <i>Aedes aegypti</i> adsorvidas à matriz WSMoL-Sepharose e sequências de proteínas depositadas no NCBIProt.	68
------------	---	----

ARTIGO 3

Tabela 1 –	Atividades larvícida e ovícida de comprimidos contendo fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de <i>Moringa oleifera</i> contra <i>Aedes aegypti</i> .	84
------------	---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	OBJETIVOS	23
1.1.1	Objetivo Geral	23
1.1.2	Objetivos Específicos.....	23
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
2.1	<i>Aedes aegypti</i>	24
2.1.1	Características gerais.....	24
2.1.2	Doenças transmitidas pelo <i>Aedes aegypti</i>	27
2.1.2.1	Dengue.....	27
2.1.2.2	Chikungunya.....	31
2.1.2.3	Zika.....	33
2.1.2.4	Febre Amarela.....	35
2.1.3	Intestino de <i>Aedes aegypti</i>	36
2.2	<i>Moringa oleífera</i> Lam.....	38
2.3	LECTINAS.....	40
2.3.1	Lectina solúvel em água de semente de <i>M. oleífera</i> (WSMoL)..	43
2.4	Formulações.....	45
3	RESULTADOS	46
3.1	ARTIGO 1. EXPOSURE OF MOSQUITO (<i>Aedes aegypti</i>) LARVAE TO THE WATER EXTRACT AND LECTIN-RICH FRACTION OF MORINGA OLEIFERA SEEDS IMPAIRS THEIR DEVELOPMENT AND FUTURE FECUNDITY	46
3.2	ARTIGO 2. INVESTIGAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTRAÍDAS DE PATAS DE <i>Aedes aegypti</i> COMO LIGANTES DA LECTINA ESTIMULANTE DE OVIPOSIÇÃO ISOLADA DAS SEMENTES DE <i>moringa</i> <i>oleífera</i> (WSMoL)	55
3.3	ARTIGO 3. EFEITOS DE FORMULAÇÃO SÓLIDA CONTENDO LECTINA DE SEMENTES DE <i>Moringa</i> <i>oleífera</i> NA ECLOSÃO DE OVOS E DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i>	70

5	CONCLUSÃO.....	82
	REFERENCIAS.....	83
ANEXO A–	COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DA PATENTE À POSITIVA – DIRETORIA DE INOVAÇÃO/UFPE	102

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que aproximadamente 40% da população mundial, distribuída em mais de 130 países, está exposta a variados tipos de doenças transmitidas por mosquitos (as arboviroses) resultando em milhares de mortes anualmente (YANG *et al.*, 2012). Dentre essas doenças, a dengue é um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil e no mundo. Ela é transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), o qual é também vetor de outras arboviroses, como febre amarela, febre Chikungunya e doença do vírus Zika. O controle de populações desse mosquito permanece sendo a principal medida adotada nos programas de prevenção dessas doenças em áreas endêmicas (PLIEGO-PLIEGO *et al.*, 2020).

A busca por novos agentes inseticidas tem sido estimulada, uma vez que a utilização excessiva de inseticidas químicos para controle de populações do *A. aegypti* tem resultado na seleção de populações resistentes; ainda, esses compostos apresentam toxicidade contra organismos não-alvo e são persistentes no ambiente. Diversos estudos têm demonstrado o potencial de produtos naturais contra o *A. aegypti*, tais como extratos vegetais, óleos essenciais, metabólitos secundários, lectinas e inibidores de proteases (PONTUAL *et al.*, 2014; AZEEM *et al.*, 2019; ARRUDA *et al.*, 2019; ALVES *et al.*, 2020).

Larvas e adultos de *A. aegypti* vivem de maneiras diferentes e, portanto, apresentam diferentes características morfológicas e fisiológicas. Para o amadurecimento da larva até a fase adulta, é necessário que ela acumule reservas energéticas durante o estágio larval e passe por uma reorganização celular a nível intestinal (BRUSCA & BRUSCA, 2007). Assim, qualquer interferência no desenvolvimento do intestino médio pode afetar a metamorfose e até mesmo provocar redução da fertilidade de adultos (FERNANDES *et al.*, 2014). Os inseticidas que atuam sobre as larvas têm recebido maior atenção que os agentes adulticidas, uma vez que previnem a emergência da forma adulta, que é transmissora de doenças e com maior capacidade de dispersão (FARNESI & VALLE, 2013). O intestino do *A. aegypti* é um órgão bem estudado no adulto pois é o local onde acontece a digestão do sangue e é considerado o "portal" para entrada vários patógenos através da ingestão de sangue contaminado (GUPTA *et al.*, 2005; PENNINGTON *et al.*, 2011). Sendo assim, estudos sobre este órgão são importantes para estabelecer estratégias de controle do vetor.

Moringa oleifera é uma planta pertencente à família Moringaceae, nativa da Índia e amplamente cultivada nos trópicos de todo o mundo (AMAGLO *et al.*, 2010). Nos países em desenvolvimento, as sementes de *M. oleifera* são amplamente utilizadas como coagulante

natural para tratamento de água, principalmente em áreas rurais onde recursos hídricos são escassos. As sementes contêm proteínas coagulantes que podem ser facilmente extraídas em água e promovem a precipitação de partículas em suspensão, levando à diminuição na turbidez da água (SANTOS *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2011). Dentre essas proteínas, encontram-se lectinas, proteínas que se ligam a carboidratos de forma específica e reversível. Além da atividade coagulante, a lectina solúvel em água de sementes de *M. oleifera* (WSMoL, do inglês *water-soluble M. oleifera lectin*) apresentou efeitos deletérios sobre o *A. aegypti*, sendo potencial candidata para utilização em estratégias de controle do mosquito (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012, 2014).

WSMoL foi agente larvicida contra larvas de *A. aegypti* no quarto estágio e apresentou efeito ovicida sobre ovos frescos e estocados (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012). Agra-Neto *et al.* (2014) demonstraram que o efeito larvicida de WSMoL pode estar relacionado com um efeito estimulatório sobre a atividade de enzimas proteolíticas presentes no trato intestinal das larvas. WSMoL apresentou também atividade estimulante de oviposição sobre fêmeas grávidas de *A. aegypti*, tanto em condições de laboratório quanto em campo simulado. Os estudos demonstraram que WSMoL atua como uma pista química para a oviposição, provavelmente devido à interação com receptores e sensores de contato (gustatórios) e não através de estímulos olfativos (SANTOS *et al.*, 2012, 2014).

O desenvolvimento de uma formulação inseticida deve considerar que a mesma seja fácil de ser produzida e administrada, possa ser convenientemente armazenada e apresente viabilidade econômica (BULLA JR *et al.* 1975; MEDEIROS *et al.* 2005). As duas formas principais de administração são as formulações líquidas (emulsões, suspensões aquosas) e as formulações sólidas (pó, pó molhável, grânulos, grânulos dispersíveis em água, briquetes, tabletes e comprimidos solúveis).

Diante do exposto sobre a necessidade de controle do *A. aegypti* e a ação inseticida da lectina WSMoL sobre esse mosquito, a presente tese foi construída de forma a responder três questionamentos:

- Seriam extrato de sementes de moringa e fração enriquecida em WSMoL capazes de interferir no remodelamento intestinal durante a metamorfose de larvas em pupas e adultos, com consequente impacto na fecundidade das fêmeas originadas?
- WSMoL atua como estimulante de oviposição por interagir com proteínas receptores presentes nas patas das fêmeas?

- A fração enriquecida em WSMoL é capaz de exercer os efeitos deletérios sobre *A. aegypti* quando incorporada em uma formulação sólida (comprimidos).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 GERAL

- Investigar preparações contendo WSMoL quanto à repercussão da exposição de larvas de *A. aegypti* a essas amostras no desenvolvimento intestinal e fecundidade de adultos, capacidade de interação com proteínas extraídas de patas de fêmeas e eficiência inseticida quando incorporadas em comprimidos.

1.1.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Obter preparações contendo WSMoL (extrato, fração enriquecida em lectina e WSMoL isolada) seguindo procedimentos previamente estabelecido.
- ✓ Investigar o impacto da exposição por 24 horas de larvas de *A. aegypti* ao extrato e fração lectínica na sobrevivência, remodelação intestinal durante a metamorfose e capacidade de alimentação e fecundidade das fêmeas originadas.
- ✓ Definir melhores métodos de extração de proteínas de membrana das patas de fêmeas de *A. aegypti*.
- ✓ Avaliar a ligação de proteínas extraídas das patas à matriz contendo a WSMoL imobilizada.
- ✓ Caracterizar as proteínas de patas ligantes de WSMoL através de cromatografia de gel filtração, eletroforese e espectrometria de massas.
- ✓ Investigar a compatibilidade entre a fração lectínica e excipientes utilizadas na preparação de formulação sólida (comprimidos).
- ✓ Obter comprimidos contendo a fração lectínica e avaliá-los quanto às atividades larvicida, ovicida e efeito na oviposição de *A. aegypti*.

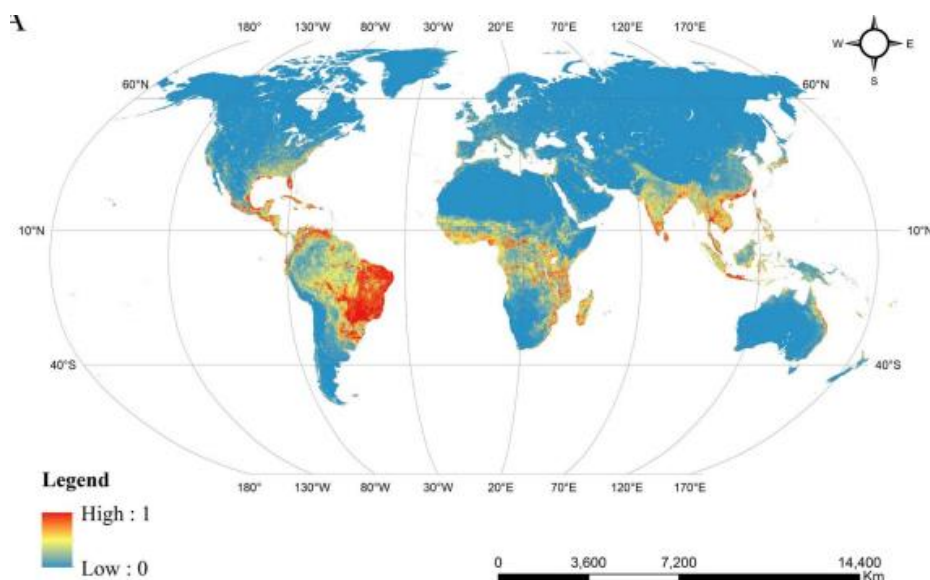
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Aedes aegypti*

2.1.1 Características gerais

Existem duas espécies principais de mosquitos do gênero *Aedes* (Ordem Diptera, Família Culicidae) capazes de transmitir, além da dengue, outras arboviroses como chikungunya, doença do vírus Zika e febre amarela: *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2004). Devido à ampla distribuição global do *A. aegypti* nos trópicos e subtropicais (Figura 1) e ao seu fácil desenvolvimento nos centros urbanos, ele representa um sério risco à saúde humana e controlar a população desse inseto é uma forma importante de diminuir a transmissão dessas doenças (SMITH, KASAI & SCOTT, 2016).

Figura. 1 - Distribuição geográfica de populações de *Aedes aegypti*.



Fonte: Ding *et al.* (2018).

A ocorrência do *A. aegypti* foi descrita pioneiramente por Linnaeus no Egito, em 1762. Esse mosquito é encontrado em praticamente todo o continente americano, no Sudeste da Ásia, e em toda a Índia (KRAEMER *et al.*, 2015). Provavelmente, a inserção dessa espécie no

Brasil aconteceu na época colonial, entre os séculos XVI e XIX, através dos navios negreiros (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). As características dos ambientes urbanos favorecem a proliferação do *A. aegypti*, sendo raramente encontrado em ambientes em que o homem não esteja presente intensamente. Seus principais criadouros são os ditos artificiais (pneus, garrafas, recipientes, entre outros), principalmente os abandonados a céu aberto, que acumulam água da chuva ou armazenam água parada (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; SIMOY *et al.*, 2015).

Durante o seu ciclo de vida, o *A. aegypti* passa por quatro distintas fases: ovo, larva, pupa e adulto. As três primeiras fases são chamadas de estágios imaturos e ocorrem na água. A fase terrestre é representada pelo inseto adulto. As estratégias de controle do mosquito utilizadas mais rotineiramente têm como alvo as fases aquáticas, principalmente larvas (REIS *et al.*, 2017).

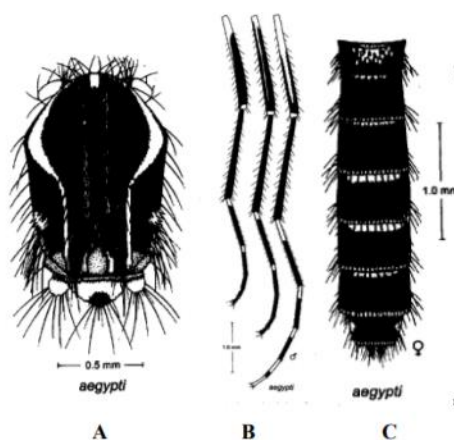
Os ovos são alongados com leve curvatura dorso-ventral e afilados nas extremidades, apresentando cor pálida no momento da oviposição tornando-se, logo após, escuros e brilhantes. A quiescência dos ovos permite a manutenção do ciclo na natureza durante as variações climáticas sazonais, uma vez que a viabilidade dos ovos de *A. aegypti* pode chegar até 492 dias em condições de seca, eclodindo após contato com a água (SILVA & SILVA, 1999; SIMOY *et al.*, 2015). O tempo entre a oviposição e a eclosão dos ovos dura, em média, de 2 a 5 dias dependendo das condições do ambiente (FORATTINI, 1962; SIMOY *et al.*, 2015).

As larvas passam por quatro estágios evolutivos (L1, L2, L3 e L4), sendo o último destes o mais longo. Os machos têm, em média, um desenvolvimento larvário mais rápido que as fêmeas. A duração da fase larvária também depende da temperatura, disponibilidade de alimento e da densidade das larvas no criadouro. Em condições ótimas, o período entre a eclosão e a pupação não excede 5 dias. Contudo, com alterações de temperatura e escassez de alimento, o estágio L4 pode prolongar-se por várias semanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; MOHAMMED & CHADEE, 2011; MOURYA *et al.*, 2004). As larvas do *A. aegypti* são compostas de cabeça, tórax e abdômen, são sempre aquáticas e de aspecto vermiforme. Embora aquáticas, as larvas respiram sempre o oxigênio do ar, necessitando para isso chegar à superfície da água. Movimentam-se em forma de serpente, fazendo um S em seu deslocamento e são sensíveis a movimentos bruscos. Sob feixe de luz, deslocam-se com rapidez, buscando refúgio no fundo do recipiente, característica denominada fotofobia (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

As pupas, que sucedem o último estágio larval, têm aspecto de vírgula e estão quase sempre paradas em contato com a superfície da água. Seu corpo divide-se em duas porções: cefalotórax e abdômen (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1962; SUMAN *et al.*, 2011). Os adultos de *A. aegypti* possuem seu corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen e representam a fase reprodutiva da espécie. O adulto caracteriza-se por ser antropofílico e possuir hábito diurno. Geralmente alimenta-se e oviposita ao amanhecer e no período vespertino, próximo ao crepúsculo. Morfologicamente, caracterizam-se por ser um mosquito de tamanho médio, de cor escura, ornamentado com escamas claras prateadas na cabeça, no escudo, nas pernas e no abdome (Figura 2) (BECKER *et al.*, 2010; CONSOLI & OLIVEIRA, 1998; FORATTINI, 1962; HUANG, 2004).

A capacidade de reprodução do mosquito é fortemente influenciada pela capacidade da fêmea de conseguir alimento em um hospedeiro desde que o sangue é necessário para o amadurecimento completo dos ovos (BRIEGEL, 1990; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). A fêmea consegue fazer ingestões múltiplas de sangue durante um único ciclo gonadotrófico, o que amplia a sua capacidade de se infectar e de transmitir vírus. Este comportamento torna o *A. aegypti* um vetor eficiente (SCOTT *et al.*, 1993). A seleção do local de oviposição é influenciada por fatores físicos, químicos e biológicos, incluindo intensidade luminosa, coloração do criadouro, temperatura, grau de salinidade, presença de vegetais e microrganismos (ou os seus produtos metabólicos) e substâncias liberadas por formas imaturas do mosquito (FORATTINI, 1962).

Figura. 2 – Representações esquemáticas do escudo (A), patas (B) e abdômen (C) de adulto de *Aedes aegypti*.



Fonte: Huang (2004).

Para *A. aegypti*, assim como para outros insetos, a percepção e análise do ambiente é muito importante, principalmente no momento da oviposição visando a escolha do ambiente propício. O trabalho de coletar informações do ambiente e integrar tais informações pertence às células do sistema nervoso. Nos insetos, a captação de informações ambientais como odores e sabores se concentram em estruturas semelhantes a pelos, chamadas sensilas, as quais se distribuem praticamente por todo o corpo, porém se concentram principalmente nas antenas, aparato bucal e patas (GOMES *et al.*, 2010).

A espécie *A. aegypti* chegou a ser erradicada do Brasil duas vezes, entre 1958 e 1973 (SOPER, 1965; NOBRE *et al.*, 1994). Mas, três anos depois, surgiram os primeiros registros da reintrodução do mosquito no país, devido a falhas na vigilância epidemiológica e urbanização descontrolada (TAUIL *et al.*, 2001; MACIEL *et al.*, 2008). Sendo assim, desde 1976, o *A. aegypti* está presente em todas os estados brasileiros.

O desenvolvimento de inseticidas iniciou-se em 1867, com a formulação e uso do composto arsênico “verde de Paris” e desde 1920 foi notado um aumento do potencial desses compostos como ferramenta para o controle de insetos. Em 1939, Muller descreveu as propriedades inseticidas do diclorodifeniltricloroetano (DDT) (ROCHA, 2014). Esse composto foi muito usado no controle de insetos e pragas agrícolas mas, devido a sua persistência no meio ambiente e a reduzida eficácia contra insetos resistentes, teve seu uso banido na maioria dos países (HEMINGWAY; RANSON, 2005).

Os inseticidas químicos são classificados de acordo com as suas estruturas químicas em quatro principais grupos: piretroides, organofosforados, carbamatos e organoclorados, sendo os dois primeiros os mais frequentemente usados no controle de vetores (BISSET, 2002; HEMINGWAY; RANSON, 2005). De maneira geral, esses quatro tipos atuam ligando-se a sítios específicos nas células do inseto. Os organoclorados e os piretroides atuam no sistema nervoso, ligando-se aos canais de sódio da membrana das células nervosas e aos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA). Já os organofosforados e os carbamatos atuam ligando-se à enzima acetilcolinesterase (AChE) nas junções nervosas, provocando um acúmulo da acetilcolina, o que leva à morte do inseto (HEMINGWAY; RANSON, 2005).

Esses inseticidas sintéticos atualmente utilizados apresentam toxicidade não seletiva e são persistentes no ambiente. Ainda, tem crescido o número de populações de *A. aegypti* resistentes a esses compostos. Todos esses fatores têm estimulado a procura por inseticidas de origem vegetal para uso no controle químico (PROCÓPIO *et al.*, 2015).

2.1.2. Doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti*

As arboviroses, são doenças virais transmitidas pelos mosquitos em animais e humanos. Nesse contexto, o mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor de diferentes doenças infecciosas em regiões tropicais e subtropicais do mundo. A circulação simultânea dos vírus da Dengue (DENV), vírus Chikungunya (CHIKV) e Zika vírus (ZIKV) tem colocado o Brasil entre as principais áreas afetadas pela presença desse mosquito (ARAGÃO *et al.*, 2018).

2.1.2.1 Dengue

A dengue é uma doença viral causada por arbovírus de genoma RNA da família Flaviviridae e gênero *Flavivirus*, que apresenta quatro sorotipos infectantes: DEN-1 a DEN-4 (OMS 2009). Seu principal vetor em toda faixa intertropical do globo terrestre é o *A. aegypti* (BRAGA & VALLE, 2007; WHO, 2009). A dengue traz uma alta carga econômica devido aos recursos e serviços prestados na saúde (WILDER-SMITH, 2019).

A dengue é considerada a mais importante das doenças virais transmitidas por artrópodes e tem se destacado entre as enfermidades reemergentes devido a sua ampla distribuição mundial (OMS, 1997; RIGAU-PÉREZ *et al.*, 1998; OMS, 2002). A Organização Mundial da Saúde (OMS) está envolvida, de maneira bastante ativa, no desenvolvimento e na promoção de estratégias de tratamento e controle da doença desde o início dos anos 70 (OMS, 1997). O intenso fluxo migratório rural-urbano e a ausência de saneamento básico (principalmente no que se refere ao abastecimento de água e à coleta de lixo) são fatores que propiciam o crescimento no número de criadouros, assim promovendo a proliferação do vetor e levando a vários surtos em todos os cinco continentes, sendo mais frequente em países tropicais e subtropicais onde os fatores climáticos, como a temperatura, favorecem ainda mais a proliferação do vetor. A dengue afeta cerca de 390 milhões de pessoas anualmente em todo o mundo, com significativa mortalidade devida à dengue hemorrágica (TAUIL, 2001; TAUIL, 2002; BHATT *et al.*, 2013; OMS, 2018).

A ascensão da dengue clássica e a emergência da febre hemorrágica se toranaram alguns dos maiores problemas de Saúde Pública a partir da segunda metade do século XX. Durante e após a Segunda Guerra Mundial, se iniciaram as epidemias de dengue no Sudeste Asiático e, a partir de então, se expandiram para o resto do mundo, até se disseminarem na década de 80 pelas Américas, que começaram a se destacar nesse cenário e passaram a

contribuir com mais da metade dos casos notificados no mundo (MARTINEZ, 1990; PINHEIRO & NELSON, 1997; WHO, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2008). Em 2019 (até 24 de agosto), foram registrados 1.439.471 de casos de dengue no Brasil, com crescimento de 599,5% em relação ao mesmo período de 2018 (205.791). A taxa de incidência, que considera a proporção de casos por habitantes, é de 690,4 casos/100 mil habitantes. Entre os estados com casos, destacam-se Minas Gerais, Goiás, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal. Com relação ao número de óbitos, foram confirmadas 591 mortes (OMS, 2019).

As epidemias de dengue ocorrem no Brasil desde 1986 e vários estados brasileiros conviveram com grandes epidemias, tendo alcançado 80% das notificações registradas nas Américas no final da década de 1990, em 24 estados mais o Distrito Federal (SCHATZMAYR, 2000). A circulação viral (DEN-1 e DEN-2) após o ano de 1992 se expandiu rapidamente para todas as áreas do território brasileiro, acompanhando a expansão do *A. aegypti*, com circulação simultânea de ambos os sorotipos. Em 1994, o DEN-3 foi reintroduzido nas Américas e, em 2000, no Brasil (NOGUEIRA *et al.*, 2001). Em 2002, na maior epidemia de dengue do Brasil, com mais de 1,2 milhões de casos notificados sendo 1.408 de dengue hemorrágica, além de 53 óbitos, os vírus DEN-1, DEN-2 e DEN-3 co-circulavam (LENZI & COURA, 2004; SIQUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2005).

A existência de imunidade cruzada não foi constatada, ou seja, a infecção por um dos sorotipos só confere imunidade permanente para aquele sorotipo e parcial e temporária contra os outros tipos (DEGALLIER *et al.*, 2001, TAUIL, 2001). Quando ocorrem infecções sucessivas por sorotipos diferentes ou heterólogos há um maior potencial de letalidade, aumentando o risco de dengue hemorrágica (SCHATZMAYR, 2003; KYLE & HARRIS, 2008).

O mosquito vetor se contamina com o vírus após picar um humano infectado com viremia, sendo este período correspondente entre o dia antes do aparecimento da febre e até o 6º dia da doença. Já no mosquito, o vírus se propaga atravessa do intestino para a circulação, se alojando nas glândulas salivares, onde vai se multiplicar durante 8 a 12 dias de incubação e só após este período o mosquito é capaz de transmitir a doença. O vírus é introduzido na corrente sanguínea no momento do repasto sanguíneo, quando a fêmea de *A. aegypti* regurgita saliva que contém substâncias anticoagulantes. Cada mosquito *A. aegypti* vive em média 45 dias e, nesse período, um único mosquito pode infectar até 300 pessoas. A transmissão não ocorre por contato direto de um doente ou de suas secreções com pessoas sadias, nem por

intermédio de água ou alimento contaminado (McBRIDE & BIELEFELDT-OHMANN, 2000; BRASIL, 2005; GUBLER, 2011; NUNES, 2011; MS, 2013; SVS, 2014; PICINATO *et al.*, 2015).

A infecção pelo vírus da dengue apresenta três formas clínicas principais: assintomática, a dengue clássica ou febre de dengue, e a forma hemorrágica, às vezes com síndrome de choque de dengue (MARTINEZ-TORRES, 1998). As características clínicas variam de acordo com a idade. Os casos mais severos geralmente ocorrem em crianças mais velhas e adultos. A dengue clássica raramente leva à morte. Os sintomas aparecem de 3 a 15 dias após a picada pelo inseto infectado e os principais sintomas são dor de cabeça, febre alta ($\geq 39^{\circ}\text{C}$), forte dor no corpo, cabeça e atrás dos olhos, falta de apetite e vômito. O sinal clássico de infecção pelo vírus da dengue é a ocorrência de manchas avermelhadas e coceira na pele que aparecem 3 a 4 dias após o início da febre (OMS, 2009; OMS, 2010).

Já a dengue hemorrágica, a forma mais severa da doença, é dividida em 4 níveis crescentes de gravidade sendo o III e o IV grau também chamados de síndrome do choque da dengue. A síndrome de choque da dengue ocorre entre o terceiro e sétimo dia da doença, sendo frequentemente fatal devido à alta permeabilidade dos capilares, extravasamento do plasma sanguíneo e falência circulatória. Os sintomas iniciais da dengue hemorrágica são semelhantes ao da dengue clássica, porém as manifestações hemorrágicas e/ou choque evoluem mais rapidamente. É caracterizada por excessiva permeabilidade capilar responsável pelo sangramento nas gengivas, nariz e no trato gastrointestinal, hepatomegalia, insuficiência circulatória, podendo ainda apresentar hematúria e aumento do fluxo menstrual (BRASIL, 1998; FUNASA, 2002b; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). As hemorragias variam de intensidade e podem desencadear choque por diminuição da pressão sanguínea seguido de morte (HUBERT & HALSTEAD, 2009). Os primeiros casos de febre hemorrágica da dengue foram relatados na década de 1950, durante as epidemias nas Filipinas e na Tailândia (HALSTEAD, 2006). Em 2008 dengue hemorrágica foi uma das principais causas de hospitalização e morte infantil no sudeste da Ásia e o oeste do Pacífico (WHO, 2008).

O diagnóstico é realizado mediante manifestações clínicas e exames sanguíneos, sendo confirmado por teste sorológico através da detecção de anticorpos após 6 dias se necessário (SINGHI *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2010). O tratamento da dengue clássica é sintomático com o uso de medicação antitérmica e analgésica, hidratação oral e repouso. Em média, após 8 dias de tratamento, o indivíduo se encontra curado. Em casos de dengue hemorrágica, é

recomendada internação com intensa hidratação via parenteral (LUPI *et al.*, 2007, SINGHI *et al.*, 2007; OMS, 2009).

A procura por uma vacina contra o vírus da dengue teve início durante a Segunda Guerra Mundial (HOMBACH, 2007). Em dezembro de 2015, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autorizou o registro para a comercialização no Brasil da vacina Dengvaxia[®] produzida pela empresa francesa Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. A vacina apresentou eficácia global de 65,6% e geral de 80,8% contra os 4 sorotipos em estudos clínicos que envolveu quase 21 mil voluntários da América Latina e Caribe com idade entre 9 e 45 anos. O Instituto Butantan em parceria com o Instituto Nacional da Saúde dos Estados Unidos também está em processo de desenvolvimento de uma vacina contra a dengue que seja totalmente eficaz contra os 4 sorotipos do vírus DEN (INSTITUTO BUTANTAN, 2015; PORTAL ANVISA, 2015). Sendo assim, o combate direto ao *A. aegypti* ainda é a melhor forma de intervenção e controle da doença (ESMERALDO, 2016).

2.1.2.2 Chikungunya

O vírus chikungunya (CHIKV), um alphavírus de RNA fita simples semelhante ao vírus da dengue e pertencente à família Togaviridae, também é transmitido pelo *A. aegypti*. Foi primeiramente descrito na Índia em 1824. Chikungunya significa “aqueles que se dobram” e se refere às fortes dores que a doença causa nas articulações. Esse vírus circula em todos os continentes habitados, se tornando um problema global de saúde pública na última década, tendo uma expansão territorial desde 2004 (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SAÚDE, 2011; KUCHARZ & CEBULA-BYRSKA, 2012; MUSSO *et al.*, 2015).

Acredita-se que o vírus Chikungunya tenha se espalhado para a Ásia, Europa e as Américas séculos atrás em navios à vela e do comércio de escravos vindos da África, onde a transmissão a bordo provavelmente foi mediada por *A. aegypti* (HALSTEAD, 2015).

Durante o segundo semestre de 2014, foram confirmados os primeiros casos autóctones de chikungunya no Brasil, em Oiapoque, estado do Amapá (HONÓRIO, 2015), após a confirmação da introdução do CHKV na América Central, no ano anterior (YAKOB, 2013; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2011). No mesmo ano de 2014, esse vírus foi detectado em outros seis estados, e em 2015 disseminou-se para mais de 690 municípios brasileiros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). No Ceará, os primeiros casos autóctones foram confirmados em 2015, e, nos anos de 2016 e 2017, houve a confirmação de

duas grandes epidemias, com incidências de 320,2/100 mil habitantes e 1.149,2/100 mil habitantes, respectivamente (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ, 2019). Em 2017, foram notificados à Secretaria de Saúde do Ceará 443 óbitos suspeitos de arboviroses. Entre esses óbitos notificados, 312 (70,4%) foram suspeitos de Chikungunya e os demais (131; 29,6%) de dengue (CAVALCANTI, 2019). Os casos da febre chikungunya no Brasil chegaram a 110.627 em 2019, 44,2% de aumento em relação ao ano anterior. A taxa de incidência foi de 53,1 casos/100 mil habitantes. Entre os estados com casos, destacaram-se Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte. Neste ano, foram confirmados laboratorialmente 57 óbitos (OMS, 2019)

O *A. albopictus* também foi confirmado como capaz de transmitir o vírus CHIKV (VEGA-RÚA *et al.*, 2014). Tanto o *A. aegypti* quanto o *A. albopictus* são abundantes no Brasil, sendo que o segundo tem caráter mais silvestre que o *A. aegypti*, sendo assim responsável pela transmissão do vírus Chikungunya em cidades médias ou cidades do interior (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2015).

O período necessário para que uma fêmea adulta de *A. aegypti* possa contaminar uma pessoa com o vírus Chikungunya é curto, levando apenas três dias (DUPONT-ROUZEYROL *et al.*, 2012). O CHIKV, é responsável por infecção aguda caracterizada por febre alta durante 3 a 5 dias, seguida por artralgia grave e mialgia, dores de cabeça, fotofobia, erupção cutânea, disfunção orgânica grave e encefalite em idosos e infecção neonatal grave, sendo incomum manifestações hemorrágicas. Os sintomas incapacitantes podem durar meses ou anos e são mais frequentemente relatados em pacientes com mais de 35 anos ou quando os sintomas persistem quatro meses após o início (BORGHERINI *et al.*, 2007; SCHILTE *et al.*, 2013; WEAVER & LECUIT, 2015; BURT *et al.*, 2012; HORWOOD; BUCHY, 2015; REZZA *et al.*, 2007; QUEYRIAUX *et al.*, 2008; LEMANT *et al.*, 2008). Linfopenia, trombocitopenia e transaminases elevadas são frequentemente observadas (HOCHEDÉZ *et al.*, 2006). Complicações potencialmente fatais são observadas em pacientes idosos com comorbidades, incluindo encefalite, miocardite e insuficiência renal ou hepática aguda (WEAVER & LECUIT, 2015). A taxa de letalidade é globalmente estimada em ~1/1.000, com mortes ocorrendo principalmente em pacientes acima de 75 anos de idade (MANIMUNDA *et al.*, 2011). Apesar de ser de baixa letalidade, seus sintomas deixam os pacientes debilitados, podendo desencadear artrite crônica, alterações neurológicas e hematológicas (BIRENDRA *et al.*, 2012). Cerca de 3 a 25% das pessoas com provas sorológicas de infecção não têm sintomas óbvios (BURT *et al.*, 2012). Normalmente os pacientes têm melhora parcial da

artralgia em 1 a 2 semanas após o início agudo da doença, podendo se recuperar completamente, porém, muitos pacientes têm artralgia persistente que dura meses ou até mesmo anos (BURT *et al.*, 2012; HORWOOD; BUCHY, 2015).

Há relatos de infecção vertical, raramente detectadas antes do parto, mas ocorrem em cerca de metade dos partos de mães virêmicas quando o sangue contaminado da mãe entra em contato com o bebê (COUDERC *et al.*, 2008; TORRES *et al.*, 2016). A infecção neonatal pode levar a encefalite e insuficiência respiratória aguda, afetando também o desenvolvimento neurológico pós-natal (TORRES *et al.*, 2016; GERARDIN *et al.*, 2014). O vírus também é capaz de infectar uma ampla variedade de tecidos, incluindo fígado, baço, músculo e linfonodos (WEAVER & LECUIT, 2015). Porém, ao contrário de muitos vírus do Novo Mundo, o vírus da Chikungunya não infecta neurônios ou vasos sanguíneos do cérebro e não é detectada indução da destruição cerebral. Entretanto, pode infectar o envelope cerebral e é detectável no líquido cefalorraquidiano de pacientes submetidos a uma punção lombar (WEAVER & LECUIT, 2015). Não existe um tratamento específico, então o tratamento é sintomático, incluindo repouso, ingestão de líquidos, antipiréticos e analgésicos (POWERS, 2010).

2.1.2.3 Zika

O vírus Zika é um flavivírus de RNA de cadeia simples pertencente à família Flaviviridae e transmitido pelo *A. aegypti* (KUNO *et al.*, 1998; KUNO & CHANG, 2007; HAYES, 2009; LI *et al.*, 2012). Foi originalmente isolado de uma fêmea de macaco *Rhesus* na Floresta Zika, localizada na Uganda, em 20 de abril de 1947 (KARABATSOS, 1985). Esse arbovírus possui epidemiologia e ciclo de transmissão semelhantes a dengue em ambientes urbanos (MUSSO *et al.*, 2015). O vírus Zika causa febre, cefaleia, erupção cutânea, conjuntivite, mal estar, edema e dores articulares, por vezes intensas sendo muitas vezes confundida com outras doenças, principalmente dengue e Chikungunya. Apesar da aparente benignidade da doença, na Polinésia Francesa e no Brasil, foram descritos quadros mais severos, incluindo comprometimento do sistema nervoso central (síndrome de Guillain-Barré, mielite transversa e meningite), associados ao Zika, evidenciando o pouco conhecimento sobre essa doença (OEHLER *et al.*, 2014; CAMPOS *et al.*, 2015; MUSSO *et al.*, 2015; ZANLUCA *et al.*, 2015).

Em fevereiro de 2015, foram relatados casos de circulação do vírus Zika na Bahia (CAMPOS *et al.*, 2015) e em São Paulo, sendo confirmada pelo uso de métodos moleculares e, posteriormente, o surgimento de casos no em vários outros estados (ZANLUCA *et al.*, 2015). Os casos de zika apresentaram aumento de 47,1%, em 2019, quando foram registrados 9.813 casos, enquanto em 2018 foram 6.669 o que representa uma taxa de incidência de 4,7 casos/100 mil habitantes. Entre os estados com casos, destacam-se Tocantins, Rio Grande do Norte, Alagoas e Espírito Santo. Neste ano, foram confirmados 2 óbitos por zika (OMS, 2019).

Existem pelo menos três razões para que o vírus da Zika seja tratado de forma única: 1) o total de pessoas afetadas e velocidade de disseminação do vírus; 2) gravidade das manifestações possivelmente associadas ao vírus, como a microcefalia nos filhos de mães acometidas durante a gravidez e o desenvolvimento de sequelas neurológicas em alguns casos de pessoas que foram infectadas; e 3) epidemia de (des)informação disseminada tão ou mais rapidamente que a própria situação de Saúde Pública (VALLE *et al.*, 2016).

O vírus da Zika é o único exemplo da família Flaviviridae, até o momento, que é teratogênico, provocando microcefalia, atrofia macular e lesões craniofaciais e músculo-esqueléticas, além de restrição ao crescimento intra-uterino e perdas fetais, indicando que ele possa ser transmitido da mãe para o feto durante a gravidez (BRASIL *et al.*, 2016; PETERSEN *et al.*, 2016). Foi identificado no líquido amniótico das mães cujos fetos apresentaram anormalidades cerebrais detectadas por ultrassonografia, sendo identificados antígenos e RNA virais no tecido cerebral e placentas de crianças que nasceram com microcefalia e morreram logo após o nascimento, bem como nos tecidos de abortos espontâneos (PETERSEN *et al.*, 2016; CALVET *et al.*, 2016; OLIVEIRA MELO *et al.*, 2016; JOUANNIC *et al.*, 2016). Esse vírus também é capaz de infectar células-tronco neurais adultas e podem ser esperados efeitos a longo prazo sobre a plasticidade neural, aprendizado e memória (LI *et al.*, 2016).

O tempo do período de incubação extrínseco, ou seja, tempo necessário para que uma fêmea adulta de *A. aegypti* se torne capaz de transmitir o vírus Zika, é de 7 a 10 dias (BOORMAN & PORTERFIELD, 1956). Porém, a transmissão do ZIKV também pode ocorrer por vias alternativas incomuns para os flavivírus. Existem relatos de suspeitas de transmissão sexual desde 2008 (FOY *et al.*, 2011), sendo reforçada em 2013, quando foram detectadas partículas virais ativas no sêmen de um homem no Tahiti (MUSSO *et al.*, 2015). Mais recentemente foram detectadas partículas virais ativas, em quantidade elevada, na urina

e na saliva de pacientes com sintomas de fase aguda de infecção pelo vírus da Zika, no Rio de Janeiro (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2016).

Em pacientes do Rio Grande do Norte e da Bahia foram relatados a possibilidade dessa e de outras arboviroses na triagem de doadores de sangue. O aumento de casos de comprometimento do sistema nervoso central, em pacientes com doença pelo vírus Zika, leva a necessidade de aprimorar a vigilância de síndromes neurológicas em doentes febris agudos (VASCONCELOS, 2015). vírus Zika ser transmitido por sangue e hemoderivados, uma condição que sugere a inclusão

Muitos esforços têm sido realizados, nas últimas décadas, para a descoberta de terapias para infecções por flavivírus. Devido à semelhança entre o Zika e a dengue, o conhecimento derivado da descoberta de drogas para tratar a dengue poderia ser aplicado no tratamento de infecções por Zika. Porém, Weaver et al. (2016) recomendam não criar falso alarde sobre a possibilidade de encontrar inibidores ativos tanto contra o vírus Zika como contra o vírus da dengue, pois a biologia dos dois vírus pode ser muito diferente. Enquanto as vacinas e a terapêutica permaneçam indisponíveis, as melhores perspectivas para o controle do vírus Zika está relacionada à redução do contato entre o vetor e os seres humanos.

2.1.2.4 Febre amarela

A febre amarela é causada por um flavivírus da família Flaviridae, tendo a sua origem provável na África, tendo a sua disseminação no continente americano durante o comércio de escravos, no início do século XVI (BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007). É uma doença febril, aguda, não contagiosa, transmitida por mosquitos infectados e de gravidade variável (VASCONCELOS, 2003).

Ocorreram muitas epidemias de febre amarela em cidades da América do Norte e do Sul até o início do século XX, todas associadas ao *A. aegypti*. Houve uma intensa campanha de erradicação do mosquito neste período, com o amplo uso de diclorodifeniltricloroetano, o que fez com que a doença desaparecesse dos centros urbanos (KYLE & HARRIS, 2008). Com a descontinuidade das medidas de controle, o mosquito reemergiu em vários países americanos resultando no reaparecimento da febre amarela, culminando na re-emergência dos casos de dengue nesse mesmo período na América do Sul. A expansão epidêmica do vírus na Ásia e nas Américas, e a reemergência dos mosquitos em centros urbanos podem aumentar as

chances do estabelecimento de um ciclo endêmico permanente (MUTEBI *et al.*, 2004; WEAVER & REISEN, 2010).

O método mais eficaz para se prevenir a febre amarela é a vacinação. A OMS recomenda que sejam vacinadas todas as pessoas híginas com mais de 6 meses de idade que residem nas áreas de risco ou que se dirijam a elas. Uma única dose da vacina protege o indivíduo por pelo menos 10 anos, quando então é recomendada a aplicação de nova vacinação.

A febre amarela clássica é caracterizada por febre inespecífica e sintomas semelhantes aos da gripe; remissão transitória; sepse grave, disfunção hepática com icterícia, disfunção renal, hemorragia e miocardite que se desenvolve de 3 a 6 dias após o início, quando a viremia diminui e a resposta imune humoral surge (MEULEN *et al.*, 2004, ROBERTSON *et al.*, 1996). Por consequência de distúrbios metabólicos há consciência alterada, em vez de disseminação da infecção para o sistema nervoso central. As taxas de letalidade nesta fase variam de 20% a 50% (JENTES *et al.*, 2010). Os pacientes relatam fadiga persistente por semanas. Os hepatócitos são o principal local de replicação viral e a infecção viral responde diretamente pela disfunção hepática, renal e do miocárdio. Sendo a insuficiência renal agravada pelas alterações hemodinâmicas e síndrome hepato-renal. A síndrome hemorrágica é multifatorial e é secundária a trombopenia, síntese hepática alterada de fatores de coagulação e coagulação intravascular disseminada (ROBERTSON *et al.*, 1996; MEULEN *et al.*, 2004).

2.1.3. Intestino de *Aedes aegypti*

O trato digestivo de insetos se divide em três regiões: anterior (estomodeu), mediana (intestino médio) e posterior (proctodeu). A região anterior está relacionada com a ingestão e trituração do alimento. O intestino médio produz e secreta enzimas digestivas e absorve produtos da digestão, enquanto a região posterior absorve água, sais e outras moléculas importantes, bem como recebe o material remanescente da digestão e a urina (produzida pelos túbulos de Malpighi) a serem excretados (GULLAN & CRANSTON, 2007).

A morfologia do intestino médio varia com o estágio de desenvolvimento do *A. aegypti*. No estágio larval, corresponde a um tubo com sua região posterior ligeiramente mais larga que a anterior, mas no estágio adulto, a região anterior é mais fina e a posterior tem a forma de um saco expansível, que acomoda o sangue após a alimentação. O intestino médio

larval e adulto é composto por uma única camada epitelial multifuncional revestida externamente por fibras musculares (PROCÓPIO, 2014)

Geralmente, o epitélio do intestino médio é separado do alimento pela matriz peritrófica, a qual consiste em uma rede de fibrilas de quitina disposta em uma matriz glicoproteica. A matriz peritrófica permite a passagem de moléculas pequenas, porém restringe o acesso direto de moléculas grandes às células do intestino médio, além de proteger insetos herbívoros do efeito abrasivo de partículas alimentares e de compostos antinutricionais, tais como os taninos (GULLAN & CRANSTON, 2007).

Um dos larvicidas recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é o Bti. As larvas ingerem os cristais de Bti, que são dissolvidos no intestino alcalino do inseto. As proteases digestivas clivam as pró-toxinas presentes nos cristais e ativam seu componente inseticida. Os peptídeos tóxicos resultantes agem sobre o epitélio intestinal das formas imaturas do vetor, promovendo a diminuição do peristaltismo e, conseqüentemente, a interrupção da alimentação, causando a morte da larva (GILL *et al.*, 1995; FREDERICI, 1995).

Muitos inseticidas, como as lectinas, agem também no intestino médio das larvas do mosquito, e alguns são capazes de interferir no desenvolvimento, mesmo em concentrações subletais (PAIVA *et al.*, 2013). As lectinas com atividade inseticida podem apresentar múltiplos alvos no intestino dos insetos, incluindo a matrix peritrófica, borda em escova e células secretoras de camada, enzimas digestivas, proteínas de transporte e simbiontes microbianos (NAPOLEÃO *et al.*, 2019).

O epitélio do intestino médio de *A. aegypti* consiste em diversos tipos celulares, entre eles células digestivas e células-tronco (também conhecidas como regenerativas). As células digestivas possuem microvilosidades, produzem enzimas e absorvem os produtos de digestão. As células-tronco, que são pequenas e indiferenciadas, estão presentes isoladas, em pares ou em pequenos grupos entre as células digestivas (BROWN *et al.*, 1985; HECKER *et al.*, 1977). Durante a metamorfose, o epitélio do intestino médio de *A. aegypti* é reconstruído através da diferenciação e proliferação dessas células-tronco (NISHIURA *et al.*, 2003; RAY *et al.*, 2007). Sendo assim, moléculas inseticidas que interfiram no desenvolvimento normal do intestino médio de insetos podem afetar negativamente a absorção e armazenamento de nutrientes, bem como prejudicar a metamorfose e a fertilidade adulta, até mesmo em concentração sub-letal (PAIVA *et al.*, 2013).

2.2. *Moringa oleifera* Lam.

O gênero *Moringa* compreende cerca de 13 espécies sendo 11 originárias da África e Arábia e 2 nativas da Índia (NASIR & ALI, 1972; AMAGLO *et al.*, 2010; MINAIYAN *et al.*, 2014). *Moringa oleifera* (Figura 3), pertencente à família Moringaceae, é uma planta nativa da Índia, Paquistão e Afeganistão e amplamente cultivada nos trópicos de todo o mundo (AMAGLO *et al.*, 2010). Esta espécie é amplamente distribuída na Ásia, África e América Latina graças a sua grande capacidade resiliente e longevidade (ZHAO & ZHANG, 2013; TAO-BIN HE, 2018).

No Brasil, foi introduzida para arborização de ruas e praças e é popularmente conhecida pelo nome de lírio branco, quiabo-de-quina ou simplesmente moringa. É uma árvore de crescimento rápido, tolerante a solos pobres, podendo alcançar 4 m de altura, gerando flores e frutos em um ano; múltiplas colheitas de sementes são possíveis em muitas partes do mundo (McCONNACHIE *et al.*, 1999; PRABHU *et al.*, 2011; RANGEL, 2011). Suas folhas, flores e sementes são utilizadas na alimentação humana e como forrageira na alimentação de animais (SANTOS *et al.*, 2015).

Figura 3. Árvore de *Moringa oleifera*.



Foto: A autora

O cultivo da moringa é proveitoso principalmente em regiões secas, devido ao fato das suas folhas poderem ser colhidas quando nenhum outro vegetal fresco está disponível. A excelente capacidade de se adaptar a solos pobres e climas áridos torna a moringa uma alternativa ao consumo de sementes leguminosas como fonte de proteínas de alta qualidade, de óleo e de compostos antioxidantes (FERREIRA *et al.*, 2008). As folhas da moringa contêm alto valor proteico (27% de proteína) e são ricas em vitaminas A e C, além de cálcio, ferro e fósforo (RANGEL, 2011).

No nordeste brasileiro é cultivada como planta ornamental e medicinal (MATOS, 1998). Todas as partes da planta são amplamente utilizadas na medicina popular por serem ricas em vitaminas, minerais e antioxidantes, conferindo a esta planta diferentes potenciais farmacológicos e biotecnológicos (BRILHANTE *et al.*, 2017; ANWAR *et al.*, 2007). O óleo das sementes, por ser altamente resistente à oxidação, possui várias utilizações industriais, tais como na produção de cosméticos, lubrificantes de máquinas, e combustível para lâmpadas, sendo também muito utilizado na indústria de perfumaria, devido a sua alta capacidade de retenção de odor (FERREIRA *et al.*, 2008).

As sementes de *M. oleifera* são utilizadas na purificação da água, principalmente em áreas rurais onde recursos hídricos adequados não estão disponíveis. As sementes contêm proteínas coagulantes que podem ser facilmente extraídas em água e promovem a precipitação de partículas em suspensão, levando à diminuição na turbidez da água (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995; GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005; BHUPTAWAT *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2011). No tratamento de águas residuais, estudo combinando o extrato de moringa a 100 mg/L com coagulante químico (alúmen) a 10 mg/L demonstrou elevada remoção global (64%) na demanda química de oxigênio, DQO (BHUPTAWAT *et al.*, 2007). Sementes de moringa foram também capazes de adsorver e remover Ag em soluções aquosas, apresentando-se vantajosas pelo baixo custo e elevado poder de adsorção (ARAÚJO *et al.*, 2010).

Extrato aquoso de sementes de moringa apresentou atividade ovicida contra *A. aegypti* (SANTOS *et al.*, 2012). Extrato metanólico das sementes promoveu mortalidade de larvas e pupas de *Anopheles stephensi* (PRABHU *et al.*, 2010). Outros tecidos da moringa também constituem potenciais fontes de inseticidas, como o extrato da casca que apresentou ação larvicida e adulticida contra os mosquitos *Culex gelidus* e *Culex quinquefasciatus* (KAMARAJ & RAHUMAN, 2010). O extrato aquoso de flores de moringa, contendo

inibidor de protease, induziu a mortalidade de larvas de *A. aegypti* no segundo (L2), terceiro (L3) e quarto (L4) estágios (PONTUAL *et al.*, 2012).

Quatro lectinas foram isoladas a partir das sementes de *M. oleifera*, denominadas WSMoL (*water-soluble M. oleifera lectin*), cMoL (*coagulant M. oleifera lectin*), MoL (*M. oleifera lectin*) e MOSL (*Moringa oleifera seed lectin*), as quais diferem quanto a características estruturais e físico-químicas, bem como propriedades biológicas (KATRE *et al.*, 2008; COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009; ASADUZZAMAN *et al.*, 2018).

2.3. Lectinas

As lectinas constituem um grupo de proteínas presentes nos diversos organismos vivos, tendo como característica a capacidade de ligação a carboidratos livres e/ou gliconjugados, incluindo glicoproteínas ou glicolipídeos presentes nas superfícies celulares (NAPOLEÃO *et al.*, 2015). As lectinas se associam a carboidratos de forma reversível, com alta afinidade e especificidade sem, contudo, promoverem nenhuma alteração na estrutura covalente dos mesmos (ABREU, 2010).

Dentre os grupos de lectinas estudadas, as lectinas vegetais estão entre as mais bem caracterizadas, atuando na proteção contra patógenos e insetos, no transporte e armazenamento de carboidratos e no reconhecimento celular (dentro da célula, entre células ou entre organismos), bem como proteínas de reserva ou reguladoras de crescimento (TEIXEIRA, 2012). As lectinas são encontradas em diferentes partes das plantas, podendo ser isoladas de sementes (OLIVEIRA *et al.*, 2011), folhas (NAPOLEÃO *et al.*, 2011), cascas (SÁ *et al.*, 2009) e raízes (SOUZA *et al.*, 2011).

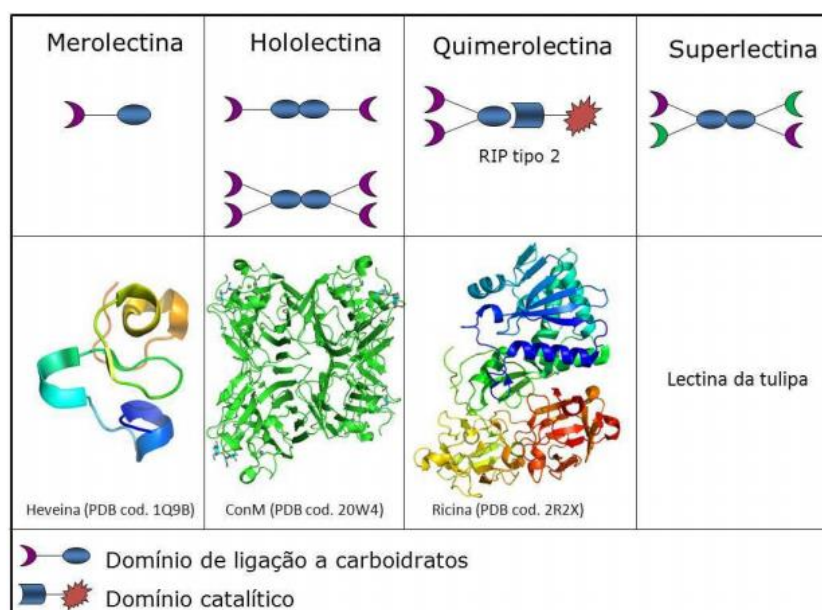
O termo “lectina” é derivado do latim e remete às palavras “escolher” e “selecionar” devido ao fato da interação lectina-carboidrato ser específica. Lectinas de diferentes fontes podem apresentar sequências primárias e estruturas tridimensionais similares ou totalmente distintas. A função ligadora de carboidratos é exercida por uma região denominada “sítio de ligação a carboidrato” ou “domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC)” (SHARON & LIS, 2004).

Peumans e Van Damme (1995) classificam as lectinas em: merolectinas, que possuem apenas um DRC, o qual se liga a açúcares simples, e não apresentam atividade aglutinante e catalítica; hololectinas (a maioria), que possuem dois DRCs com elevada homologia e são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados; e quimerolectinas, possuindo ao

menos um DRC, e outro domínio com atividade biológica distinta, como por exemplo, ação enzimática. Dependendo do número dos sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou como hololectinas. Por fim, as superlectinas são aquelas lectinas que se ligam pelo menos a dois tipos de carboidratos estruturalmente diferentes (Figura 4).

Figura 4. Classificação estrutural de lectinas (Fonte: TEIXEIRA, 2012)

Esquema representando as merolectinas (Heveína;PDB: 1Q9B), hololectinas (ConM; PDB: 2OW4), quimerolectinas (Ricina; PDB: 2R2X) e superlectinas, estas últimas sem representantes com estrutura tridimensional elucidadas.

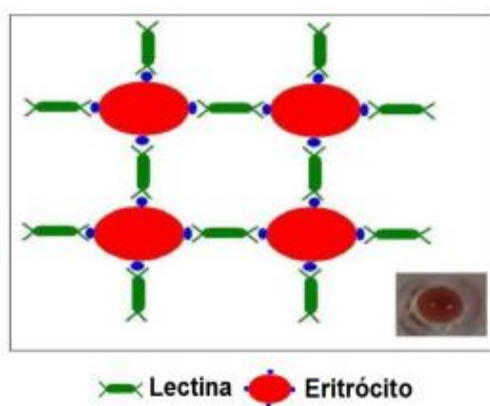


As lectinas podem ser detectadas numa amostra através de um ensaio de hemaglutinação (Figura 5). Esse ensaio é realizado em placa de microtitulação, na qual é realizada uma diluição seriada da amostra em solução salina e, em seguida, são adicionados os eritrócitos. A atividade hemaglutinante é evidenciada pela formação de uma rede de aglutinação. Para assegurar a natureza lectínica da hemaglutinação, realiza-se o teste de inibição com carboidratos ou glicoconjugados (PAIVA *et al.*, 2013).

Essas proteínas têm apresentado atividade inseticida contra insetos de diversas ordens. Quando ingeridas por insetos, as lectinas das plantas são capazes de interferir na alimentação, desenvolvimento e sobrevivência (CAMAROTI *et al.*, 2017). A toxicidade das lectinas tem sido atribuída à sua ligação a estruturas presentes no intestino do inseto, como os glicoconjugados na superfície das células epiteliais e a quitina encontrada na matriz peritrófica, afetando a absorção de nutrientes, vias de sinalização e processos de transporte

(PAIVA *et al.*, 2013). Essas lectinas geralmente apresentam resistência a proteases digestivas (SANTOS *et al.*, 2014; PAIVA *et al.*, 2011; MOURA *et al.*, 2017) e podem causar a morte de microrganismos simbiossantes presentes no trato digestivo dos insetos (NAPOLÃO *et al.*, 2011). As lectinas também podem se ligar às enzimas digestivas e promover desorganização do intestino médio, alterações morfológicas em microvilosidades, alterações na expressão de genes associados a proteínas do citoesqueleto, metabolismo da quitina, enzimas digestivas, desintoxicação, reações metabólicas e metabolismo energético (VANDENBORE *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2017, 2018).

Figura 5. Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos por lectina e aspecto da rede de aglutinação em placa de microtitulação



(Fonte: Paiva *et al.*, 2011)

As lectinas de cerne (MuHL), entrecasca (MuBL) e folhas (MuLL) de *Myracrodruon urundeuva* foram letais contra larvas de *A. aegypti*, com valores de CL₅₀ (concentração necessária para matar 50% das larvas em 24 h) de 0,04, 0,125 e 0,202 mg/mL, respectivamente. A mortalidade das larvas promovida por MuLL está provavelmente ligada à resistência à degradação proteolítica, inibição da atividade de tripsina e estimulação da atividade de amilase (NAPOLÃO *et al.*, 2012). MuBL e MuHL também apresentaram atividade ovicida contra *A. aegypti*, com valores de CE₅₀ (concentração necessária para reduzir a eclosão em 50% após 72 h) de 0,26 e 0,8 mg/mL, respectivamente; estudo por microscopia revelaram que essas lectinas são capazes de formar agregados que recobrem toda a superfície dos ovos, bem como podem penetrar no ovo atingindo o intestino do embrião em formação (ALVES *et al.*, 2020).

2.3.1. Lectina solúvel em água de sementes de *M. oleifera* (WSMoL)

WSMoL (do inglês *water-soluble Moringa oleifera* lectin) é uma proteína ácida (pI 5,5), extraída facilmente em água destilada e ligadora de quitina (COELHO *et al.*, 2009; MOURA *et al.*, 2016). Ferreira *et al.* (2011) demonstraram que WSMoL é uma das proteínas das sementes de moringa com atividade coagulante, reduzindo tanto a turbidez quanto o número de colônias bacterianas presentes na água. WSMoL não apresentou efeito mutagênico nem genotóxico nas concentrações de 0,0125 a 0,8 µg/µL, indicando a segurança na utilização desta lectina, desse ponto de vista, para o tratamento de água para consumo humano (ROLIM *et al.*, 2011).

Além disso, segundo Freitas *et al.* (2016) a WSMoL é eficaz na diminuição da turbidez de águas poluídas. Ensaio combinando WSMoL e sulfato de alumínio foram mais eficientes do que aqueles que usaram esses agentes separadamente. A maior redução na turbidez (96,8%) foi obtida com o tratamento com sulfato de alumínio seguido de WSMoL, comparado quando foram aplicados simultaneamente (91,3%). Ainda, WSMoL reduziu a concentração de alumínio residual na água para 0,3 mg/L, muito mais baixa do que a registrada após o tratamento com apenas o sal (35,5 mg/L). A ecotoxicidade da água poluída analisada também foi fortemente reduzida após os tratamentos.

A WSMoL também tem efeito bactericida contra *Bacillus* sp., *Bacillus pumillus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens* e *Serratia marcescens* e através da microscopia de fluorescência foi demonstrado que WSMoL causou perda de integridade celular de *S. marcescens* (MOURA *et al.*, 2015). Moura *et al.* (2017) evidenciaram a atividade antibiofilme de WSMoL contra *S. marcescens* e *Bacillus* sp., inclusive quando aderida a uma superfície de vidro.

WSMoL é um agente inseticida contra *Anagasta kuehniella*, causando prejuízos no metabolismo e desenvolvimento das larvas desse inseto (OLIVEIRA *et al.*, 2017). WSMoL também apresentou atividade inseticida contra o quarto estágio larval (L4) de *A. aegypti* (CL₅₀ = 0,197 mg/mL), sendo observado o rompimento do epitélio intestinal; a lectina também pode modular a atividade das enzimas digestivas larvares, estimulando a atividade de proteases (COELHO *et al.*, 2009; AGRA-NETO *et al.*, 2014). Além disso, a lectina foi também capaz de reduzir a eclosão de ovos de *A. aegypti* (CE₅₀: 0,1 mg/mL), interferindo tanto no desenvolvimento embrionário quanto na sobrevivência da larva ainda dentro do ovo

(SANTOS, *et al.*, 2012) Alves et al. (2020) demonstraram que a atividade ovicida de WSMoL está relacionada com danos na casca dos ovos, iniciando com rompimento da rede exocoriônica e destacamento das células exocoriônicas e culminando com extensiva deformação e degeneração da superfície. WSMoL também apresentou efeito estimulante sobre a oviposição de *A. aegypti* em condições de laboratório e de campo simulado. Os estudos demonstraram que WSMoL atua como uma pista química para a oviposição, provavelmente devido à interação com receptores e sensores de contato (gustatórios) e não através de estímulos olfativos (SANTOS *et al.*, 2012, 2014). Dessa forma, WSMoL é uma potencial candidata para uso no controle de populações de *A. aegypti*, para uso em armadilhas de captura de ovos, as ovitrampas, uma vez que interfere na sobrevivência tanto dos ovos quanto das larvas que vierem a eclodir. Oliveira et al. (2016), conseguiram adicionar valor biotecnológico a torta residual e sementes *Moringa oleifera* (resíduo resultante da extração do óleo) como fonte de lectina com atividade inseticida contra *Aedes aegypti*.

Receptores quimiossensoriais de natureza olfatória e/ou gustatória têm sido descritos em *A. aegypti*, sendo detectados em tecidos de adultos e durante outros estágios de desenvolvimento. São expressos em sensores presentes em antenas, palpos maxilares, probóscide e patas, participando tanto na sensibilidade química quanto mecânica (MELO *et al.*, 2004; MATTHEWS *et al.*, 2016). Foi demonstrado que o efeito repelente do DEET (N, N-diethyl-meta-toluamida) é mediado por segmentos tarsais das patas de *A. aegypti*, e não por neurônios gustatórios presentes na probóscide (DENNIS et al., 2019). Sendo assim, é possível que o efeito estimulante de oviposição de WSMoL envolva a interação com receptores gustatórios presentes nas patas das fêmeas de *A. aegypti*.

Devido ao potencial ovicida e larvicida de WSMoL, estudos toxicológicos foram realizados utilizando organismos não-alvo, como o peixe paulistinha (*Danio rerio*). Silva *et al.* (2017) constataram que a WSMoL também tem efeito tóxico contra *D. rerio*, sendo os valores de CL₅₀ para os embriões de 0,190, 0,133 e 0,049 mg/mL após 48, 72 e 96 horas, respectivamente, e para larvas foi de 0,21 e 0,135 mg/mL, após 24 e 96 h, respectivamente. Esses dados indicam cautela em relação à dosagem e requer maior atenção com relação ao local onde essa lectina será aplicada.

2.4. Formulações

Inúmeras formulações de inseticidas foram desenvolvidas e testadas contra um amplo espectro de vetores de mosquitos, sendo a principal as formulações de liberação lenta contra larvas de mosquitos por ter maior atividade residual por maior estabilidade e contato maximizado com as larvas de mosquitos-alvo (MULLA *et al.*, 1988; CORNEL *et al.*, 2000; BOND *et al.*, 2004; OMS, 2005; SENG *et al.*, 2008; JACUPS *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de uma formulação larvicida deve considerar que a mesma seja fácil de ser produzida e administrada, possa ser convenientemente armazenada e apresente viabilidade econômica (BULLA JR *et al.*, 1975; MEDEIROS *et al.*, 2005). De acordo com Couch (2000), o processo de formulação é utilizado para converter uma pasta técnica ou pó contendo o ingrediente ativo em uma forma compatível com sistemas de aplicação existentes. Além disso, deve assegurar a estabilidade biológica do ingrediente ativo e deve ter uma vida de prateleira adequada. As duas formas principais de administração são as formulações líquidas (emulsões, suspensões aquosas) e as formulações sólidas (pó, pó molhável, grânulos, grânulos dispersíveis em água, briquetes, tabletes e comprimidos solúveis).

O uso concomitante de formulações é estimulado, devido aos inúmeros mecanismos de ação, que interferem no desenvolvimento de resistências pelos insetos. Estudos demonstraram que o uso de Bactimos (formulação em pellets de Bti a 10%) e Altosid (formulações em briquets de metopreno a 2,1%) em conjunto aumentaram o controle efetivo de *A. aegypti* quando comparado com seus efeitos isolados por exemplo (ALKENANI *et al.*, 2015; ALKENANI, 2017). Também foi observado que o uso do bactericida Spinosad, que apresenta rápida ação contra o estágio larval, juntamente com o regulador de crescimento de insetos Dudim, leva a uma ação sinérgica (DARRIET *et al.* 2010). Lee *et al.* (2005) demonstraram que a adição de piriproxifeno às formulações de Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*) melhorou o controle larval e impediu o surgimento de adultos. Essa ação sinérgica reduz substancialmente o custo e a toxicidade como resultado de uma redução nas quantidades de inseticida.

Processos de obtenção de larvicidas naturais ativos contra mosquitos têm sido descritos e patenteados como, por exemplo, para obtenção de gordura de amêndoas do caroço da manga, *Mangifera indica* ou *Mangifera* sp. (BRPI0906565A2), do líquido manipueira" obtido de *Manihot esculenta* durante a fabricação da farinha de mandioca (BRPI0505112A) e do hidrolato larvicida da espécie vegetal *Lippia sidoides* (BR9902911A). Outras invenções

descrevem a produção de formulações contendo larvicidas naturais contra *A. aegypti*, muitas compostas por óleos essenciais, por exemplo: microemulsão contendo óleo essencial de *Citrus sinensis* (BR102016012240A2), formulação também à base do óleo essencial de *Citrus sinensis*, consistindo em um sistema polimérico microparticulado óleo essencial/ciclodextrina (BRPI1106415A2) e produto larvicida em pó, a base de ricinoleato de sódio, composto derivado do ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-9-cis- octadecenoico) obtido do óleo essencial de *Ricinus communis* (BR102017003140A2).

Formulações sólidas com ação larvicida, geralmente na forma de pós ou grânulos (BR1020170031403), podem ser aplicadas diretamente na água ou serem incluídas em sachês, como sugerido para o larvicida sólido composto de sal de cozinha, pimenta-do-reino preta, vinagre de álcool e água, que se mostrou eficaz por até 12 meses (BR1020160126010 - WO2017205952A1). Porém, em nossa busca, não encontramos formulações baseadas em proteínas vegetais com elevada solubilidade em água, como seria o caso dos comprimidos a base de sementes de moringa.

3. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho são apresentados na forma de artigos.

3.1 – Artigo 1: Exposure of mosquito (*Aedes aegypti*) larvae to the water extract and lectin-rich fraction of *Moringa oleifera* seeds impairs their development and future fecundity

Esse artigo foi publicado no periódico *Ecotoxicology and Environmental Safety*, no volume 183, referência 190853, em 2019.

3.2. Artigo 2 - Investigação de proteínas de membrana extraídas de patas de *Aedes aegypti* como ligantes da lectina estimulante de oviposição isolada das sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL)

Livia Lais de Santana Silva^{a,1}, Nataly Diniz de Lima Santos^{a,1}, Stella Cristina Cabral Silva^a, Thâmarah de Albuquerque Lima^a, Russolina Benedeta Zingali^b, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^c, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

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

^b*Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.*

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

¹Esses autores contribuíram igualmente para o estudo.

*Autor para correspondência. E-mail: ppaivaufpe@yahoo.com.br

Resumo

Aedes aegypti é um mosquito de grande importância nas regiões tropicais e subtropicais, uma vez que é o vetor de doenças como dengue, Chikungunya e febre do vírus Zika. A lectina solúvel em água isolada das sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) apresentou atividades larvicida, ovicida e estimulante de oviposição sobre *A. aegypti*. Esse estudo teve como objetivo investigar proteínas de membrana das patas de *A. aegypti* como possíveis ligantes de WSMoL. Inicialmente, foram preparados extratos das patas utilizando diferentes detergentes (desoxicolato de sódio, digitonina, sulfato sódico de dodecila, Triton X-100 e Tween 20). Maior concentração de proteínas foi detectada no extrato obtido utilizando Tween 20, seguido extrato preparado com Triton X-100. No presente trabalho, o extrato em Triton X-100 foi aplicado em coluna contendo a matriz WSMoL-Sepharose e as proteínas adsorvidas foram eluídas com ácido acético 0,1 M e avaliadas quanto ao perfil em cromatografia de gel filtração

e em eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). A similaridade das proteínas adsorvidas com sequências depositadas em bancos de dados foi investigada. A matriz foi capaz de reter proteínas presentes no extrato, obtendo-se um único pico proteico, o qual apresentou-se como um pico com massa molecular de aproximadamente 20 kDa na cromatografia de gel filtração e como duas bandas polipeptídicas (17,0 e 23,7 kDa) em SDS-PAGE. Análise por MS/MS indicou similaridade com transportadores ABC, que são amplamente distribuídos nos organismos, inclusive em insetos, e têm sido relacionados com o efluxo de inseticidas. Em conclusão, WSMoL é capaz de se ligar a proteínas de membrana presentes nas patas de fêmeas de *A. aegypti*, podendo exercer seu efeito estimulante de oviposição por meio dessas interações.

Introdução

Globalmente, milhões de pessoas estão expostas a variados tipos de arboviroses (doenças virais transmitidas por mosquitos), eventualmente ocorrendo surtos que variam em magnitude e duração (LIU *et al.*, 2020). Chikungunya, dengue e Zika vírus são arboviroses transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*. Dentre essas, a dengue é um dos maiores desafios da saúde pública, com aproximadamente 100 milhões de infecções sintomáticas e 10.000 mortes ocorrendo a cada ano em mais de 125 países (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017; MESSINA *et al.*, 2019). Vacina contra a dengue foi licenciada em 2015, estando disponível em 20 países; contudo, algumas limitações são descritas, como maior risco de desenvolvimento da forma grave e hospitalizações em pacientes soronegativos que recebam a vacina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019). Chikungunya é uma doença caracterizada por uma artralgia febril altamente incapacitante e nenhuma vacina licenciada ou tratamento específico está atualmente disponível (LEPARC-GOFFART *et al.*, 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). Já a doença do vírus Zika se destaca pelo risco aumentado de complicações neurológicas em adultos e crianças, incluindo síndrome de Guillain-Barré, neuropatia e mielite, também não havendo vacina disponível (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018).

No cenário descrito acima, o controle de populações do vetor é de extrema relevância para minimizar a incidência dessa doenças. Esse controle pode ser feito de diversas maneiras, inclusive por meio do uso de substâncias químicas com ação ovicida, larvicida, adulticida e/ou moduladora de oviposição (CAMAROTI *et al.*, 2017). Lectinas, proteínas que se ligam a

carboidratos de forma específica e reversível, têm sido descritas como agentes inseticidas contra *A. aegypti* capazes de causar morte das larvas e reduzir a eclosão dos ovos (COELHO *et al.*, 2009; SÁ *et al.*, 2009; NAPOLEÃO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2016; ALVES *et al.*, 2020).

Moringa oleifera (Moringaceae) é uma planta nativa da Índia e amplamente cultivada nos trópicos de todo o mundo, cujas sementes contêm agentes coagulantes que promovem a precipitação de partículas em suspensão, levando à diminuição na turbidez da água (VILLASENOR-BASULTO *et al.*, 2018; NAPOLEÃO *et al.*, 2019). As sementes de *M. oleifera* contêm uma lectina solúvel em água, denominada WSMoL, que possui propriedades coagulantes e é capaz de atuar na remoção de metais em meio aquoso (FREITAS *et al.*, 2016; MOURA *et al.*, 2016). Tendo em vista o fato de que populações vivendo em regiões de seca, em que também há elevado risco para arboviroses, estocam água por longos períodos e utilizarem as sementes de moringa para tratamento, foi investigado se a lectina WSMoL seria capaz de promover um benefício adicional impedindo o desenvolvimento de *A. aegypti* na água armazenada. Estudos demonstraram que WSMoL apresentou atividades larvicida e ovicida contra *A. aegypti*, sendo capaz de promover danos ao epitélio intestinal das larvas e degeneração da superfície coriônica dos ovos (COELHO *et al.*, 2009; ALVES *et al.*, 2020).

Interessantemente, WSMoL (0,1 mg/mL) apresentou efeito estimulante sobre a oviposição de fêmeas de *A. aegypti*, tanto em condições de laboratório quanto em campo simulado; adicionalmente, foi determinado que os ovos depositados em solução contendo WSMoL apresentavam capacidade de eclosão reduzida, de forma que a lectina, ao mesmo tempo que atua como uma pista química para deposição dos ovos, é capaz de inviabilizar a eclosão e a sobrevivência das larvas originadas (SANTOS *et al.*, 2012; 2014). Foi ainda demonstrado que WSMoL não atua através de estímulos olfativos e que as fêmeas depositam os ovos diretamente na água quanto esta contém a lectina, o que levou os autores a considerar uma provável interação com receptores e sensores de contato, que são conhecidos como receptores gustatórios (SANTOS *et al.*, 2014).

Receptores quimiossensoriais de natureza olfatória e/ou gustatória têm sido descritos em *A. aegypti*, sendo detectados em tecidos de adultos e durante outros estágios de desenvolvimento. São expressos em sensores presentes em antenas, palpos maxilares, probóscide e patas, participando tanto na sensibilidade química quanto mecânica (MELO *et al.*, 2004; MATTHEWS *et al.*, 2016). Foi demonstrado que o efeito repelente do DEET (N,

N-dietil-meta-toluamida) é mediado por segmentos tarsais das patas de *A. aegypti*, e não por neurônios gustatórios presentes na probóscide (DENNIS et al., 2019).

O presente trabalho teve como objetivo principal investigar a possibilidade de interação entre a lectina WSMoL e proteínas de membrana extraídas das patas de fêmeas de *A. aegypti*. Para tanto, inicialmente foram utilizados diferentes detergentes para determinar a estratégia mais eficiente para obtenção das proteínas a partir patas. Em seguida, a interação entre as proteínas extraídas e a lectina foi investigada por cromatografia de afinidade em coluna de WSMoL imobilizada.

Metodologia

Extração de proteínas de patas de fêmeas de *A. aegypti*

Colônias de *A. aegypti* (cepas Rockefeller) foram criadas e mantidas no Laboratório de Ecologia Química da Universidade Federal de Pernambuco a $27\pm0,5$ °C, $73\pm0,4\%$ de umidade relativa e fotoperíodo 12:12. Ovos de *A. aegypti* foram eclodidos em água destilada contendo ração para gato (Whiskas). Ao atingirem o estágio de pupa, os insetos foram colocados em gaiolas. Após a emergência dos adultos, as fêmeas foram coletadas, com base na diferenciação através das antenas. Amostras de 400 patas compreendidas entre os segmentos pro-, meso- e metatorácicos foram obtidas e imediatamente estocadas em gelo seco.

Procedimentos de extração de proteínas das patas foram realizados utilizando diferentes detergentes (ROBAJAC *et al.*, 2017). Inicialmente, as patas foram homogeneizadas manualmente por 5 min em sacarose 0,25 M. Após uma primeira centrifugação ($3,000 \times g$; 15 min) para remoção de restos das patas, os sobrenadantes foram coletados e centrifugados a $14,000 \times g$ por 45 min. O *pellet* resultante foi lavado com HEPES 0,05 M pH 7,4 em NaCl 0,15 M e, após nova centrifugação, teve sua massa determinada em balança analítica para ser posteriormente aliquoteado em porções de 10 mg/mL. A cada porção foi então adicionado um dos seguintes detergentes (1%, v/v, em tampão HEPES): desoxicolato de sódio, digitonina, sulfato sódico de dodecila (SDS), Triton X-100 ou Tween 20. Após 4 h sob agitação constante, as proteínas de membrana solubilizadas foram coletadas por centrifugação a $14,000 \times g$ por 90 min. A concentração de proteínas foi estimada utilizando o método do ácido bicinconínico (*Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination*, Sigma-Aldrich, EUA).

Purificação de WSMoL

Sementes de *M. oleifera* foram coletadas em Recife, Pernambuco, sendo um exemplar depositado no herbário do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA, Recife) sob o número 73.345. A coleta do material teve autorização (nº 38690) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). O acesso foi registrado no (A720498 and AC03B51) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

As sementes foram trituradas utilizando multiprocessador e a farinha (10 g) foi homogenizada por 16 h a 4°C em água destilada (100 mL) utilizando um agitador magnético. Em seguida, a suspensão foi filtrada e centrifugada ($3,000 \times g$; 15 min) para obtenção do extrato bruto. Proteínas presentes no extrato foram então precipitadas por tratamento com sulfato de amônio (saturação de 60%) durante 4 h (GREEN e HUGHES, 1955). Após centrifugação ($3,000 \times g$; 15 min), a fração de proteínas precipitadas foi dialisada contra NaCl 0,15 M e aplicada em coluna (7,5 x 1,5 cm) de quitina (Sigma-Aldrich, EUA) equilibrada com NaCl 0,15 M (fluxo 0,3 mL/min). A eluição de WSMoL foi realizada com ácido acético 1,0 M (COELHO et al., 2009). A estimativa da concentração de proteínas foi realizada de acordo com Lowry et al. (1951) utilizando curva-padrão de albumina sérica bovina (31,25–500 µg/mL).

Determinação da atividade hemaglutinante

A propriedade ligadora de carboidratos de WSMoL foi verificada através de ensaio de atividade hemaglutinante (AH) em placas de microtitulação. Aliquota de 50 µL da amostra foi serialmente diluída em NaCl 0,15 M e, em seguida, foram adicionados em cada poço 50 µL de suspensão (2,5% v/v) de eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído, coletados conforme aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE (processo 23076.033782/2015-70). Uma unidade de AH foi definida como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu total hemaglutinação. AH específica foi definida pela razão entre o título e a concentração de proteínas (mg/mL).

Imobilização de WSMoL em Sepharose CL-4B

Sepharose CL-4B ativada com brometo de cianogênio (1 g) foi lavada com HCl 1,0 mM, seguido de NaHCO₃ 0,1 M pH 8,3 contendo NaCl 0,15 M e HCl 1,0 mM. A reação de acoplamento foi realizada misturando-se WSMoL (30 mg) e a resina por 2 h a 24 °C. A lectina não-acoplada foi removida por filtração. O gel foi então incubado em etanolamina 1,0 M pH 8,0, durante 2 h a 24 °C para bloquear qualquer grupo ativo remanescente da Sepharose. Em seguida, a matriz WSMoL-Sepharose foi lavada com: (a) acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 contendo NaCl 0,5 M; (b) Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo NaCl 0,5 M; (c) acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 contendo NaCl 0,5 M; e (d) Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo NaCl 0,5 M. A quantidade de proteína imobilizada foi calculada pela diferença entre a quantidade de proteína inicial e a quantidade encontrada no filtrado. O suporte WSMoL-Sepharose foi mantido em Tris-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,5 M a 4 °C.

Cromatografia em coluna de WSMoL-Sepharose

A coluna contendo a matriz WSMoL-Sepharose (5 mL) foi equilibrada com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,6) contendo Triton X-100 0,1% (v/v). O extrato obtido utilizando Triton X-100 foi então aplicado (1,5 mL) e a coluna foi lavada com a solução de equilíbrio para remoção das proteínas não-adsorvidas. As proteínas adsorvidas foram eluídas com ácido acético 0,1 M. Frações de 1 mL foram coletadas e a eluição foi monitorada pela absorbância em 280 nm.

Análise das proteínas adsorvidas a WSMoL-Sepharose

A amostra eluída da matriz WSMoL-Sepharose foi submetida (2 mL; 1 mg de proteína) à cromatografia de gel filtração em uma coluna HiPrep 16/60 Sephacryl S-100HR acoplada ao sistema ÄKTAprime plus (GE Healthcare Life Sciences, Suécia). A cromatografia foi realizada usando NaCl a 0,15 M a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. As frações coletadas (3,0 mL) foram monitoradas quanto à absorbância a 280 nm. Uma mistura dos seguintes padrões de massa molecular também foi cromatografada nas mesmas condições: albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e lisozima (14 kDa).

A amostra também foi seca em concentrador a vácuo (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Alemanha) e submetida à eletroforese em gel (15%, p/v) de poliacrilamida (PAGE) em condições desnaturantes (presença de sulfato

sódico de dodecila, SDS), conforme descrito por Laemmli (1970). O gel foi fixado por 16 h em etanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), lavado por 30 min com solução fresca de fixação, e corado com Azul de Coomassie a 0,02% (p/v) em etanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) por 3 h. O gel foi descorado com ácido acético 10% (v/v).

As bandas polipeptídicas foram excisadas do gel e descoloridas por três etapas de lavagem (a cada 15 min) com 400 µL de uma solução 1: 1 (v/v) de de acetonitrila a 50% (p/v) bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0, sob agitação. Após o último passo de lavagem, o fragmento de gel foi coberto com acetonitrila a 100% e desidratado usando o concentrador de vácuo. Em seguida, 10 µL de ditioneitol 10 mM preparado em bicarbonato de amônio 100 mM foi adicionado e o material foi incubado por 1 h a 56 °C. Após a lavagem com bicarbonato de amônio 100 mM, 10 µL de iodoacetamida a 50 mM (em bicarbonato de amônio 100 mM) foram adicionados e o ensaio foi incubado a 28 °C no escuro. Iodoacetamida foi então removida e o material foi lavado com bicarbonato de amônio 100 mM e desidratado novamente com 100% de acetonitrila. Os polipeptídeos foram digeridos por 16 h a 37 °C com 5 µL de uma solução de tripsina a 20 mg/mL (grau de espectrometria de massa, Promega Corp., EUA), preparada em bicarbonato de amônio 50 mM. A solução foi então transferida para um tubo estéril em que foram adicionados 30 µL de ácido trifluoroacético a 1% (p/v) em acetonitrila a 30% (p/v) para extração dos peptídeos. O sobrenadante resultante foi removido, armazenado e o procedimento de extração foi repetido duas vezes. Todos os sobrenadantes foram então reunidos e secos em concentrador a vácuo. Os peptídeos foram analisados usando um espectrômetro ESI-QUAD-TOF (Waters, Milford, MA, EUA) e os espectros obtidos foram comparados com os presentes no banco de dados NCBIInr usando o mecanismo de busca *MS/MS Ion Search* do software MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

Análise estatística

Os dados foram analisados usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, a um nível de significância de 5%, utilizando o software GraphPad Prism versão 4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

Resultados e discussão

Resultados prévios indicaram que a atividade estimulante de oviposição de WSMoL sobre fêmeas de *A. aegypti* não está relacionada a estímulos olfatórios, sugerindo o envolvimento de sensores gustatórios (SANTOS *et al.*, 2014). Receptores gustatórios permitem que os mosquitos sejam capazes de detectar sinais químicos importantes para alimentação, oviposição e reconhecimento conspecífico (SPARK *et al.*, 2013). Nesse sentido, o presente trabalho avaliou uma possível interação entre WSMoL e proteínas de membrana extraídas das patas das fêmeas.

Embora as proteínas de membrana sejam constituintes celulares muito importantes, existem poucas informações sobre elas, devido a fatores como quantidade reduzida e a natureza singular do ambiente natural destas proteínas, o que demanda procedimentos específicos para sua extração e análise. Os detergentes são substâncias utilizadas para extrair e solubilizar proteínas de membranas em meio aquoso. A escolha do melhor detergente para extração é de grande importância, considerando os diferentes tipos celulares e a origem tecidual das proteínas de membrana (ROBAJAC *et al.*, 2017).

Cinco detergentes foram avaliados quanto à eficiência em extrair proteínas de membrana de patas de fêmeas e os resultados estão apresentados na Figura 1. Maior concentração de proteínas foi detectada no extrato obtido empregando-se Tween 20, seguido pelos extratos preparados com Triton X-100, digitonina, desoxicolato de sódio e SDS. Uma vez que Triton X-100 e Tween 20 foram responsáveis pelos melhores resultados, foram escolhidos para continuação do estudo. No presente artigo serão apresentados os resultados obtidos para o extrato preparado com Triton X-100.

WSMoL foi isolada, seguindo o procedimento previamente estabelecido por Coelho *et al.* (2009), e apresentou AH específica de 1.244. A detecção de capacidade aglutinante em confirma a funcionalidade dos sítios de ligação a carboidratos da lectina na amostra obtida. WSMoL foi eficientemente imobilizada em Sepharose e a matriz foi capaz de reter proteínas presentes no extrato preparado com Triton X-100. Um único pico proteico foi obtido após eluição com ácido acético 0,1 M, como pode-se observar na Figura 2A. Esse resultado confirma a capacidade da lectina de se ligar a proteínas presentes nas patas das fêmeas. As patas dos insetos são particularmente importantes por serem usadas para avaliar as fontes de alimentos. As fêmeas de *A. aegypti* possuem cerca de 100 pelos tarsais, os quais estão envolvidos na sensibilidade a soluções contendo sal e açúcar, sendo considerados estruturas gustatórias das patas do mosquito (SUPER, 1962).

Estudo realizado por Dennis et al. (2019) concluiu que a quimiorreflexão de contato com o DEET (um repelente de insetos) é mediada exclusivamente pelos segmentos tarsais das patas de *A. aegypti*, estabelecendo as patas como sensores de contato relevantes para o comportamento do mosquito. Sparks et al. (2013) descreveram a presença de proteínas em labelos e tarsos de *A. aegypti* ortólogas a receptores gustatórios de *Drosophila melanogaster* relacionadas com a detecção de CO₂, cafeína, DEET e frutose.

Visando obter maiores informações sobre a(s) proteína(s) de patas que se ligaram a WSMoL, o pico adsorvido foi então cromatografado em coluna de gel filtração, sendo detectado um único pico de massa molecular de aproximadamente 20 kDa (Figura 2B). Quanto ao perfil em SDS-PAGE, a amostra apresentou duas bandas polipeptídicas com massa molecular 17,0 e 23,7 kDa (Figura 2C, linha 1), as quais podem corresponder a duas proteínas diferentes que, devido à proximidade da massa molecular, não foram separadas em dois picos na cromatografia de gel filtração. A ausência de bandas correspondentes a WSMoL (Figura 2C, linha 2) assegura que a lectina não foi desligada do suporte durante o processo cromatográfico.

As bandas polipeptídicas foram excisadas do gel e submetidas à análise por espectrometria de massas. Nenhuma similaridade com sequências de proteínas no banco de dados foi detectada para a banda polipeptídica de 23,7 kDa. Já a banda polipeptídica de 17,0 kDa apresentou similaridade com sequências de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), conforme apresentado na Tabela 1. Os transportadores ABC constituem uma grande classe de proteínas transmembranas e são amplamente encontradas em diversos organismos, atuando no transporte de xenobióticos. Em insetos, esses transportadores têm sido descritos em várias espécies, porém o conhecimento sobre o papel e a função dessas proteínas ainda é limitado (WU et al., 2019). Os transportadores ABC têm sido principalmente relacionados com a resistência a inseticidas, tais como uma P-glicoproteína encontrada em *A. aegypti*, cujo silenciamento resultou em aumento da susceptibilidade de larvas ao temefós (FIGUEIRA-MANSUR et al., 2013).

Conclusão

A lectina estimulante de oviposição WSMoL é capaz de se ligar a proteínas de membrana presentes nas patas de fêmeas de *A. aegypti*, podendo exercer seu efeito estimulante por meio de interações com essas proteínas. Proteínas das patas capazes de se

ligar a WSMoL apresentaram similaridade com a sequência de transportadores do tipo ABC. Os resultados abrem uma janela para investigações mais detalhadas sobre a interação entre WSMoL e proteínas das patas de *A. aegypti*.

Referências

- ALVES, R.R.V. *et al.* Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Management Science**, v. 76, p. 730-736, 2020.
- CAMAROTI, J.R.S.L. *et al.* Phytoinsecticides for controlling pests and mosquito vectors of diseases. In: GREEN, V. (Org.). **Biocontrol Agents: Types, Applications and Research Insights**. 1ed.ew York: Nova Science Publishers, pp. 147-188, 2017.
- COELHO, J. S. *et al.*. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934-938, 2009.
- DENNIS, E.J. *et al.* *Aedes aegypti* mosquitoes use their legs to sense DEET on contact. **Current Biology**, v. 29, p. 1551–1556, 2019.
- FIGUEIRA-MANSUR, J. *et al.* Silencing of P-glycoprotein increases mortality in temephos-treated *Aedes aegypti* larvae. **Insect Molecular Biology**, v. 22, p. 648–658, 2013.
- FREITAS, J.H.E.S. *et al.* Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Lectin as a metal remover in aqueous solutions. **Protein and Peptide Letters**, v. 23, p. 645-646, 2016a.
- FREITAS, J.H.E.S. *et al.* Evaluation of using aluminum sulfate and water-soluble *Moringa oleifera* seed lectin to reduce turbidity and toxicity of polluted stream water. **Chemosphere**, v. 163, 133-141, 2016b.
- GREEN, A.A.; HUGHES, L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents. In: COLOWICK, S.; KAPLAN, N. (Eds.) **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, pp.67-90, 1955.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 22, p. 680–685, 1970.
- LEPARC-GOFFART, I. *et al.* Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, v. 383, p. 514, 2014.
- LIU , Y.; LILLEPOLD , K.; SEMENZA , J.C.; TOZAN , Y.; QUAM, M.B.M.; ROCKLÖV, J. Reviewing estimates of the basic reproduction number for dengue, Zika and chikungunya across global climate zones. **Environmental Research**, 182, 2020.

- LOWRY, O.H *et al.*. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p.265–275, 1951.
- MATTHEWS, Benjamin J., *et al.*. The neurotranscriptome of the *Aedes aegypti* mosquito. *BMC genomics*. 17.1: 32, 2016,.
- MELO, A. C. A., *et al.* Identification of a chemosensory receptor from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, that is highly conserved and expressed in olfactory and gustatory organs. *Chemical senses*, 29.5: 403-410, 2004.
- MESSINA, J.P. *et al.* The current and future global distribution and population at risk of dengue. **Nature Microbiology**, v. 4, p. 1508-1515, 2019.
- MOURA, K.S. *et al.* Coagulant activity of water-soluble *Moringa oleifera* lectin is linked to lowering of electrical resistance and inhibited by monosaccharides and magnesium ions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, p. 1361–1371, 2016.
- NAPOLEÃO, T.H. *et al.* Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, v. 110, p. 609-616, 2012.
- NAPOLEÃO, T.H. *et al.* *Moringa oleifera*: a powerful source of environmentally, medicinally and biotechnologically relevant compounds. In: TEODOR, R. (Ed.) **Advances in Applied Science and Technology**, vol. 5, West Bengal: Book Publisher International, 2019, pp. 58-77.
- OLIVEIRA, A.P.S. *et al.* Biotechnological value of *Moringa oleifera* seed cake as source of insecticidal lectin against *Aedes aegypti*. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 1683-1690, 2016.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Chikungunya**. Fact sheet 12 April 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue and severe dengue**. Fact sheet 4 November 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Zika virus**. Fact sheet 20 July 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
- ROBAJAC, D. *et al.* Screening for the best detergent for the isolation of placental membrane proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 431–437, 2017.

- SÁ, R.A. *et al.* Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 149, p. 300-306, 2009.
- SANTOS, N.D.L. *et al.*. Evaluation of the *Moringa oleifera* seed lectin in traps for capture of *Aedes aegypti* eggs and mosquitoes under semi-field conditions. **Parasitology Research**, v. 113, p. 1837-1842, 2014.
- SANTOS, N.D.L. *et al.*. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, v. 7, e0044840, 2012.
- SPARKS, J.T. *et al.* Gustatory receptor expression in the labella and tarsi of *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, p. 1161-1171, 2013.
- SUPER, E.H. sensory hairs with permeable tips on the tarsi of the yellow-fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 55, p. 531-525, 1962.
- VILLASEÑOR-BASULTO, D.L. Wastewater treatment using *Moringa oleifera* Lam seeds: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 23, p. 151-164, 2018.
- WU, C. *et al.* Insect ATP-binding cassette (ABC) transporters: roles in xenobiotic detoxification and Bt insecticidal activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, artigo 2829, 2019.

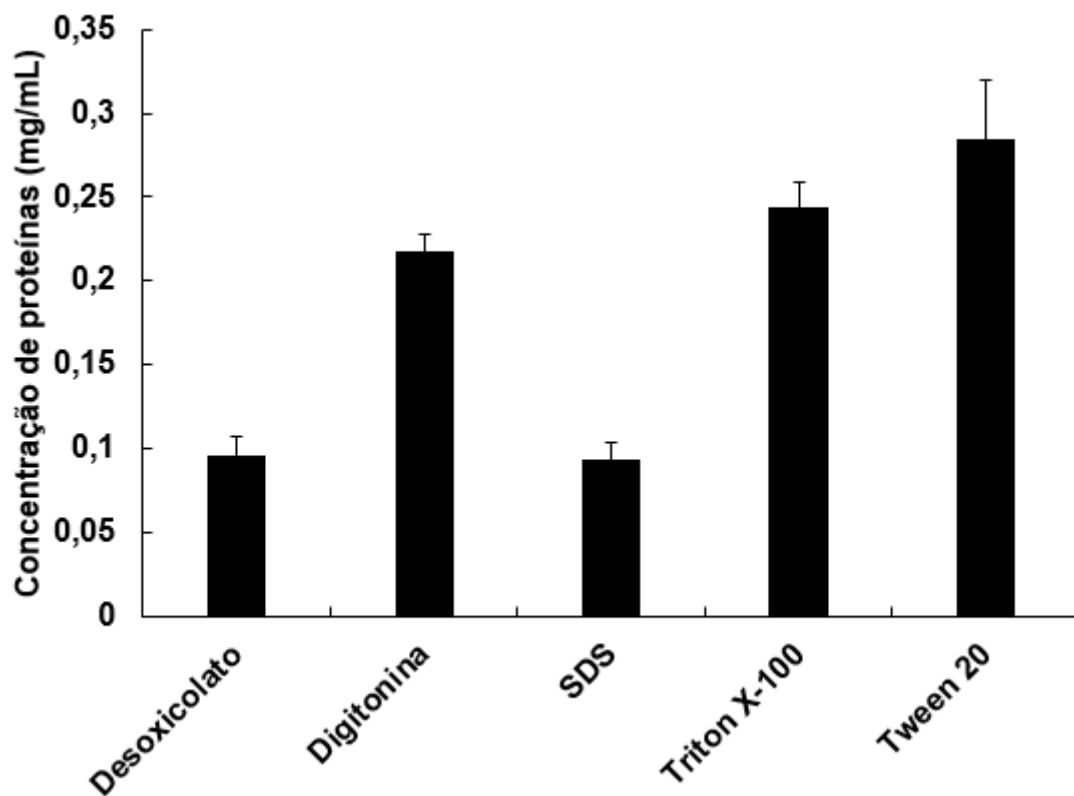


Figura 1. Concentração proteica em extratos de proteínas de membrana de patas de *Aedes aegypti* obtidos utilizando diferentes detergentes: desoxicolato de sódio, digitonina, sulfato sódico de dodecila (SDS), Triton X-100 e Tween 20.

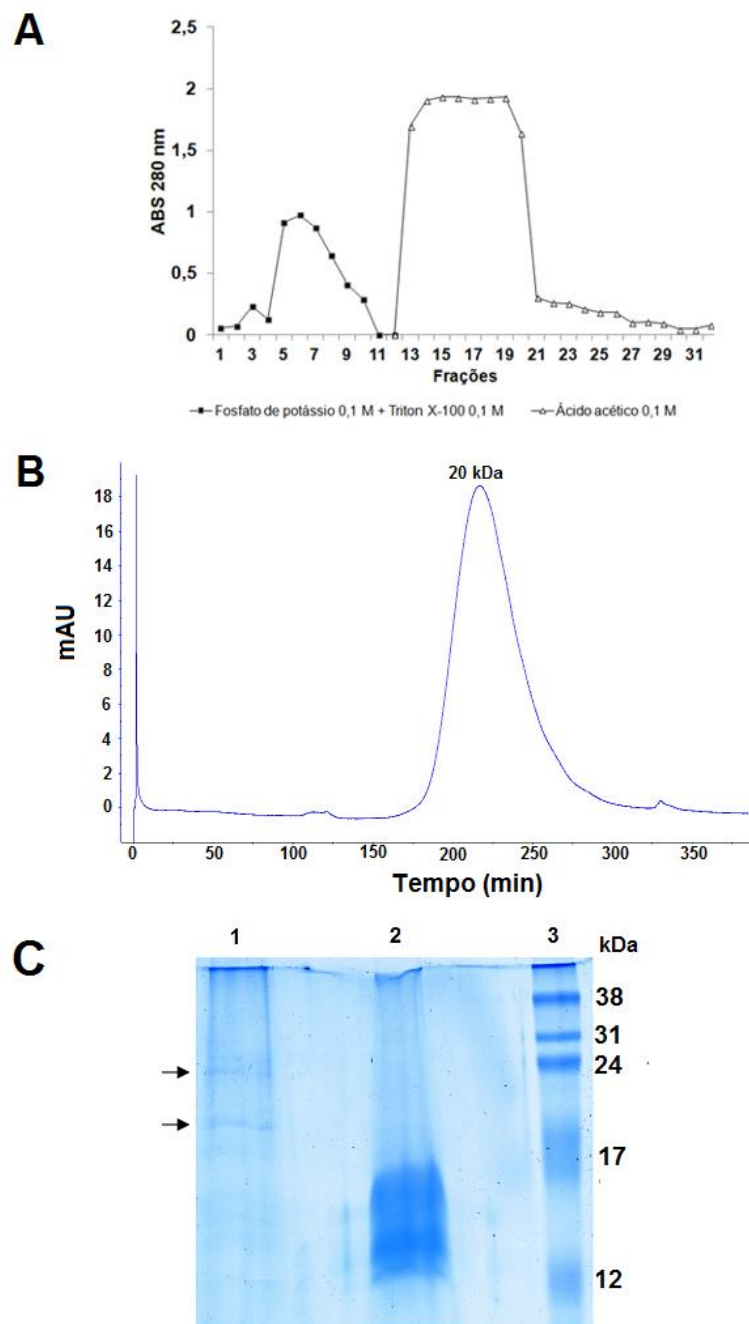


Figura 2. Investigação da interação entre WSMoL e proteínas das patas de fêmeas de *A. aegypti*. **(A)** Cromatografia de afinidade do extrato de patas em suporte WSMoL-Sepharose, equilibrada com fosfato de potássio 100 mM pH 7,6 contendo Triton X-100 0,1% (v/v). O material não adsorvido foi removido utilizando a solução de equilíbrio. Proteínas adsorvidas foram eluídas com ácido acético 0,1 M. **(B)** Cromatografia de gel filtração (%) do pico de proteínas adsorvidas à matriz. **(C)** SDS-PAGE (15%) do pico de proteínas adsorvidas à matriz (1), WSMoL (2) e mistura de padrões de massa molecular.

Tabela 1. Similaridades detectadas entre peptídeos derivados de proteínas de patas de *Aedes aegypti* adsorvidas à matriz WSMoL-Sepharose e sequências de proteínas depositadas no NCBIProt.

Sequência peptídica	Número de acesso no NCBI	Massa do peptídeo (Da)	Proteína	Score
R.FTALQSGEVDILSR.N K.YTPITFDTSDSAK.S	OYU07836.1	1534.8038 1573.7158	amino acid ABC transporter substrate-binding protein [<i>Pseudomonas</i> sp. PGPPP1]	142
R.AGVEADYALDNGK.W K.QYPQTTTVVEGHTDSVG PDAYNQK.L	SMQ11636.1	1321.6150 2634.2198	outer membrane protein, partial [<i>Pseudomonas</i> sp. Zh1N-3]	225
R.FTAIQSGEVDILSR.N	TXG94600.1	1534.7991	amino acid ABC transporter substrate-binding protein [<i>Zoogloea</i> sp.]	75
R.FTAIQSGEVDLLSR.G	WP_028601149.1	1534.8038	amino acid ABC transporter substrate-binding protein [<i>Ottowia thiooxydans</i>]	75

Peptídeos foram obtidos após digestão trípica e as sequências obtidas utilizando a ferramenta *MS/MS ion search* do MASCOT.

3.3. Artigo 3 - Efeitos de formulação sólida contendo lectina de sementes de *Moringa oleifera* na eclosão de ovos e desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti*

Livia Lais de Santana Silva^a, Stella Cristina Cabral Silva^a, Ana Patrícia Silva de Oliveira^a, Jéssica da Silva Nascimento^b, Emerson de Oliveira Silva^c, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Pedro José Rolim Neto^c, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^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 de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^c*Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

*Autor para correspondência. E-mail: ppaivaufpe@yahoo.com.br

RESUMO

Atualmente, a principal medida de prevenção das arboviroses dengue, Chikungunya e febre pelo vírus Zika compreende o controle da população do vetor, o mosquito *Aedes aegypti*. Novos inseticidas tem sido pesquisados devido aos relatos de populações resistentes aos compostos atualmente utilizados, além da toxicidade contra organismos não-alvo. O desenvolvimento de uma formulação é importante para aumentar a estabilidade e viabilidade econômica desses novos inseticidas. No presente trabalho, foram desenvolvidos comprimidos contendo fração proteica de sementes de *Moringa oleifera* enriquecida na lectina WSMoL, a qual possui atividades larvicida e ovicida contra *A. aegypti*. Inicialmente, foi avaliada a compatibilidade entre a fração e os excipientes utilizados na obtenção dos comprimidos por termogravimetria (TG), calorimetria diferencial exploratória (DSC) e espectrometria de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Os comprimidos obtidos (5%, 10% e 15%, p/p, da fração) foram então avaliados quanto às atividades larvicida e ovicida e quanto ao efeito sobre a oviposição do mosquito; os ensaios foram também realizados

utilizando comprimido placebo. As avaliações por TG, DSC e FTIR demonstraram que a composição proteica da fração não sofreu alteração quando misturada aos componentes da formulação. Os comprimidos contendo 10% e 15% de fração promoveram mortalidade de 42,5% e 95% das larvas após 48 h, respectivamente. Foi observado que as larvas incubadas com esses comprimidos apresentaram atividade reduzida de acetilcolinesterase. Os comprimidos a 5%, 10% e 15% inibiram (36 a 74%) a eclosão dos ovos após 72 h de exposição. Ainda, o comprimido a 15% apresentou efeito repelente de oviposição. O estudo revelou que a formulação desenvolvida é eficiente em interferir no ciclo de vida do *A. aegypti*, sendo candidata para uso no controle desse mosquito.

Palavras-chave: Mosquito da dengue. Formulação inseticida. Lectina. Larvicida. Ovicida.

Introdução

O *Aedes aegypti*, conhecido como mosquito da dengue, é um vetor de importantes arboviroses, incluindo dengue, Chikungunya e febre pelo vírus Zika. Vacinas desenvolvidas contra a dengue ainda apresentam limitações e não estão disponíveis na rede pública (SWAMINATHANA e KHANNA, 2019), enquanto para as outras duas doenças ainda não há vacina. Sendo assim, o controle das populações do mosquito permanece como a principal medida adotada nos programas de prevenção (PLIEGO-PLIEGO et al., 2020).

As medidas de controle da população de *A. aegypti* incluem melhoramento das condições sanitárias, campanhas de conscientização da população e o uso de inseticidas (MACIEL-DE-FREITAS et al., 2014). A busca por novos agentes inseticidas é urgente, uma vez que a utilização indiscriminada de inseticidas sintéticos para controle desse mosquito tem resultado na seleção de indivíduos resistentes, com consequente estabelecimento de populações insensíveis a determinados compostos (DAVID et al., 2018).

As sementes de *Moringa oleifera* contêm uma lectina solúvel em água (WSMoL) que apresentou atividades ovicida e larvicida contra *A. aegypti* (COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2012). Foi demonstrado que a atividade ovicida de WSMoL está relacionada com danos na casca dos ovos, iniciando com rompimento da rede exocoriônica e destacamento das células exocoriônicas e culminando com extensiva deformação e degeneração da superfície

(ALVES et al., 2020). WSMoL também apresentou atividade estimulante de oviposição sobre fêmeas grávidas de *A. aegypti*, tanto em condições de laboratório quanto de campo simulado (SANTOS et al., 2012, 2014). Silva et al. (2019) demonstraram que larvas de *A. aegypti* que foram expostas a uma fração proteica enriquecida na lectina WSMoL originaram fêmeas com ingurgitamento reduzido após o repasto sanguíneo, com consequente comprometimento da fertilidade e fecundidade. Os autores relacionaram esses achados com danos ao processo de remodelação do intestino processo durante a metamorfose.

Os produtos vegetais, normalmente, são componentes químicos instáveis, sendo necessário o desenvolvimento de formulações para uso em campo (ISMAN, 2020). O desenvolvimento de uma formulação larvicida deve levar em conta que a mesma seja fácil de ser produzida e administrada, possa ser convenientemente armazenada e apresente viabilidade econômica (BULLA JR et al., 1975; MEDEIROS et al., 2005). De acordo com Couch (2000), o processo de formulação deve assegurar a estabilidade biológica do ingrediente ativo e uma vida de prateleira adequada. As duas formas principais são as formulações líquidas e as formulações sólidas (tais como pó, grânulos, tabletes e comprimidos).

O presente trabalho teve como objetivos obter comprimidos contendo fração proteica enriquecida na lectina WSMoL e avaliá-los quanto aos efeitos sobre a sobrevivência de larvas, eclosão de ovos e oviposição de *A. aegypti*.

Metodologia

Material vegetal

Sementes de *M. oleifera* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em Recife, Brasil, com autorização (38690) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente. O acesso foi registrado no (A720498 and AC03B51) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

Obtenção da fração enriquecida em lectina

As sementes foram trituradas utilizando multiprocessador e o pó obtido foi submetido à extração em água destilada por 16 h, na proporção 1:10 (p/v), utilizando-se agitador

magnético. A suspensão foi então filtrada e centrifugada ($9000 \times g$, 15 min, 25 °C) sendo o sobrenadante correspondente ao extrato bruto. Proteínas presentes no extrato foram precipitadas por tratamento com sulfato de amônio a 60% de saturação (Green e Hughes, 1955) por 4 h a 25 °C, sob agitação suave. Em seguida, o material foi centrifugado (15 min, $3000 \times g$, 25 °C) e o precipitado foi ressuspensionado em NaCl 0,15 M e dialisado contra água destilada (6 h, três trocas de líquido), correspondendo então à fração enriquecida em lectina (Silva et al., 2019).

Determinação da concentração de proteínas e atividade hemaglutinante (AH)

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951) usando uma curva padrão de albumina de soro bovino (31,25–500 $\mu\text{g/mL}$). Para confirmação da presença de lectina, ensaio de atividade hemaglutinante (AH) foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços, de acordo com Paiva e Coelho (1992). Em uma fileira da microplaca, a amostra (50 μL) foi diluída serialmente (1:1) em NaCl 0,15 M e, posteriormente, cada poço recebeu 50 μL de uma suspensão (2,5% v/v) de eritrócitos de coelho fixados com glutaraldeído (Bing et al., 1967). Os eritrócitos foram coletados conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE (processo no. 23076.033782/2015-70). No controle negativo, os eritrócitos foram incubados com NaCl 0,15 M. A AH foi definida como o inverso da maior diluição da amostra capaz de promover aglutinação total dos eritrócitos. AH específica foi calculada como a razão entre a AH e a concentração proteica (mg/mL).

Análise termogravimétrica

Ensaio de termogravimetria com a fração proteica foi realizado empregando uma termobalança, modelo TGA-60 (Shimadzu Cor., Kyoto, Japan). As curvas de termogravimetria (TG) foram obtidas a uma razão de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL/min), num intervalo de temperatura de 30 a 600 °C. Para a realização dos ensaios foi utilizada massa da amostra de $5,0 \pm 0,5$ mg em suporte de amostras de platina. Antes dos ensaios foram obtidas curvas em branco para avaliar a linha de base do sistema. A calibração dos equipamentos foi realizada na razão de aquecimento de 10 °C/min com o padrão oxalato de cálcio.

Análise por calorimetria diferencial exploratória (DSC)

Curvas de DSC foram obtidas para a fração proteica e para misturas da fração com os excipientes a serem utilizados na preparação dos comprimidos. Foram avaliadas as seguintes misturas binárias (MB), sempre na proporção 1:1 (p/p): MB1 - fração + celulose microcristalina; MB2: - fração + croscarmelose de sódio; MB3 - fração + estearato de magnésio; MB4 - fração + dióxido de titânio. Foi utilizada uma célula calorimétrica, modelo DSC-50 (Shimadzu), a uma razão de aquecimento de 20 °C/min, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min), num intervalo de temperatura de 25 a 250 °C. Para a realização dos ensaios, foi utilizada massa da amostra de 2,0±0,1 mg em cadinhos de alumínio fechado. Antes dos ensaios foram obtidas curvas em branco para avaliar a linha de base do sistema. Para a calibração da célula de DSC, foi empregado índio metálico ($T_{\text{fusão}}=156,6\text{ °C}$; $\Delta H_{\text{fusão}}=28,7\text{ J/g}$) com pureza de 99,99%.

Desenvolvimento dos comprimidos contendo a fração

Para preparação da formulação, a fração foi seca por liofilização até a obtenção de um pó. Os comprimidos foram preparados como descrito no pedido de patente “Comprimido larvicida a base de sementes de moringa” (processo no. 23076.036013/2019-57). Foram formulados comprimidos contendo 3 doses diferentes da fração (5%, 10% e 15%, p/p), além de comprimido placebo (sem a fração), tendo cada comprimido um peso de 200 mg. Para a produção deles foram utilizados os excipientes: celulose microcristalina (diluyente), croscarmelose de sódio (desintegrante), estearato de magnésio (lubrificante) e dióxido de titânio (corante inorgânico). O tempo de desintegração dos comprimidos, sob agitação manual ou não, foi avaliado visualmente adicionando-os à água destilada. Após desintegração, a suspensão foi avaliada quanto à concentração de proteínas e presença de lectinas através do ensaio de hemaglutinação.

Análise espectroscópica

A análise espectroscópica foi realizada em espectrômetro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), modelo 400 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). As amostras (fração e MBs) foram caracterizadas empregando-se a técnica de reflexão total atenuada (ATR), no modo transmitância, com resolução espectral de 4 cm^{-1} e média de 64 varreduras por espectro. A região espectral avaliada foi de 4000 a 650 cm^{-1} . Os espectros de cada amostra foram obtidos após colocação das amostras, com auxílio de uma espátula, sobre o cristal da célula de ATR. A limpeza da célula foi realizada entre as leituras por processo químico com o uso de acetona, de modo a evitar erros na realização dos ensaios. Os espectros obtidos foram comparados aos disponibilizados na literatura.

Avaliação de efeitos dos comprimidos sobre larvas de *A. aegypti*

Ensaio larvicida

Colônias de *A. aegypti* (cepas Rockefeller) foram criadas e mantidas no Laboratório de Ecologia Química da UFPE a $27\pm0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $73\pm0,4\%$ de umidade relativa e fotoperíodo 12:12. Ovos de *A. aegypti* foram eclodidos em água destilada contendo ração para gato (Whiskas). Larvas no início do quarto estágio (L₄) foram coletadas para uso nos ensaios larvicidas. A atividade larvicida foi avaliada segundo uma adaptação do método da Organização Mundial de Saúde (1981) descrita por Navarro et al. (2003). Cada bioensaio consistiu em manter 20–25 larvas em contato por 48 h com água destilada (20 mL), a qual foi adicionado 1 comprimido contendo a fração (5%, 10% ou 15%) ou 1 comprimido placebo. Larvas no grupo controle foram incubadas somente em água destilada. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata. Larvas incapazes de se locomover mediante estímulos com um pincel foram consideradas mortas.

Efeito dos comprimidos sobre atividade de acetilcolinesterase (AChE) das larvas

As larvas que sobreviveram ao final do ensaio larvicida foram recolhidas e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5. Após centrifugação ($9000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min), os extratos obtidos foram avaliados quanto à concentração de proteínas (Lowry et al., 1951). A atividade de AChE foi determinada incubando-se 10 μL do extrato de larvas com 20 μL de acetiltiocolina 0,052 M e 200 μL de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

(DTNB) 0,25 mM durante 3 min a 25°C. Após este período, a liberação de tiocolina foi monitorada por determinação da absorbância a 405 nm. Uma unidade de atividade de AChE foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de acetiltiocolina por minuto (ELLMAN et al., 1961).

Efeito dos comprimidos na atividade das enzimas digestivas das larvas

Comprimido contendo a fração a 15% ou comprimido placebo foi adicionado a 20 mL de água destilada. Após 10 min para desintegração do comprimido, a suspensão resultante foi coletada, centrifugada ($3.000 \times g$, 5 min) e avaliada quanto aos efeitos *in vitro* sobre as atividades enzimáticas do intestino das larvas. A suspensão-mãe obtida a partir do comprimido teste (contendo 1,5 mg/mL de proteínas) ou placebo (1 mL) foi diluída serialmente em água destilada até uma razão de 1:32.

A atividade de α -amilase foi determinada de acordo com o método proposto por Bernfeld (1955). Larvas L₄ (50) tiveram seus intestinos dissecados em gelo e, em seguida, homogeneizados em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5. Após centrifugação ($9000 \times g$, 4 °C, 15 min), os extratos obtidos foram avaliados quanto concentração de proteínas (Lowry et al., 1951). Em cada ensaio, o extrato de intestino (15 μ L, 80 μ g de proteína) foi incubado (30 min, 28 °C) com 15 μ L de cada suspensão do comprimido contendo a fração (testes), da suspensão do comprimido placebo (controle 1) ou de tampão acetato (controle 2). Em seguida, cada ensaio foi incubado a 50 °C durante 10 min com 400 μ L de amido solúvel a 1% (p/v) em tampão acetato. A reação foi parada adicionando 500 μ L de reagente de ácido dinitrosalicílico (DNS). Em seguida, os ensaios foram aquecidos a 100 °C em água durante 6 min, imediatamente resfriados em gelo durante 15 min e avaliados quanto à absorbância a 540 nm. A quantidade de açúcares redutores foi determinada utilizando uma curva padrão de reação de glicose com DNS ($Y = 1,7366X + 0,0228$, em que Y é a absorbância a 540 nm e X é a concentração de glicose em mg/mL). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 μ mol de glicose por minuto.

A atividade de tripsina foi determinada de acordo com uma adaptação do método proposto por Kakade et al. (1969). Intestinos de larvas L₄ (50) foram dissecados em gelo e, em seguida, homogeneizados em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. Após centrifugação ($9000 \times g$, 4 °C, 15 min), os extratos obtidos foram avaliados quanto concentração de proteínas (Lowry et al., 1951). Em cada ensaio, o extrato de intestino (15 μ L, 78 μ g de proteína) foi

incubado (30 min, 37 °C) com 15 µL de cada suspensão do comprimido contendo a fração (testes), da suspensão do comprimido placebo (controle 1) ou de tampão Tris (controle 2). Em seguida, foram adicionados 5 µL de N-benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida 8 mM (BApNA) e tampão Tris (165 µL) em cada ensaio. A atividade de tripsina foi seguida pela medição da absorbância a 405 nm. Uma unidade de atividade de tripsina foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de BApNA por minuto.

Ensaio ovicida

Ovos de *A. aegypti*, estocados por no máximo 3 meses, foram selecionados quanto à integridade utilizando-se estereomicroscópio. Cada ensaio consistiu em um recipiente contendo 20 mL de água, 1 comprimido contendo a fração (5%, 10% ou 15%) ou comprimido placebo (controle) e 50 ovos. A taxa de eclosão (%) foi determinada após 72 h de incubação a $27\pm0,5$ °C, $73\pm0,4\%$ de umidade relativa e fotoperíodo 12:12. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Ensaio de oviposição

Ensaio de oviposição foi realizado de acordo com Navarro et al. (2003), com modificações. Um total de 10 fêmeas grávidas de *A. aegypti* foram colocadas em uma gaiola (33 x 21 x 30 cm) contendo dois recipientes de plástico: um com 40 mL de água destilada (controle) e outro com 40 mL de água destilada e 1 comprimido contendo a fração (5%, 10% ou 15%), dispostos em cantos opostos da gaiola. Também foram realizados ensaios utilizando o comprimido placebo no lugar daquele contendo a fração. Uma peça de papel de filtro (18 × 18 cm) foi colocada em cada recipiente para servir como suporte para oviposição. Os insetos foram mantidos a $27\pm0,5$ °C e umidade relativa $73\pm0,4$ % por 14 h no escuro. Após esse período, os ovos depositados nas folhas de papel foram contados manualmente usando um estereomicroscópio (Leica M80, Leica Microsystems, Alemanha). Foram realizadas 8 repetições pra cada tipo de comprimido.

Análise estatística

Os dados foram analisados usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, a um nível de significância de 5%, utilizando o software GraphPad Prism versão 4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

Resultados e discussão

A utilização de inseticidas sintéticos continua sendo a principal estratégia no controle de populações de *A. aegypti*. Todavia, o uso indiscriminado tem levado ao aumento no número de populações resistentes, o que intensifica a busca por alternativas, principalmente de origem natural (ROJAS-PINZÓN et al., 2018). Preparações de sementes de *M. oleifera* contendo a lectina WSMoL isolada foram descritas como agentes inseticidas contra diferentes estágios do ciclo de vida do *A. aegypti* (COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2012, 2014; SILVA et al., 2019; ALVES et al., 2020). No presente trabalho, foi desenvolvida formulação contendo preparação enriquecida em WSMoL. O desenvolvimento dessa formulação levou em conta a facilidade da metodologia de obtenção da fração enriquecida e alta solubilidade em água da lectina WSMoL (SANTOS et al., 2005). Ainda, a escolha pelo formato em comprimidos foi feita pensando na forma de aplicação e de armazenamento.

O extrato de sementes de *M. oleifera* apresentou concentração de proteínas de 7,9 mg/mL e uma AH específica de 2,02. Após o tratamento com sulfato de amônio, a fração obtida apresentou concentração proteica de 45 mg/mL e AH específica de 22,75. A detecção de capacidade aglutinante em ambas as preparações confirma a presença da lectina WSMoL ativa, em consonância com resultados descritos anteriormente (COELHO et al., 2009; SILVA et al., 2019). O aumento da AH específica confirma que a fração obtida é uma preparação enriquecida em WSMoL. O processo de obtenção da fração apresenta maior viabilidade para uso em formulações do que a lectina purificada (SILVA et al., 2019).

A análise termogravimétrica (TG) foi utilizada para estudar a estabilidade térmica da fração proteica. A curva TG na Figura 1 mostra que a degradação da fração ocorreu em três etapas subsequentes. O primeiro evento (1) ocorreu de forma rápida entre 36,88 e 76,18 °C, com um pico de temperatura média de 53,53 °C e perda de massa de 6,157%. Essa primeira perda de massa é provavelmente devido à evaporação de água e demais compostos voláteis. Já no segundo evento (2), entre as temperaturas de 228,98 e 328,33 °C, ocorreu uma perda de massa mais relevante, com um pico de temperatura média de 274,99 °C e perda de massa de 45,98%. Por fim, o evento 3 corresponde à degradação completa da fração. Os resultados

revelaram uma boa estabilidade dos componentes da fração frente ao aquecimento, o que é interessante para a formulação de comprimidos.

Quando observados os dados da curva de calorimetria diferencial exploratória (DSC) na Figura 1, pode-se notar um primeiro pico (A) endotérmico e um segundo pico (B) exotérmico; o primeiro pico coincide com o evento 1 visualizado na curva TG, onde o material absorve energia para evaporar a água; o segundo pico coincide com a faixa de temperatura do evento 2 da curva TG, sendo um evento de degradação que corresponde à volatilização de fragmentos de proteína devido à decomposição pelas altas temperaturas. Os resultados de TG e DSC indicam a viabilidade da incorporação da fração em uma formulação sólida.

A análise por DSC das misturas binárias (MB) entre a fração e os componentes da formulação foi realizada visando avaliar a compatibilidade ativo/excipientes. Em todas as análises (Figura 2), foi observado que os eventos A e B relacionados à fração permaneceram como determinados para a fração sozinha, não sendo observada antecipação dos eventos térmicos. Os eventos térmicos dos excipientes foram observados após os eventos da fração. Os resultados demonstram a compatibilidade com todos os componentes da formulação, uma vez que as características da fração permaneceram inalteradas.

A espectroscopia FTIR foi utilizada para caracterizar a presença de funções orgânicas relacionadas com a composição proteica da fração, assim como auxiliar na investigação de possíveis alterações estruturais quando misturada com os componentes da formulação. Os picos característicos da fração estão apresentados na Figura 3. Foram observadas bandas mais largas em 3290 e 3420 cm^{-1} (N-H amida I), 2929 e 2913 cm^{-1} (C-H), 1645 cm^{-1} (C=O amida I) e 1612 cm^{-1} (N-H amida II) e uma banda mais fina em 1511 cm^{-1} (C-H amida I). As bandas amida I e amida II são importantes bandas de absorção características de proteínas (SUN et al., 2019). Foram observadas bandas adicionais em torno 1745 e 1160 cm^{-1} (Figura 3), sendo atribuídas ao grupo funcional éster de resíduos de pectina, assim como em concentrado proteico de grão-de-bico (RICCI et al., 2018). Bandas típicas de polissacarídeos foram observadas na região entre 1250 e 1000 cm^{-1} (Figura 3), as quais são devidas ao alongamento de C-C e C-O nos anéis de açúcar (KIZIL et al., 2002; AMIR et al., 2011).

Na Figura 4, é possível observar os espectros FTIR da fração e das misturas binárias entre ela e os excipientes. Os picos característicos da função amida foram observadas em todos os casos, indicando a presença das proteínas. A visualização desses picos confirma que a composição proteica da fração mantém suas características principais em contato com as

componentes da formulação. Foi observada uma maior interação entre a fração e o excipiente lubrificante (estearato de magnésio), devido à sobreposição de alguns picos (Figura 4D); porém, os picos característicos da fração continuaram presentes, demonstrando que a composição não foi inalterada.

Após a confirmação da compatibilidade entre a fração e os excipientes a serem utilizados, foram preparados os comprimidos. Os comprimidos obtidos apresentaram desintegração num tempo média de $3,06 \pm 0,25$ min sob agitação, enquanto a desintegração completa sem agitação ocorreu em $8,0 \pm 0,4$ min. Nenhuma das formulações se dissolveu em contato com a água. Foi detectada AH de 2, 4 e 8 na suspensão após a desintegração dos comprimidos contendo 5%, 10% e 15% de fração, respectivamente. AH não foi detectada em suspensão após desintegração do comprimido placebo. Esses resultados demonstram que houve liberação de lectinas no meio.

A Tabela 1 mostra os dados do ensaio larvicida nos dois períodos investigados (24 e 48 h). O comprimido a 5% não apresentou efeito larvicida, enquanto os comprimidos a 10% a 15% causaram mortalidade de 42,5% e 95%, respectivamente, após 48 h. Mortalidade larval não foi detectada nos ensaios controle e com o comprimido placebo.

Dosagem de proteínas nas suspensões dos comprimidos de 5%, 10% e 15% da fração após desintegrados em água destilada indicaram concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/mL, respectivamente. Silva et al. (2019) relataram que a fração, na concentração de 0,2 mg/mL de proteínas, causou redução de 50% na sobrevivência das larvas em 48 h, enquanto todas as larvas já se encontravam mortas após 24 h de exposição à concentração de 0,6 mg/mL de proteínas. Sendo assim, observa-se que, quando incorporada nos comprimidos, a fração perdeu um pouco da sua eficiência, o que pode ser devido à interação de proteínas com os excipientes ou pelo fato de componentes ativos da fração não terem sido liberados por completo após a desintegração. A fração enriquecida em WSMoL é capaz de promover desorganização e vacuolização epitelial no intestino das larvas de *A. aegypti* e adultos originados dessas larvas apresentaram epitélio menos desenvolvido em comparação ao dos adultos que se desenvolveram de larvas do grupo controle (SILVA et al., 2019).

Durante o ensaio larvicida, foram observadas alterações na motilidade das larvas incubadas com os comprimidos. Sendo assim, avaliamos a atividade de AChE nos extratos de larvas dos tratamentos controle, placebo e teste. Os resultados mostraram uma diminuição da atividade enzimática nas larvas expostas aos comprimidos a 10% e 15% (Figura 5A). A inibição de AChE é o mecanismo de ação dos inseticidas organofosforados e carbamatos e

leva o inseto à morte devido à paralisia como consequência da contração muscular interrompida (AIUB et al., 2002). A inibição de AChE resulta no acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas (ou sinapses), o que impede a interrupção da propagação do impulso elétrico. Consequentemente, o sistema nervoso central continuará sendo estimulado, desencadeando o processo de paralisia (BRAGA e VALLE, 2007).

Quando alcançam o intestino médio de insetos, as lectinas podem exercer efeitos inibitórios ou estimuladores nas enzimas digestivas, levando à desregulação do processo de digestão e absorção de nutrientes (NAPOLEÃO et al., 2019). Sendo assim, foi investigada a atividade de amilase e tripsina em extratos de intestinos de larvas de *A. aegypti* quando incubados com suspensões derivadas dos comprimidos placebo e contendo a fração. Na avaliação da atividade da α -amilase (Figura 6A), pode-se observar que houve uma diminuição na atividade enzimática quando o extrato de intestino foi incubado com as suspensões derivadas do comprimido contendo a fração. Efeito inibitório também foi observado sobre a atividade de tripsina do intestino das larvas (Figura 6B). A inibição de glicosidases e proteases, como amilase e tripsina, respectivamente, é capaz de induzir a morte de insetos por prejudicar a digestão de carboidratos e proteínas, reduzindo a biodisponibilidade e absorção dos nutrientes, comprometendo o crescimento e induzindo mortalidade (CAMAROTI et al., 2017).

A Tabela 1 mostra os resultados do ensaio ovicida. Após 72 h de incubação, houve uma diminuição na eclosão dos ovos nos testes com os comprimidos contendo a fração a 5%, 10% e 15%, quando comparados ao controle e ao comprimido placebo. Maior atividade ovicida foi detectada para o comprimido a 15%. Os resultados demonstram que a ação ovicida de WSMoL, previamente conhecida, foi preservada nos comprimidos.

Os resultados do ensaio de oviposição revelaram que as fêmeas de *A. aegypti* não tiveram preferência em depositar seus ovos no controle ou nas soluções contendo os comprimidos placebo ou com a fração a 5% e 10% (Figuras 7A, 7B e 7C). No entanto, o comprimido contendo a fração a 15% teve um efeito repelente sobre a oviposição pelas fêmeas grávidas (Figura 7D). Apesar da lectina WSMoL, quando isolada, ter um efeito estimulante sobre a oviposição de *A. aegypti*, já havia sido descrito que a fração proteica (preparada como utilizada nesse trabalho) não tem efeito na oviposição quando testada a uma concentração de 0,1 mg/mL de proteínas (SANTOS et al., 2012). Esse dado corrobora com os resultados encontrados para os comprimidos de 5% e 10% e, provavelmente, se deve ao fato da concentração de WSMoL estar abaixo da necessária para desencadear a resposta

estimuladora. No entanto, os dados obtidos agora revelaram uma ação repelente da fração, que pode ser detectada a partir de uma dosagem de 15% nos comprimidos utilizados.

Conclusão

A formulação de comprimidos contendo a fração enriquecida em WSMoL se mostrou eficiente e análises por termogravimetria, calorimetria e FTIR confirmaram a compatibilidade entre a fração e os excipientes utilizados. Os comprimidos foram capazes de induzir a mortalidade de larvas e de reduzir a eclosão de ovos de *A. aegypti*, além de apresentarem efeito repelente sobre a oviposição. Os resultados indicam um novo produto que pode ser utilizado no controle de populações deste vetor de diversas arboviroses de importância global.

Referências

- AIUB, C. A. F. *et al.* (2002) “Genotoxic evaluation of the organophosphorus pesticide temephos.” *Genetics and Molecular Research*, 1.2: 159-166.
- ALVES, R. R.V, *et al.* (2019) “Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs.” *Pest Management Science*.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D.(2007) “*Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência”. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v.16, n.4, p.279-293, out-dez.
- BULLA JR., L.A. (1975). “Bacteria as insect pathogens”. *Annual Review in Microbiology*, v. 29, p. 163-190.
- CAMAROTI, J.R.S.L. *et al.* (2017) Phytoinsecticides for controlling pests and mosquito vectors of diseases. In: GREEN, V. (Org.). *Biocontrol Agents: Types, Applications and Research Insights*. 1ed.ew York: Nova Science Publishers, pp. 147-188.
- COELHO, J. S. *et al.* (2009). “Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae”. *Chemosphere*, v. 77, p. 934-938.
- COUCH, T.L. (2000). “Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria”. In: *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*, Dordrecht, The Netherland, pp. 297-316.
- DAVID, M. R. *et al.*(2018) “Insecticide resistance and fitness: the case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions”. *BioMed research international*.V.2018
- ISMAN, Murray B.(2020) “Botanical Insecticides in the Twenty-First Century—Fulfilling Their Promise?.” *Annual review of entomology*, 65: 233-249.
- LOWRY, O.H *et al.* (1951). “Protein measurement with the Folin phenol reagent”. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p.265–275, 1951.
- MACIEL-DE-FREITAS, Rafael, *et al.* Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. *PloS one*, 2014, 9.3.
- MEDEIROS, F. P.M. *et al.* (2005). “Development of a *Bacillus sphaericus* tablet formulation and its evaluation as a larvicide in the biological control of *Culex quinquefasciatus*”. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 431-434, 2005.

- NAPOLEÃO, T. H., *et al.*(2019) “Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins.” *Pest management science*, 75.5: 1212-1222.
- PLIEGO-PLIEGO, E. *et al.* (2020) “Control strategies for a population dynamics model of *Aedes aegypti* with seasonal variability and their effects on dengue incidence”. *Applied Mathematical Modelling*, 81: 296-319.
- ROJAS-PINZON, P. A. *et al.* (2018) Laboratory and simulated-field bioassays for assessing mixed cultures of *Lysinibacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to temephos. *Applied entomology and zoology*, 53.2: 183-191.
- SANTOS, N.D.L. *et al.* (2012). “Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*”. *PLoS ONE*, v. 7, e0044840.
- SANTOS, N.D.L. *et al.* (2014). “Evaluation of the *Moringa oleifera* seed lectin in traps for capture of *Aedes aegypti* eggs and mosquitoes under semi-field conditions”. *Parasitology Research*, v. 113, p. 1837-1842.
- SILVA, L. L.S. *et al.*(2019) Exposure of mosquito (*Aedes aegypti*) larvae to the water extract and lectin-rich fraction of *Moringa oleifera* seeds impairs their development and future fecundity. *Ecotoxicology and environmental safety*, 183: 109583.
- SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. (2019) “Dengue vaccine development: Global and Indian scenarios.” *International Journal of Infectious Diseases*, 84: S80-S86.

Tabela 1. Atividades larvicida e ovicida de comprimidos contendo fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de *Moringa oleifera* contra *Aedes aegypti*.

Amostra	Mortalidade (%)		Eclosão de ovos (%)
	Larvas		
	24 h	48 h	
Controle	0,0 a	0,0 a	90,0 ± 4,08 a
Comprimido placebo	0,0 a	0,0 a	88,0 ± 1,63 a
Comprimidos com a fração			
5% (p/p)	0,0 a	0,0 a	64,0 ± 3,26 b
10% (p/p)	30,0 ± 7,07 b	42,5 ± 3,53 b	72,0 ± 2,79 b
15% (p/p)	65,0 ± 0,0 c	95,0 ± 4,08 c	36,0 ± 1,63 c

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

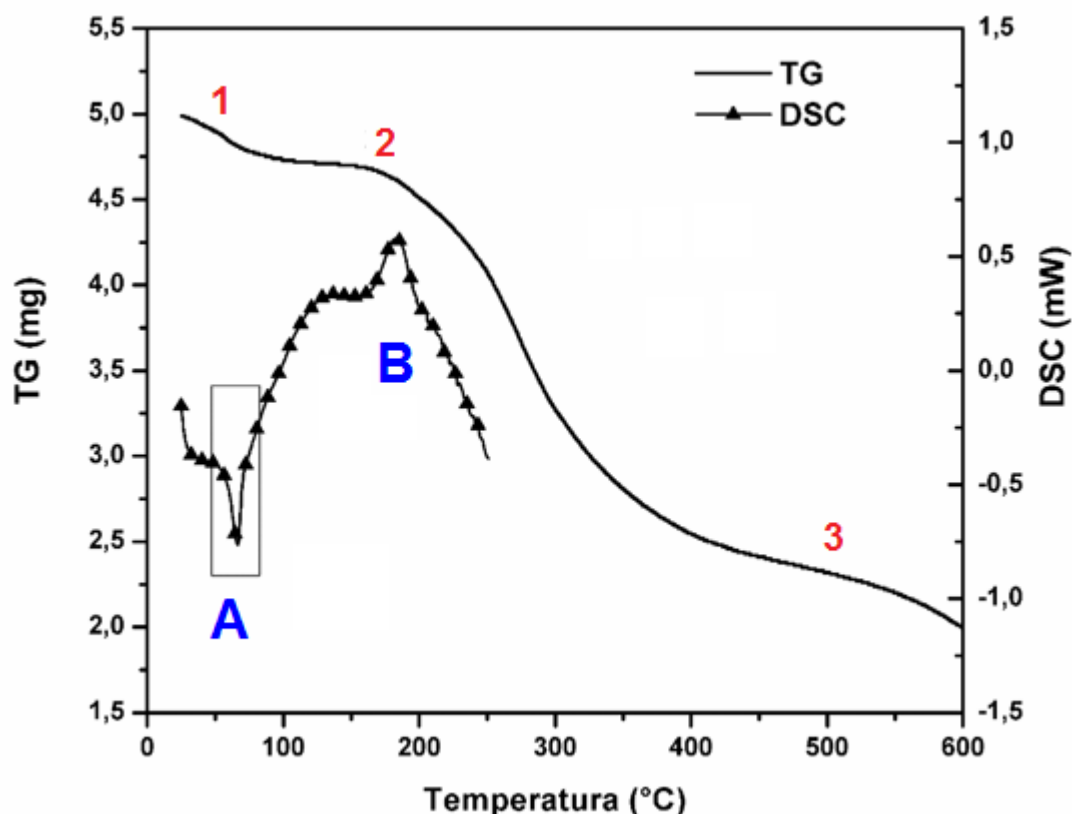


Figura 1. Avaliação por termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC) de alterações provocadas pelo aquecimento na composição da fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de *Moringa oleifera*. Na curva TG é possível distinguir três eventos que evidenciam desidratação (1), decomposição relacionada com volatilização de fragmentos de proteínas (2) e decomposição completa (3). Na curva DSC são evidenciados um pico endotérmico (A) e um pico exotérmico (B), que estão relacionados com os eventos 1 e 2 da curva TG.

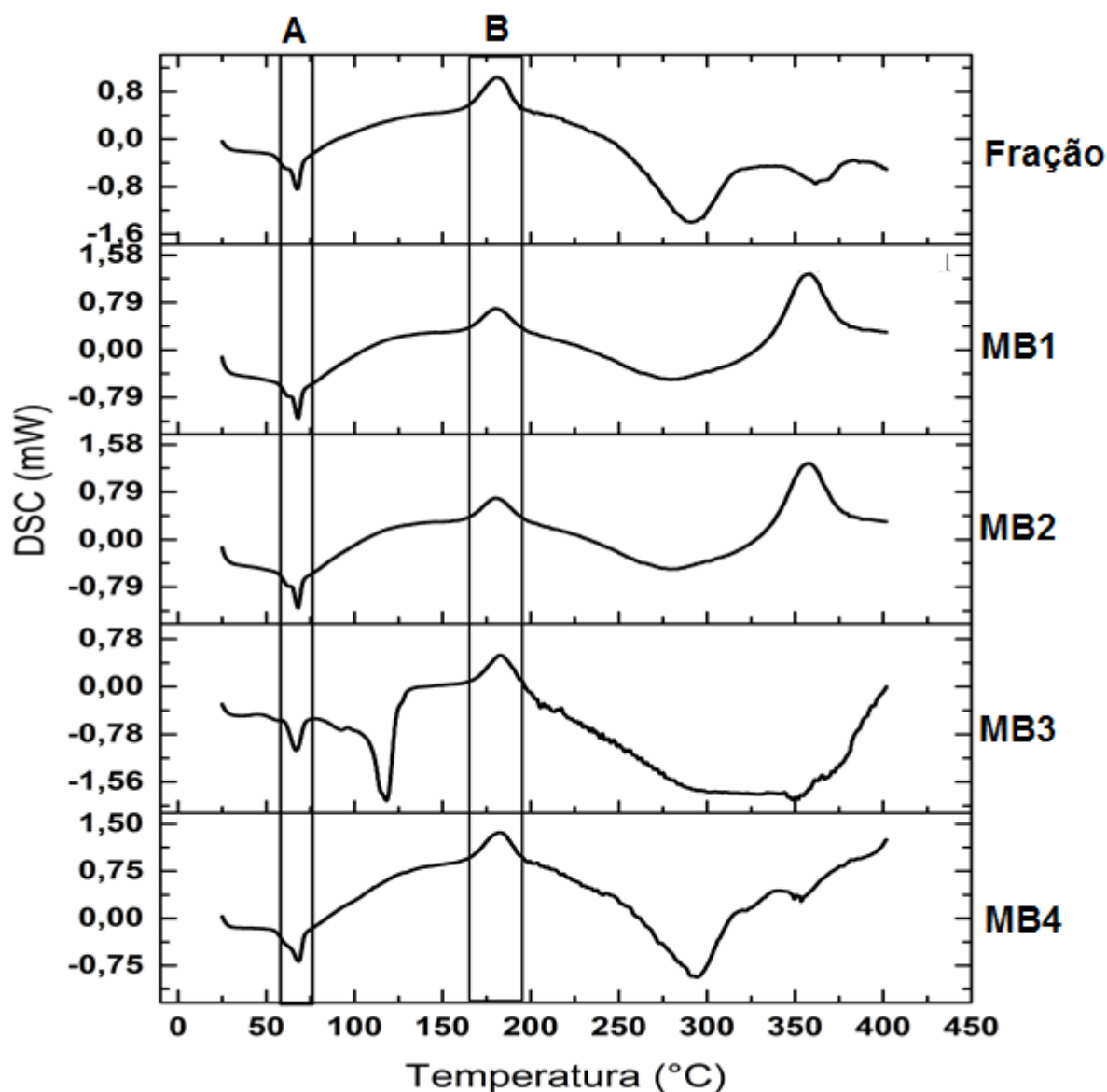


Figura 2. Avaliação por calorimetria diferencial exploratória (DSC) da compatibilidade entre a fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de *Moringa oleífera* e os excipientes utilizados na produção dos comprimidos. Estão apresentadas as curvas da fração e das seguintes misturas binárias (MB): MB1 - fração + celulose microcristalina; MB2: - fração + croscarmelose de sódio; MB3 - fração + estearato de magnésio; MB4 - fração + dióxido de titânio. Os picos A e B característicos da fração podem ser observados em todas as curvas, sem nenhuma antecipação, demonstrando a compatibilidade entre os componentes da formulação e a fração.

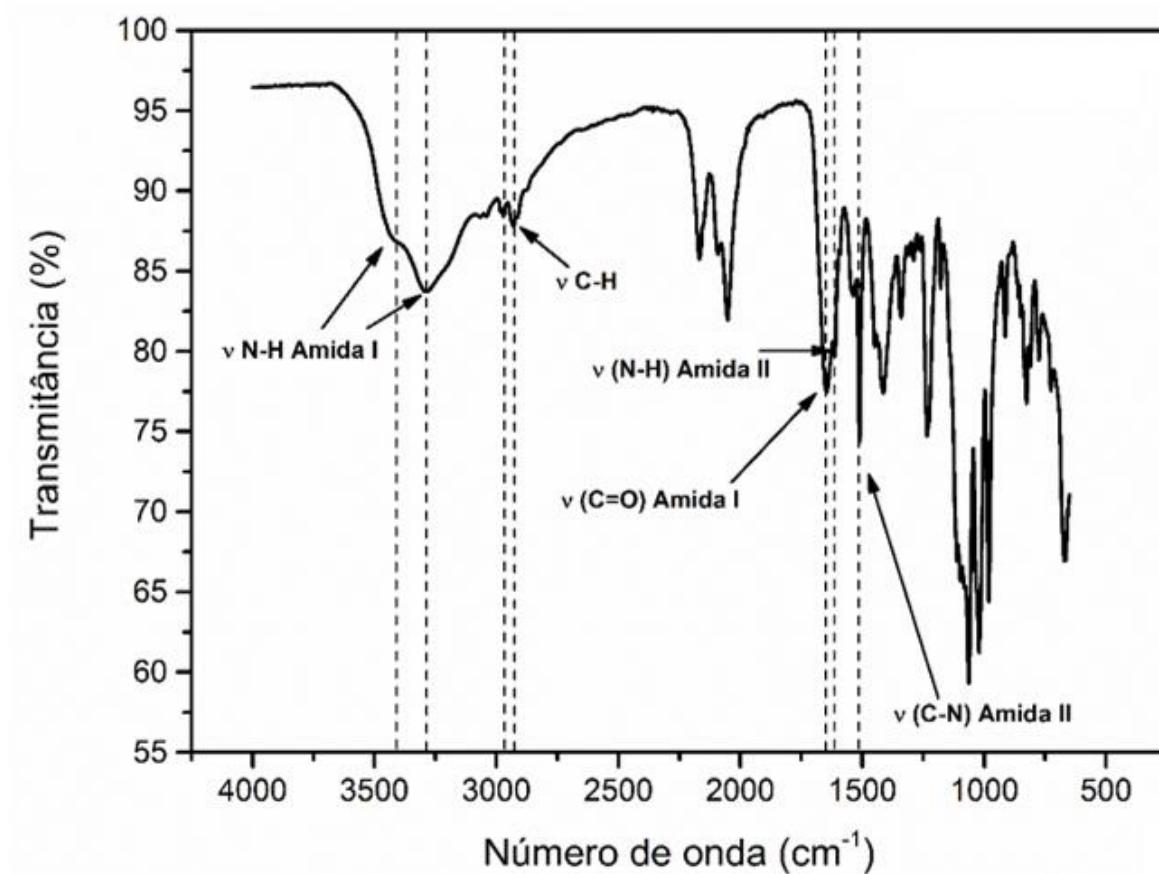


Figura 3. Análise da composição da fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de *Moringa oleifera* por espectrometria de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Estão indicadas na figura as bandas relacionadas com componentes proteicos presentes na fração.

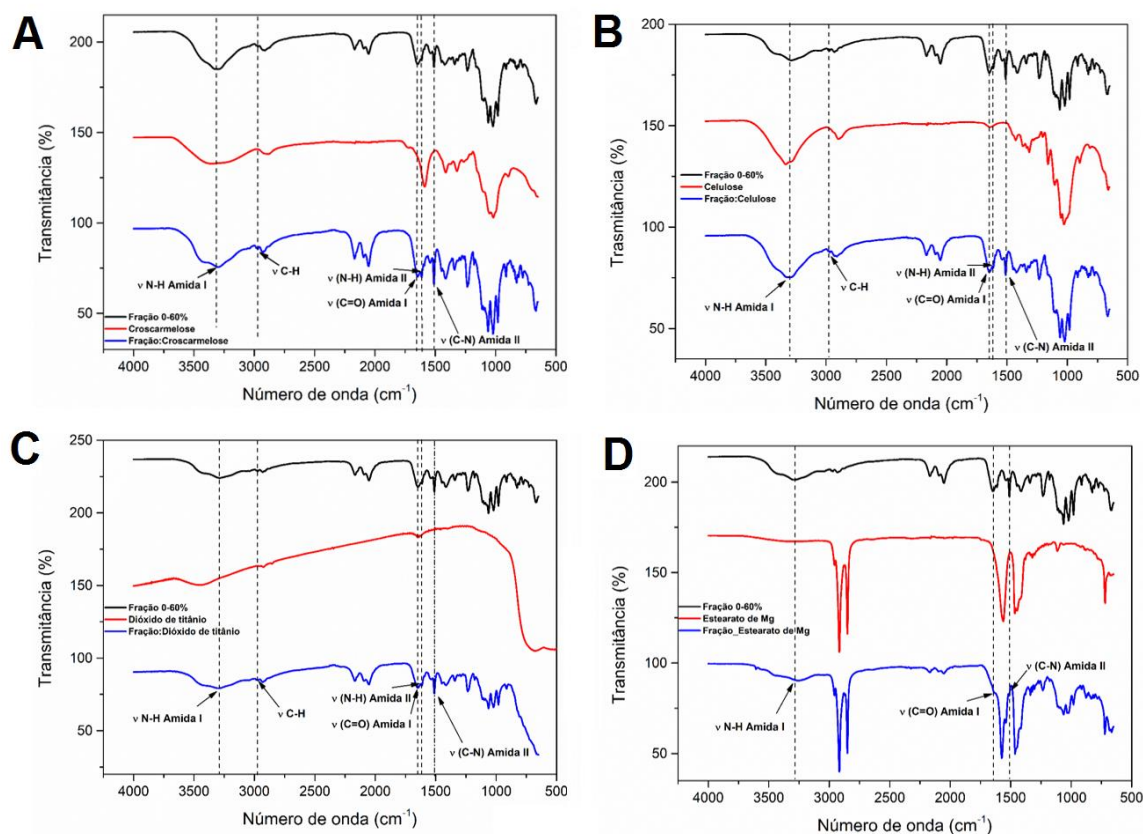


Figura 4. Análise por espectrometria de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das misturas binárias entre a fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de *Moringa oleifera* e os excipientes utilizados na obtenção de comprimidos. As curvas em preto correspondem ao espectro da fração sozinha, enquanto as curvas em vermelho do excipiente sozinha. Já em azul estão apresentadas as curvas das misturas (A) fração + croscarmelose de sódio, (B) fração + celulose microcristalina, (C) fração + dióxido de titânio, e (D) fração + estearato de magnésio. Estão indicadas na figura as bandas relacionadas com componentes proteicos presentes na fração.

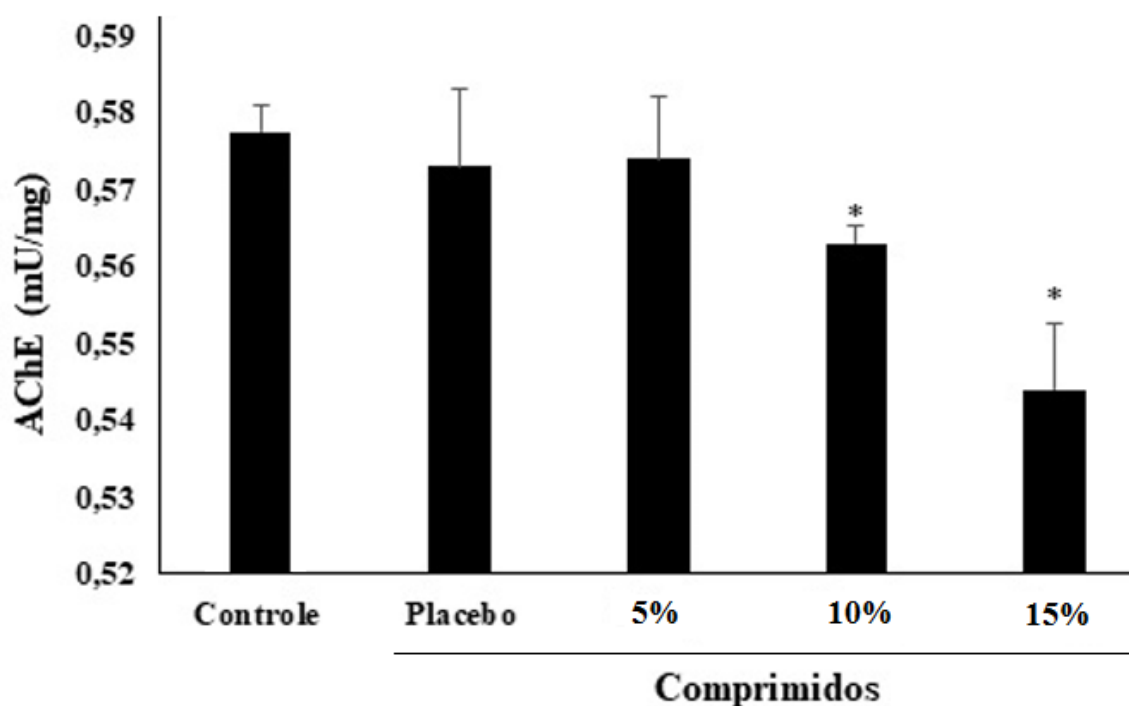


Figura 5. Atividade de acetilcolinesterase em extratos de larvas de *Aedes aegypti* incubadas com comprimidos contendo fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de *Moringa oleifera* (5%, 10% e 15%). Larvas incubadas com comprimidos placebo ou somente em água destilada (controle) também foram avaliadas. (*) indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

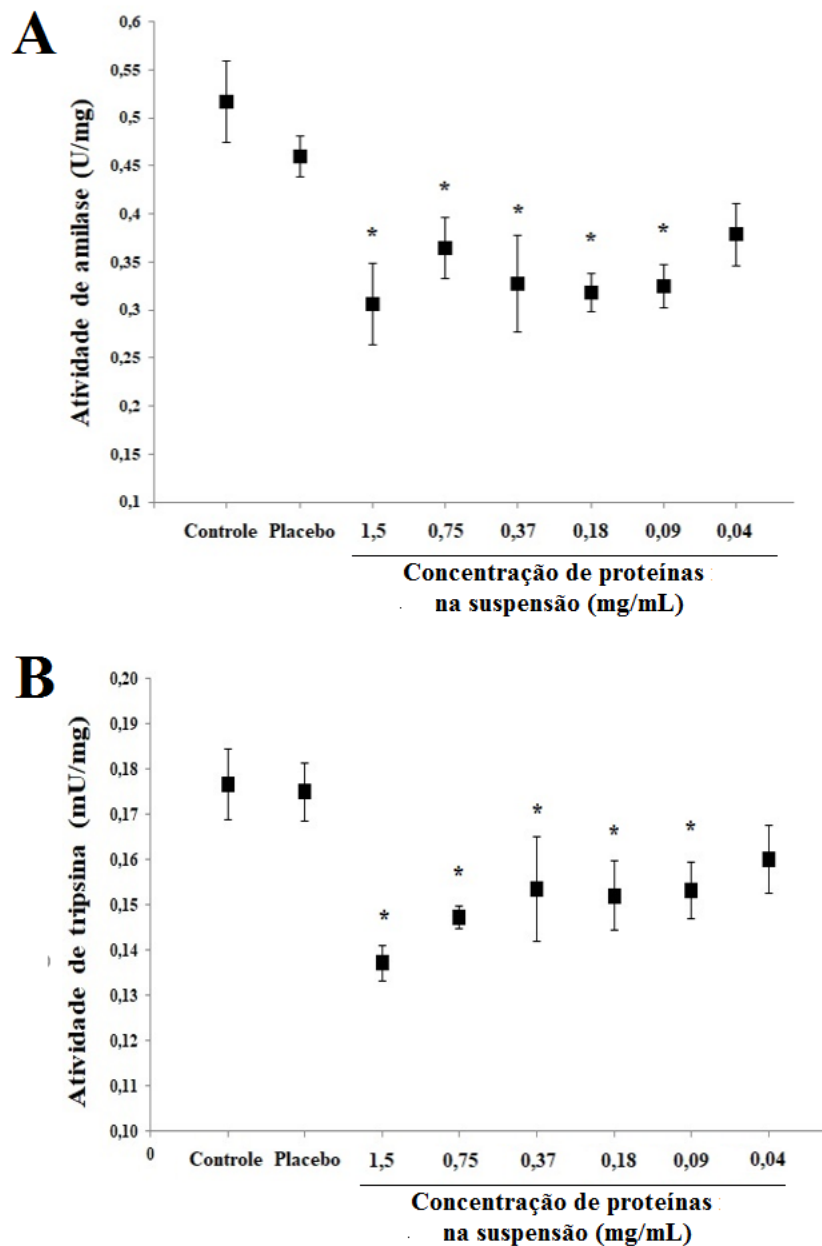


Figura 6. Atividade das enzimas digestivas amilase (A) e tripsina (B) em extratos de intestino de larvas de *Aedes aegypti* incubados ou não com suspensões derivadas da adição em água destilada de comprimidos placebo ou contendo fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de *Moringa oleifera*. (*) indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

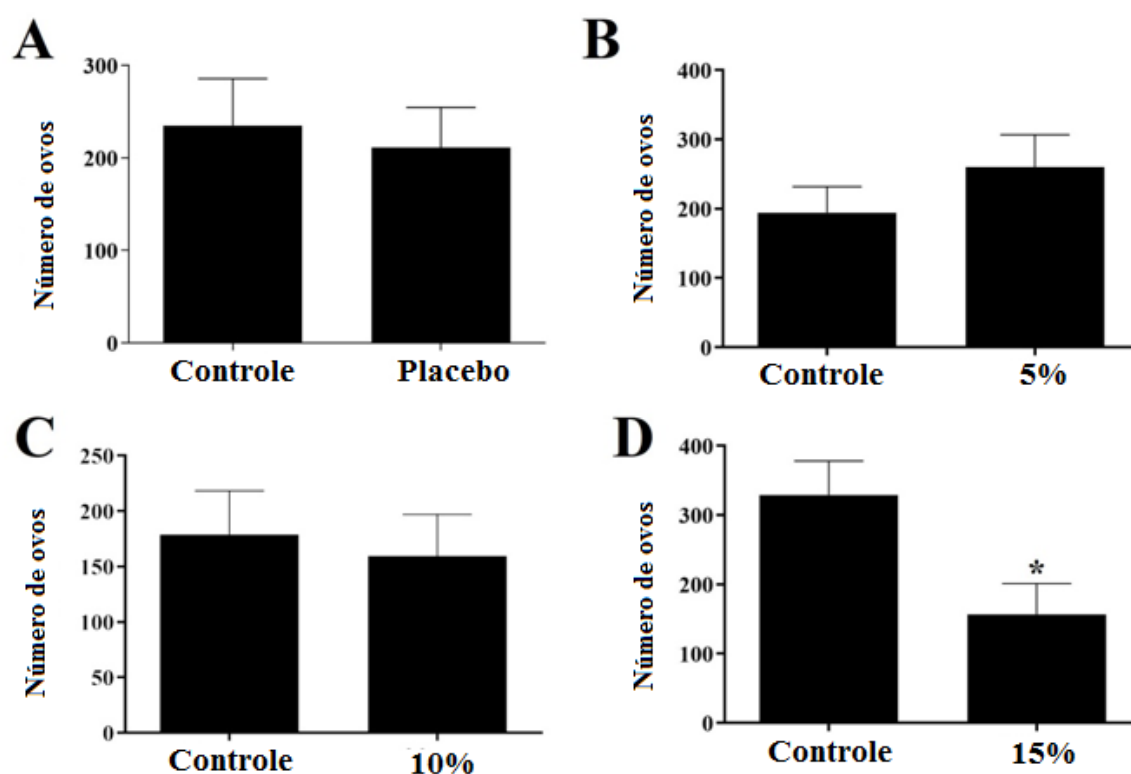


Figura 7. Avaliação do efeito de comprimidos placebo (A) ou contendo fração enriquecida na lectina WSMoL de sementes de *Moringa oleifera* (B, C e D) sobre a oviposição de *Aedes aegypti*. As barras representam o número médio de ovos depositado no papel filtro colocado em recipiente contendo somente água destilada (controle) ou 1 comprimido adicionado à água destilada. (*) indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

4. CONCLUSÕES

- A exposição de larvas de *A. aegypti* a extrato aquoso e fração contendo WSMoL resultou no desenvolvimento de fêmeas com epitélio intestinal subdesenvolvido, ingurgitamento reduzido após repasto sanguíneo e consequente comprometimento de sua fertilidade e fecundidade.
- WSMoL é capaz de se ligar a proteína(s) de membrana presentes nas patas de fêmeas, o que pode estar relacionado com a atividade estimulante de oviposição
- Preparação enriquecida de WSMoL apresentou atividades larvicida, ovicida e repelente de oviposição sobre *A. aegypti* quando incorporada em comprimidos.

REFERÊNCIAS

- 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. *Parasitol Res* 113:175–184 ,2014.
- ARAGÃO, C. F.; CRUZ, A. C. R.; NETO, J. P. N.; MONTEIRO, H. A. O.; SILVA, E. V. P.; SILVA, S. ANDRO P.; ANDRADE, A. T. S.; TADEI, W. P.; PINHEIRO, V.C.S. Circulation of *Chikungunya virus* in *Aedes aegypti* in Maranhão, Northeast Brazil. **Acta Tropica**, v.186, 1-4, 2018.
- ARRUDA,, C.C.L.; FREITAS, D.V.; SEABRA, M.A.B.L.; XAVIER-JÚNIOR, F.H.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M.G.; NAVARRO, D. M.A.F.; NAVARRO, MARCELO. CdTe-GSH as luminescent biomarker for labeling the larvicidal action of WSMoL lectin in *Aedes aegypti* larvae. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.**, 2019.
- AZEEM, M.; ZAMAN, T.; TAHIR, M.; HARIS, A.; IQBAL, Z.; BINYAMEEN, M.; NAZIR, A.; SHAD, S. A.; MAJEED, S.; MOZŪRAITIS, R. Chemical composition and repellent activity of native plants essential oils against dengue mosquito, *Aedes aegypti*. **Industrial Crops and Product**, v.140, 2019.
- BANDYOPADHYAY S., *et al.* of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. *Plant Sci.* 161:1025–1033 ,2001.
- BEZERRA, F.P. ,*et al.*. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) como novo bioinseticida: análise fitoquímica preliminar e atividade larvica contra *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). **Revista Amazônia Science & Health**, jul/set;2(3), p. 17-25, 2014.
- BIANCO, E.M. *et al.*. Larvicidal activity of sea weeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). **Industrial Crops and Products**, v.43, p.270-275, 2013.

BRASIL. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Dengue , Zika e Chikungunya. Disponível em : <<https://rededengue.fiocruz.br/noticias/630-iraa-aponta-357-municipios-em-situacao-de-risco-para-dengue-zika-e-chikungunya>> . Acesso em : 11 ago.2018.

BRASIL. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Dengue vírus e vetor. Disponível em : <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html>> . Acesso em: 03 jan. 2018.

BRASIL. **Instruction for Determining the susceptibility or Resistance of Mosquito Larvae to Insecticides**. WHO – VBC 81-807, p. 1–6, 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Prevenção e combate: Dengue , Zika e Chikungunya Portal da Saúde. Disponível em: <<http://combateaedes.saude.gov.br/pt/>> . Acesso em : 03 jan. 2018.

BULLA JR., L.A. Bacteria as insect pathogens. *Annual Review in Microbiology*, v. 29, p. 163-190, 1975. CHADEE, D.D.Oviposition strategies adopted by gravid *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) as detected by ovitraps in Trinidad, West Indies (2002–2006). *Acta Tropica*, v. 111, p. 279-283, 1975.

CACCIA S, *et al.*, Mechanism of entomotoxicity of the plant lectin from *Hippeastrum hybrid* (Amaryllis) in *Spodoptera littoralis* larvae. *J. Insect Physiol.* 58:1177-1183 (2012).

CARRINGTON, L.B.; SIMMONS, C.P. Human to mosquito transmission of dengue viruses. *Frontiers in Immunology*, v.5, p. 290, 2014.

CAVALCANTI, L. P. G., *et al.* Experiência do Comitê de Investigação de Óbitos por Arboviroses no Ceará em 2017: avanços e desafios. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 28: e2018397, 2019.

CHRISTOPHERS SR. *Aedes aegypti* (L.): the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure [Internet]. London: Cambridge University Press;.750 p. Disponível em: http://www.dpi.inpe.br/geocxnets/wiki/lib/exe/fetch.php?media=wiki:christophers_1960.pdf, 1960.

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

CONSOLI R.A.G.B., OLIVEIRA R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: FioCruz. 228 p. Disponível em: <http://static.scielo.org/scielobooks/th/pdf/consoli-9788575412909.pdf> 1994.

CONSOLI, R.A.G.B., OLIVEIRA, R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, 1994.

COUCH, T.L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: **Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application**, Dordrecht, The Netherlands, pp. 297-316, 2000.

FORATTINI O.P. Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia. São Paulo: EDUSP; 864 p. 2002.

FORATTINI, O.P. **Entomologia Médica**. 1ª. Ed. São Paulo: USP, 1962.

FREITAS, José Henrique Edmilson Souza et al. Evaluation of using aluminum sulfate and water-soluble *Moringa oleifera* seed lectin to reduce turbidity and toxicity of polluted stream water. **Chemosphere**, v. 163, p. 133-141, 2016.

GREEN, A.A.; HUGHES, L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents. In: COLOWICK, S.; KAPLAN, N. (Eds.) **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, pp.67-90, 1955.

GUPTA L. *et al.* Midgut epithelial responses of different mosquito–*Plasmodium* combinations: the actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*;102:4010–5. 2005.

HERMANN, L.L. *et al.* Advances in the understanding, management, and prevention of dengue. **Journal of Clinical Virology**, v.64, p.153–159, 2015.

HONÓRIO N.A, *et al.*. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. May, 2015.

KRAEMER M.U.G., *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. Elife. jun;4:e08347, 2015.

LI H.M., *et al.* Transcriptional signatures in response to wheat germ agglutinin and starvation in *Drosophila melanogaster* larval midgut. Insect Mol. Biol. 18:21-31 (2009).

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, *et al.* *Aedes aegypti* in Brazil: Genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. Trans R Soc Trop Med Hyg. p.43–5,. 2004.

LOWRY, O.H *et al.*. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p.265–275, 1951.

MACIEL I.J. *et al.* Epidemiologia e desafios no controle do dengue. Rev Patol Trop. mai-jun;37(2):111–30, 2008.

MEDEIROS, F. P.M. *et al.* Development of a *Bacillus sphaericus* tablet formulation and its evaluation as a larvicide in the biological control of *Culex quinquefasciatus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 431-434, 2005.

MEDEIROS, V.F..**Potencial larvicida de extratos de plantas regionais no controle de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae)**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. 2007.

MILLER B.R., BALLINGER M.E. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. Trans R Soc Trop Med Hyg.;82(3):476–7, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 32, 2016. Bol Epidemiol . 2016

Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/setembro/16/2016-028---Dengue-SE32.pdf>

» <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/setembro/16/2016-028---Dengue-SE32.pdf>

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Preparação e resposta à introdução do vírus Chikungunya no Brasil . Brasília: Ministério da Saúde; 2014. 100 p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/preparacao_resposta_virus_chikungunya_brasil.pdf

MORAIS, L. M. O.; JUSSIANI, E. I.; ZEQUI, J. A.C.; REIS, P. J.; ANDRELLO, A. C.; Morphological study of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs by X-ray computed microtomography. **Micron**, v.126, 2019.

MOURA, K. S. Atividade coagulante e toxicidade sobre células humanas e *Culex quinquefasciatus* de preparações enriquecidas da lectina WSMoL e WSMoL isolada. 2017.

MOURA, K. S. et al. Coagulant activity of water-soluble Moringa oleifera lectin is linked to lowering of electrical resistance and inhibited by monosaccharides and magnesium ions. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 180, n. 7, p. 1361-1371, 2016.

MOURA, M. C. et al. Water-soluble Moringa oleifera lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 119, n. 3, p. 666-676, 2015.

NAPOLEÃO T.H., *et al.*, Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. *Pest Manag Sci* 75:1212–1222,2019.

NAVARRO, D.M.A.F. *et al.* The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Journal of Applied Entomology**, v.127, p.46-50, 2003.

NOBRE A, *et al.*. Febre amarela e dengue no Brasil: epidemiologia e controle. Rev Soc Bras Med Trop.;27 Supl 3:59–66,1994.

PAIVA, P.M.G. *et al.*. **Lectins and trypsin inhibitors from plants: Biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae**. Nova Science Publishers, Inc., New York, 2013.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Preparedness and response for Chikungunya virus: introduction in the Americas [Internet]. Washington, DC: Pan American Health Organization; 2011 [cited 2019 Jul 11]. 161 p. Disponível em :
» https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=3545:2010-preparedness-response-chikungunya-virus-introduction-americas&Itemid=39837&lang=en

PENNINGTON J.E. *et al.*,. The midgut adult: structure and function. In: Marquart WC, editor. Biology of disease vectors. Amsterdam: Elsevier;. p. 289–95. 2004

PLIEGO-PLIEGO, E.;VASILIEVA,O.;VELÁZQUEZ-CASTRO, J.; COLLAR, A. F. Control strategies for a population dynamics model of *Aedes aegypti* with seasonal variability and their effects on dengue incidence. Applied mathematical modelling, v. 81, 296-319, 2020.

PLUEMPANUPAT, S. *et al.* Laboratory evaluation of *Dalbergiaoliveri*(Fabaceae: Fabales) extracts and isolated isoflavonoids on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Industrial and Crops Products**, v.44, p.653-658, 2013.

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.

PROCÓPIO, T. F. *et al.* *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. **PLoS ONE**, v. 10, e0126612, 2015.

ROCHA H. D. R. . Dissertação : Perfil de suscetibilidade da população de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) da ilha de Santiago, Cabo Verde, a inseticidas. Fiocruz , Recife 2014.

ROSE, Robert I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging Infectious Diseases*, Washington, v.7, n1, p. 17-23, fev . 2001.

ROSS, T. M.. Dengue Virus. *Clinics In Laboratory Medicine*, [s..], v.30, n. 1, p. 149-160, mar. 2010.

SANTOS, N.D.L. *et al.*.Evaluation of the *Moringa oleifera* seed lectin in traps for capture of *Aedes aegypti* eggs and mosquitoes under semi-field conditions. *Parasitology Research*, v. 113, p. 1837-1842, 2014.

SANTOS, N.D.L. *et al.*.Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, v. 7, e0044840, 2012.

SCOTT T.W., *et al.* Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. *J Med Entomol.* jan;30(1):94–9. 1993.

SILVA , L. L. S. et al. Ecotoxicity of water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds to zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Chemosphere*, v. 185, p. 178-182, 2017.

SILVA H.H.G. et al. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Rev Soc Bras Med Trop.* jul-ago;32(4):349–55, 1999.

SILVA, L. L. S.; FERNANDES, K. M.; MIRANDA, F.R. SILVA, S.C.C.; PAIVA, P.M.G. Exposure of mosquito (*Aedes aegypti*) larvae to the water extract and lectin -rich fraction of *Moringa oleifera* seeds impairs their development and future fecundity, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.183, 2019.

SIMOY, M.I., *et al.* The effect of temperature on the population dynamics of *Aedes aegypti*. *Ecological Modelling.* v. 314, p. 100-110, 2015.

SOPER F.L. The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. Am J Trop Med Hyg. (6):887–91, nov;14,1965.

TAUIL P.L. Urbanização e ecologia do dengue. Cad Saude Publica.;17 Supl:99–102. 2001.

TOMLINSON, S.M. *et al.* Structure-based discovery of dengue virus protease inhibitors. Antiviral research, v.82, p.110-114, 2009.

VANDENBORRE G, *et al.*, Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. Phytochemistry 72:1538-1550 ,2011.

WILDER-SMITH, A., *et al.* "Dengue." *The Lancet* 393.10169 p.350-363. 2019.

YAKOB L, *et al.*. A mathematical model of chikungunya dynamics and control: the major epidemic on Réunion Island. PLoS One [Internet]. [cited 2019 Jul 11];8(3):e-57448. Mar 2013 .

YANG, K. *et al.* Global distribution of outbreaks of water-associated infectious diseases. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 6, e1483, 2012.

ANEXOS

ANEXO A – Comprovante de submissão da patente à POSITIVA – Diretoria de Inovação/UFPE



POSITIVA
DIRETORIA DE INOVAÇÃO

Universidade Federal de Pernambuco
Diretoria de Inovação

COMPROVANTE DE RECEBIMENTO DE DOCUMENTOS

Declaro para os devidos fins que esta diretoria recebeu no dia 31/07/2019, o processo eletrônico administrativo no SIPAC com respectiva documentação da solicitação para depósito do Pedido de Patente de título: “COMPRIMIDO LARVICIDA E OVICIDA A BASE DE SEMENTES DE MORINGA”.

Para:

- () estudo por esta diretoria;
- () busca prévia;
- () análise e emissão de parecer de patenteabilidade;
- (X) depósito dos documentos para Pedido de Patente de Invenção.

A presente solicitação pertence a um grupo tendo como inventora vinculada à UFPE Patrícia Maria Guedes Paiva, portadora do RG: 534.809 SSP/RN e CPF: 365.654.314-34, nascida em Natal-RN, estado civil: divorciada. A referida é professora da UFPE, do Departamento de Bioquímica, do Centro de Biociências.

Os outros membros do Grupo, coinventores da tecnologia são: Livia Lais de Santana Silva Barbosa, Thiago Henrique Napoleão, Stella Cristina Cabral da Silva, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Pedro José Rolim Neto, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro, Emerson de Oliveira Silva, Jéssica da Silva Nascimento.

Recife, 20 de novembro de 2019.

Atenciosamente,



Ana Carolina Borba Fernandes Padrão
Assistente em Administração
SIAPE 2156155
UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária Recife-PE, CEP 50670-901, fone (81) 2126 8958
www.ufpe.br/dine

