

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**TORTA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* COMO FONTE DE
COMPOSTOS COM EFEITOS DELETÉRIOS NA SOBREVIVÊNCIA
E NO DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE *Aedes aegypti***

ANA PATRÍCIA SILVA DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: Prof^a Dra. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO

**RECIFE
2012**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANA PATRÍCIA SILVA DE OLIVEIRA

**TORTA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* COMO FONTE DE
COMPOSTOS COM EFEITOS DELETÉRIOS NA SOBREVIVÊNCIA
E NO DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE *Aedes aegypti***

ORIENTADORA: Prof^a Dra. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO

**RECIFE
2012**

Catálogo na fonte
Elaine Cristina
CRB 1728

Oliveira, Ana Patrícia Silva de

Torta de sementes de *Moringa oleifera* como fonte de compostos com efeitos deletérios na sobrevivência e no desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti* Ana Patrícia Silva de Oliveira. – Recife: O Autor, 2012.

77 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador: Thiago Henrique Napoleão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

1. Moringaceae 2. *Aedes aegypti* 3. Lectinas I. Paiva, Patrícia Maria Guedes (orientadora) II. Napoleão, Thiago Henrique (coorientador) III. Título

632.95

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-218

Ana Patrícia Silva de Oliveira

“Torta de sementes de *Moringa oleifera* como fonte de compostos com efeitos deletérios na sobrevivência e no desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti*”

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Aprovado por:

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
Presidente

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Prof. Dr. Roberto Araújo Sá

Data: 22 / 07 / 2012

*Ao meu pai e minha mãe, pelo incentivo,
apoio, dedicação e paciência que me foram dados com
tanto amor durante toda essa trajetória.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai eterno, por estar sempre presente em minha vida me guiando nos momentos de fraqueza e desânimo e me tornando perseverante em meus objetivos. Minha felicidade e vitória pertencem a ti senhor.

Aos meus pais, Gerson e Helena, que me ofertaram segurança necessária que jamais encontraria em outro lugar, que por toda vida se doaram por inteiro, muitas vezes fazendo renúncias a favor da realização dos meus sonhos, que enfrentaram a distância e a saudade simplesmente por amor sem limites e me ensinaram o valor da simplicidade, nos gestos de respeito e carinho.

À minha amada irmã, Ana Paula, que toda vida dividiu comigo todas as minhas conquistas, por todo apoio dado em todos os momentos e por todo o cuidado e carinho expressado sempre nas situações de maior dificuldade. Obrigada, orgulhinho!

Ao meu noivo Laurent, pelo amor, carinho e atenção dados durante toda essa caminhada. Ainda por toda paciência e compreensão tida sem jamais me deixar sentir sozinha. Obrigada, Amor!

À minha irmã Andreia, ao meu cunhado Cutrim e aos meus sobrinhos André Felipe, Ana Carolline e Murilo, simplesmente por, apesar da distância, se mostrarem presentes e sempre comemorarem comigo os frutos conquistados. Amo vocês.

À professora Patrícia Paiva, minha orientadora, pela oportunidade dada, pela confiança em mim depositada e por acreditar em nosso trabalho. Agradeço pela orientação, atenção, dedicação e entusiasmo. Muitíssimo obrigado!

Ao professor e amigo Thiago Henrique, meu co-orientador, por toda sua enorme e admirável paciência, dedicação e humildade em passar seus conhecimentos me ajudando na construção desse caminho científico.

Ao Laboratório de Ecologia Química, em especial à professora Daniela Navarro, pela receptividade e prontidão em nos auxiliar em parceria com o nosso laboratório.

Aos professores Roberto Sá, Luana Coelho e Márcia Vanusa por aceitarem o convite de fazer parte de um momento tão importante e especial para mim.

Ao Departamento de Bioquímica, em especial ao professor Nicácio, à secretaria da Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia e a todos os funcionários, em especial “Seu” João, sempre muito prestativo e solícito.

Aos amigos do Laboratório de Glicoproteínas: Emmanuel, Nataly, Francis, Lidiane, Maiara, Raiana, Leonardo, Afonso e Igor, pela recepção calorosa e por fazer meu convívio no laboratório mais divertido e prazeroso.

Às minhas duas grandes amigas, Thâmarah Albuquerque e Kézia Moura, companheiras desde o início do mestrado e cúmplices da construção dos melhores momentos vividos em minha vida. Obrigado pela amizade verdadeira.

Às “amigas da torta”, Idila, pelo acolhimento e dedicação a mim depositada sem mesmo me conhecer, e Lívia, por toda sua presteza, dedicação, simpatia e alegria que tornaram a execução do trabalho mais leve e agradável.

A todas as minhas amigas, especialmente Amanda, Glauciely, Camila, Juciana, Larissa e Poliana que compartilharam e compartilham comigo sonhos, momentos e descobertas mesmo à distancia; Érica Carla, amiga confidente, leal e verdadeira, cuja amizade se construiu no respeito, sinceridade e cumplicidade, e Sinara Mônica, um anjo que Deus colocou na minha vida e que minha amizade e gratidão não cabem aqui.

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

*“Confia no Senhor de todo o teu coração e não te
estribes no teu próprio entendimento. Reconhece-o em
todos os teus caminhos, e ele endireitará as tuas
veredas.”*

Provérbios 3:5-6

RESUMO

Sementes de *Moringa oleifera* possuem elevado conteúdo de óleo (27–40%), o qual é utilizado na produção de biocombustível. A torta de sementes corresponde ao material residual obtido após o processo de extração do óleo. As sementes de moringa contêm as lectinas WSMoL (do inglês *water-soluble M. oleifera lectin*) e cMoL (do inglês *coagulant M. oleifera lectin*). WSMoL possui atividade larvicida (CL_{50} de 0,197 mg/mL) contra *Aedes aegypti*, mosquito vetor da dengue. Diferentemente, cMoL não possui ação larvicida. O presente trabalho descreve a torta de moringa obtida após extração do óleo com solvente orgânico como fonte de lectinas e outros compostos com efeitos deletérios sobre larvas de *A. aegypti*. A torta foi obtida após extração do óleo das sementes de moringa com n-hexano durante 6 h, utilizando extrator do tipo Soxhlet. Suspensões aquosas à base da torta (CS, do inglês *cake suspensions*) foram obtidas a partir da adição de 0,2, 0,6, 1,2 ou 3,0 g do pó da torta a água destilada (1 L), seguida de rápida agitação manual por 3 min, repouso por 30 min e filtração em papel de filtro. As suspensões foram avaliadas quanto à atividade hemaglutinante, concentração de proteínas e efeito sobre o desenvolvimento larval. Para purificação de lectinas, extrato aquoso foi obtido através da homogeneização do pó da torta (10 g) em água destilada (100 mL) por 16 h a 4 °C, seguida de centrifugação (9.000 g, 15 min). O extrato foi tratado com sulfato de amônio a 60% e a fração de proteínas precipitadas, enriquecida em lectinas, foi dialisada contra NaCl 0,15 M e cromatografada em coluna de quitina equilibrada com NaCl 0,15 M. As proteínas adsorvidas na coluna foram eluídas com ácido acético 1,0 M e, após diálise contra água destilada, as frações que apresentaram atividade hemaglutinante foram reunidas (MoCL, *M. oleifera cake lectins*). MoCL foi avaliada quanto ao perfil eletroforético em SDS-PAGE e inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos e glicoproteínas. Atividade larvicida do extrato de torta, fração enriquecida em lectinas e MoCL foi avaliada contra larvas de *A. aegypti* no quarto estágio. As suspensões à base da torta promoveram atraso no desenvolvimento larval. Dentre as larvas incubadas com CS_{1,2} e CS_{3,0}, 50% e 60% não ultrapassaram o segundo estágio, respectivamente. Nenhuma das suspensões apresentou atividade hemaglutinante nem causou mortalidade das larvas. O extrato de torta e a fração enriquecida em lectinas apresentaram atividade hemaglutinante específica de 26,2 e 39,5, revelando que lectinas de sementes de moringa resistiram ao tratamento com n-hexano. MoCL apresentou atividade hemaglutinante específica de 93.622 (fator de purificação: 3.573) e três bandas polipeptídicas em SDS-PAGE de massas moleculares 10, 15 e 27 kDa. Esses resultados sugerem que MoCL consiste em uma mistura de WSMoL (que se apresenta com polipeptídeos de 10 e 15 kDa em SDS-PAGE) e cMoL (um polipeptídeo de 26,5 kDa em SDS-PAGE). Atividade hemaglutinante de MoCL foi inibida pelos monossacarídeos frutose, glicose, manose, galactose e *N*-acetilglicosamina, bem como pelas glicoproteínas asialofetuína, caseína e tiroglobulina. Extrato, fração e MoCL apresentaram atividade larvicida, com CL_{50} de 2,98, 0,95 e 0,89 mg/mL de proteínas, respectivamente. MoCL foi menos ativa que WSMoL obtida a partir de sementes inteiras, provavelmente devido à presença de cMoL na preparação. Em conclusão, torta de sementes de *M. oleifera* contém lectinas com ação larvicida e compostos capazes de atrasar o desenvolvimento de larvas de *A. aegypti*. Os resultados obtidos no presente trabalho agregam novos valores à torta de moringa como recurso biotecnológico, bem como a toda a cadeia de produção de biocombustível a partir da moringa.

Palavras-chave: moringa; mosquito da dengue; lectina; atividade inseticida; aproveitamento de resíduos.

ABSTRACT

Moringa oleifera seeds have high oil content (27–40%) which is used in the production of biofuel. The seed cake corresponds to the residual material obtained after oil extraction process. Moringa seeds contain the lectins WSMoL (*water-soluble M. oleifera lectin*) and cMoL (*coagulant M. oleifera lectin*). WSMoL has larvicidal activity (LC_{50} of 0.197 mg/mL) against *Aedes aegypti*, dengue vector mosquito. Differently, cMoL did not have larvicidal action. The present work describes the moringa seed cake obtained after oil extraction with organic solvent as source of lectins and other compounds with deleterious effects on *A. aegypti* larvae. The cake was obtained after extraction of moringa seeds oil with n-hexane during 6 h using Soxhlet-type extractor. Aqueous suspensions from cake (CS, *cake suspensions*) were obtained by addition of 0.2, 0.6, 1.2 or 3.0 g of cake powder to distilled water (1 L) followed by rapid manual agitation for 3 min, resting during 30 min and filtration through filter paper. The suspensions were evaluated for hemagglutinating activity, protein concentration and effect on larval development. For purification of lectins, aqueous extract was obtained by homogenization of cake powder (10 g) in distilled water (100 mL) for 16 h at 4 °C, followed by centrifugation (9,000 g, 15 min). The extract was treated with 60% ammonium sulphate and the precipitated protein fraction, enriched in lectins, was dialyzed against 0.15 M NaCl and chromatographed on chitin column equilibrated with 0.15 M NaCl. The proteins adsorbed to column were eluted with 1.0 M acetic acid and, after dialysis against distilled water, the fractions that showed hemagglutinating activity were pooled (MoCL, *M. oleifera cake lectins*). MoCL was evaluated for electrophoretic profile in SDS-PAGE and inhibition of hemagglutinating activity by carbohydrates and glycoproteins. Larvicidal activity of cake extract, lectin-rich fraction and MoCL was evaluated against *A. aegypti* larvae at fourth stage. The cake suspensions promoted delay in larval development. Among the larvae incubated with CS_{1.2} and CS_{3.0}, 50% and 60% did not overpass the second stage, respectively. None suspension showed hemagglutinating activity neither promoted larvae mortality. Cake extract and lectin-rich fraction showed specific hemagglutinating activity of 26.2 and 39.5 revealing that moringa seed lectins resisted to treatment with n-hexane. MoCL showed specific hemagglutinating activity of 93,622 (purification fold: 3,573) and three polypeptide bands in SDS-PAGE with molecular mass 10, 15 and 27 kDa. These results suggest that MoCL consists in a mix of WSMoL (which shows 10 and 15 kDa polypeptides in SDS-PAGE) and cMoL (a polypeptide of 26.5 kDa in SDS-PAGE). Hemagglutinating activity of MoCL was inhibited by the monosaccharides fructose, glucose, mannose, galactose and *N*-acetylglucosamine as well as by the glycoproteins asialofetuin, casein and thyroglobulin. Cake extract, lectin-rich fraction and MoCL showed larvicidal activity with LC_{50} of 2.98, 0.95 and 0.89 mg/mL of protein, respectively. MoCL was less active than WSMoL obtained from whole seeds probably due to the presence of cMoL in the preparation. In conclusion, *M. oleifera* seed cake contains lectins with larvicidal action and compounds able to delay the development of *A. aegypti* larvae. The results obtained in the present work aggregate new values to moringa seed cake as a biotechnological resource as well as to all the moringa biofuel production chain.

Keywords: moringa; dengue mosquito; lectin; insecticidal activity; use of residues.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Países/áreas com risco de transmissão da dengue, 2008.....	16
Figura 2. Mapa de risco de infecção de dengue em 2011.....	19
Figura 3. Os estágios do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	20
Figura 4. (A) Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos por lectinas. (B). Representação esquemática da inibição de aglutinação de eritrócitos por lectinas em presença de carboidratos livre.....	27
Figura 5. Aspecto das sementes íntegras (A) e da torta (B) de sementes de <i>Moringa oleifera</i> obtida após extração do óleo com solvente orgânico.....	33

ARTIGO

Figure 1. Purification of <i>M. oleifera</i> cake lectins (MoCL). (A) Chromatography of lectin-rich fraction on chitin column. (B) SDS-PAGE (12%, w/v) of MoCL and densitogram showing intensities of polypeptide bands staining. (C) SDS-PAGE (12%, w/v) of WSMoL isolated as described by Coelho <i>et al.</i> (2009) (D) SDS-PAGE (12%, w/v) of cMoL isolated as described by Santos <i>et al.</i> (2009). All gels were stained with Coomassie Brilliant Blue.....	73
Figure 2. <i>A. aegypti</i> larval instar (%) at 24 (A), 48 (B), and 72 h (C) in control (distilled water) and <i>M. oleifera</i> cake suspensions (CS) obtained starting from 0.2, 0.6, 1.2 and 3.0 g of cake powder. Data were analyzed with Student's <i>t</i> -test and Tukey test to determine significant differences ($p < 0.05$) among treatments. The different letters indicate significant differences between treatments.....	74

LISTA DE TABELAS

	Página
ARTIGO	
Table 1. Summary of <i>M. oleifera</i> cake lectins purification.....	70
Table 2. Inhibition of hemagglutinating activity of MoCL, WSMoL and cMoL by monosaccharide and glycoprotein preparations.....	71
Table 3. Larvicidal activity of <i>M. oleifera</i> cake preparations against <i>A. aegypti</i>	72

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1. Dengue.....	15
2.1.1. Epidemiologia da dengue.....	15
2.2. O vetor <i>Aedes aegypti</i>	18
2.3. Controle da dengue.....	22
2.4. Bioinseticidas contra mosquitos vetores de doenças humanas.....	23
2.5. Lectinas.....	25
2.5.1. Aspectos gerais.....	25
2.5.2. Lectinas inseticidas.....	28
2.6. <i>Moringa oleifera</i> Lam.	30
2.6.1. Aspectos gerais	30
2.6.2. Tortas de moringa	32
2.6.3. Lectinas de <i>M. oleifera</i>	34
3. OBJETIVOS	37
3.1. Geral	37
3.2. Específicos	37
4. REFERÊNCIAS	38
5. ARTIGO	51
6. CONCLUSÕES	75
7. ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

Moringa oleifera é uma árvore amplamente cultivada nos trópicos e subtropicais de todo o mundo e seus tecidos contêm diversos compostos bioativos. As sementes de moringa contêm proteínas coagulantes que podem ser facilmente extraídas em água e promovem a precipitação de partículas em suspensão, sendo muito utilizadas popularmente para diminuição da turbidez da água (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995; GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005; BHUPTAWAT *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2011). As sementes apresentam também elevado teor de óleo não-volátil (27-40%), o qual é usado para consumo humano, na indústria cosmética e é matéria-prima para produção de biodiesel (SOLIVA *et al.*, 2005; GALLÃO *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2011). O biocombustível derivado do óleo das sementes de moringa apresenta um elevado número de cetano e estabilidade oxidativa, tornando-o um potencial substituto para o diesel de petróleo (RASHID *et al.*, 2008).

A torta de sementes corresponde a todo o material residual obtido após processo de extração do óleo, constituindo um co-produto da produção do biodiesel. A torta de moringa tem sido utilizada na alimentação animal, sendo também rica em proteínas e outros componentes minoritários que podem ser fracionados e aproveitados (SCHNEIDER *et al.*, 2006). Contudo, esse co-produto tem sido pouco estudado com o objetivo de recuperar compostos bioativos (BALBINOT *et al.*, 2006).

Sementes de *M. oleifera* contêm lectinas – proteínas com capacidade de ligação a carboidratos – denominadas WSMoL (*water-soluble M. oleifera lectin*), cMoL (*coagulant M. oleifera lectin*) e MoL (*M. oleifera lectin*), que apresentam diferenças quanto à especificidade, estrutura e atividades biológicas (KATRE *et al.*, 2008; COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009; ROLIM *et al.*, 2011). cMoL possui atividade coagulante e foi capaz de remover partículas em suspensão na água turva, incluindo ácidos húmicos (SANTOS *et al.*, 2009;

SANTOS *et al.*, 2011). WSMoL matou larvas em estágio L4 de *Aedes aegypti* apresentando valores de CL₅₀ (concentração necessária para matar 50% das larvas em 24 h) de 0,197 mg/mL, promovendo ruptura do epitélio intestinal, aumento do volume do lúmen intestinal e hipertrofia dos segmentos, estimulação da atividade de enzimas digestivas (protease, tripsina e α -amilase) e inibição da atividade da enzima detoxificadora β -esterase (COELHO *et al.*, 2009; AGRA-NETO, 2012). A lectina também prejudicou a eclosão de ovos de *A. aegypti* armazenados, matando os embriões dentro dos ovos, bem como apresentou efeito estimulante sobre a oviposição e impediu o desenvolvimento de embriões nos ovos depositados pelas fêmeas grávidas (SANTOS *et al.*, 2012). Os efeitos deletérios de WSMoL sobre *A. aegypti* tornam esta lectina uma promissora candidata para uso como inseticida e um componente de alto valor das sementes de moringa. A recuperação de cMoL e WSMoL a partir da torta de sementes de *M. oleifera* constitui uma estratégia interessante para a utilização deste material com notável potencial biotecnológico.

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, possuindo maior incidência em países tropicais e subtropicais, inclusive no Brasil. A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 20 mil pessoas morram em decorrência dessa infecção por ano em todo o mundo (SIMAS *et al.*, 2004; KURANE, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009, 2012; WHITEHORN & SIMMONS, 2011). A atual situação epidemiológica da dengue tem levado ao desenvolvimento de diferentes estratégias por diversos setores públicos voltadas para o controle do principal vetor de transmissão do vírus, o mosquito *A. aegypti* (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012). Este cenário, juntamente com os relatos anteriores dos efeitos deletérios sobre o *A. aegypti* exercidos por WSMoL, isoladas de sementes de *M. oleifera*, estimularam a purificação da lectina da torta de sementes de *M. oleifera* e a investigação de sua atividade larvicida contra *A. aegypti*.

Este trabalho relata o isolamento de lectinas (MoCL, do inglês *M. oleifera cake lectins*) a partir da torta de moringa obtida após extração do óleo com solvente orgânico (n-hexano), o atraso promovido no desenvolvimento larval de *A. aegypti* por suspensões obtidas da torta, bem como o efeito larvicida de extrato aquoso da torta, fração enriquecida em lectinas e MoCL.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Dengue

A dengue é uma infecção viral causada pelo arbovírus do gênero *Flavivirus* (família Flaviviridae), que possui quatro diferentes sorotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). A infecção por um sorotipo de dengue proporciona imunidade ao longo da vida para o determinado sorotipo, mas não há formação de imunidade para os outros sorotipos; dessa forma, pessoas que vivem em áreas endêmicas para a dengue podem ser infectadas com os quatro sorotipos durante a vida (SEEMA, 2005). A dengue é considerada uma séria causa de morbidade e mortalidade no Sudeste e Sul da Ásia, América Central, América do Sul e Caribe (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Atualmente os casos de dengue vêm preocupando as autoridades sanitárias em virtude do grande potencial desta doença em assumir formas graves e letais. A dengue pode ser assintomática ou apresentar duas formas: a febre do dengue (FD), uma doença febril aguda com calafrios, dores de cabeça, no corpo e retro-ocular, artralgia, náusea, vômitos e erupção cutânea, e a febre hemorrágica da dengue (FHD), que é a forma grave da doença caracterizada pelos mesmos sintomas da FD acrescidos por vômito, hemorragias graves e choque, podendo evoluir para a morte do paciente (SIMAS *et al.*, 2004; KURANE, 2007; WHITEHORN & SIMMONS, 2011).

2.1.1. Epidemiologia da dengue

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo e uma das doenças de maior incidência no Brasil. É estimada a sua disseminação em mais de 100 países das Américas, África, Sudeste da Ásia, Ilhas do Pacífico e Leste do Mediterrâneo (Figura 1). É encontrada principalmente em áreas urbanas e semi urbanas, porém existe um aumento dos casos em áreas rurais. Sua incidência nos últimos 50 anos aumentou 30 vezes, principalmente devido à expansão geográfica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009; WILDER-SMITH & GUBLER, 2010).



Figura 1. Países/áreas com risco de transmissão da dengue, 2008.

Fonte: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009.

Mais de 2,5 bilhões de pessoas, cerca de 40% da população mundial, estão sob o risco de contrair a dengue e estima-se que ocorram cerca de 50 milhões de casos por ano. Desse total, cerca de 550 mil necessitam de hospitalização e pelo menos 20 mil morrem em consequência da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009, 2012).

A dengue encontra-se amplamente disseminada no mundo surgindo nas Américas durante a colonização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). A incidência da dengue nas Américas tem apresentado uma tendência ascendente, com mais de 30 países notificando a doença, mesmo com os numerosos programas de erradicação ou controle implementados. Entre 2001 e 2005, foram notificados 2.879.926 casos de dengue nessa região, sendo 65.235 de dengue hemorrágica, com 789 óbitos. As maiores incidências nesse período foram reportadas pelo Brasil, Colômbia, Venezuela, Costa Rica e Honduras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A dengue surgiu no Brasil com a introdução do seu vetor durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos. O mosquito foi intensamente combatido em nosso território, tendo sido considerado erradicado em 1955. Contudo, países vizinhos como as Guianas e a Venezuela, dentre outros países sul-americanos, não eliminaram a população do *A. aegypti*. Com a descontinuação do programa de erradicação, houve a reinfestação do Brasil pelo *A. aegypti*, inicialmente em Belém do Pará no ano de 1967 e posteriormente no Estado do Rio de Janeiro, provavelmente em 1977, e em Roraima no início da década de 1980 (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004).

A primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente no Brasil ocorreu entre 1981 e 1982, em Boa Vista (RR), causada pelos sorotipos 1 e 4. Em 1986, ocorreram epidemias no Rio de Janeiro e em algumas capitais da região Nordeste. Desde então, a dengue vem ocorrendo no Brasil de forma continuada, intercalando-se com a ocorrência de epidemias, geralmente associadas com a introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente indenes e/ou alteração do sorotipo predominante (NOGUEIRA *et al.*, 1999; CÂMARA *et al.*, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

O Rio de Janeiro é considerado o mais importante ponto de entrada da dengue no Brasil devido à elevada densidade populacional e o movimento freqüente de moradores e

turistas entre os estados, permitindo a maior disseminação do vetor da dengue e do vírus. Além disso, ocorreu um grande aumento no número de criadouros do *A. aegypti* devido ao processo desorganizado de urbanização nas grandes cidades (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2004).

No Brasil, o quadro epidemiológico atual da dengue caracteriza-se pela ampla distribuição do seu vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, em todas as regiões, com uma complexa dinâmica de dispersão do vírus, com circulação simultânea de três sorotipos virais (DEN-1, DEN-2 e DEN-3). Em meados da última década, foi identificada a presença do sorotipo DEN 4 em território brasileiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Atualmente o vírus da dengue circula simultaneamente em 24 estados do Brasil (Figura 2) e isso tem contribuído para o aumento da probabilidade do surgimento de formas mais graves da doença (CÂMARA *et al.*, 2007). Em 2010 foram notificados 984.689 casos de dengue em todo território brasileiro e, em 2011, foram notificados 735.348. Só em Pernambuco no ano de 2011 foram notificados 19.583 casos de dengue. Em 2012, até o mês de junho, tinham sido contabilizados 269.356 casos no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

2.2. O vetor *Aedes aegypti*

O mosquito *A. aegypti* pertence à Ordem Diptera e à Família Culicidae. É considerado o principal vetor responsável pela transmissão do vírus da dengue nas Américas, bem como é vetor dos vírus causadores da febre amarela e da febre chikungunya. O *A. aegypti* é originário da África, porém acompanhou o homem em sua migração pelo mundo e hoje é considerado um mosquito cosmopolita com ocorrência em regiões tropicais e subtropicais compreendidas principalmente entre as latitudes 45° N e 35° S (CONSOLI & OLIVEIRA,

1994; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). Existem achados do *A. aegypti* em regiões mais ao norte, acima de 45° N, mas tais invasões ocorreram durante os meses mais quentes e os mosquitos não sobreviveram aos invernos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

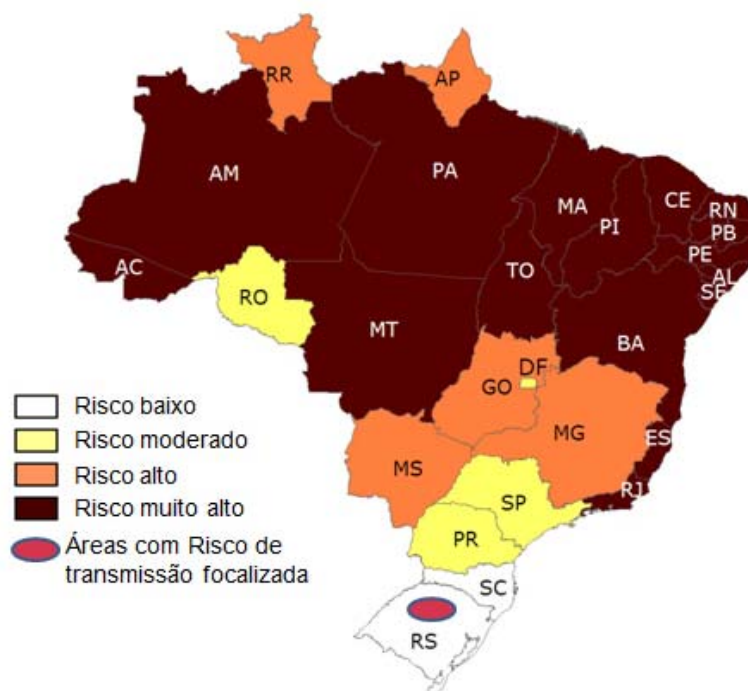


Figura 2. Mapa de risco de infecção de dengue em 2011.

Fonte: Ministério da Saúde.

O vírus da dengue é transmitido aos seres humanos através da picada de mosquitos do sexo feminino infectados. A fêmea do mosquito possui hábitos hematófagos com horários diurnos e, após um repasto de sangue infectado, o mosquito está apto a transmitir o vírus, depois de 8 a 12 dias de incubação extrínseca. Uma vez infectado, o mosquito é capaz de transmitir o vírus pelo resto de sua vida (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

O ciclo biológico do *A. aegypti* compreende as fases de ovo, larva (4 estágios: L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Figura 3). Todas as formas ocorrem na água, exceto o adulto. Seus

criadouros preferenciais são os recipientes artificiais, tanto os abandonados pelo homem a céu aberto e preenchidos pelas águas das chuvas, como aqueles utilizados para armazenar água para uso doméstico (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; CÂMARA *et al.*, 2007).

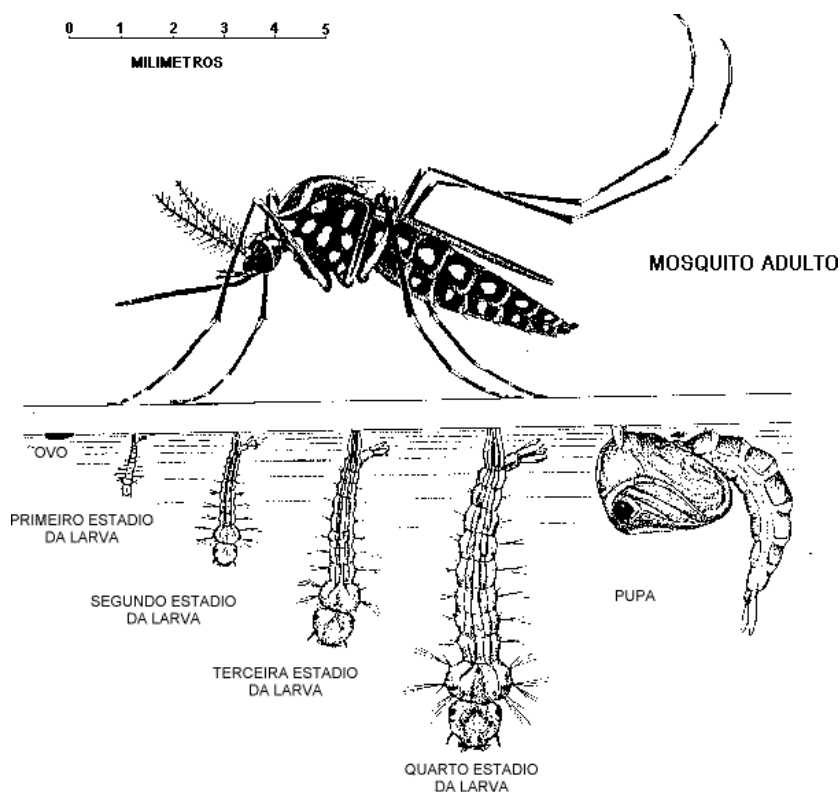


Figura. 3. Os estágios do ciclo de vida do *Aedes aegypti*

Fonte: http://www.dengue.org.br/mosquito_aedes.html

Os ovos do *Aedes aegypti* 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. 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).

As larvas possuem quatro estágios evolutivos, sendo o último destes o mais longo. Os machos têm, em média, um desenvolvimento larvário mais rápido do 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 cinco dias. Contudo, com alterações de temperatura e escassez de alimento, o 4º estágio larvário pode prolongar-se por várias semanas, antes de sua transformação em pupa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; MOURYA *et al.*, 2004; MOHAMMED & CHADEE, 2011). A larva do *A. aegypti* é composta 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 para respirar, onde ficam em posição quase vertical. Movimentam-se em forma de serpente, fazendo um S em seu deslocamento e são sensíveis a movimentos bruscos na água. Sob feixe de luz, deslocam-se com rapidez, buscando refúgio no fundo do recipiente, característica denominada fotofobia (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Os adultos de *A. aegypti* também possuem seu corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen e representam a fase reprodutiva da espécie. Tanto a fêmea quanto o macho exibem mecanismos diuréticos necessários à sua sobrevivência (PLAWNER *et al.*, 1991). 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 amadurecimento completo dos ovos (BRIEGEL, 1990; MINISTERIO DA SAÚDE, 2009). 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).

2.3. Controle da dengue

A atual situação epidemiológica da dengue no Brasil e no mundo tem levado ao desenvolvimento de diferentes estratégias de controle por diversos setores públicos. Existem várias pesquisas direcionadas para o desenvolvimento de vacinas eficientes e para o diagnóstico específico da dengue (ALLONSO *et al.*, 2011; SCHMITZ *et al.*, 2011; AMORIM *et al.*, 2012). No entanto, as intervenções neste nível ainda esbarram em diferentes aspectos de difícil aplicação. As vacinas, por exemplo, necessitam de especificidade para os 4 sorotipos da doença, sendo este o maior desafio nesta área (COSTA *et al.*, 2012). A ausência de um diagnóstico, terapêutica e vacina específicos direciona a prevenção e o controle da dengue para medidas de controle do vetor *A. aegypti*, as quais podem ser direcionadas para larvas, pupas ou insetos adultos (PAIVA *et al.*, 2011; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012; VONTAS *et al.*, 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2012), o combate ao vetor se faz através da remoção dos seus habitats artificiais feitos pelo homem bem como aplicação de inseticidas apropriados em recipientes de armazenamento de água e aplicação de inseticidas no espaço por pulverização durante surtos. A maioria das larvas de mosquitos alimenta-se indistintamente do microplâncton presente em seus habitats, constituído de algas, rotíferos, bactérias, esporos de fungos, ou quaisquer partículas de matéria orgânica. A ingestão não seletiva de partículas por parte das larvas facilita a utilização de larvicidas por ação digestiva (FORATTINI, 1962; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Atualmente o uso de inseticidas químicos é a principal forma de controle do vetor dentre os quais os mais utilizados pertencem aos grupos dos organoclorados, organofosforados, piretróides e carbamatos, todos agentes neurotóxicos (BRAGA & VALLE, 2007). Porém, esses inseticidas químicos são não-seletivos e podem ser prejudiciais para

outros organismos no ambiente (OMENA *et al.*, 2007; PAIVA *et al.*, 2011). Adicionalmente, o uso continuado desses inseticidas tem provocado o aparecimento de populações resistentes que desenvolveram mecanismos enzimáticos de detoxificação dos inseticidas ou que expressam formas moleculares enzimáticas insensíveis (LUMJUAN *et al.*, 2011). O mecanismo de resistência desenvolvida por alguns insetos tem sido detectado para todas as classes de inseticidas, afetando, direta e profundamente, a re-emergência das doenças transmitidas por vetores (BRAGA & VALLE, 2007; PAIVA *et al.*, 2011). A racionalização do emprego de inseticidas, sua utilização rotativa e o seu uso integrado com medidas de controle físico e biológico têm sido recomendados para diminuir os riscos de aparecimento ou agravamento de resistência em populações de vetores (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

O atual quadro para o controle de vetores depende principalmente de estratégias para diminuir o desenvolvimento de resistência. Nesse sentido, compostos naturais com atividade inseticida, tais como aqueles de origem vegetal, são preferíveis para o controle de vetores, uma vez que, em geral, não exercem ou possuem pequeno efeito deletério sobre organismos não-alvo e são biodegradáveis (KAMARAJ & RAHUMAN, 2010; PAIVA *et al.*, 2011).

2.4. Bioinseticidas contra mosquitos vetores de doenças humanas

A busca de novos compostos com atividade larvicida contra mosquitos vetores tem se tornado cada vez mais importante, uma vez que o Brasil experimenta aumento contínuo no número de casos de doenças transmitidas por estes insetos. A extensa e diversificada flora brasileira apresenta um natural e imenso potencial como fontes de compostos do metabolismo primário e secundário a serem aplicados na biotecnologia e biomedicina (OMENA *et al.*, 2007).

A busca por inseticidas biodegradáveis e mais seguros do ponto de vista ambiental estimula a avaliação do amplo leque de compostos produzidos pelas plantas para este fim (PAIVA *et al.*, 2011). As plantas têm desenvolvido mecanismos de defesa sofisticados necessários para sua sobrevivência e propagação (MACEDO *et al.*, 2011). Participa nesses mecanismos uma variedade de compostos de defesa, incluindo proteínas. Proteínas vegetais, incluindo lectinas e hemilectinas, proteínas inibidoras de ribossomos (RIP) dos tipos 1 e 2, inibidores de enzimas proteolíticas e de glicohidrolases, as enzimas quitinases e ureases e a canatoxina conferem às plantas resistência contra predadores fitófagos e infecção por vírus, bactérias, fungos e nemátodos, entre outros (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; SILVA *et al.*, 2009).

Produtos de plantas têm sido utilizados tradicionalmente em muitas partes do mundo contra insetos vetores de doenças (PRABHU *et al.*, 2011). Extratos obtidos utilizando solventes orgânicos foram testados contra mosquitos vetores de filariose. Extrato em acetato de etila de *Ocimum gratissimum* foi larvicida contra *Culex gelidus* (CL₅₀ de 39,31 µg/mL) e extratos metanólicos de *O. gratissimum*, *Ocimum tenuiflorum* e *Punica granatum* foram larvicidas para *Culex quinquefasciatus* com CL₅₀ de 38,47, 24,90 e 67,20 µg/mL, respectivamente (KAMARAJ & RAHUMAN, 2010). Bagavan e Rahuman (2011) reportaram que extratos metanólicos de *Abrus precatorius* e de *Musa paradisiaca*, bem como extrato hexânico de *Syzygium aromaticum*, foram larvicidas contra *Culex vishnui* com CL₅₀ de 136,84, 103,36 e 149,56 µg/mL, respectivamente, enquanto extratos obtidos com acetato de etila e metanol de *Cynodon dactylon* foram larvicidas contra *Armigeres subalbatus* com valores de CL₅₀ de 21,67 e 32,62 µg/mL, respectivamente (BAGAVAN e RAHUMAN, 2011). Extratos em acetato de etila de *Abrus precatorius* e de *Croton bonplandianum* e extrato clorofórmico de *Musa paradisiaca* apresentaram ação larvicida contra *Anopheles*

vagus (potencial vetor da malária), com CL_{50} de 19,31, 39,96 e 35,18 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Levantamento de espécies com potencial larvicida contra larvas de *A. aegypti*, realizado por Omena *et al.* (2007), evidenciou algumas plantas do gênero *Annona* como importantes fontes de agentes larvicida com valores de CL_{50} menores que 200 $\mu\text{g/mL}$. As maiores atividades foram observadas em extrato etanólico de *Annona glabra*, seguido pelo extrato de *Annona crassiflora* com CL_{50} de 0,06 e 0,71 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Extratos de *Abuta grandifolia*, *Minthostachys setosa* e fração do extrato de *Magonia pubescens* apresentaram CL_{50} de 2,6, 9,2 e 3,1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, contra larvas de *A. aegypti* (CICCIA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2004).

Extrato das folhas de *Melia azedarach* apresentou atividade larvicida e inibiu a oviposição das fêmeas de *A. aegypti* (CORIA *et al.*, 2008). Exposição das larvas de *A. aegypti* ao extrato de *Sapindus emarginatus* resultou em mortalidade e redução significativa nas atividades de acetilcolinesterase, β -carboxilesterases e fosfatases ácidas (KODALINGAM *et al.*, 2011). Os mecanismos larvicidas propostos para extratos de solventes orgânicos são alterações celulares, atividade anti quitinogênica e efeito tóxico sobre o sistema nervoso das larvas (PAIVA *et al.*, 2011).

Dentre os compostos vegetais isolados com ação larvicida contra *A. aegypti* encontram-se metabólitos secundários, tais como óleos essenciais, tectoquinonas, cordiaquinonas, limonóides, dicentrina e saponinas (PAIVA *et al.*, 2011) e as lectinas, proteínas que se ligam a carboidratos e que serão discutidas a seguir.

2.5. Lectinas

2.5.1. Aspectos Gerais

Lectinas são proteínas com a capacidade de se ligar a carboidratos de forma reversível, por pelo menos um domínio (SHARON, 2007; PAIVA *et al.*, 2011). As lectinas foram inicialmente referidas como hemaglutininas por apresentarem a capacidade de aglutinar eritrócitos. Até o final do século 19, elas também eram designadas como fitohemaglutininas pelo fato de serem detectadas principalmente em extratos de plantas (KENNEDY *et al.*, 1995; SHARON, 2007).

A primeira lectina foi isolada em 1888 por Peter Hermann Stillmark a partir de sementes da árvore rícino (*Ricinus communis*) sendo esta uma hemaglutinina altamente tóxica (SHARON & LIS, 2004). Karl Landsteiner iniciou as primeiras investigações sobre a especificidade das lectinas por açúcares, testando diversos extratos de sementes em diferentes tipos de hemácias concluindo que as ações dessas plantas hemaglutinantes assemelhavam-se as reações de anticorpo no aspecto de especificidade de ligação (KENNEDY *et al.*, 1995; SHARON, 2007).

Lectinas se ligam de forma específica a eritrócitos pertencentes a grupos sanguíneos humanos distintos, tais como ABO, MN e subgrupo A₁ (SHARON & LIS, 1972). Tal fato se justifica pela habilidade das lectinas de se ligarem a tipos específicos de açúcares na superfície celular (SHARON, 2007). Ainda, as lectinas são capazes de se ligar a monossacarídeos (tais como glicose, manose, galactose, fucose, *N*-acetil-galactosamina ou *N*-acetil-glucosamina), dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, porém muitas delas apresentam uma maior afinidade para oligossacarídeos que para açúcares simples (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

A detecção da presença das lectinas pode ser realizada através de um ensaio de atividade hemaglutinante que consiste primeiramente na realização de diluição seriada da amostra em solução salina, seguida de incubação com eritrócitos humanos ou animais (Figura 4A). As lectinas se ligam a carboidratos presentes nas superfícies dos eritrócitos, promovendo

ligação cruzada entra as células (rede de hemaglutinação). Já a determinação da especificidade da lectina se dá por meio do ensaio da inibição da atividade hemaglutinante, em que a lectina é previamente incubada com solução de carboidratos livres (monossacarídeos, oligossacarídeos ou glicoproteínas) antes da adição dos eritrócitos (Figura 4B). A ligação da lectina aos carboidratos livres impede a formação da rede de aglutinação (KENNEDY *et al.*, 1995).

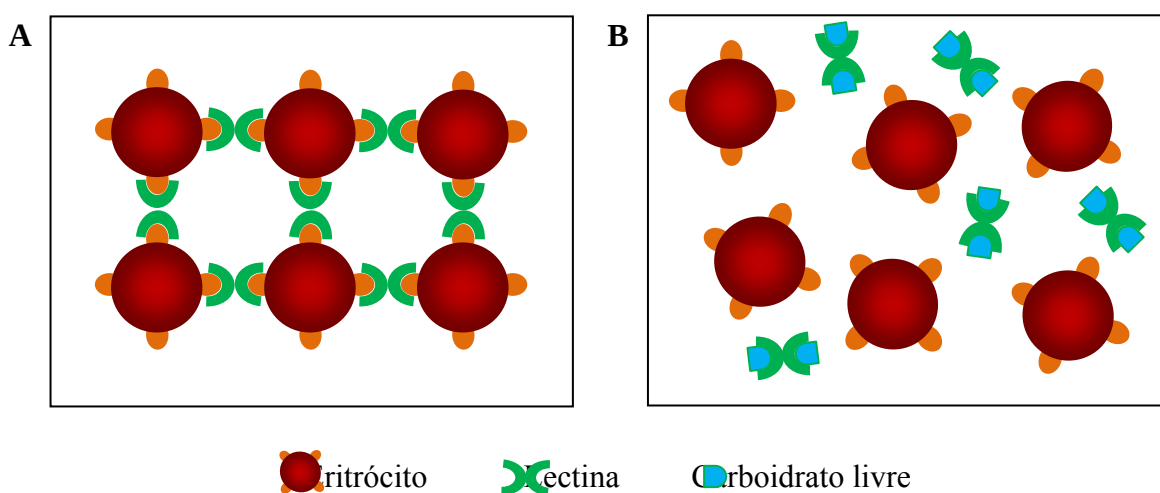


Figura. 4. (A) Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos por lectinas. (B). Representação esquemática da inibição de aglutinação de eritrócitos por lectinas em presença de carboidratos livre.

Fonte: A Autora.

As lectinas representam um diversificado grupo de proteínas no que diz respeito ao tamanho, composição e estrutura. Elas podem se apresentar em múltiplas formas moleculares e podem ser obtidas com alto rendimento e grau de pureza através de técnicas convencionais de cromatografia, principalmente cromatografia de afinidade (KENNEDY *et al.*, 1995; PAIVA *et al.*, 2011). Há um crescente reconhecimento do papel desempenhado pelas lectinas em uma variedade de processos fisiológicos que envolvem ligações específicas a carboidratos.

Devido a sua especificidade, as lectinas podem apresentar diversas atividades como antibacteriana (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006), mitogênica (MACIEL *et al.*, 2004; VETRI *et al.*, 2010) e antiinflamatória (QUEIROZ *et al.*, 2008). Ainda, elas podem apresentar diferentes aplicações biomédicas e biotecnológicas, como por exemplo, diagnóstico de tecidos neoplásicos (CAMPOS *et al.*, 2006; MELO-JÚNIOR *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006), identificação de esquistossomose experimental e humana (GUIMARÃES *et al.*, 2008), determinação de infecções virais (HASENACK *et al.*, 2002), desenvolvimento de testes rápidos para identificação de micobactérias (ATHAMNA *et al.*, 2006), identificação de alterações neurológicas (NISHI *et al.*, 2003), monitoramento do diabetes (BALLERSTADT *et al.*, 2006; YIN *et al.*, 2010) e purificação de glicoproteínas e outros glicoconjugados (BUCUR *et al.*, 2004).

2.5.2. Lectinas inseticidas

Lectinas têm apresentado atividade inseticida contra insetos de diversas ordens. A toxicidade das lectinas contra insetos tem sido atribuída à sua ligação a estruturas presentes no intestino do inseto, tais como glicoconjugados na superfície das células epiteliais e a quitina encontrada na matriz peritrófica. As lectinas com atividade inseticida geralmente apresentam resistência a proteases digestivas (SILVA *et al.*, 2009; MACEDO *et al.*, 2007), podem causar a morte de microrganismos simbioses presentes no trato digestivo dos insetos (NAPOLEÃO *et al.*, 2011), são termoestáveis e capazes de se ligar à quitina (PAIVA *et al.*, 2011). As lectinas podem também se ligar a proteínas glicosiladas, tais como enzimas, interferindo na atividade catalítica (PAIVA *et al.*, 2011).

A lectina de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) apresentou atividade inseticida contra besouros *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* e larvas da mariposa

Anagasta kuehniella, provavelmente por se ligar a componentes da quitina (ou estruturas equivalentes) no intestino do inseto bem como modular a atividade da α -amilase (MACEDO *et al.*, 2007). Já a lectina do híbrido *Hippeastrum (Amaryllis)* (HHA) influenciou o crescimento larval de *Spodoptera littoralis*, causando atraso de desenvolvimento e redução do peso larval. HHA interagiu com a borda em escova das células intestinais, como evidenciado em culturas de células marcadas com isocianato de fluoresceína (FITC)-HHA (CACCIA *et al.*, 2012).

A lectina de *Sclerotinia sclerotiorum* (SSA), quando adicionada na dieta do pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum*, causou elevada mortalidade. Estudos de histofluorescência em secções dos insetos alimentados com dieta artificial líquida contendo FITC ligado a SSA indicaram a zona da borda em escova como alvo primário no intestino do inseto (HAMSHOU *et al.*, 2010). Técnicas de microscopia de fluorescência e imunohistoquímica revelaram o estômago de *A. pisum* como principal tecido alvo de ligação da lectina concanavalina A (ConA) (SAUVION *et al.*, 2004).

Lectinas isoladas do líquen *Cladonia verticillaris* (ClaveLL), do cerne (MuHL), entrecasca (MuBL) e folhas (MuLL) de *Myracrodruon urundeuva*, bem como de rizoma de *Microgramma vacciniifolia* (MvRL) promoveram mortalidade de soldados e operários de cupins *Nasutitermes corniger* (SÁ *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009; NAPOLEÃO *et al.*, 2011; ALBUQUERQUE *et al.*, 2012). A atividade termiticida de MuBL, MuHL e MuLL está ligada à resistência à degradação proteolítica e efeito antibacteriano sobre simbiontes do trato intestinal dos cupins, enquanto MvRL inibiu a atividade de tripsina de operários, estimulou a atividade de fosfatase ácida de ambas as castas e ainda modulou as atividades de celulasas em operários e soldados (NAPOLEÃO *et al.*, 2011; ALBUQUERQUE *et al.*, 2012). As lectinas de entrecasca de *Crataeva tapia* (CrataBL) e de cladódios de *Opuntia ficus indica* (OfiL)

apresentaram atividade termiticida contra operários de *N. corniger*. (PAIVA *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2012).

As lectinas de *M. urundeuva* foram também inseticidas contra larvas do mosquito vetor da dengue, *Aedes aegypti*, tendo valores de CL₅₀ de 0,04, 0,125 e 0,202 mg/mL para MuHL, MuBL e MuLL, 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 (SÁ *et al.*; 2009; NAPOLEÃO *et al.*, 2012).

2.6. *Moringa oleifera* Lam.

2.6.1. Aspectos gerais

Moringa oleifera (Moringaceae) é uma planta nativa da Índia e amplamente cultivada nos trópicos de todo o mundo (AMAGLO *et al.*, 2010). Árvore de crescimento rápido, já era utilizada no mundo antigo por romanos, gregos e egípcios com os mais diversos fins (PRABHU *et al.*, 2011). Suas folhas, flores e sementes são utilizadas na alimentação humana e, no nordeste do Brasil, é utilizada como forrageira na alimentação de animais. Todas as partes da moringa são fontes de compostos fenólicos, tocoferóis, beta caroteno, vitamina C e proteínas, apresentando excelentes propriedades nutricionais. A excelente capacidade em 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).

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 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 água (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995; GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005; BHUPTAWAT *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2011). Além de proteínas, as sementes são ricas em óleo, o qual é utilizado como óleo de cozinha, na produção de sabonetes e como matéria-prima para produção de biodiesel. Os conteúdos de proteínas e óleo nas sementes de moringa são mais elevados que aqueles encontrados em legumes e em algumas variedades de soja, respectivamente. Ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido oléico, carboidratos e minerais estão presentes nas sementes em quantidades razoáveis (FERREIRA *et al.*, 2008).

O óleo da semente de moringa é altamente resistente a oxidação, o que pode explicar as suas várias utilizações industriais, tais como produção de cosméticos, lubrificantes de máquinas, e combustível para lâmpadas, sendo muito utilizado na indústria de perfumaria devido a sua alta capacidade de retenção de odor (FERREIRA *et al.*, 2008).

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 DQO (demanda química de oxigênio) (BHUPTAWAT *et al.*, 2007). Sementes de moringa foram estudadas quanto à sua capacidade de adsorção e remoção de Ag em soluções aquosas, apresentando-se vantajosas pelo baixo custo, eficiência e elevado poder de adsorção e constituindo uma alternativa de relevâncias econômica e ambiental (ARAÚJO *et al.*, 2010).

Extrato aquoso de sementes de moringa apresentou atividades larvicida e ovicida contra *A. aegypti* (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012). Extrato metanólico das sementes promoveu mortalidade de larvas e pupas de *Anopheles stephensis*, vetor da malária (PRABHU *et al.*, 2010). Outros tecidos da moringa também constituem potenciais fontes de inseticidas, tendo o extrato da casca apresentado ação larvicida e adulticida contra os mosquitos vetores da filariose *Culex gelidus* e *Culex quinquefasciatus* (KAMARAJ &

RAHUMAN, 2010), enquanto extrato aquoso de flores de moringa contendo inibidor de protease induziu a mortalidade de larvas de *A. aegypti* no primeiro (L1), segundo (L2), terceiro (L3) e quarto (L4) estágios, sendo capaz de inibir a atividade de tripsina de larvas L4 em 98,6% após 5 horas de exposição (PONTUAL *et al.*, 2012).

O potencial farmacológico da moringa também vem sendo estudado. Extratos de folhas de moringa apresentaram potencial hipoglicemiante e anti-diabético em modelos animais e a propriedade de modular a liberação de serotonina por interação com receptores no trato intestinal em modelos de úlcera (JAISWAL *et al.*, 2009; DEBNATH *et al.*, 2011). A administração do extrato de sementes da moringa em ratos induzidos à fibrose hepática resultou na redução dos danos ao fígado e sintomas decorrentes da fibrose (HAMZA, 2010). Efeito bactericida foi observado em extratos aquosos de folhas e sementes de moringa contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (CACERES *et al.*, 1991). Ainda, a suplementação com extrato aquoso e alcoólico da raiz de *Moringa oleifera* em ratos com urolitíase mostrou ter atividade anirolitíaca, pois reduziu significativamente o oxalato urinário elevado, bem como reduziu a deposição de pedras nos rins de ratos (KARADI *et al.*, 2006).

2.6.2. Torta de moringa

As sementes de moringa (Figura 5A) contêm entre 27 e 40% de óleo não volátil, sendo uma matéria-prima aceitável para produção de biodiesel. A propriedade mais notável do biodiesel derivado de óleo de *M. oleifera* é o alto número de cetano (aproximadamente 67), que é o mais elevado dentre os relatados para um biocombustível. O biodiesel de moringa também apresenta maior estabilidade oxidativa e ponto de turvação elevados, em comparação

com outros combustíveis produzidos a partir de óleo vegetal. Dessa forma, o biodiesel de moringa é um substituto aceitável para o petrodiesel (RASHID *et al.*, 2008).

A torta de sementes corresponde a todo o material residual obtido após processo de extração do óleo, constituindo um co-produto da produção de biodiesel. As tortas de diversas oleaginosas, incluindo a moringa (Figura 5B) têm sido utilizadas na alimentação animal, sendo também ricas em componentes minoritários que podem ser fracionados e aproveitados (SCHNEIDER *et al.*, 2006). Contudo, a torta de moringa tem sido pouco estudada com o objetivo de recuperar compostos bioativos que são descritos nas sementes íntegras.



Figura 5. Aspecto das sementes íntegras (A) e da torta (B) de sementes de *Moringa oleifera* obtida após extração do óleo com solvente orgânico

Fontes: A e B: A Autora.

Estudo foi realizado para avaliar o potencial uso de extratos aquosos e salinos de tortas de moringa provenientes da extração química (utilizando solvente orgânico) e mecânica no tratamento e clarificação de água. O extrato obtido a partir da torta resultante da extração química foi mais eficaz, removendo até 90,4% de turbidez diante de uma remoção de no máximo 60,2% com a torta resultante da extração mecânica. Segundo os autores, essa diferença na capacidade coagulante pode ser explicada devido ao maior teor de óleo restante na torta mecânica, uma vez que o óleo pode dificultar a ação do coagulante nas partículas

dispersas na água (SANTOS *et al.*, 2011a). Segundo Santana *et al.* (2010), não há variação significativa entre a composição da semente e da torta de moringa obtida por prensagem mecânica. Os autores atribuíram esse resultado a não-utilização de solvente.

As sementes de *M. oleifera* são ricas em lectinas com diversas atividades biológicas e potenciais biotecnológicos. A exploração da torta de moringa para isolamento dessas proteínas é importante para a valorização deste co-produto da produção de biodiesel.

2.6.3. Lectinas de *M. oleifera*

As sementes de *M. oleifera* contêm três lectinas, denominadas WSMoL (*water-soluble M. oleifera lectin*), cMoL (*coagulant M. oleifera lectin*) e MoL (*M. oleifera 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; ROLIM *et al.*, 2011). WSMoL e cMoL são lectinas ligadoras de quitina e exerceram fraca atividade termicida contra *N. corniger*, promovendo mortalidade somente em altas concentrações (PAIVA *et al.*, 2011).

cMoL é uma proteína isolada por extração em solução salina (NaCl 0,15 M) seguida de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de gel de guar. Apresenta massa molecular de aproximadamente 26,5 kDa e atividade coagulante (SANTOS *et al.*, 2009). Santos *et al.* (2011b) demonstraram que esta lectina foi capaz de remover ácidos húmicos presentes na água. cMoL também promoveu efeitos deletérios sobre larvas e a morte de pupas de *Anagasta kuehniella*, fato associado à capacidade de ligação da lectina à quitina e a glicoconjugados no intestino do inseto (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

WSMoL é uma proteína extraída com água e isolada por meio de cromatografia em coluna de quitina. A lectina apresenta uma única banda polipeptídica de 5 kDa em condições desnaturantes (presença de dodecil sulfato de sódio) e redutoras (presença de ditioneitol) e duas bandas polipeptídicas de 10 e 15 kDa em condições desnaturantes e não redutoras (ROLIM, 2007; COELHO *et al.*, 2009). Dentre as lectinas de moringa, somente WSMoL possui atividade hemaglutinante inibida por frutose (SANTOS *et al.*, 2005; ROLIM *et al.*, 2011).

A elevada solubilidade em água de WSMoL estimulou a investigação do seu efeito sobre as larvas de *A. aegypti*, as quais são encontradas na água. Suspensões aquosas obtidas a partir de 1, 3, 6 e 15 sementes e contendo atividade hemaglutinante promoveram atraso no desenvolvimento larval. WSMoL matou larvas L4 de *A. aegypti* (CL₅₀ de 0,197 mg/mL) e a desnaturação da lectina após aquecimento resultou em perda da ação larvicida. As larvas mortas após incubação com WSMoL apresentaram ausência da camada delimitante do epitélio intestinal, volume intestinal aumentado e hipertrofia dos segmentos. Esses resultados indicam que estruturas quitinosas na matriz peritrófica e/ou receptores em células epiteliais constituem alvos de ligação da lectina. Estudo do efeito de WSMoL sobre a atividade de enzimas de larvas L4 revelou que a lectina é capaz de estimular a atividade de enzimas digestivas (protease, tripsina e α -amilase) e inibir a atividade da enzima detoxificadora β -esterase (COELHO *et al.*, 2009; AGRA-NETO, 2012).

Os efeitos deletérios de WSMoL sobre as larvas de *A. aegypti* estimularam a avaliação do efeito dessa lectina sobre os ovos e o comportamento de oviposição de fêmeas deste inseto. WSMoL impediu a eclosão de ovos estocados por promover a morte do embrião dentro do ovo. A lectina apresentou atividade estimulante sobre a oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti*, o que provavelmente está associado à percepção da presença da lectina na água através de sensores gustatórios. Adicionalmente, não foram visualizados embriões dentro dos

ovos depositados pelas fêmeas na solução de WSMoL, indicando que a lectina prejudicou o desenvolvimento embrionário (SANTOS *et al.*, 2012).

Os efeitos deletérios de WSMoL sobre ovos e larvas de *A. aegypti* e a atividade estimulante de oviposição tornam esta lectina uma promissora candidata para uso como inseticida e um componente de alto valor das sementes de moringa. A recuperação de WSMoL a partir da torta de sementes constitui uma interessante estratégia de aproveitamento com notável potencial biotecnológico.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Purificar lectina(s) presentes em torta de sementes de *M. oleifera* obtida após extração do óleo com solvente orgânico e investigar suspensões aquosas à base da torta e preparações lectínicas quanto ao efeito no desenvolvimento e sobrevivência de larvas de *A. aegypti*.

3.2. Específicos

- Obter torta de sementes de *M. oleifera* através de extração do óleo utilizando solvente orgânico.
- Extrair proteínas da torta em água destilada e avaliar a presença de lectinas no extrato através de ensaio de hemaglutinação.
- Purificar lectinas (MoCL, do inglês *M. oleifera cake lectins*) a partir do extrato de torta utilizando cromatografia em coluna de quitina.
- Avaliar MoCL através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).
- Avaliar a especificidade de MoCL a carboidratos.
- Investigar o efeito de preparações lectínicas e MoCL na sobrevivência de larvas de *A. aegypti* no quarto estágio (L4).
- Determinar os valores da concentração letal de proteínas necessária para matar 50% das larvas (CL₅₀) em 24 horas.
- Obter suspensões aquosas a partir da torta de sementes de *M. oleifera* e avaliá-las quanto ao efeito sobre o desenvolvimento larval de *A. aegypti*.

4. REFERÊNCIAS

AGRA-NETO, A.C. **Efeito de lectinas de *Moringa oleifera* na sobrevivência e atividade de enzimas de larvas de *Aedes aegypti* susceptíveis e resistentes a organofosforado.** Dissertação de Mestrado (Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

ALBUQUERQUE, L.P.; SANTANA, G.M.S.; 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**, *in press*, 2012.

ALLONSO, D.; ROSA, M.S.R.; COELHO, D.R.; COSTA, S.M.; NOGUEIRA, R.M.R.; BOZZA, F.A.; SANTOS, F.B.; ALVES, A.M.B.; MOHANA-BORGES, R. Polyclonal antibodies against properly folded Dengue virus NS1 protein expressed in *E. coli* enable sensitive and early dengue diagnosis. **Journal of Virological Methods**, v. 175, p. 109-116, 2011.

AMAGLO, N.K.; BENNETT, R.N.; CURTO, R.B.; ROSA, E.A.S.; TURCO, V.; GIUFFRIDA, A.; CURTO, A.; CREA, F.; TIMPO, G.M. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1047-1054, 2010.

AMORIM, J.H.; DINIZ, M.O.; CARIRI, F.A.M.O.; RODRIGUES, J.F.; BIZERRA, R.S.P.; ALVES, A.J.S.G.; ALVES, A.M.B.; FERREIRA, L.C.S. Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. **Vaccine**, v. 30, p. 837-845, 2012.

ARAÚJO, R.M.S.; FERREIRA, R.S.; NAPOLEÃO, T.H.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; PAIVA, P.M.G. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v. 183, p. 20-26, 2012.

ARAÚJO, C.S.T.; MELO, E.I.; ALVES, V.N.; COELHO, N.M.M. *Moringa oleifera* Lam. Seeds as a Natural Solid Adsorbent for Removal of Ag^I in Aqueous Solutions. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1727-1732, 2010.

ATHAMNA, A.; COHEN, D.; OFEK, I.; ATHAMNA, M.; STAVRI, H. Rapid identification of *Mycobacterium* species by lectin agglutination. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, 209-215, 2006.

BAGAVAN, A.; RAHUMAN, A.A. Evaluation of larvicidal activity of medicinal plant extracts against three mosquito vectors. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 29-34, 2011.

BALBINOT, N.S.; SCHNEIDER, R.C.S.; RODRIGUEZ, A.A.L.; KAPPEL, F.I.; PREDIGER, M.H.; LARA, L.R.S. Aproveitamento dos resíduos da produção de oleaginosas e da extração de óleo. **Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Montevideo**, 2006.

BALLERSTADT, R.; EVANS, C.; MCNICHOLS, R.; GOWDA, A. Concanavalin A for in vivo glucose sensing: A biotoxicity review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 275-284, 2006.

BHUPTAWAT, H.; FOLKARD, G.K.; CHAUDHARI, S. Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating *Moringa oleifera* seed coagulant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 142, p. 477-482, 2007.

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

BRIEGEL, H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, p. 165-172, 1990.

BUCUR, B.; DANET, A.F.; MARTY, J.L. Versatile method of cholinesterase immobilisation via affinity bonds using Concanavalin A applied to the construction of a screen-printed biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, 217-225, 2004.

CACCIA, S.; VAN DAMME, E.J.M.; DE VOS, W.H.; Smagghe, G. Mechanism of entomotoxicity of the plant lectin from *Hippeastrum* hybrid (*Amaryllis*) in *Spodoptera littoralis* larvae. **Journal of Insect Physiology**, doi:10.1016/j.jinsphys.2012.05.014, 2012.

CACERES, A.; CABRESA, O.; MORALES, O.; MOLLINEDO, P.; MENDIA, P. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, p. 213-216, 1991.

CÂMARA, F.P.; THEOPHILO, R.L.G.; SANTOS, G.T.; PEREIRA, S.R.F.G.; CÂMARA, D.C.P.; MATOS, R.R.C. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 192-196, 2007.

CAMPOS, L.M.; CAVALCANTI, C.L.B.; LIMA-FILHO, J.L.; CARVALHO JR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. **Biomarkers**, v. 11, p. 480-484, 2006.

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

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 185-189, 2000.

COELHO, J. S.; SANTOS, N.D.L.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; FERREIRA, R.S.; ZINGALI, R.B.; COELHO, L.C.B B.; LEITE, S.P.; NAVARRO, D.M.A.F.; PAIVA, P.M.G. 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, 1994.

CORIA, C.; ALMIRON, W.; VALLADARES, G.; CARPINELLA, C.; LUDUEÑA, F.; DEFAGO, M.; PALACIOS, S. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology** v. 99, p. 3066–3070, 2008.

COSTA, R.L.C.; VOLOCH, C.M.L.; SCHRAGO, C.G. Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 309-314, 2012.

DEBNATH, S.; BISWAS, D.; RAY, K.; GUHA, D. *Moringa oleifera* induced potentiation of serotonin release by 5-HT₃ receptors in experimental ulcer model. **Phytomedicine**, v. 11, p. 91-95, 2011.

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 431-437, 2008.

FERREIRA, R.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, A.F.S.; SÁ, R.A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; MORAIS, M.M.C.; SILVA-LUCCA, R.A.; OLIVA, M.L.V.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p. 186-192, 2011.

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

GALLÃO, M.I.; DAMASCENO, L.F.; BRITO, E.S. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, p. 106-109, 2006.

GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K.D.; TAUSCHER, B.; NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysics Acta**, v. 1243, p. 477-481, 1995.

GHEBREMICHAEL, K.A.; GUNARATNA, K.R.; HENRIKSSON, H.; BRUMER, H.; DALHAMMAR, G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water Research**, v. 39, p. 2338-2344, 2005.

GUIMARÃES, M.T.; MELO-JUNIOR, M.R.; COSTA SILVA, R.B.; CAVALCANTE, C.B.L.; BELTRÃO, E.I.C.. Estudo comparativo da expressão de carboidratos no sistema ovogranuloma hepático na esquistossomose humana e experimental. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, p. 59-63, 2008.

HAMSHOU, M.; SMAGGHE, G.; SHAHIDI-NOGHABI, S.; GEYTER, E.; LANOO, N.; VAN DAMME, E.J.M. Insecticidal properties of *Sclerotinia sclerotiorum* agglutinin and its interaction with insect tissues and cells. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 883-890, 2010.

HAMZA, A. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam seed extract on liver fibrosis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 345–355, 2010.

HASENACK, B.S.; BOTELHO, M.V.J.; LAURETTI, F.; MELO, F.L.; ORLANDI, J.M.; LINHARES, R.E.C.; UEDA, M.; NOZAWA, C.M.. The effect of Concanavalin A on the replication of rotavirus (SA-11) in cell culture. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 125-135, 2002.

JAISWAL, D.; RAI, P.K.; KUMAR, A.; MEHTA, S.; WATAL, G. Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 392-396, 2009.

KAMARAJ, C.; RAHUMAN, A.A. Larvicidal and adulticidal potential of medicinal plant extracts from south India against vectors. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, p. 948-953, 2010.

KARADI, R.V.; GADGE, N.B.; ALAGAWADI, K.R.; SAVADI, R.V. Effect of *Moringa oleifera* Lam. root-wood on ethylene glycol induced urolithiasis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 306–311, 2006.

KATRE, U.V.; SURESH, C.G.; KHAN, M.I.; GAIKWAD, S.M. Structure-activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 203-207, 2008.

KENNEDY, J.F.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; CAVALCANT, M.S.M.; COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

KOODALINGAM, A.; MULLAINADHAN, P.; ARUMUGAM, M. Effects of extract of soapnut *Sapindus emarginatus* on esterases and phosphatases of the vector mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Acta Tropica**, v. 118, p. 27-36, 2011.

KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, p. 329-340, 2007.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; VAZEILLE, M.; FILIPPIS, A.M.B.; FAILLOUX, A.B. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 43-54, 2004.

LUMJUAN, N.; RAJATILEKA, S.; CHANGSOM, D.; WICHEER, J.; LEELAPAT, P.; PRAPANTHADARA, L.; SOMBOON, P.; LYCETT, G.; RANSON, H. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, p. 203-209, 2011.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; KUBO, C.E.G.; PARRA, J.R. Bioinsecticidal activity of *Talisia esculenta* reserve protein on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Anticarsia gemmatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 153, p. 24-33, 2011.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; 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**, v. 146, p. 486-498, 2007.

MACIEL, E.V.M.; ARAÚJO-FILHO, V.S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y.M.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32, p. 57-60, 2004.

MELO-JÚNIOR, M.R.; ARAÚJO-FILHO, J.L.S.; PATU, V.J.R.M.; MACHADO, M.C.F.P.; BELTRÃO, E.I.C.; CARVALHO JR., L.B. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumour differential diagnosis. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 455-460, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/dengue/bases/denguebrnet.def>> Acesso em: Julho de 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**, 7. ed., Brasília, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue**. Brasília, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. 3. ed., Brasília, 2001.

MOHAMMED, A.; CHADEE, D.D. Effects of different temperature regimens on the development of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 119, p. 38-43, 2011.

MOURYA, D.T.; YADAV, P.; MISHRA, A.C. Effect of temperature stress on immature stages and susceptibility of *Aedes aegypti* mosquitoes to chikungunya virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 346-350, 2004.

NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; LIMA, T.A.; SANTOS, N.D.L.; SÁ, R.A.; ALBUQUERQUE, A.C.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.

NAPOLEÃO, T.H.; PONTUAL, E.V.; LIMA, T.A.; SANTOS, N.D.L.; SÁ, R.A.; COELHO, L.C.B.B.; NAVARRO, D.M.A.F.; PAIVA, P.M.G. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, v. 110, p. 609-616, 2012.

NISHI, K.; TANEGASHIMA, A.; YAMAMOTO, Y.; USHIYAMA, I.; IKEMOTO, K.; YAMASAKI, S.; NISHIMURA, A.; RAND, S.; BRINKMANN, B.. Utilization of lectin-histochemistry in forensic neuropathology: lectin staining provides useful information for postmortem diagnosis in forensic neuropathology. **Legal Medicine**, v. 5, p. 117-131, 2003.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; CUNHA, R.V.; ZAGNE, S.M.O.; GOMES, F.P.; NICOL, A.F.; COELHO, J.C.O.; SCHATZMAYR, H.G. Fatal primary dengue infections in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 418, 1999.

OLIVEIRA, C.F.R.; LUZ, L.A.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 498-504, 2011.

OMENA, M.C.; NAVARRO, D.M.A.F.; PAULA, J.E.; LUNA, J.S.; LIMA, M.R.F.; SANT'ANA, A.E.G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2549-2556, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva, Switzerland, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue and severe dengue**. Fact sheet n. 117, 2012.

PAIVA, P.M.G.; SANTANA, G.M.S.; SOUZA, I.F.A.C.; ALBUQUERQUE, L.P.; AGRA-NETO, A.C.; ALBUQUERQUE, A.C.; LUZ, L.A.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 982-989, 2011.

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. In: LIONG, M.T. **Bioprocess Sciences and Technology**. New York: Nova Science Publishers Inc., 2011, pp. 269-294.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1998.

PLAWNER, L.; PANNABECHER, L.T.; LAUFER, S.; BAUSTIAN, M.B.; BEYENBAC, K.W. Control of diuresis in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: evidence for similar mechanisms in the male and female. **Journal of Insect Physiology**, v. 37, p. 119-1281, 1991.

PONTUAL, E.V.; NAPOLEÃO, T.H.; ASSIS, C.R.D.; BEZERRA, R.S.; XAVIER, H.S.; NAVARRO, D.M.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, p. 135-152, 2012.

PRABHU, K.; MURUGAN, K.; NARESHKUMAR, A.; BRAGADEESWARAN, S. Larvicidal and repellent potencial of *Moringa oleifera* against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, p. 124-129, 2011.

QUEIROZ, A.F.S.; MOURA, R.M.; RIBEIRO, J.K.C.; LYRA, I.L.; CUNHA, D.C.S.; SANTOS, E.A.; DE-SALES, M.P. Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 147, p. 216-221, 2008.

RASHID, U.; ANWAR, F.; MOSER, B.R.; KNOTHE, G. *Moringa oleifera* oil: A possible source of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8175-8179, 2008.

ROLIM, L.A.D.M.M.; MACEDO, M.F.S.; SISENANDO, H.A.; NAPOLEÃO, T.H.; FELZENSZWALB, I.; AIUB, C.A.F.; COELHO, L.C.B.B.; MEDEIROS, S.R.B.; PAIVA, P.M.G. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. **Journal of Food Science**, v. 76, p. T53-T58, 2011.

ROLIM, L.A.D.M.M. **Purificação da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) e avaliação de genotoxicidade**. Dissertação de Mestrado (Bioquímica), Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

SÁ, R.A.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, N.D.L.; GOMES, F.S.; XAVIER, H.S.; ALBUQUERQUE, A.C.; COELHO, L.C.B.B.; BIEBER, L.W.; PAIVA, P.M.G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, p. 460-464, 2008.

SÁ, R.A.; SANTOS, N.D.L.; SILVA, C.S.B.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; CAVADA, B.S.; COELHO, L.C.B.B.; NAVARRO, D.M.A.F.; BIEBER, L.W.; PAIVA, P.M.G. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 149, p. 300-306, 2009.

SANTANA, C.R.; PEREIRA, D.F.; ARAÚJO, N.A.; CAVALCANTI, E.B.; SILVA, G.F. Caracterização físico-química da moringa (*Moringa oleifera* Lam). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 55-60, 2010.

SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C.A.A.; ARAGÃO, K.S.; OLIVEIRA, C.C.; MOTA, M.R.L.; GOMES, R.C.; PIRES, A.F.; TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D.O.; ALENCAR, N.M.N.; CRIDDLE, D.N.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S.. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, p. 1050-1055, 2006.

SANTOS, A.F.S.; ARGOLO, A.C.C.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v. 39, p. 975-980, 2005.

SANTOS, B.S.; FARIAS, P.M.A.; MENEZES, F.D.; FERREIRA, R.C.; JÚNIOR, S.A.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; CARVALHO JUNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. CdS-Cd(OH)₂ core shell quantum dots functionalized with Concanavalin A lectin for recognition of mammary tumors. **Physica Status Solidi**, v. 11, p. 4017-4022, 2006.

SANTOS, A.F.S.; LUZ, L.A.; ARGOLO, A.C.C.; TEIXEIRA, J.A.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504–508, 2009.

SANTOS, W.R.; MATOS, D.B.; OLIVEIRA, B.M.; SANTANA, T.M.; SANTANA, M.M.; SILVA, G.F. Estudo do tratamento e clarificação de água com torta de sementes de *Moringa oleifera* Lam. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, p. 293-297, 2011a.

SANTOS, A.F.S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; TEIXEIRA, J.A.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; NOGUEIRA, R.M.O.B. Interaction of *Moringa oleifera* seed lectin with humic acid. **Chemical Papers**, v. 65, p. 406-411, 2011b.

SANTOS, N.D.L.; MOURA, K.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, G.K.N.; COELHO, L.C.B.B.; NAVARRO, D.M.A.F.; PAIVA, P.M.G. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS One**, doi: 10.1371/journal.pone.0044840, 2012.

SAUVION, N.; NARDON, C.; FEBVAY, G.; GATEHOUSE, A.M.R.; RAHBE, Y. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, p. 1137-1150, 2004.

SCHMITZ, J.; ROEHRIG, J.; BARRETT, A.; HOMBACH, J. Next generation dengue vaccines: A review of candidates in preclinical development. **Vaccine**, v. 29, p. 7276- 7284, 2011.

SCHNEIDER, R.C.S.; RODRIGUEZ, A.L.; MAHLMANN, C.M.; BALBINOT, N.; RADKTE, L.; BERGONSKI, R. Obtenção e caracterização de compósitos de termoplásticos e resíduos da produção de óleo de girassol. **17º CBECIMat**, Foz do Iguaçu-PR, p. 4065-4076, 2006.

SEEMA, S.K.J. Molecular mechanism of pathogenesis of dengue virus: entry and fusion with target cell. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 20, p. 92-103, 2005.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, p. 949-959, 1972.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, p. 53-62, 2004.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **Journal of biological chemistry**, v. 282, p. 2753-2764, 2007.

SILVA, M.D.C.; SÁ, R.A.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; SANTOS, N.D.L.; ALBUQUERQUE, A.C.; XAVIER, H.S.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 334-340, 2009.

SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G.; SANTOS, R.M.G.; RODRIGUES-FILHO, E.; ELIAS, C.N. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 396-399, 2004.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA FILHO, A. M. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, p. 46-49, 2004.

SOLIVA, C.R.; KREUZER, M.; FOIDL, N.; FOIDL, G.; MACHMULLER, A.; HESS, H.D. Feeding value of whole and extracted *Moringa oleifera* leaves for ruminants and their effects on ruminal fermentation in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v. 118, p. 47-62, 2005.

SUMAN, D.S.; SHRIVASTAVA, A.R.; PLANT, S.C.; PARASHAR, B.D. Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with egg surface morphology and morphometrics using scanning electron microscopy. **Arthropod Structure & Development**, v. 40, p. 479-483, 2011.

VETRI, V.; CARROTTA, R.; PICONE, P.; DI CARLO, M.; MILITELLO, V. Concanavalin A aggregation and toxicity on cell cultures. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804, p. 173-183, 2010.

VONTAS, J.; KIOULOS, E.; PAVLIDI, N.; MOROU, E.; DELLA TORRE, A.; RANSON, H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, doi:10.1016/j.pestbp.2012.05.008, 2012.

WHITEHORN, J.; SIMMONS, C.P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**, v. 29, p. 7221–7228, 2011.

WILDER-SMITH, A.; GUBLER, D.J. Geographic Expansion of Dengue: The Impact of International Travel. **Medical Clinics of North America**, v. 92, p. 1377–1390, 2008.

YIN, R.; HAN, J.; ZHANG, J.; NIE, J. Glucose-responsive composite microparticles based on chitosan, concanavalin A and dextran for insulin delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, 483-488, 2010.

5. ARTIGO

***Moringa oleifera* seed cake obtained after oil extraction with n-hexane is source of compounds with deleterious effects on survival and development of *Aedes aegypti* larvae**

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO

“Bioresource Technology”



Fator de Impacto: 4.980
(JCR-2011)

***Moringa oleifera* seed cake obtained after oil extraction with n-hexane is source of compounds with deleterious effects on survival and development of *Aedes aegypti* larvae**

Ana Patrícia Silva de Oliveira^a, Livia Lais de Santana Silva^a, Emmanuel Viana Pontual^a, Nataly Diniz de Lima Santos^a, Nicácio Henrique da Silva^a, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil.*

***Corresponding author.** Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br

Abstract

Moringa oleifera seed cake is obtained after oil extraction. The moringa seeds contain the lectins cMoL and WSMoL and this last was active against *Aedes aegypti* larvae. This work shows that *M. oleifera* cake suspension in water (3.0 g/L) promoted delay in larval development, with 60% of larvae still in second instar after 72 h. Also, *M. oleifera* cake lectins (MoCL) were purified by treatment of water extract with ammonium sulphate (60%) and chitin chromatography. SDS-PAGE of MoCL revealed three polypeptide bands (10, 15 and 27 kDa), indicating that this preparation may contain a mix of cMoL and WSMoL. MoCL hemagglutinating activity was inhibited by monosaccharides and glycoproteins. MoCL induced mortality of *Aedes aegypti* larvae (LC_{50} of 0.89 mg/mL). In conclusion, *M. oleifera* cake contains larvicidal lectin and compounds able to interfere in *A. aegypti* larval cycle. The work adds new values to moringa cake as biotechnological resource.

Keywords: *Moringa oleifera*; *Aedes aegypti*; lectin; seed cake; insecticidal activity; biodiesel chain co-product.

1. Introduction

Moringa oleifera is a tree widely cultivated throughout the tropics and subtropics whose tissues contain several and different bioactive compounds, being referred as the “miracle tree” or “multipurpose tree”. Its seeds contain a high content of non-volatile oil (27–40%), which is used for human consumption and in cosmetic industry as well as is considered an acceptable raw material for biodiesel production (Soliva et al., 2005; Gallão et al., 2006; Santos et al., 2011). The high ketane content and the high oxidative stability of the biodiesel derived from *M. oleifera* seeds become it a potential substitute for the petro diesel (Rashid et al., 2008).

Seed cakes correspond to the residual co-product generated after the oil extraction both by organic solvent treatment or mechanical pressing. The cakes from several oleaginous seeds have been used for animal feeding (Makkar et al., 2008; Moyo et al., 2012) but have been poorly studied in order to recover bioactive compounds. In the case of *M. oleifera*, the seeds are also rich in proteins and other compounds so that its seed cake can be a notable source of components that can be extracted, fractionated and used with biotechnological purposes (Balbinot et al., 2006). The exploitation of cakes is important for the oleaginous market since aggregates values for a biodiesel chain co-product.

Lectins, carbohydrate-binding proteins, are among the bioactive compounds found in *M. oleifera* seeds. The coagulant *M. oleifera* lectin (cMoL) was able to remove particles in suspension in turbid water (Santos et al., 2009). When immobilized to Sepharose, cMoL bind to humic acids and can be used in water treatment to remove these components (Santos et al., 2011). The water-soluble *M. oleifera* lectin (WSMoL) killed *Aedes aegypti* fourth-stage larvae (LC₅₀ of 0.197 mg/mL) promoting disruption of underlying epithelium, increase of gut lumen volume and hypertrophy of segments (Coelho et al., 2009). WSMoL also impaired the hatching of *A. aegypti* stored eggs by killing the embryos inside the eggs as well as showed

oviposition-stimulant activity and prevented the development of embryos in the eggs laid by *A. aegypti* gravid females (Santos et al., 2012). The recovering of cMoL and WSMoL from *M. oleifera* seed cakes constitutes an interesting strategy for utilization of this material as technological bioresource.

Dengue fever represents a major international public health concern since it has a great potential to take serious and lethal complications and about 40% of world population are at risk of infection (World Health Organization, 2012). Furthermore, the effective control of vector populations represents the main strategy to control disease spreading since there is no vaccine for dengue. This scenario, coupled with the previous reports of deleterious effects on *A. aegypti* exerted by WSMoL, isolated from powder of *M. oleifera* whole seeds, stimulated the isolation of lectins from *M. oleifera* seed cake and investigation of their larvicidal activity against *A. aegypti*.

This work reports the isolation of lectins (MoCL) from *M. oleifera* seed cake obtained after oil extraction with n-hexane, the delay in *A. aegypti* larval development promoted by cake water suspensions as well as the larvicidal effect of cake extract, lectin-rich fraction and MoCL.

2. Materials and methods

2.1. *M. oleifera* seed cake

M. oleifera seeds were collected from 10-15-year-old trees in Recife City, State of Pernambuco, northeastern Brazil, and stored at -20°C. Voucher specimen (number 73,345) is archived at the herbarium *Dárdano de Andrade Lima* (*Instituto Agrônômico de Pernambuco*, Recife, Brazil). Seed powder (100 g) was transferred to filter paper cartridge and placed in a

Soxhlet extractor. Solvent n-hexane was added for oil removal during 6 h at 70° C and the resulting material was named *M. oleifera* seed cake.

2.2. Protein content

Protein concentration was evaluated according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (31.25–500 µg/mL; Sigma-Aldrich, USA) as standard.

2.3. Hemagglutinating activity

Hemagglutinating activity was assessed using microtiter plates (Kartell S.P.A., Italy) according to Paiva and Coelho (1992). The sample (50 µl) was serially 2-fold diluted in 0.15 M NaCl before incubation with a suspension (2.5 % v/v) of rabbit erythrocytes fixed with glutaraldehyde (Bing et al. 1967). One hemagglutination unit (titer) was defined as the reciprocal of the highest dilution of sample promoting full erythrocyte agglutination (Napoleão et al., 2012). Specific hemagglutinating activity was defined as the ratio between the titer and protein concentration (mg/mL). Hemagglutinating activity inhibitory assays were performed by previous incubation (45 min) of MoCL with 200 mM monosaccharide (fructose, glucose, *N*-acetylglucosamine, galactose, mannose) or 0.5 mg/mL glycoprotein (asialofetuin, casein and thyroglobulin) solutions before addition of erythrocyte suspension.

2.4. Isolation of MoCL

Seed cake (10 g) was powdered and homogenized with distilled water (100 mL) using a magnetic stirrer for 16 h at 4 °C. After filtration through gauze and centrifugation (9,000 g,

15 min, 4 °C), the collected supernatant corresponded to cake extract, which was evaluated for protein concentration and hemagglutinating activity. Soluble proteins in cake extract were precipitated with ammonium sulphate at the saturation of 60% (w/v) according to Green and Hughes (1955). After centrifugation (9000 *g*, 15 min, 4 °C), the precipitate was collected and submitted to dialysis (3500 Da cut-off membrane) against distilled water (4 h) and 0.15 M NaCl (4 h) at 4 °C. The dialyzed fraction with hemagglutinating activity (lectin-rich fraction) was loaded (52 mg of proteins) onto a chitin column (7.5 x 1.5 cm) equilibrated (0.3 mL/min flow rate) with 0.15 M NaCl. After washing with the equilibrating solution, the proteins adsorbed on the column were eluted with 1.0 M acetic acid and the fractions with hemagglutinating activity were pooled (MoCL). MoCL was dialyzed (3500 Da cut-off membrane) against distilled water (4 h) at 4 °C for eluent elimination. Protein concentration and hemagglutinating activity from lectin-rich fraction and MoCL were determined.

2.5. Purification of WSMoL and cMoL

WSMoL and cMoL were purified from *M. oleifera* whole seeds as described by Coelho et al. (2009) and Santos et al. (2009), respectively.

2.6. SDS-PAGE

PAGE of MoCL, WSMoL and cMoL in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) was performed on 12% (w/v) gel according to Laemmli (1970). Polypeptides and molecular mass markers (bovine serum albumin, 66,000 Da; carbonic anhydrase, 29,000 Da; trypsin inhibitor, 20,000 Da; cytochrome c, 12,500 Da; aprotinin, 6500 Da; from Sigma-Aldrich, USA) were stained with Coomassie Brilliant Blue in 10% acetic acid (0.02%, v/v).

After staining the gel containing MoCL was dehydrated and scanned and the intensity of polypeptide bands was analyzed using the software Scion Image Beta 4.02.2 (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

2.7. Effect of *M. oleifera* cake suspensions on *A. aegypti* larval development.

Powder of *M. oleifera* seed cake (0.2, 0.6, 1.2 or 3.0 g) was added to distilled water (1 L) and agitated for 3 min. After resting period of 30 min, the suspensions were passed through filter paper to remove remnants of cake powder. The filtrates (cake suspensions, CS), called CS_{0.2}, CS_{0.6}, CS_{1.2} and CS_{3.0}, with the numeric index corresponded to the initial grams of seed cake powder used to obtain the suspension, were evaluated for protein concentration and hemagglutinating activity.

The evaluation of the effect of suspensions on larval development was performed according to Coelho et al. (2009). Five *A. aegypti* larvae in first stage were placed into disposable plastic cups containing 20 mL of distilled water (control) or CS_{0.2}, CS_{0.6}, CS_{1.2} and CS_{3.0}. The assay was incubated at 27 °C and larvae were fed daily with cat food (Whiskas[®]). The larval stage and mortality rate were recorded at the start of the experiment and after 24, 48, and 72 h. For identification of the larval stage, the larvae were compared with the standard larvae of each instar fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate solution, pH 7.2. Three independent experiments were run in triplicate.

2.8. Larvicidal activity

A. aegypti eggs were hatched in distilled water at a temperature range of 25–27°C and cat food (Whiskas[®]) was offered to larvae. When reaching the early fourth-stage (L4), larvae

were collected and used in bioassays. Larvicidal activity was evaluated using an adaptation of the World Health Organization (1981) method described by Navarro et al. (2003). Stock solutions of cake extract (19.5 mg/mL of protein), lectin-rich fraction (25.9 mg/mL of protein) and MoCL (1.4 mg/mL of protein) were diluted in distilled water to provide test solutions in the protein concentration ranges 1.5–8.0 mg/mL (cake extract), 0.2–2.0 mg/mL (lectin-rich fraction) and 0.2–1.0 mg/mL (MoCL). The final volume of each larvicidal assay was 20 mL of test solution or negative control (distilled water or 0.15 M NaCl) and contained 20–25 larvae in early fourth stage. Mortality rate (%) was determined after 24 h of incubation at 28 ± 2 °C and 12/12 (light–dark) photoperiodism. Larvae were considered dead when they were unable to reach the surface solution and did not respond to stimulus when the cups were shaken (World Health Organization, 1981). Three independent experiments were run in triplicate.

2.9. Statistical analysis

Standard deviations (SD) were calculated using GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA) and data were expressed as a mean of replicates $\pm$ SD. Significant differences between treatment groups were analysed by Student's *t*-test (significance at $p < 0.05$) and Tukey test using Origin 6.0 program. The lethal concentrations required to 16% (LC_{16}), 50% (LC_{50}) and 84% (LC_{84}) of larvae in 24 h were calculated by probit analysis with a reliability interval of 95% using the computer software StatPlus® 2006 (AnalystSoft, Canada).

3. Results and discussion

Oleaginous seeds, which are used as oil source for biodiesel production, are also rich in other valuable components that can be recovered. This study aimed to add new biotechnological value to a co-product of *M. oleifera* biodiesel production chain, evaluating the seed cake as source of lectin with insecticidal activity.

High protein concentration and hemagglutinating activity were detected in cake extract (Table 1) revealing that lectins from *M. oleifera* seeds resisted to oil extraction using n-hexane. The specific hemagglutinating activity and protein concentration in cake extract were higher than those reported for water extract (protein: 4.1 mg/mL; specific hemagglutinating activity: 15) prepared using powder from *M. oleifera* whole seeds (Santos et al., 2012). These results were probably due to the elimination of seed oil, which become the cake mass used in extraction more rich in protein than an equivalent mass of whole seed powder. Sereewatthanawut et al. (2008) reported that the protein content of rice brans determined by near infrared increased after oil extraction.

A low interference of oil in solubilization of proteins in water could also have been the reason for the increase in hemagglutinating activity in crude extract when compared with extract obtained from whole seeds. According to Boatright and Hettiarachchy (1995), the presence of lipids in soy protein isolates was related to decreased protein solubility. Also, Liang (1999) demonstrated that the interaction between soybean oil and soy proteins resulted in decrease of water solubility of proteins.

Table 1 shows the summary of MoCL purification using protein extraction in water, ammonium sulphate precipitation and chitin chromatography. The treatment of extract with 60% ammonium sulphate resulted in concentration of lectin in precipitated fraction (lectin-rich fraction) as evidenced by increase of specific hemagglutinating activity. This lectin-rich

fraction was then chromatographed on chitin column and a single peak of adsorbed proteins with hemagglutinating activity (MoCL) was eluted with 1.0 M acetic acid (Figure 1A). MoCL was recovered with very high specific hemagglutinating activity (93,622) revealing high purification level.

The purification factor obtained for MoCL (3573) was very higher than those reported for lectins isolated from *M. oleifera* whole seeds. WSMoL was purified with specific hemagglutinating activity of 2598 and a purification factor of 137 (Coelho et al., 2009; Rolim et al., 2011) while cMoL was isolated with specific hemagglutinating activity of 864 and the obtained purification factor was 2.3 (Santos et al., 2009). These results may also be ascribed to concentration of proteins in seed cake and to facilitation in the solubilization of lectins after oil removal.

SDS-PAGE revealed the presence of three polypeptide bands in MoCL, with molecular masses of approximately 10, 15 and 27 kDa, being this last more intense (Figure 1B). Interestingly, similarities can be observed between the SDS-PAGE profiles of MoCL, WSMoL and cMoL. SDS-PAGE of WSMoL revealed two polypeptide bands of 10 and 15 kDa (Figure 1C) and cMoL appeared as a single polypeptide band with 27 kDa (Figure 1D), corroborating the results of Santos et al. (2009). It is plausible that MoCL, in fact, corresponds to a mix of WSMoL and cMoL, which were co-purified being cMoL present at higher concentration. The presence of both lectins may also be a reason for the very high specific hemagglutinating activity.

The effect of carbohydrates on MoCL hemagglutinating activity is shown in Table 2 besides data previously reported for WSMoL and cMoL. The results showed that MoCL hemagglutinating activity was inhibited by carbohydrates that inhibit WSMoL and cMoL activities, in agreement with the presence of a mix of these lectins. Hemagglutinating activity of MoCL was also inhibited by the glycoproteins used (Table 2).

Studies showed that WSMoL is easily solubilized only by soaking intact seeds in water (Santos et al., 2005) and that suspensions obtained by steeping of one, three, six or fifteen *M. oleifera* intact seeds in 1 liter of water showed hemagglutinating activity and impaired the larval development of *A. aegypti* (Coelho et al., 2009). In this sense, aqueous suspensions CS_{0.2}, CS_{0.6}, CS_{1.2} and CS_{3.0} were prepared using 0.2, 0.6, 1.2 and 3.0 g/L of *M. oleifera* cake, which corresponded to the weight of one, three, six and fifteen intact seeds, respectively. The suspensions were assessed for protein content, hemagglutinating activity and effect on development of *A. aegypti* larvae.

CS_{0.2} did not show protein content, while CS_{0.6}, CS_{1.2} and CS_{3.0} showed protein concentrations of 0.02, 0.13 and 0.28 mg/mL, respectively. None of the suspensions were able to agglutinate rabbit erythrocytes, indicating that the conditions employed to prepare the suspensions did not solubilize lectins. In despite of this, the cake suspensions promoted a significant delay in *A. aegypti* larval development (Figure 2). After 72-h incubation with CS_{1.2} and CS_{3.0}, 14% and 20% of larvae were still in the first instar, respectively; in addition, 50–60% of larvae were still at the second instar in both treatments. The absence of hemagglutinating activity in suspensions that delayed larval development indicates that *M. oleifera* cake contains other compounds able to exert deleterious effects on *A. aegypti* larvae. Consoli and Oliveira (1994) reported that plant-derived compounds influence the development of mosquito larvae and Coria et al. (2008) demonstrated a correlation between the concentration of the plant extracts and their ability to delay the development of larvae to pupae.

Despite the damage to larval development, no mortality was detected after incubation of larvae with the cake suspensions. Differently, the incubation of *A. aegypti* larvae with the aqueous suspension from fifteen *M. oleifera* seeds (3.0 g) resulted in a mortality rate of 45% (Coelho et al., 2009). This preparation showed a specific hemagglutinating activity of 128 and

the authors related lectin activity to the delayed development and larvae death (Coelho et al., 2009).

The previous report of WSMoL ability to kill *A. aegypti* fourth-stage larvae stimulated the evaluation of cake preparations containing lectin for larvicidal activity. The results from larvicidal assay revealed that crude extract, lectin-rich fraction and MoCL were toxic for *A. aegypti* larvae after 24-h incubation (Table 3). The decrease of LC_{50} value after each purification step demonstrates the efficiency of the protocol in concentrate the active principle. Cake extract was more effective on *A. aegypti* larvae than extracts from heartwood, bark and leaf of *Myracrodruon urundeuva*, which showed LC_{50} of 14.86, 8.81 and 10.9 mg/mL, respectively (Sá et al., 2009; Napoleão et al., 2012).

WSMoL showed a LC_{50} value of 0.197 mg/mL against *A. aegypti* larvae (Coelho et al., 2009) while no mortality was detected after incubation with cMoL (Agra-Neto et al., 2012). The larvicidal effect observed for MoCL corresponded to an intermediate response between those observed for WSMoL and cMoL supporting the hypothesis that MoCL can be a mixture of these two lectins or molecular forms similar to them. In addition, the high LC_{50} value determined for MoCL could be explained by a higher amount of cMoL (inactive against *A. aegypti* larvae) than WSMoL, as indicated by SDS-PAGE. It has been reported that distinct effects of WSMoL and cMoL on *A. aegypti* larvae are linked to distinct interaction patterns between these lectins and larval proteases, trypsin-like and amylase resulting in distinct modulation of digestive enzyme activities (Agra-Neto et al., 2012).

The larvicidal activity of lectins has been recently reported. The *Myracrodruon urundeuva* bark, heartwood and leaf lectins also showed larvicidal activity against *A. aegypti* fourth-stage larvae with LC_{50} values of 0.125, 0.04 and 0.202 mg/mL, respectively (Sá et al., 2009; Napoleão et al., 2012). The insecticidal mechanisms by which lectins kill insects can involve resistance to hydrolysis by proteases from insect gut, binding to glycosylated

molecules present at stomach and gut lumen, epithelial cells and peritrophic matrix, disruption of intestinal tract organization as well as interference in activity of digestive enzymes (Macedo et al., 2007; Coelho et al., 2009; Caccia et al., 2012; Napoleão et al., 2012).

Bioactive compounds have been recovered from seed cakes from other plants. Kaempferol acetylated glycosides with high antioxidant activity on DPPH radical were isolated from the seed cake of *Camellia oleifera* (Gao et al., 2011) and *Camelina sativa* cake extracts containing phenolic compounds showed strong reducing power and radical scavenging activity (Terpinc et al., 2012).

Similar to the results obtained with *M. oleifera* seed cake, lectin activity from *Jatropha curcas* seeds were also resistant to oil extraction procedure. It was also reported the presence of toxic phorbol esters and trypsin inhibitor activity in *J. curcas* cake, which is used as an ingredient in livestock feed; the authors stated that these components and the lectins should be removed from cake before offered to animals (Makkar et al., 2008).

4. Conclusions

M. oleifera seed lectins resisted to treatment of seeds with n-hexane. MoCL obtained by procedure that includes protein extraction in water, ammonium sulphate treatment and chitin chromatography probably is a mix of WSMoL and cMoL and showed specific hemagglutinating activity higher than the lectins obtained from whole seeds. This study reveals that seed cake is source of compounds without hemagglutinating activity that delay larval development (cake suspensions) and lectins with larvicidal activity (MoCL).

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants and fellowships (L.C.B.B. Coelho and P.M.G. Paiva), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), and *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE) for research grants. A.P.S. Oliveira would like to thank CNPq for graduate scholarship. L.L.S. Silva would like to thank CNPq for Scientific Initiation scholarship. E.V. Pontual and N.D.L. Santos would like to thank FACEPE for graduate scholarships.

References

- Agra-Neto, A.C., Napoleão, T.H., Pontual, E.V., Santos, N.D.L., Luz, L.A., Oliveira, C.M.F., Melo-Santos, M.A., Navarro, D.M.A.F., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G. 2012. Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and activity of enzymes from *Aedes aegypti* organophosphate-susceptible and resistant larvae. Submitted for publication.
- Balbinot, N.S., Schneider, R.C.S., Rodriguez, A.A.L., Kappel, F.I., Prediger, M.H., Lara, L.R.S., 2006. Aproveitamento dos resíduos da produção de oleaginosas e da extração de óleo. Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Montevideo.
- Bing, D.H., Weyand, J.G., Stavinsky, A.B., 1967. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124, 1166-1170.
- Boatright, W.L., Hettiarachchy, N.S., 1995. Soy protein isolate solubility and surface hydrophobicity as affected by antioxidants. *J. Food Sci.* 60, 798- 800.
- Caccia, S., Van Damme, E.J.M., De Vos, W.H., Smagghe, G., 2012. Mechanism of entomotoxicity of the plant lectin from *Hippeastrum* hybrid (*Amaryllis*) in *Spodoptera littoralis* larvae. *J. Insect Physiol.* 58, 1177-1183.

- Coelho, J.S., Santos, N.D.L., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Ferreira, R.S., Zingali, R.B., Coelho, L.C.B. B., Leite, S.P., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., 2009. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere* 77, 934-938.
- Consoli, R.A.G.B.; Oliveira, R.L., 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz.
- Coria, C., Almiron, W., Valladares, G., Carpinella, C., Ludueña, F., Defago, M., Palacios, S., 2008. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bioresour. Technol.* 99, 3066-3070.
- Gallão, M.I., Damasceno, L.F., Brito, E.S., 2006. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. *Rev. Ciên. Agron.* 37, 106-109.
- Gao, D-F., Xu, M., Zhao, P., Zhang, X-Y., Wang, Y-F., Yang, C-R., Zhang, Y-J. Kaempferol acetylated glycosides from the seed cake of *Camellia oleifera*. *Food Chem.* 124, 432-436.
- Green, A.A., Hughes, L., 1955. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents. In: Colowick, S., Kaplan, N. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, pp. 67-90.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Liang, J-H., 1999. Fluorescence due to interactions of oxidizing soybean oil and soy proteins. *Food Chem.* 66, 103-108.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Silva, M.B.R., Coelho, L.C. B.B., 2007. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera:

- Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Comp. Biochem. Physiol. A 146, 486-498.
- Makkar, H.P.S., Francis, G., Becker, K., 2008. Protein concentrate from *Jatropha curcas* screw-pressed seed cake and toxic and antinutritional factors in protein concentrate. J. Sci. Food Agric. 88, 1542-1548.
- Moyo, B., Oyedemi, S., Masika, P.J., Muchenje, V., 2012. Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake. Meat Sci. 91, 441-447.
- Napoleão, T.H., Pontual, E.V., Lima, T.A., Santos, N.D.L., Sá, R.A., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., 2012. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. Parasitol. Res. 110, 609-616.
- Navarro, D.M.A.F., Oliveira, P.E.S., Potting, R.J.P., Brito, A.C., Fital, S.J.F., Sant'Ana, A.E.G., 2003. The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L (Dipt., Culicidae). J. Appl. Entomol. 127, 46-50.
- Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart (amaratu bean). Appl. Biochem. Biotechnol. 36, 113-118.
- Rashid, U., Anwar, F., Moser, B.R., Knothe, G., 2008. *Moringa oleifera* oil: A possible source of biodiesel. Bioresour. Technol. 99, 8175-8179.
- Rolim, L.A.D.M.M., Macedo, M.F.S., Sisenando, H.A., Napoleão, T.H., Felzenszwalb, I., Aiub, C.A.F., Coelho, L.C.B.B., Medeiros, S.R.B., Paiva, P.M.G., 2011. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. J. Food Sci. 76, T53-T58.
- Sá, R.A., Santos, N.D.L., Silva, C.S.B., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Cavada, B.S., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Bieber, L.W., Paiva, P.M.G., 2009. Larvicidal activity of

- lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. Comp. Biochem. Physiol. C 149, 300-306.
- Santos, A.F.S., Argolo, A.C.C., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2005. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. Water Res. 39, 975-980.
- Santos, A.F.S., Luz, L.A., Argolo, A.C.C., Teixeira, J.A., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 2009. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. Process Biochem. 44, 504-508.
- Santos, W.R., Matos, D.B., Oliveira, B.M., Santana, T.M., Santana, M.M., Silva, G.F., 2011. Estudo do tratamento e clarificação de água com torta de sementes de *Moringa oleifera* Lam. Rev. Bras. Prod. Agroind. 13, 293-297.
- Santos, N.D.L., Moura, K.S., Napoleão, T.H., Santos, G.K.N., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., 2012. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. PLoS One, doi: 10.1371/journal.pone.0044840.
- Sereewatthanawut, I., S. Prapintip, K. Watchiraruji, M. Goto, M. Sasaki and A. Shotipruk, 2008. Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis. Bioresour. Technol. 99: 555-561.
- Soliva, C.R., Kreuzer, M., Foidl, N., Foidl, G., Machmuller, A., Hess, H.D., 2005. Feeding value of whole and extracted *Moringa oleifera* leaves for ruminants and their effects on ruminal fermentation in vitro. Animal Feed Sci. Technol. 118, 47-62.
- Terpinc, P., Polak, T., Makuc, D., Ulrih, N.P., Abramovič, H., 2012. The occurrence and characterisation of phenolic compounds in *Camelina sativa* seed, cake and oil. Food Chem. 131, 580-589.
- World Health Organization, 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC/81.807, 1-6.

World Health Organization, 2012. Dengue and severe dengue. Fact sheet number 117.

Table 1. Summary of *M. oleifera* cake lectins purification.

Sample	Protein (mg/mL)	HA (titer ⁻¹)	SHA	Purification (times)
Cake extract	19.5	512	26.2	1
Lectin-rich fraction	25.9	1024	39.5	1.5
MoCL	1.4	131072	93622	3573

Hemagglutinating activity (HA) was defined as the as the reciprocal of the highest dilution of sample promoting full erythrocyte agglutination. Specific HA (SHA) corresponded to the ratio between titer and protein concentration (mg/mL). Purification was measured as the ratio between the SHA in the stage and SHA of cake extract. MoCL: *M. oleifera* cake lectins.

Table 2. Inhibition of hemagglutinating activity of MoCL, WSMoL and cMoL by monosaccharide and glycoprotein preparations.

Inhibitor	MoCL	WSMoL ^a	cMoL ^b
Fructose	+	+	-
Glucose	+	+	+
Mannose	+	+	-
N-acetylglucosamine	+	+	-
Galactose	+	+	+
Asialofetuin	+	ND	+
Casein	+	ND	+
Thyroglobulin	+	+	ND

^aAccording to Santos et al. (2005), Coelho et al. (2009) and Rolim et al. (2011). ^bAccording to Santos et al. (2009) and Paiva et al. (2011). Inhibited (+) and not inhibited (-). ND: not described.

Table 3. Larvicidal activity of *M. oleifera* cake preparations against *A. aegypti*.

Sample	Protein concentration (mg/mL)		
	LC ₁₆	LC ₅₀	LC ₈₄
Cake extract	1.40	2.98	4.56
Lectin-rich fraction	0.58	0.95	1.33
MoCL	0.44	0.89	1.34

Lethal concentrations required to 16% (LC₁₆), 50% (LC₅₀) and 84% (LC₈₄) of larvae in 24 h were calculated by probit analysis with a reliability interval of 95%. MoCL: *M. oleifera* cake lectins.

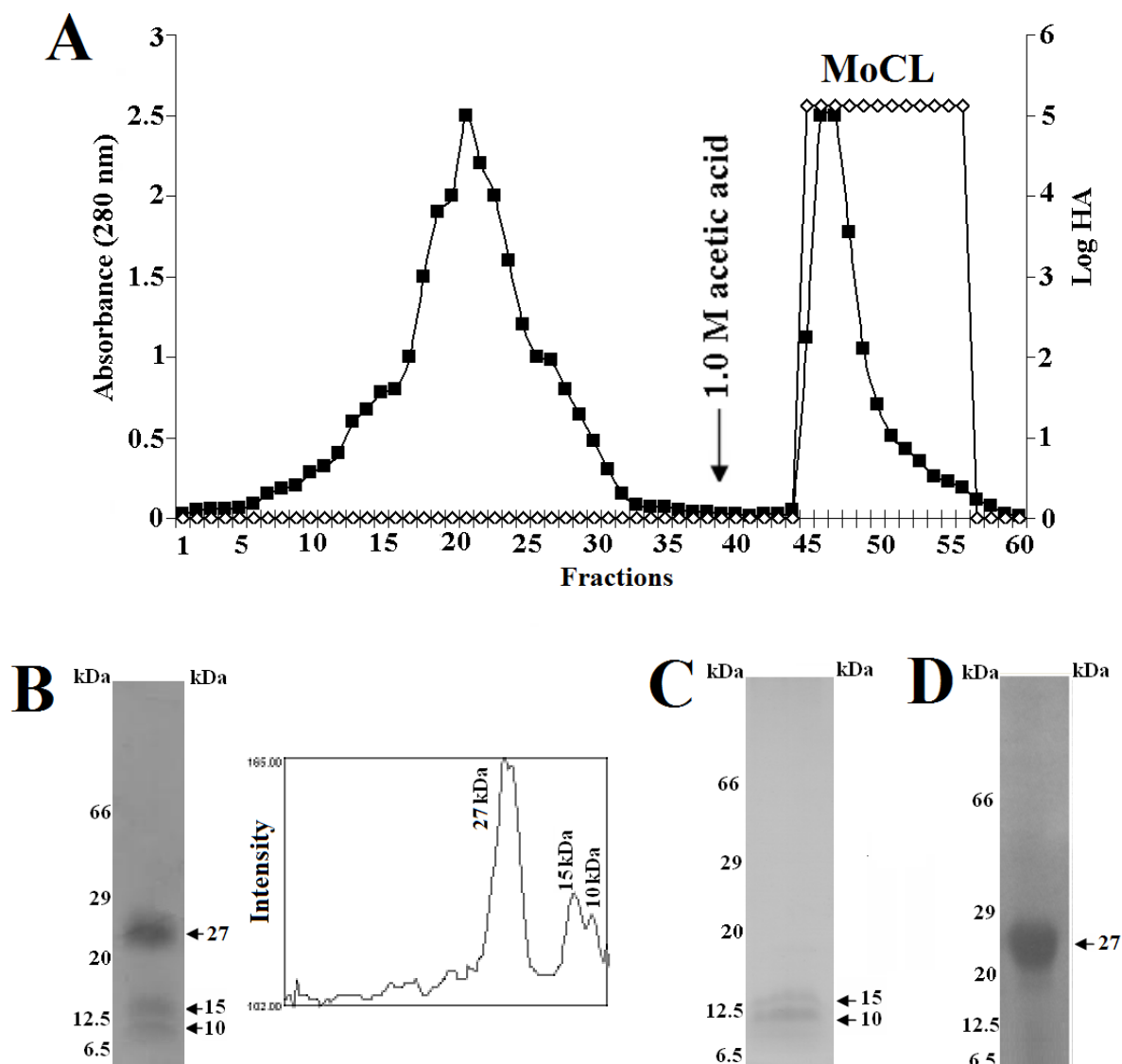


Figure 1. Purification of *M. oleifera* cake lectins (MoCL). (A) Chromatography of lectin-rich fraction on chitin column. The washing step used 0.15 M NaCl; arrow represents eluent added. Fractions (2.0ml) were collected and evaluated for hemagglutinating activity (HA). (B) SDS-PAGE (12%, w/v) of MoCL and densitogram showing intensities of polypeptide bands staining. (C) SDS-PAGE (12%, w/v) of WSMoL isolated as described by Coelho et al. (2009). (D) SDS-PAGE (12%, w/v) of cMoL isolated as described by Santos et al. (2009). All gels were stained with Coomassie Brilliant Blue.

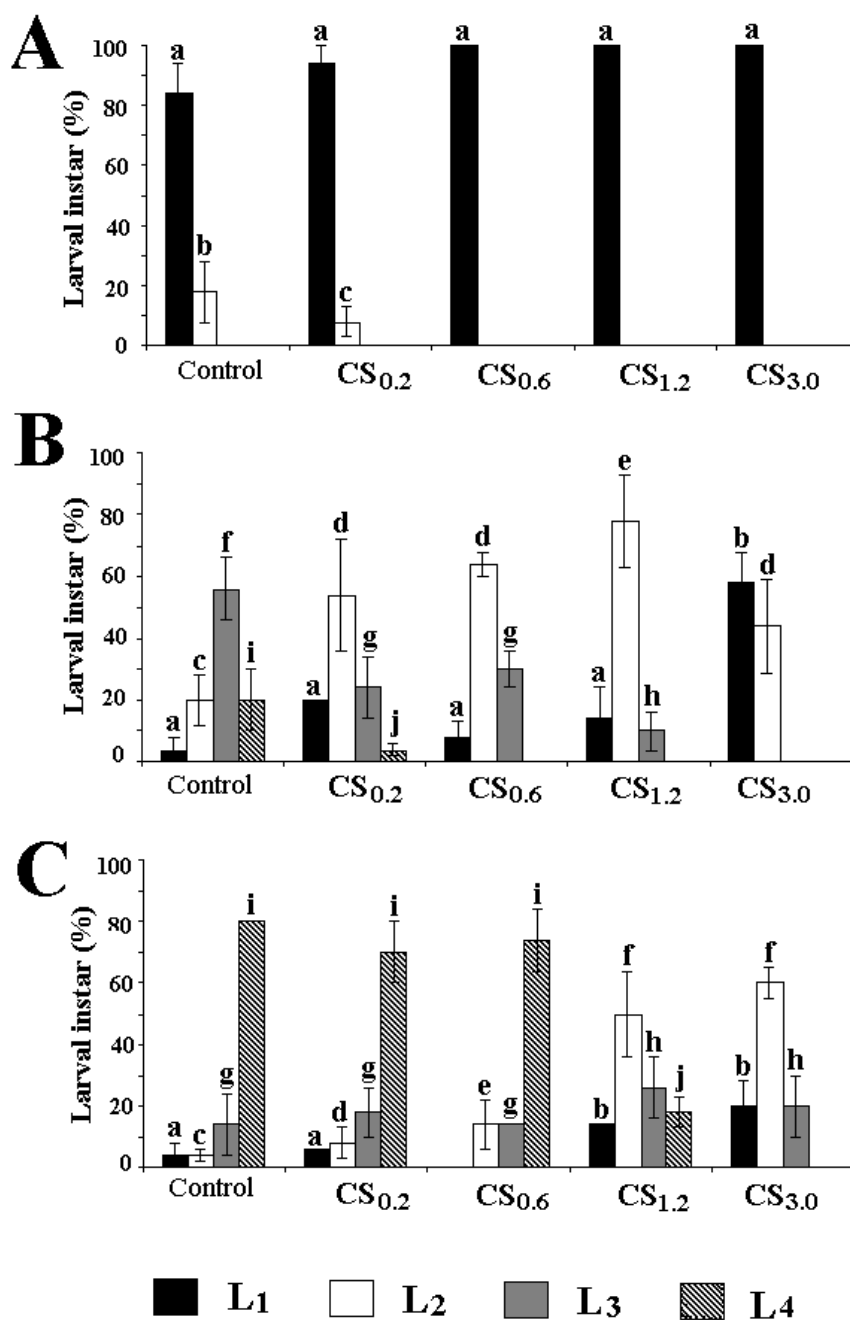


Figure 2. *A. aegypti* larval instar (%) at 24 (A), 48 (B), and 72 h (C) in control (distilled water) and *M. oleifera* cake suspensions (CS) obtained starting from 0.2, 0.6, 1.2 and 3.0 g of cake powder. The bars are the mean $\pm$ S.D. Data were analyzed with Student's *t*-test and Tukey test to determine significant differences ($p < 0.05$) among treatments. The different letters indicate significant differences between treatments.

6. CONCLUSÕES

- Extrato aquoso da torta de sementes de *M. oleifera* apresentou atividade hemaglutinante, revelando que lectinas resistiram ao tratamento das sementes com n-hexano.
- Lectinas de torta de sementes de moringa (MoCL) foram isoladas por extração de proteínas em água, precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de quitina.
- MoCL consiste provalmente em uma mistura das lectinas WSMoL e cMoL, e apresentou atividade hemaglutinante específica maior que a das lectinas isoladas a partir das sementes não desengorduradas.
- A torta de moringa também contém compostos capazes de promover o atraso do desenvolvimento de larvas de *A. aegypti*.
- Extrato aquoso da torta, fração enriquecida em lectinas e MoCL apresentaram atividade larvícida contra larvas de *A. aegypti*.
- Os resultados obtidos agregam novos valores à torta de sementes de *M. oleifera*, bem como a toda cadeia de produção do biodiesel de moringa.

7. ANEXO

Menção honrosa concedida aos melhores trabalhos/painéis apresentados na VII Reunião Regional da Federação das Sociedades Biologia Experimental (FeSBE), realizada de 31 de maio a 02 de junho em Maceió-AL.



Menção Honrosa (Melhores Painéis)



Farmacologia, Toxicologia, Produtos Naturais e Química Medicinal

10.106 - INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES TÓXICA E ANTIDIARREICA DOS FRUTOS VERDES E MADUROS DE *SOLANUM STRAMONIFOLIUM* JACQ. (SOLANACEAE) EM CAMUNDONGOS de autoria CLEMENTINO-NETO, J, MENDONÇA, M. A. O, VASCONCELOS, M. A, SILVA, A. D. S, SILVA, T. M. S, CAVALCANTE, F. A. - Universidade federal de Alagoas - UFAL, Universidade federal rural de Pernambuco - UFRPE, Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

10.125 - CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE LESÃO MUSCULAR INFLAMATÓRIA INDUZIDO POR CARRAGENINA de autoria SOUZA, A. C. A, SANTANA, J. M. D, CRUZ, K. M. L, CAMARGO, E. A, - Universidade Federal De Sergipe – UFS.

10.155 - TORTA DE SEMENTES DE *MORINGA OLEIFERA* COMO FONTE DE AGENTE LARVICIDA SOBRE *AEDES AEGYPTI* de autoria OLIVEIRA, A. P. S, ROCHA, J. M. T. S, ARAÚJO, I. M. S, NAPOLEÃO, T. H, COELHO, L. C. B. B, NAVARRO, D. M. A. F, PAIVA, P. M. G. - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

TORTA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* COMO FONTE DE AGENTE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti*. ¹Oliveira, A.P.S.**; ¹Rocha, J.M.T.S.; ¹Araújo, I.M.S.**; ¹Napoleão, T.H.**; ¹Coelho, L.C.B.B.; ²Navarro, D.M.A.F.; ¹Paiva, P.M.G. ¹Departamento de Bioquímica, UFPE, Recife/PE; ²Departamento de Química Fundamental, UFPE, Recife/PE.

Objetivos: *Moringa oleifera* é uma oleaginosa de grande importância para produção do biodiesel. Após a extração do óleo de suas sementes é gerado um co-produto denominado torta. As sementes de moringa sementes contêm duas lectinas (proteínas que reconhecem carboidratos e aglutinam células): cMoL (lectina coagulante de *M. oleifera*) e WSMoL (lectina solúvel em água de *M. oleifera*). WSMoL apresentou atividade larvicida o quarto estágio larval (L4) de *Aedes aegypti*, o vetor da dengue (Chemosphere, 77, 934-938, 2009). O objetivo do trabalho foi investigar a atividade larvicida contra *A. aegypti* de extratos salinos e aquosos de torta de sementes de moringa contendo lectina.

Métodos: Farinha de sementes de moringa foi submetida à extração do óleo com solvente n-hexano e a torta obtida foi homogeneizada em água destilada ou NaCl 0,15 M (16 h, 4 °C). Após filtração e centrifugação, os sobrenadantes corresponderam aos extrato aquoso (EAT) e extrato salino (EST) da torta, respectivamente. EAT e EST foram submetidos a dosagem de proteínas e determinação da atividade hemaglutinante (AH) com eritrócitos de coelho. A atividade larvicida foi avaliada utilizando diferentes concentrações dos extratos e 20 larvas no estágio L4. A mortalidade foi avaliada após 24 h e os valores da concentração letal de proteínas necessária para matar 50% das larvas (CL50) foram calculados através de análise de probitos.

Resultados: EAT (31,3 mg/mL de proteínas) e EST (23,6 mg/mL de proteínas) apresentaram AH de 512^{-1} e 1024^{-1} , respectivamente, indicando a presença de lectina. Ambos os extratos promoveram a mortalidade das larvas, sendo os valores da CL50 para EAT e EST de 4,028 e 4,804 mg/mL de proteínas, respectivamente. Os resultados obtidos revelam que as atividades lectínica (hemaglutinante) e larvicida das sementes de moringa foram preservadas mesmo após o processo de extração de óleo utilizando solvente orgânico.

Conclusão: Extratos de torta de sementes de moringa (EAT e EST) contêm lectina e apresentam atividade larvicida contra *A. aegypti*. Os resultados estimulam o isolamento de lectinas a partir da torta e agregam novo valor biotecnológico a este co-produto da cadeia de produção de biodiesel.

Apoio Financeiro: CNPq, CAPES, FACEPE e FACEPE/PRONEX.