

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



ATIVIDADE LARVICIDA DO EXTRATO CELULAR E DE LECTINA  
EXTRAÍDOS DE *Chlorella vulgaris* FRENTE LARVAS EM L4 de *Aedes  
aegypti*

MARIA LAURA DA SILVA

RECIFE

2020

MARIA LAURA DA SILVA

**ATIVIDADE LARVICIDA DO EXTRATO CELULAR E DE LECTINA  
EXTRAÍDOS DE *Chlorella vulgaris* FRENTE LARVAS EM L4 de *Aedes  
aegypti***

Monografia apresentada ao Curso de  
Licenciatura Plena em Ciências  
Biológicas/UFRPE como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Raquel Pedrosa Bezerra

RECIFE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S586a da Silva, Maria Laura  
Atividade larvicida do extrato celular e de lectina extraídos de *Chlorella vulgaris* frente larvas em L4 de *Aedes aegypti* / Maria Laura da Silva. - 2020.  
34 f. : il.

Orientadora: Raquel Pedrosa Bezerra.  
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

1. *Aedes aegypti*. 2. *Chlorella vulgaris*. 3. lectina. 4. microalga. I. Bezerra, Raquel Pedrosa, orient. II.  
Título

CDD 574

---

MARIA LAURA DA SILVA

**ATIVIDADE LARVICIDA DO EXTRATO CELULAR E LECTINA EXTRAÍDOS  
DE *Chlorella vulgaris* FRENTE LARVAS EM L4 de *Aedes  
aegypti***

Comissão Avaliadora:

---

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Raquel Pedrosa Bezerra – UFRPE

Orientador

---

MSc José Noé da Silva Júnior – UFPE

Titular

---

MSc Alexandra Frazao de Andrade – UFRPE

Titular

---

MSc Elaine Cristina da Silva – UFRPE

Suplente

## AGRADECIMENTOS

A Deus, sobretudo, por me conceder sabedoria, força e saúde durante essa trajetória.

Aos meus avós maternos, que sem dúvidas estariam tão felizes quanto eu por essa conquista, Cecília Alice e João José (*in memoriam*).

Aos meus avós paternos, meu eterno amor José (*in memoriam*), a quem adorava me chamar de “professorinha”. E A minha querida avó Madalena, por me oferecer todo suporte, pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis, me fazendo acreditar cada vez mais no meu potencial.

Aos meus pais José Rockefeller e Vera Lúcia, por todo investimento que me foi feito.

A minha orientadora Raquel Pedrosa e coorientadora Vivianne Lays, por ter me dada a oportunidade de estar sob vossas orientações e por toda atenção que me foi oferecida.

A toda equipe do CENAPESQ E LABTECBIO pela contribuição e realização desse trabalho.

Aos amigos de laboratório, em especial a Yanara, Andreza, José Noé, Leandro e Alexsandra, por tornarem os dias mais maleáveis e por toda troca de conhecimento.

As amigas de faculdade Dayanne e Mirelle pelo apoio e companheirismo de sempre.

As companheiras de apartamento, Nathalia, Gérsia, Fernanda e Gyslayne, pelas inúmeras vezes que me ajudaram com dúvidas relacionadas a pesquisa científica.

Aos amigos que diretamente ou indiretamente estiveram na torcida, meu muito obrigada.

## RESUMO

A dengue, chikungunya e zika são doenças virais ocasionadas pelo agente transmissor *Aedes aegypti*. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), os números de casos dessas infecções são crescentes, sendo o principal método de prevenção, a utilização de inseticidas químicos para o combate ao vetor, os quais tem provocado resistência nas populações. A busca por inseticidas extraídos de fontes naturais tem sido uma alternativa, assim, as microalgas surgem como uma nova possibilidade por apresentarem bioativos biodegradáveis e não tóxicos. Portanto, esta pesquisa visou a utilização do extrato celular e de lectina de *Chlorella vulgaris* sobre o *A. aegypti* para investigar a atividade larvicida e inibição sobre a tripsina no quarto estágio larval (L4). A biomassa da *C. vulgaris* foi cultivada em Bold's Basal Medium. A biomassa foi concentrada e ressuspensa em uma proporção de 10% p/v em tampão Tris-HCl-NaCl 0,1 M, pH 7,5 para a preparação do extrato celular por agitação magnética durante 9h e posterior realizado atividade hemaglutinante. A lectina foi purificada através da cromatografia aniônica (DEAE-Sephadex) e de exclusão molecular Superdex 75. O extrato celular nas concentrações de 3,13% a 100 %, e a lectina de 25 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , foram aplicados nas larvas L4 de *A. aegypti* durante o período de 72 horas seguindo as recomendações da OMS. O extrato celular apresentou um valor de  $\text{LC}_{50}$  com 3 horas ( $\text{LC}_{50} = 43,50\%$ ) e 24 horas ( $\text{LC}_{50} = 10,62\%$ ). Enquanto a lectina apresentou  $\text{LC}_{50}$  com 24 horas (164,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 48 horas (125,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 72 horas (106,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Para observação do mecanismo de ação da tripsina intestinal, A  $\text{LC}_{50}$  do extrato celular contendo 260  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de proteína foi aplicado no quarto estágio das larvas de *A. aegypti*. Ao atingir o quarto estágio, as larvas foram incubadas com o extrato celular da microalga durante o período total de 10 horas, e a cada 2 horas foi realizada atividade de tripsina. Foi observado que quanto maior o tempo de tratamento do extrato celular com as larvas, maior foi a redução na atividade da tripsina do extrato intestinal. Houve uma redução na atividade de 34,93 % do tempo inicial com 2 horas ao tempo final com 10 horas. Assim, o presente estudo utilizando o extrato celular, bem como a lectina isolada da *C. vulgaris* surge como um novo potencial larvicida de *A. aegypti*.

**Palavras-chave:** *Aedes aegypti*, *Chlorella vulgaris*, lectina, microalga.

## ABSTRACT

Dengue, chikungunya and zika are viral diseases caused by the transmitting agent *Aedes aegypti*. According to data from the World Health Organization (WHO), the numbers of cases of these infections are increasing, the main method of prevention being the use of chemical insecticides to combat the vector, which has provoked resistance in the populations. The search for insecticides extracted from natural sources has been an alternative, thus, microalgae appear as a new possibility because they present biodegradable and non-toxic bioactives. Therefore, this research aimed to use the cell extract and *Chlorella vulgaris* lectin on *A. aegypti* to investigate larvicidal activity and inhibition on trypsin in the fourth larval stage (L4). The biomass of *C. vulgaris* was grown in Bold's Basal Medium. The biomass was concentrated and resuspended in a proportion of 10% w / v in 0.1 M Tris-HCl-NaCl buffer, pH 7.5 for the preparation of the cell extract by magnetic stirring for 9h and later performed hemagglutinating activity. Lectin was purified using anionic chromatography (DEAE-Sephadex) and Superdex 75 molecular exclusion. Cell extract at concentrations of 3.13% to 100%, and lectin from 25 to 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , were applied to the larvae *A. aegypti* L4 during the 72-hour period following WHO recommendations. The cell extract showed an LC50 value with 3 hours (LC50 = 43.50%) and 24 hours (LC50 = 10.62%). While lectin showed LC50 at 24 hours (164.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 48 hours (125.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and 72 hours (106.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). To observe the mechanism of action of intestinal trypsin, the LC50 of the cell extract containing 260  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of protein was applied to the fourth stage of *A. aegypti* larvae. Upon reaching the fourth stage, the larvae were incubated with the microalgae cell extract for a total period of 10 hours, and every 2 hours trypsin activity was performed. It was observed that the longer the cell extract treatment time with the larvae, the greater the reduction in intestinal extract trypsin activity. There was a 34.93% reduction in activity from the initial time with 2 hours to the final time with 10 hours. Thus, the present study using the cell extract, as well as the lectin isolated from *C. vulgaris*, appears as a new larvicidal potential of *A. aegypti*.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, *Chlorella vulgaris*, lectina, microalga.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Espécie de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	14
<b>Figura 2:</b> Atividade larvicida do extrato celular (A) lectina de <i>C.vulgaris</i> (B). ..	20
<b>Figura 3:</b> Avaliação do extrato celular de <i>Chlorella vulgaris</i> na atividade da tripsina do quarto instar larval de <i>Aedes aegypti</i> in vivo.....	22



## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	11
<b>2.1 <i>Aedes aegypti</i></b> .....	11
2.1.1 Dengue.....	11
<b>2.2 Inseticidas</b> .....	12
<b>2.3 Microalgas</b> .....	13
<b>2.4 Lectinas</b> .....	14
2.4.1 Mecanismo de ação das lectinas com ação inseticida.....	15
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	16
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	16
<b>4. Metodologia</b> .....	17
<b>4.1 Material</b> .....	17
<b>4.2 Métodos</b> .....	17
4.2.1 Obtenção da biomassa.....	17
4.2.2 Preparação do extrato celular da microalga.....	17
4.2.3 Purificação de lectinas:.....	17
4.2.4 Determinação de proteínas totais.....	18
4.2.5 Determinação da atividade hemaglutinante (AH).....	18
4.2.6 Larvas de <i>Aedes aegypti</i> e bioensaio larvicida.....	18
4.2.7 Atividade inibidora de protease tipo tripsina do extrato intestinal L4 de <i>Aedes aegypti</i> .....	18
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	19
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	23
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	24

## 1. INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* é o principal agente transmissor das doenças virais conhecidas como dengue, chikungunya e zika. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (2020), entre o período de dezembro de 2019 até setembro de 2020 foram notificados no Brasil 928.282 casos de dengue e 69.702 casos de chikungunya. Enquanto o zika vírus registrou 6.220 casos entre dezembro de 2019 a agosto de 2020. Diante dos dados apresentados, percebe-se que dentre as doenças virais transmitidas por este mosquito, a dengue acontece com maior frequência, como afirmando por Guillena *et al.*, (2010), é uma das arboviroses mais importantes a nível de infecção viral.

Estas arboviroses trouxeram fortes impactos econômicos no Brasil em 2016, resultando em um valor aproximado de R\$ 2,3 bilhões com custos médicos, cerca de R\$ 1,5 bilhão para combate ao vetor e 78, 6 milhões com aquisição de larvicida e inseticida (TEICH, ARINELLI, FAHHAM, 2017). Nota-se com isso, que os custos com as arboviroses bem como o combate ao vetor são elevados e apesar de existirem formas de controle por inseticidas, o uso intensivo e desequilibrado de alguns compostos químicos tais como o organoclorados, piretróides, e organofosfato tem propiciado resistência as populações (POLSON *et al.*, 2011). Por essa razão, é necessário que se desenvolva estratégias de substituição a esse método (CHELLAPPANDIAN *et al.*, 2018).

A literatura vem demonstrando o interesse de muitos pesquisadores nesta área, visando o aprimoramento de um produto que além de eficiente, seja seguro ao meio ambiente (SANTOS *et al.*, 2011). Dessa forma, a busca por novos inseticidas tem aumentado, principalmente de fontes naturais como as extraídas de vegetais. Estes possuem compostos bioativos que desempenham funções biodegradáveis maior que os inseticidas químicos, provocando menor impacto nos seres humanos e meio ambiente (VIEGAS, 2003; BARRETO, 2005). Estudos relatam que por ingestão de algas, estágios larvais são atingidos e

consequentemente a sobrevivência das larvas também, tornando-se uma ferramenta no controle de doenças (ANDRADE, ANDRADE, 2017).

Assim, as microalgas surgem como uma nova alternativa. Estas são exploradas de diversas formas, na área cosmética, farmacêutica, alimentícia, biorremediação de água residuais e biocombustíveis (ANDRADE, ANDRADE, 2017). Pesquisas científicas vêm demonstrando a eficiência de microalgas com atividades biológicas tais como, anticâncer, antimicrobiano, atividades anti-inflamatórias, imunomoduladoras, antiepilepsia (CHEN *et al.*, 2019, MARTÍNEZ *et al.*, 2019, BRILLATZ *et al.*, 2018, MONTERO-LOBATO *et al.*, 2018, RODRIGUEZ-LUNA *et al.*, 2018).

A microalga *Chlorella vulgaris* é uma espécie unicelular, composta de proteínas, ácidos graxos, minerais, vitaminas, dietéticos, aminoácidos, rica antioxidantes, substâncias bioativas e clorofila (NIU *et al.*, 2011, BOROWITZKA, 1988, SHUBERT, 1988). Dentre as proteínas encontradas nesta microalga estão as lectinas (CAVALCANTI, 2018), estudos prévios teem demonstrado a utilização de lectina da folha de *Myracrodruon urundeuva* com atividade inibitória da tripsina do *A. aegypti* (PONTUAL, 2010, NAPOLEÃO, 2012). A tripsina são enzimas digestivas que estão presentes no *A. aegypti*, e esta se encontra em maior quantidade na fase larval (ZARA *et al.*, 2016, SOARES *et al.*, 2009; SASAKI *et al.*, 2015).

Tendo em vista os numerosos casos de doenças transmitidas pelo vetor *A. aegypti* e levando em consideração que a dengue possui grande importância a nível de infecção viral humana, o presente estudo visa investigar o potencial larvicida do extrato e lectina de *Chlorella vulgaris* bem como a inibição a tripsina intestinal por ação do extrato celular sobre a larva (L4) de *Aedes aegypti*, como uma nova alternativa de inseticida biológico.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é um mosquito de coloração preta, pintas brancas espalhadas sobre o corpo e pernas rajadas. As fêmeas se alimentam de sangue humano e através disso adquirem elementos necessários para o desenvolvimento dos seus ovos. O macho se alimenta de açúcar assim como a fêmea, porém por não produzir ovos não são hematófagos (GOMES, 2016). O *Aedes aegypti* em sua maioria é de área urbana, pois necessitam de ambientes humanos, especialmente domiciliados, por essa razão raramente são encontrados em locais onde não há presença humana. (ZARA *et al.*, 2016).

Seu ciclo biológico abrange as fases de ovo, larva, pupa e fase adulta. São quatro os estágios que compreendem a fase larval, denominados de L1, L2, L3 e L4 (SILVA *et al.*, 2008). Neste último estágio (L4), o corpo da larva é formado pela cabeça, tórax e abdômen dividido em 8 segmentos (ALTO *et al.*, 2008). Além disso, é também na fase larval que ocorre uma maior evidência de enzimas intestinais como a tripsina e a quimiotripsina (YANG *et al.*, 1971).

O mosquito leva em torno de 10 dias para se desenvolver entre a oviposição e início da fase adulta (CLEMONS *et al.*, 2010). Para o controle de doenças virais, tais como a dengue, o combate ao vetor no estágio larval é uma possibilidade de evitar propagações, uma vez que não haverá evolução para a fase adulta e conseqüentemente impedirá a transmissão do vírus (SANTOS *et al.*, 2020).

#### 2.1.1 Dengue

A dengue é uma doença típica de países tropicais e subtropicais visto que o principal vetor, o *A. aegypti*, se desenvolver melhor nessas regiões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016), essa característica sazonal torna propício a propagação dos insetos. No Brasil, existem 4 sorotipos distintos do vírus (DENV-

1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), todos do gênero Flavivirus e da família Flaviviridae (GUZMAN, ISTÚRIZ, 2010).

Dentre as doenças virais causadas por um vetor esta tem sido nos últimos anos a principal causadora de morte. Cerca de 500 mil pessoas são anualmente levadas ao hospital com o quadro mais grave da doença (WHO, 2019). Os números de óbitos entre a semana 1 a 36 do período que compreende dezembro de 2019 a setembro de 2020, revelaram uma taxa de mortalidade de 484 casos acometidos pela dengue, sendo o público idoso os mais atingidos, entretanto, observou-se uma redução de casos a partir da semana 10 se comparado ao mesmo período do ano de 2019 (OMS, 2020).

Apesar da redução de casos de morte, a doença continua sendo propagada e por essa razão é que se faz necessário ter uma solução para o combate ao vetor, tendo em vista que eliminando-o evitará a disseminação da doença no Brasil e no mundo.

## 2.2 Inseticidas

O controle populacional de mosquitos acontece através de três métodos, químico, mecânico e biológico. O método químico consiste na utilização de produtos, tais como os inseticidas organofosforados e piretróides, o qual é usado com o intuito de matar larvas e insetos adultos (NASCIMENTO, 2012). Entretanto, quando utilizados de modo desgovernado há chances de ser provocada resistências dos indivíduos, além de serem tóxicos ao ser humano e meio ambiente (LIMA, 2019). O método mecânico visa à eliminação de recipientes que possibilitem a criação de larvas e mosquitos (ZARA *et al.*, 2016), no entanto não possui competência em selecionar os insetos resistentes, por essa razão não pode ser visto como o principal método de controle (IOC/FIOCRUZ, 2020).

Já O método biológico, as larvas ou mosquitos passam por aplicação de produtos derivadas de organismos vivos com capacidade competitiva, eliminatória, parasitária e predatória (BARRETO, 2005, BRASIL, 2014), contudo é utilizado com baixa frequência (ZARA *et al.*, 2016). Pesquisas que demonstrem atividade inseticida têm sido realizadas visando solucionar esta problemática por meio de fontes naturais (SHAMSI *et al.*, 2018).

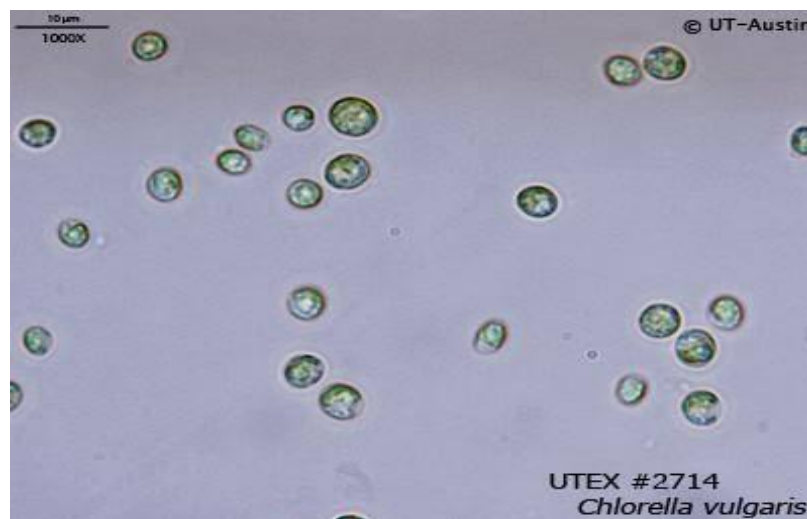
Inseticidas com ação larval apresentam vantagens uma vez que a mortalidade das larvas impede a formação do mosquito na fase adulta, evitando a transmissão de doenças e a propagação do inseto (IOC/FIOCRUZ, 2020). É imprescindível identificar as populações resistentes para busca de estratégias, mas além disso é importante compreender os seus possíveis mecanismos. Sendo assim, mecanismos de ação com inibidores de proteases inseticidas já tem sido alvo de investigação frente as larvas do *Aedes aegypti* (PONTUAL, 2010; DIAS, 2016; ALMEIDA FILHO, 2013).

### 2.3 Microalgas

Microalgas são micro-organismos fotossintéticos e eucarióticos capazes de produzir diferentes tipos de carboidratos, proteínas e lipídios (MOSTAFA, 2012). Possuem a capacidade de fixar grande quantidade de CO<sub>2</sub> e crescer em regiões com variações de temperatura (RAVINDRAN *et al.*, 2017; ALASWAD *et al.*, 2015). A microalga de gênero *Chlorella* possui alto teor proteico, contendo aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais e ácidos graxos poliinsaturados (ASSIS, 2012; ASSIS *et al.*, 2014).

Quanto as características morfológicas, esta microalga possui coloração esverdeada, unicelular ou colonial, com forma cocóidal medindo de 2-10 µm de diâmetro, imóveis (Figura 1) e a grande maioria são encontradas em ambientes de água doce, podendo também ser localizada em águas salobras. Possui apenas um cloroplasto e acumulam pigmentos como Clorofilas a e b, β-carotenos e xantofilas (BEIJERINCK, 1890; SHIHIRA, KRAUSS, 1965; NURACHMAN *et al.*, 2015).

**Figura 1:** Espécie de microalga *Chlorella vulgaris*



Fonte: <https://utex.org/products/utex->

Quanto as aplicações biotecnológicas, *Chlorella vulgaris* pode ser utilizada como suplemento ou como substância que agrega sabor e cor ao alimento (FRADIQUE *et al.*, 2010; LI, JIANG, CHEN, 2005), também pode servir de emulsão alimentar (FERNANDES *et al.*, 2002). Além disso, possui propriedades imunomoduladora, anticâncer e age no tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão e catarata, sendo capaz de promover a produção de colágeno na pele (YASUKAWA *et al.*, 1996; JUSTO, SILVA, QUEIROZ, 2001).

Tratando-se de biorremediação, esta microalga é uma forte candidata a eliminação de amônio e fósforo de águas residuais (GONZÁLEZ, CAÑIZARES, BAENA, 1997). Estudos recentes também comprovam atividade larvicida do extrato de *Chlorella* spp. contra o *A. aegypti* (SIGAMANI *et al.*, 2020).

## 2.4 Lectinas

Lectinas são proteínas amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontradas em organismos unicelulares até os multicelulares (DE SCHUTTER, VAN DAMME, 2015). Bactérias, algas, plantas, fungos, fluido corporal de invertebrados, vertebrados inferiores e membrana celular de mamíferos, têm se mostrado como fontes de lectinas (SINGH, TIWARY, KENNEDY, 1999). A maioria dos estudos realizados com lectinas provenientes de algas tem dado maior enfoque em macroalgas marinhas. Em contrapartida,

pesquisas voltadas as lectinas de microalgas são escassas e por essa razão, o estudo sobre essas proteínas e suas respectivas características são restritas. (NASCIMENTO, 2014).

Lectinas são caracterizadas por se ligarem a carboidratos específicos, glicoproteínas ou glicolipídios de maneira reversível e não covalente, por ação de uma cadeia polipeptídica específica interna a sua estrutura, também nomeada de domínio de reconhecimento de carboidratos (CAGLIARI *et al.*, 2018). Por apresentarem potencial biotecnológico elevado as lectinas são muito procuradas para processos de reconhecimento celular e molecular, farmacologia, bioquímica, medicina e análises clínicas (SANTOS *et al.*, 2014).

Diversas atividades biológicas são aplicadas as lectinas, tais como, anti-parasitaria (CASTANHEIRA *et al.*, 2015), antitumoral (ZHANG *et al.*, 2015), antimutagênico e antioxidante (FRASSINETTI *et al.*, 2015) antifúngica (CHIKALOVETS *et al.*, 2015), antibacteriana (CARVALHO *et al.*, 2015), antiviral (GORDTS *et al.*, 2015) e inseticida (NAPOLEÃO *et al.*, 2013). Lectinas possuem alta capacidade inseticida contra espécies de ordens como Coleoptera, Diptera, Homoptera e Lepidoptera (LAM, NG, 2011). Por meio de bioensaios que integram dietas artificiais a insetos com lectinas é possível verificar dados como crescimento, desenvolvimento, fecundidade, inibição da alimentação, efeitos antimetabólicos e mortalidade (COELHO *et al.*, 2009).

A lectina se apresenta como uma proteína de alta capacidade no controle da população de *Aedes aegypti*, considerada como armadilha para os ovos do mosquito, visto que essa proteína tem ação sobre a sobrevivência dos ovos bem como das larvas que vierem a surgir (AGRA, 2014).

#### 2.4.1 Mecanismo de ação das lectinas com ação inseticida

Um das características de proteínas com potencial inseticida é permanecer ativa por um período duradouro e provocar toxicidade no trato digestório do inseto, além disso necessitam ser resistentes a lise das substâncias proteicas intestinais (CARLINI, GROSSI-DE-SA, 2002). Segundo Fitches *et al.*, (2001), a lectina possui a habilidade de interromper a absorção de nutrientes e destruir as células intestinais ao se ligar à estrutura glicosilada no intestino do inseto. Além disso, quando ligada a matriz peritrófica pode provocar desintegração das enzimas digestivas (PEUMANS, VAN DAMME, 1995;



FITCHES *et al.*, 2001; MICHIELS *et al.*, 2010). Manter a integridade da matriz peritrófica é relevante para que ocorram os processos digestivos de modo compartimentado (HEGEDUS *et al.*, 2009).

Para Macedo *et al.*, (2007), é provável que as lectinas ocasionem modificações nas atividades enzimáticas, uma vez que podem se ligar a porção glicídica de enzimas glicosiladas; ao sítio que não é o de ligação ao substrato; ao substrato, ou a enzima e o substrato juntamente. A lectina do rizoma de *Microgramma vacciniifolia* foi capaz de inibir a atividade de tripsina do extrato intestinal de operários *Nasutitermes corniger* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012). Semelhantemente, a lectina de *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda*, apresentaram resistência a hidrólise de proteases intestinais do inseto *C. maculatus* (FREITAS *et al.*, 2011).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a atividade larvívica do extrato celular e de lectina de *Chlorella vulgaris* contra a larva no estágio L4 de *Aedes aegypti*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Selecionar a melhor concentração do extrato celular e lectina para a atividade larvívica;
2. Avaliar a inibição do extrato celular de *C. vulgaris* sobre a tripsina intestinal da larva L4 do *A. aegypti*.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Material

Micro-organismos fotossintetizantes: A microalga *Chlorella vulgaris* (Utex 1803) foi selecionada da coleção de cultura da Universidade do Texas.

Larvas do *Aedes aegypti*: As larvas de *Aedes aegypti* (subespécie Recife) foram cedidas pelo Professor Leucio Camara, coordenador do Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFRPE.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Obtenção da biomassa:

*Chlorella vulgaris* foi cultivada em Bold's Basal Medium (BISCHOFF e BOLD, 1963), a uma intensidade luminosa de  $43 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 30 °C, aerado constantemente com uma bomba de ar. No final da fase exponencial de crescimento, as células foram concentradas e armazenadas em freezer a -18 °C.

#### 4.2.2 Preparação do extrato celular da microalga:

A biomassa microalgal foi ressuspensa em tampão Tris-HCl-NaCl 0,1 M, pH 7,5 na concentração de 100 mg/mL (10% p/v) e homogeneizada por agitação magnética em banho de gelo por 9 horas, e temperatura a 25 °C (Cavalcanti *et al.*, 2016). O homogenato foi centrifugado, a 10.000 rpm por 8 minutos e o sobrenadante foi denominado de extrato celular e utilizado para a realização das análises experimentais.

#### 4.2.3 Purificação de lectinas:

O extrato celular foi precipitado em sulfato de amônio em uma fração de 60-80% (Cavalcanti *et al.*, 2016), centrifugado e o precipitado foi ressuspensa no mesmo tampão de extração e submetido a coluna cromatográfica de troca iônica aniônica DEAE – Sephadex, com fluxo de 1 ml/min e as proteínas foram monitoradas e coletadas a 280nm. As proteínas foram concentradas e submetidas a cromatografia por exclusão molecular Sephadex G75 com fluxo de 0,5 ml/min (CAVALCANTI *et al.*, 2016)

#### 4.2.4 Determinação de proteínas totais:

O teor proteico do extrato célula e lectina foram avaliados com o auxílio do kit BCA (BCA TM Protein Assay Kit, Thermo SCIENTIFIC).

#### 4.2.5 Determinação da atividade hemaglutinante (AH):

A determinação da atividade hemaglutinante do extrato celular e lectina foi realizada em placas de microtitulação de acordo com Correia e Coelho (1995) e o sangue coletado de acordo com o permitido pelo comitê de ética de número 2.362.590.

#### 4.2.6 Larvas de *Aedes aegypti* e bioensaio larvicida:

Os ovos de *A. aegypti* foram mantidos até a eclosão em recipientes contendo água destilada, por submersão, num limite de temperatura de 25–27 °C. Para o crescimento e muda das larvas até atingir o estágio L4, foi oferecida ração para gatos autoclavada. As larvas separadas foram utilizadas na determinação da atividade larvicida, em concentrações de proteína no extrato celular que variaram de 3,15 a 100% e a lectina de 25 a 200 µg mL<sup>-1</sup>, testadas de acordo com a metodologia de Navarro *et al.*, (2003), seguindo as recomendações da OMS. A morte larval foi considerada quando as larvas não apresentavam resposta a estímulos mecânicos e nem deslocamento até a superfície da solução. Todas as concentrações do experimento foram realizadas em triplicatas.

#### 4.2.7 Atividade inibidora de protease tipo tripsina do extrato intestinal L4 de *Aedes aegypti*:

As larvas em L4 foram imersas por 10 horas no extrato celular de *Chlorella vulgaris* com concentração proteica de 260 µg ml<sup>-1</sup> (LC<sub>50</sub>). Posteriormente, cerca de 20 larvas foram retiradas do bioensaio a cada 2 horas (2, 4, 6, 8 e 10 horas) lavadas com água destilada e o extrato total foi homogeneizado para a determinação atividade de tripsina. O controle da amostra foi avaliado com água destilada e o ensaio foi realizado em triplicata

A atividade da tripsina do extrato de intestino L4 foi realizada de acordo com Napoleão *et al.* (2012) com algumas modificações. Grupos de 50 larvas L4 vivas foram imobilizadas, colocando-os a 4 °C por 10 min. O intestino de cada larva foi homogeneizado com 1 mL de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo NaCl 0,15

M. O homogenato foi centrifugado (9000 g, 4°C, 15 min) e o sobrenadante (extrato de intestino L4) foi avaliado quanto a concentração de proteína e atividade de tripsina. Extrato de intestino L4 (20 µl) foi incubado (30 min, 37 °C) com 8 mM BApNA (5 µl) em tampão Tris (175 µl). A atividade enzimática foi seguida por medida da absorbância 405 nm (A405nm) (Kakade *et al.*, 1969). Uma unidade de atividade de tripsina foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µg de BApNA por minuto. O controle da hidrólise do substrato foi realizado por incubação (30 min, 37 ° C) de tripsina bovina (0,5 µg) com BApNA 8 mM (5 µl).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade larvicida com o extrato celular e a lectina revelaram toxicidade para as larvas de *A. aegypti*, sendo estas observadas em um período total de 72 horas em diferentes concentrações. Com o aumento da concentração do extrato celular, observou-se maior mortalidade larval, isso indica que os possíveis bioativos da *Chlorella vulgaris*, como proteínas, terpenos, flavonoides, podem ter atuado de forma sinérgica. Em contrapartida, os extratos em menores concentrações necessitaram de um período prolongado para produzir efeito larvicida (Figura 2A).

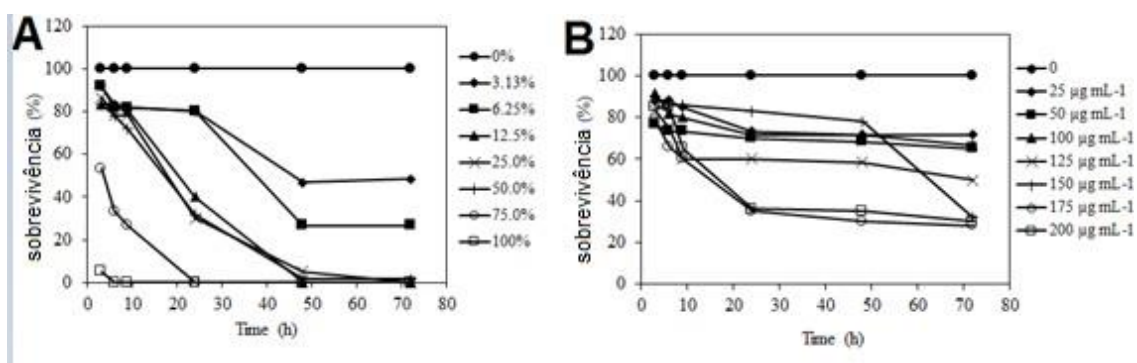
Utilizando o extrato celular na concentração de 100%, observou-se que todas as larvas morreram após 3 horas. Na concentração de 75%, todas as larvas morreram após 24 horas. Nas concentrações entre 12,5 e 50 %, todas as larvas morreram após 48 horas. Nas concentrações entre 3,12 e 6,25 % não houve 100 % de mortalidade. Sendo assim, foi definido a LC<sub>50</sub> no tempo de 3 horas (LC<sub>50</sub> = 43,50%) e 24 horas (LC<sub>50</sub> = 10,62%). Com o aumento do tempo a mortalidade larval foi maior, por essa razão não pôde ser definido a LC<sub>50</sub> no tempo de 48 e 72 horas, pois houve uma quantidade considerável de larvas mortas.

. A toxidade do extrato celular de *Chlorella vulgaris* resultou em perda total de biomassa nas larvas, outros estudos também revelaram alteração morfológicas. Segundo Kanis *et al.*, (2018) as larvas de *A. aegypti* quando expostas ao extrato de *Piper ovatum* teve o exoesqueleto reduzido e o

aparecimento de partes escuras no sifão respiratório. Similarmente, Sigamani *et al.*, (2020) comprovou em seu estudo a eficácia de extrato de clorofórmio de *Chlorella* spp. contra a larvas de *Aedes aegypti* no terceiro estágio. A composição presente no extrato dessa espécie, tais como ácido hexadecanóico, ácido oleico,  $\beta$ -sitosterol, possivelmente promoveu o efeito larvicida

Thongwat *et al.*, (2017), observou alta atividade larvicida do extrato etanólico de *Dracaena loureiri* contra o terceiro estágio de *A aegypti*. A literatura é escassa de estudo com extrato celular de microalgas, entretanto, a utilização de extrato vegetal, apresenta uma relevância de atividade tão quanto do exposto trabalho, pois traz mais uma alternativa na ciclagem de bioinseticidas.

**Figura 2:** Atividade larvicida do extrato celular e (A) lectina de *C. vulgaris* (B).



Com relação ao resultado de lectina, até as 24 horas a mortalidade larval se manteve instável, em decorrência disso as larvas testadas no período de 3, 6, e 9 horas não obtiveram  $LC_{50}$  definida. Enquanto o período testado com 24 horas resultou em uma  $LC_{50}$   $164,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ , 48 horas  $125,3 \mu\text{g ml}^{-1}$  e 106,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Apesar de não ter ocorrido 100% de mortalidade, as concentrações acima de  $175 \mu\text{g ml}^{-1}$  mataram 60% das larvas após 24 horas, atuando assim como um potencial larvicida.

.De maneira oposta, Coelho *et al.* (2009) testaram a lectina de *Moringa oleifera* (WSMoL) e apresentou atividade inseticida contra o quarto estágio larval (L4) de *A. aegypti* com uma concentração consideravelmente mais alta  $197 \mu\text{g ml}^{-1}$ , quando comparado a concentração da lectina de *Chlorella vulgaris* nos 3 diferentes tempos, promovendo alterações morfológicas no trato digestivo. Isso demonstra que o potencial bioinseticida da lectina de *C. vulgaris* é acentuado

mesmo em pequenas concentrações, o que possivelmente impactaria menos ambientalmente.

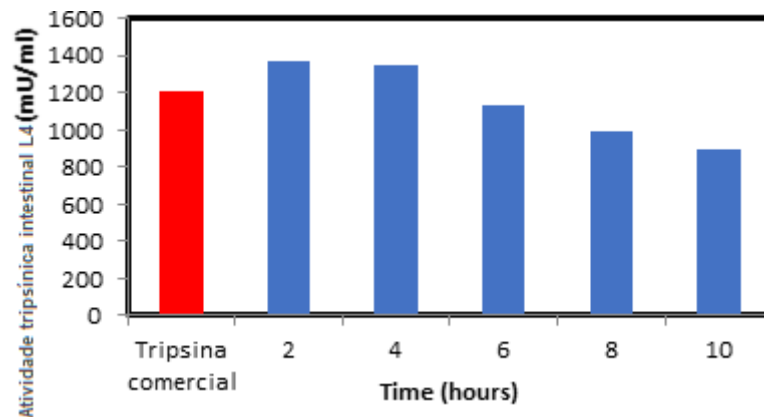
Oliveira *et al.*, (2016) observaram valores superiores de LC<sub>50</sub> para lectina isolada de *Moringa Oleifera*. A fração de lectina isolada (WSMoLc) teve um resultado de 890 µg ml<sup>-1</sup>, necessitando de concentrações maiores que as encontradas no presente trabalho, a fim de apresentar mortalidade de 50% dos indivíduos testados.

A literatura traz informações importantes como a atividade larvívica de lectinas extraídas da torta de *Azadirachta indica*, contra mosquitos de *Culex quinquefasciatus*, *Aedes albopictus* e *A. aegypti*, porém até o momento continua sem dados sobre atividade larvívica de lectinas extraídas de microalgas e seus possíveis mecanismos de ação.

A LC<sub>50</sub> do extrato de *Chlorella vulgaris* usada para observação do mecanismo de ação foi correspondente a 260 µg ml<sup>-1</sup> de proteína com 24 horas (resultado obtidos previamente). Na figura 3 mostra que entre as 2 primeiras horas de incubação das larvas (L4) com o extrato celular de *C.vulgaris*, não houve diferença significativa na redução de atividade, no entanto a partir das 4 horas a atividade iniciou um decaimento gradativo. De 2 horas para 4 horas a atividade reduziu 1,85%, de 4 para 6 horas a atividade reduziu 15,6% sendo essa a redução mais expressiva, de 6 para 8 horas a atividade reduziu 9,88%, e de 8 para 10 horas a atividade reduziu 7,64%. O tempo de menor atividade foi atingindo com 10 horas resultando em uma absorbância de 893,3 mU/mL.

Estes resultados indicam que as possíveis moléculas bioativas presentes no extrato celular, estavam atuando como um inibidor de tripsina. Uma das explicações para esse mecanismo de inibição a tripsina por ação de inseticidas, pode ser dada pela redução na absorção de nutrientes uma vez que a atividade catalítica da enzima é afetada, provocando a morte do inseto por comprometimento dos alimentos de fontes proteicas. (BHATTACHARYYA, LEIGHTON, BABU, 2007).

**Figura 3:** Avaliação do extrato celular de *Chlorella vulgaris* na atividade da tripsina do quarto instar larval de *Aedes aegypti* in vivo



O mesmo foi observado por Pontual *et al.*, (2012), houve redução significativa na atividade da tripsina intestinal do *Aedes aegypti* no estágio L4 à medida que as larvas foram tratadas com o extrato de flores de *Moringa Oleifera*, sendo o tempo de melhor atividade após 5 horas e 10 minutos de incubação, resultando em 98,6% de inibição. Outros autores na literatura também relataram diminuição na atividade da tripsina deste inseto como Almeida *et al.*, (2017) que ao testar o inibidor de tripsina de sementes de *Leucaena leucocephala* com o extrato intestinal, obteve redução de 56% da atividade proteolítica após 24 horas de incubação.

Conforme descrito por Pontual *et al.*, (2012) e Paiva *et al.*, (2013), as proteases são essenciais para que ocorra absorção de nutrientes e, quando inibidores de tripsina são ingeridos por um longo período é provocado a inibição dessas proteases acarretando complicações como a morte ou atrasando no desenvolvimento. Silva *et al.*, (2015) diferente do presente estudo, realizou a atividade das proteases intestinais *in vitro* com um inibidor purificado de *Ricinus communis* L., mostrando 91% de inibição.

Bhattacharyya, Mazumdar, Babu (2007), apesar de não ter testado na larva de *Aedes aegypti* e ter realizado o teste *in vitro*, observou um decaimento de 68% na atividade tripsínica no quinto instar larval de *Spodoptera litura*. Este trabalho diverge dos dois últimos resultados apresentados, uma vez que foi realizado em condições *in vivo* correspondente a uma maior realidade do

organismo vivo. Nesse sentido, os inibidores de proteases, em especial os inibidores de tripsina, podem surgir como uma alternativa natural de larvicidas.

## **6. CONCLUSÃO**

Microalgas são fontes de biomoléculas com importantes atividades biológicas, o que é crucial para diferentes áreas da biotecnologia, saúde humana e indústrias farmacêuticas. O extrato celular e a lectina de *Chlorella vulgaris* são uma fonte de compostos inseticidas que atuam matando larvas L4 de *Aedes aegypti*, com potencial uso no controle da dengue, pela prevenção de que esses insetos se espalhem em áreas urbanas, tornando-se uma alternativa biodegradável na área inseticida. Este trabalho abre novas perspectivas no que diz respeito ao foco em identificação de compostos tóxicos para larvas extraídas de micro-organismos fotossintetizantes, sem influência em espécies não-alvo.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, T. M.; MONTEIRO, V. S.; MARTINS, A. B. S.; TELES, F. B.; RIVANOR, C. R. L.; MOTA, E. F.; MACEDO, D. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; HONÓRIO JÚNIOR, J. E. R.; BENEVIDES, N. M. B. Involvement of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of the lectin isolated from the red marine alga *Solieria filiformis* in mice. **International journal of biological macromolecules**, v. 111, p. 534-541, 2018.

AGRA, N. A. C. **Avaliação do potencial inseticida de lectinas de sementes de *Moringa oleifera* contra larvas de *Aedes aegypti* resistentes e susceptíveis a organofosfatos e adultos desitophilus zeamais**. Tese(doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

ALASWAD, A.; DASSISTI, M.; PRESCOTT, T.; OLABI, A.G. Technologies and developments of third generation biofuel production. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v.51, p. 1446-1460, 2015.

ALBUQUERQUE, L. P.; DE SÁ SANTANA, G. M.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International biodeterioration & biodegradation**, v. 75, p. 158-166, 2012.

ALMEIDA FILHO, L. C. P.; DE SOUZA, T. M.; TABOSA, P. M. S.; SOARES, N. G., ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; VASCONCELOS, I. M.; CARVALHO, A. F. Trypsin inhibitor from *Leucaena leucocephala* seeds delays and disrupts the development of *Aedes aegypti*, a multiple-disease vector. **Pest management science**, v. 73, n. 1, p. 181-187, 2017.

ALMEIDA FILHO, L. C. P.; SOUZA, T. M.; TABOSA, P. M. S.; SOARES, N. G.; ROCHABEZERRA, L. C. B.; VASCONCELOS, I. M.; CARVALHO, A. F. U. Trypsin inhibitor from *Leucaena leucocephala* seeds delays and disrupts the development of *Aedes aegypti*, a multiple-disease vector. **Pest Management Science**, Londres, v. 73, p. 181-187, 2016

ASSIS, L. M.; MACHADO, A. R.; MOTTA, A. S.; COSTA, J. A.V.; SOARES, L.A.S. Development and characterization of nanovesicles containing phenolic compounds of microalgae *Spirulina* strain LEB-18 and *Chlorella pyrenoidosa*. **Advances in Materials Physics and Chemistry**, vol. 4, n. 1, p. 6-12, 2014.

ASSIS, L.M. **Atividade antioxidante de extratos de microalgas *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa* e estudo da sua nanoencapsulação em lipossomas**. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande Rio Grande, 2012

ASSUNÇÃO, M. F. G. **Pesquisa de compostos bioativos em microalgas da Algoteca de Coimbra (ACOI)**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade de Coimbra, 2014.

BARRETO, C. F. *Aedes aegypti*-Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 1, n. 2, p. 62-73, 2005.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E. A. The MEROPS database as a protease information system. **Journal of structural biology**, v. 134, n. 2-3, p. 95-102,

2001.

BEIJERINCK, M.W. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. **Botanische Zeitung**, v. 47, p. 725-739, 1890.

BEWLEY, C. A.; CAI, M.; RAY, S.; GHIRLANDO, R.; YAMAGUCHI, M.; MURAMOTO, K. New carbohydrate specificity and HIV-1 fusion blocking activity of the cyanobacterial protein MVL: NMR, ITC and sedimentation equilibrium studies. **Journal of Molecular Biology**, v. 339, n. 4, p. 901–914, 2004.

BHATTACHARYYA, A.; RAI, S.; BABU, C. R. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Caesalpinia bonduc* seeds: isolation, partial characterization and insecticidal properties. **Plant Physiol Biochem**. 45, 169-177, 2007.

BHAVYA, M. L.; CHANDU, A. G. S.; DEVI, S. S. Ocimum tenuiflorum oil, a potential insecticide against rice weevil with anti-acetylcholinesterase activity. **Industrial crops and products**, v. 126, p. 434-439, 2018.

BOKESCH, H. R.; O'KEEFE, B. R.; MCKEE, T. C.; PANNELL, L. K.; PATTERSON, G. M.; GARDELLA, R. S.; SOWDER, RC 2ND.; TURPIN, J.; WATSON, K.; BUCKHEIT, RW JR.; BOYD, M. R. A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium, *Scytonema varium*. **Biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 2578–2584, 2003.

BOROWITZKA, M.A. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. **Micro-algal biotechnology**. Edited by Borowitzka LJ. New York: Cambridge University Press; p. 153, 1988.

BOYD, M. R.; GUSTAFSON, K. R.; MCMAHON, J. B.; SHOEMAKER, R. H.; O'KEEFE, B. R.; MORI, T.; GULAKOWSKI, R. J.; WU, L.; RIVERA, M. I.; LAURENCOT, C. M.; CURRENS, M. J.; CARDELLINA, JH 2ND.; BUCKHEIT, R.W JR.; NARA, P. L.; PANNELL, L. K.; SOWDER, R. C.; 2ND.; HENDERSON, L. E. Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus- inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 7, p. 1521–1530, 1997.

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

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia da Vigilância em Saúde. Volume único Brasília: MS, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Controle de vetores. 2014. <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/controle-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/controle-de-vetores>. Disponível em: Acessado em 06 de Janeiro de 2020.

BRILLATZ, T.; LAURITANO, C.; JACMIN, M.; KHAMMA, S.; MARCOURT, L.; RIGHI, D.; ROMANO, G.; ESPOSITO, F.; IANORA, A.; QUEIROZ, E.F.; WOLFENDER J, L; CRAWFORD, A.D. Zebrafish-based identification of the antiseizure nucleoside inosine from the marine diatom *Skeletonema marinoi*. **PLoS one**, v. 13, n. 4, p. e0196195, 2018.

CAGLIARI, R.; KREMER, F. S.; PINTO, L. S. Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 811-820, 2018.

CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potential as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515–1539, 2002.

CARVALHO, A. S.; SILVA, M. V.; GOMES, F. S.; PAIVA, P. M. G. P.; MALAFAIA, C. B.; SILVA, D. T.; VAZ, A. F. M.; SILVA, A. G.; ARRUDA, I. R. S.; NAPOLEÃO, T. H.; CUNHA, M. G. C.; CORREIA, M. T. S. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.75, p. 402–408, 2015.

CASTANHEIRA, L.; SOUZA, D. L. N.; SILVA, R. J.; BARBOSA, B.; MINEO, J. R.; TUDINI, K.A.; RODRIGUES, R.; FERRO, E.V.; RODRIGUES, V.M. Insights into anti-parasitism induced by a C-type lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.74, p. 568–574, 2015.

CAVALCANTI, V. L. R.; SANTOS, A. R.; SILVA, M. L.; COSTA, R. M. P. B.; SILVA, A. J.; ALVES, L. C.; CADENA, P. G.; PORTO, A. L. F.; BEZERRA, R. P. LARVICIDA ORGÂNICO E BIODEGRADÁVEL CONTENDO LECTINA PRODUZIDO A PARTIR DE MICRO-ORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES. 2018, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020180735810, título: "LARVICIDA ORGÂNICO E BIODEGRADÁVEL CONTENDO LECTINA PRODUZIDO A PARTIR DE MICRO-ORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 14/11/2018.

CHELLAPPANDIAN, M.; VASANTHA-SRINIVASAN, P.; SENTHIL-NATHAN, S.; KARTHI, S.; THANIGAIVEL, A.; PONSANKAR, A.; KALAIVANI, K.; HUNTER, W. B. Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. **Environment international**, v. 113, p. 214-230, 2018.

CHEN, X.; SONG, L.; WANG, H.; LIU, S.; YU, H.; WANG, X.; LI, R.; LIU, T.; LI, P. Partial characterization, the immune modulation and anticancer activities of sulfated polysaccharides from filamentous microalgae *tribonema* sp. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 322, 2019.

CHIKALOVETS, I.V.; CHERNIKOV, O.V.; PIVKIN, M.V.; MOLCHANOVA, V.I.; LITOVCHENKO, A.P.; LI, W.; LUKYANOV, P.A. A lectin with antifungal activity from the mussel *Crenomytilus grayanus*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 42, n. 2 p. 503–507, 2015.

CHU, C. Y.; HUANG, R.; LIN, L.P. Purification and characterization of a novel haemagglutinin from *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, Heidelberg**, v. 33, n. 11, p. 967-973, 2006.

CLEMONS, A.; HAUGEN, M.; FLANNERY, E.; TOMCHANEY, M.; KAST, K.; JACOWSKI, C.; LE, C.; MORI, A.; HOLLAND, W. S.; SARRO, J.; SEVERSON, D. W.; SCHEEL, M. D. *Aedes aegypti*: an emerging model for vector mosquito development, **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2010, n. 10 p.1 -17, 2010.

COELHO, J. S.; SANTOS, N. D.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; FERREIRA, R. S.; ZINGALI, R. B.; COELHO, L.C. C. B.; LEITE, S.P.; NAVARRO, D.A.F.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere*, v. 77, n. 7, p. 934-938, 2009.

DANTAS, D. M. M. **Atividades biológicas das preparações obtidas das Clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* Chodat e suas potenciais aplicações biotecnológicas**. Dissertação (tese de doutorado), Programa de Pós-

graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife , 2013.

DE SCHUTTER, K.; VAN DAMME, E. J. Protein-Carbohydrate Interactions as Part of Plant Defense and Animal Immunity. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9029-9053, 2015.

DIAS, L. B. A.; ALMEIDA, S. C. L.; HAES, T.M.; MOTA, L. M.; FILHO, J. S. R. Dengue: transmissão, aspectos clínicos diagnóstico e tratamento. In: SIMPÓSIO CONDUTAS EM ENFERMARIA DE CLÍNICA MÉDICA DE HOSPITAL DE MÉDIA COMPLEXIDADE, parte 1, cap.VI, v. 43, n.2, p. 143-152, Ribeirão Preto-SP, 2010.

DIAS, L. P. **Purificação e caracterização bioquímica de um inibidor de tripsina de sementes de *Cassia leiandra Benth.* e avaliação de sua atividade inseticida contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** 2016. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016

DIAS, L. P.; OLIVEIRA, J. T. A.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; SOUSA, D. O. B.; COSTA, H. P. S.; ARAUJO, N. M. S.; CARVALHO, A. F. U.; TABOSA, P. M. S.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; LOBO, M. D. P.; ROCHA, B. A. M.; LOPES, J. L. S.; BELTRAMINI, L. M.; VASCONCELOS, I. M. A trypsin inhibitor purified from *Cassia leiandra* seeds has insecticidal activity against *Aedes aegypti*. **Process Biochemistry**, v. 57, p. 228-238, 2017.

DYE, C. The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. **Annual review of entomology**, v. 37, n. 1, p. 1-19, 1992.

FAIRLIE, D. P.; TYNDALL, J. D.; REID, R. C.; WONG, A. K.; ABBENANTE, G.; SCANLON, M. J.; BURKETT, B. A. Conformational selection of inhibitors and substrates by proteolytic enzymes: implications for drug design and polypeptide processing. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1271-1281, 2000.

FERNANDES, B.; DRAGONE, G.; ABREU, A.; GEADA, P.; TEIXEIRA, J.; VICENTE, A. Starch determination in *Chlorella vulgaris*—a comparison between acid and enzymatic methods. **Journal of applied phycology**, v. 24, n. 5, p. 1203-1208, 2012.

FERRARI, J. A. Insecticide resistance In: *The Biology of Disease Vectors*. Colorado: University Press of Colorado; 1996.

FFRENCH–CONSTANT, R. H.; PITTENDRIGH, B.; VAUGHAN, A.; ANTHONY, N. Why are there so few resistance–associated mutations in insecticide target genes?. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 353, n. 1376, p. 1685-1693, 1998.

FITCHES, E.; WOODHOUSE, S.D.; EDWARDS, J.P.; GATEHOUSE, J.A. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis agglutinin*; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 7, p. 777-787, 2001.

FITCHES, E.; WOODHOUSE, S.D.; EDWARDS, J.P.; GATEHOUSE, J.A. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis agglutinin*; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 7, p. 777-787, 2001.

FRADIQUE, M.; BATISTA, A. P.; NUNES, M. C.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N. M.; RAYMUNDO, A. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in

pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 10, p. 1656-1664, 2010.

FRASSINETTI, S.; GABRIELE, M.; CALTAVUTURO, L.; LONGO, V.; PUCCI, L. Antimutagenic and Antioxidant Activity of a Selected Lectin-free Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Two Cell-based Models. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, n. 1, p. 35–41, 2015.

FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V.; SOUZA, D. P.; MARINHO-FILHO, J. D. B.; TEIXEIRA, F. M.; OLIVEIRA, J. S. Correlações entre atividade inseticida e resistência a proteólise de duas lectinas vegetais glicose/manose. **Comunicata Scientiae**, v. 2, n. 1, p. 34-41, 2011.

GOMES, F. B. C. *Aedes aegypti* - (Estudo técnico). Consultoria Legislativa, Câmara dos Deputados, Brasília- DF, 2016. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/estudos-e-notas-tecnicas/publicacoes-da-consultoria-legislativa/fiquePorDentro/temas/aedes-aegypti/texto-base-da-consultoria-legislativa>. Acessado em 06 de janeiro de 2020.

GONZÁLEZ, L. E.; CANIZARES, R. O.; BAENA, S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource technology**, v. 60, n. 3, p. 259-262, 1997.

GORDTS, S. C.; RENDERS, M.; FERIR, G.; HUSKENS, D.; VAN, D. E. J.; PEUMANS, W.; BALZARINI, J.; SCHOLS, D. NICTABA and UDA, two GlcNAc-binding lectins with unique antiviral activity profiles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 6 p. 1674– 1685, 2015.

GOUVEIA, L. **Microalgae as a Feedstock for Biofuels**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 1-69, 2011.

GOVINDARAJAN, M.; BENELLI, G. Eco-friendly larvicidas from Indian plants: Effectiveness of lavandulyl acetate and bicyclogermacrene on malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, USA, v. 133, p. 395-402, 2016.

GROBBELAAR, J. U.; BORNMAN, C. H. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. **South African Journal of Botany**, v. 70, n. 1, p. 140-144, 2004.

GUEDES, A. C; MALCATA, F.X. Nutricional value and uses of microalgae in aquaculture. **Aquaculture**, 2012.

GUILLENA, J.B.; OPENA, E.L.; BAGUIO, M.L. Prevalence of dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF): a description and forecasting. In: **Proceedings of the 11th National Convention on Statistics (NCS'10)**. 2010.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v. 45, p.160-186, 2006.

GUZMAN, A.; ISTÚRIZ, R. E. Update on the global spread of dengue. **International journal of antimicrobial agents**, v. 36, p. S40-S42,2010.

HEGEDUS, D. D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; TOPRAK, U. Peritrophic matrix synthesis, architecture and function: new insights. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 285–302, 2009.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual review of entomology**, v. 45, n. 1, p. 371-391, 2000.

HONÓRIO, N. A.; CASTRO, M. G.; BARROS, F. S. M. D.; MAGALHÃES, M. D. A. F. M.; SABROZA, P. C. The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, p. 1203-1214, 2009.

Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Dengue, vírus e vetor: Curiosidade sobre o *A. aegypti*. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/curiosidades.html>. Acessado em 06 de Janeiro de 2020.

Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Estratégias de Controle do Vetor. Disponível em: <http://auladengue.ioc.fiocruz.br/?p=86>. Acessado em 06 de Janeiro de 2020.

JUSTO, G. Z, SILVA, M. R, QUEIROZ, M.L. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 23, n. 1, p. 119-132, 2001.

KANIS, L.A; RABELO, B.D; MOTERLE, D; CUSTÓDIO. K.M; OLIVEIRA J.G; LEMOS, A.B; SILVA, O.S; ZEPON, K.M; MAGNAGO, R.F; PROPHIRO J.S. *Piper ovatum* (piperaceae) extract/starch-cellulose films to control *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) larvae. **Industrial crops and products**, v. 122, p. 148-155, 2018.

KIRROLIA, A.; BISHNOI, N.R; SINGH, R. Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 20, p. 642-656, 2013.

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

LI, HUA-BIN.; JIANG, YUE.; CHEN, FENG. Isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by extraction after saponification. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 5, p. 1070-1072, 2002.

LIMA, A. C. S. **Mecanismos que atenuam o custo de fitness de mutações associadas à resistência a inseticidas em artrópodes: um levantamento bibliográfico**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

MAAZOUN, A. M.; HLEL, T. B.; HAMDY, S. H.; BELHADJ, F.; JEMÂA, J. M. B.; MARZOUKI, M. N. Screening for insecticidal potential and acetylcholinesterase activity inhibition of *Urginea maritima* bulbs extract for the control of *Sitophilus oryzae* (L.). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 20, n. 3, p. 752-760, 2017.

MACEDO, M. L. R., FREIRE, M. D. G. M., DA SILVA, M. B. R., & COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of bauhinia monandra leaf lectin (bmoll) against anagasta kuehniella (lepidoptera: pyralidae), zabrotes subfasciatus and callosobruchus maculatus (coleoptera: bruchidae). **comparative biochemistry and physiology part a: molecular & integrative physiology**, v. 146, n. 4, p. 486-498, 2007.

MARRIEL, N. B.; TOMÉ, H. V. V.; GUEDES, R. C. N.; MARTINS, G. F. Deltamethrin-mediated survival, behavior, and oenocyte morphology of insecticide-susceptible and resistant yellow fever mosquitos (*Aedes aegypti*). **Acta tropica**, v. 158, p. 88-96, 2016.

MARTINEZ ANDRADE, K.A.; LAURITANO, C.; ROMANO, G.; IANORA, A. Marine microalgae with anti-cancer properties. **Marine Drugs**, v. 16, n. 5, p. 165, 2018.

MARTÍNEZ, K.A.; LAURITANO, C.; DRUKA, D.; ROMANO, G.; GROHMANN, T.; JASPARS, M.; MARTÍN, J.; DÍAZ, C.; CAUTAIN, B.; DE LA CRUZ, M.; IANORA, A.; REYES, F. Amphidinol 22, a new cytotoxic and antifungal amphidinol from the dinoflagellate *Amphidinium carterae*. **Marine drugs**, v. 17, n. 7, p. 385, 2019.

MENDES, M. C. Q.; GONZALEZ, A. A. C.; MENEZES, M.; NUNES, J. M. C.; PEREIRA, S.; NASCIMENTO, I. A. Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para a produção de biocombustíveis: uma abordagem taxonômica. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 3: p. 691-696, 2012.

METCALF, J. S.; BRUNO, M. **Anatoxin-a(s)**. In: MERILUOTO, J., SPOOF, L., CODD, G. **Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis**. John Wiley & Sons, 2017.

MICHIELS, K.; VAN DAMME, A.; SMAGGHE, G. Plant-Insect interactions: What can we learn from plant lectins? **Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v. 73, n. 4, p. 193-212, 2010..

MONTERO-LOBATO, Z.; VAZQUEZ, M.; NAVARRO, F.; FUENTES, J.L.; BERMEJO, E.; GARBAYO, I.; VILCHEZ, C.; CUARESMA, M. Chemically-induced production of anti-inflammatory molecules in microalgae. **Marine drugs**, v. 16, n. 12, p. 478, 2018.

MOSTAFA, S. S. Microalgal biotechnology: prospects and applications. **Plant Science**, p. 275-314, 2012.

NAPOLEÃO, T. H. **Atividade inseticida e mecanismos de ação de lectinas de *Myracrodruon urundeuva* contra *Nasutitermes corniger*, *Aedes aegypti* e *Sitophilus zeamais***. 2012 . Tese (Doutorado). programa de pós-graduação em bioquímica e fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

NAPOLEÃO, T. H.; BELMONTE, B. R.; PONTUAL, E.V.; ALBUQUERQUE, L. P.; SÁ, R. A.; PAIVA, L. M.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 54, p. 26-33, 2013.

NASCIMENTO A. A.; Reis J. B.; Filho VEM. Atividade larvicida do óleo essencial de cravo-da-índia: Extração, caracterização e atividade larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti*. Brasil: Editora Novas Edições Acadêmicas, 2012.

NASCIMENTO, A. S. F. **Lectinas recombinantes das algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux e *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) M. Howe: produção heteróloga e caracterização bioquímica**. Tese (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará Centro de Ciências, Fortaleza, 2014.

NIU, Y. F.; ZHANG, M. H.; XIE, W. H.; LI, J. N.; GAO, Y. F.; YANG, W. D.; LIU, J.S.; LI, H. Y. A new inducible expression system in a transformed green alga, *Chlorella vulgaris*. **Genet Mol Res**, v. 10, n. 4, p. 3427-34, 2011.

NURACHMAN, Z.; HARTINI, H.; RAHMANIYAH, W. R.; KURNIA, D.; HIDAYAT, R.; PRIJAMBOEDI, B.; SUENDOC, V.; RATNANINGSIH, E.; PANGGABEAN, L.M.G.; NURBAITI, S. Tropical marine *Chlorella sp.* PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells. **Algal Research**, v.10, p.25–32, 2015.

OLIVEIRA, A.P.S; SILVA, L.LS; LIMA, T.A; PONTUAL, E.V; SANTOS, N.D.L; COELHO, L.C.B.B; NAVARRO, D.M.A.F; ZINGALI, R.B; NAPOLEÃO, T.H; PAIVA, P.M.G. Biotechnological value of *Moringa oleifera* seed cake as source of insecticidal lectin against *Aedes aegypti*. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1683-1690, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 5, 2020. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/fevereiro/19/Boletim-epidemiologico-SVS-07.pdf>. Acessado em 11 de Março de 2020

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya, zika), semanas epidemiológicas 1 a 36, 2020. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/September/24/Boletim-epidemiologico-SVS-38.pdf>. Acessado em 23 de outubro de 2020.

PAIVA, P. M. G., NAPOLEÃO, T. H., SANTOS, N. D. L., CORREIA, M. T. S., NAVARRO, D. M. A. F., & COELHO, L. C. B. B. Plant compounds with *Aedes aegypti* larvicidal activity and other biological properties. **Bioprocess sciences and technology**. New York: Nova Publishers Inc, p. 269-94, 2011.

PAIVA, P. M. G.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v. 1, p. 396-406, 2010.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectin as plant defense proteins. **Plant-Physiology**. v. 109, p. 347–352, 1995.

PIENKOS, P.T.; DARZINS, A. L. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy**, v. 3, n. 4, p. 431-440, 2009.

POLSON, K. A.; BROGDON, W. G.; RAWLINS, S. C.; CHADEE, D. D. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitos. **Acta tropica**, v.117, n.1, p. 31-38, 2011.

PONTUAL, E. V. **Extrato de flores de *Moringa oleifera*: atividade larvicida e efeito sobre tripsina e acetilcolinesterase de larvas de *Aedes aegypti***. 2010. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

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

PORTO, C. R. P. **Avaliação do efeito larvicida dos componentes proteicos e do óleo de *Crambe abyssinica hochst* frente ao mosquito vetor *Aedes aegypti***. 2018. Dissertação (Mestrado). PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



VEGETAL, UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO, Rio de Janeiro, 2018.

RAVINDRAN, B.; KURADE, M.B.; KABRA, A.N.; JEON, B. H.; GRUPTA, S.K. Recent Advances and Future Prospects of Microalgal Lipid Biotechnology, In: Gupta S., Malik A., Bux F. (eds) **Algal Biofuels**, 2017.

RICHARDSON, M. Seeds storage proteins: the enzyme inhibitor. In: Methods in Plant Biochemistry (edited by Verma D. P. S. and Hohn T. H), Springer Verlag, New York, p. 375-386, 1991.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, v. 577, 2004.

ROCHA, D. R.; PAIVA, M. H. S.; SILVA, N. M.; ARAÚJO, A. P.; CAMACHO, D. R. R. A.; MOURA, A. J. F.; GÓMEZ, L. F.; AYRESA, C. F. J.; SANTOS, M. A. V. M. Susceptibility profile of *Aedes aegypti* from Santiago Island, Cabo Verde, to insecticides. **Acta Tropica**, v. 152, p. 66-73, 2015

RODRIGUEZ-LUNA, A.; AVILA-ROMAN, J.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M.L.; COZAR, M.J.; RABASCO, A.M.; MOTILVA, V.; RODRIGUEZ-LUNA, A.; AVILA-ROMAN, J.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M.L.; COZAR, M.J.; RABASCO, A.M.; MOTILVA, V.; RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Londres, v. 28, p. 425-449, 1990.

SANO, T.; TANAKA, Y. Effect of dried, powdered *Chlorella vulgaris* on experimental atherosclerosis and alimentary hypercholesterolemia in cholesterol-fed rabbits. **Artery**, v. 14, n. 2, p. 76-84, 1987.

SANTOS, A.F.; SILVA, M.; NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications, **Curr. Top. Pept. Protein Res**, v. 15, p. 41-62, 2014.

SANTOS, G. K.; DUTRA, K. A.; LIRA, C. S.; LIMA, B. N.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M.; MARANHÃO, A. C.; BRANDÃO, S. S. F.; NAVARRO, D. M. Effects of *Croton rhamnifolioides* essential oil on *Aedes aegypti* oviposition, larval toxicity and trypsin activity. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16573-16587, 2014.

SASAKI, D. Y.; JACOBOWSKI, A. C.; SOUZA, A. P.; CARDOSO, M. H.; FRANCO, O. L.; MACEDO, M. L. R. Effects of proteinase inhibitor from *Adenanthera pavonina* seeds on short-and long term larval development of *Aedes aegypti*. **Biochimie**, v. 112, p. 172-186, 2015.

SATO, Y.; MURAKAMI, M.; MIYAZAWA, K.; HORI, K. Purification and characterization of a novel lectin from a fresh water cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 125, p. 169-177, 2000.

SCHUBERT L.E. The use of spirulina and chlorella as food resource for animals and humans. **Progressing physiological research**, v. 23, 1988.

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

SHAMSI, T. N.; PARVEEN, R.; FATIMA, S. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 91, p. 1120-1133, 2016.

SHIHIRA, I.; KRAUSS, R. W. **Chlorella: physiology and taxonomy of forty-one isolates**, p. 97, Maryland: University of Maryland, College Park, 1965.

SIGAMANI, S.; CHINNASAMY, R.; DHARMARAJ, R. K.; RAMAMURTHY, D.; DEVARAJAN, N.; NARAYANASAMY, M.; NATARAJAN, H. Larvicidal potency of the extracts from *Chlorella* sp. against *Aedes aegypti*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, p. 101663, 2020.

SILVA, J. S.; MARIANO Z.F.; SCOPEL, I. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle. **Hygeia**, v. 3, p. 163-175, 2008.

SILVA, L.S. **INIBIÇÃO DE ACETILCOLINESTERASE E  $\alpha$ -AMILASE POR EXTRATO DAS FOLHAS DE *Mouriri elliptica martius***. 2016. Dissertação (Mestrado). PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA. INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO. Rio Verde, 2016.

SILVA, P. M. **Potencial antimicrobiano da lectina da sarcotesta de *Punica granatum* (PgTeL) contra patógenos humanos**. (2019). Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em bioquímica e fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

SILVA, R. G.; VASCONCELOS, I. M.; ACRÍSIO FILHO, J. U. B.; CARVALHO, A. F.; SOUZA T. M.; GONDIM, D. M.; OLIVEIRA, J. T. Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 48-55, 2015.

SINGH, R. S.; TIWARY, A. K.; KENNEDY, J. F. Lectins: sources, activities and applications, **Crit. Rev. Biotechnol**, v. 19, p. 145–178.11, 1999

SOARES, T.S. **Estudos moleculares de enzimas do tipo tripsina presentes no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti***. (2009). Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

STEVENS, J., DUNSE, K., FOX, J., EVANS, S., ANDERSON, M. Biotechnological approaches for the control of insect pests in crop plants. **Pesticides-Advances in Chemical and Botanical Pesticides**, Soundararajan RP, editor. **InTech**, p. 269-308, 2012.

TALERO, E. Fucoxanthin-containing cream prevents epidermal hyperplasia and UVB-induced skin erythema in mice. **Marine drugs**, v. 16, n. 10, p. 378, 2018.

TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. (*Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico das arbovirose no Brasil. **JBES: Brazilian Journal of Health Economics/Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 9, n. 3, 2017.

TENNYSON, S.; RAVINDRAN, K. J.; ARIVOLI, S. Bioefficacy of botanical insecticides against the dengue and chikungunya vector *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Columbia (USA), p. S1842-S1844, 2012.

THONGWAT, D.; BUNCHU, N. Susceptibility to temephos, permethrin and deltamethrin of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Muang district, Phitsanulok Province, Thailand. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 8, n. 1, p. 14-18, 2015.

TWINING, S. S. Regulation of proteolytic activity in tissues. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 29, n. 5, p. 315-383, 1994.

VIEGAS, J. C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

VOLPICELLA, M.; CECI, L. R.; CORDEWENER, J.; AMERICA, T.; GALLERANI, R.; BODE, W.; BEEKWILDER, J. L. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 1, p. 10-19, 2003.

WHO. World Health Organization. Dengue and severe dengue. 2019. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acessado 06 de Janeiro de 2020

YAMAGUCHI, M.; JIMBO, M.; SAKAI, R.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (freshwater cyanobacterium) lectin. **Comparative Biochemistry and Physiology b- Biochemistry & Molecular Biology**, v. 119, n. 3, p. 593-597, 1998.

YAMAGUCHI, M.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K.; KAMIO, Y.; JIMBO, M.; KAMIYA, H. Isolation and characterization of a mannan-binding lectin from the freshwater cyanobacterium (blue-green algae) *Microcystis viridis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 265, n. 3, p. 703-708, 1999

YANG, Y. J.; DAVIES, D. M. Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin. **Journal of insect physiology**, v. 17, n. 1, p. 117-131, 1971.

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; KANNO, H.; KAMINAGA, T.; IZUMIDA, M.; SAKOH, T.; TAMURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 4, p. 573-576, 1996.

ZARA, A. L. S. A.; SANTOS, S. M. D.; OLIVEIRA, E. S. F.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.

ZHANG, C.; FANG, E.F; ZHANG, H.T; LIU, L.L; YUN, J.P. *Momordica charantia* lectin exhibits antitumor activity towards hepatocellular carcinoma. **Investigational New Drugs**, v. 33, n.1, p. 1–11, 2015.