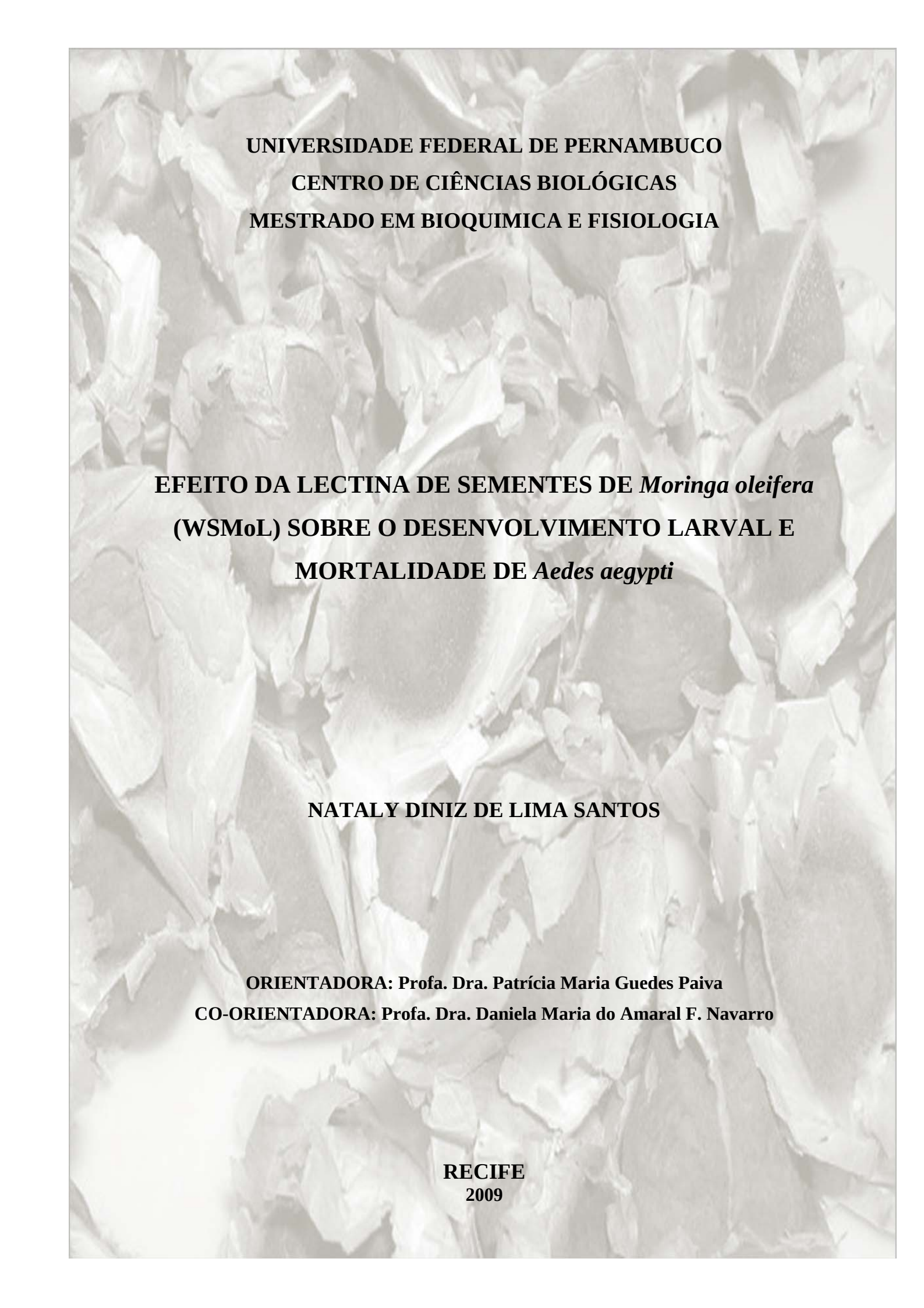




**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLÓGIA**

**EFEITO DA LECTINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera*
(WSM_oL) SOBRE O DESENVOLVIMENTO LARVAL E
MORTALIDADE DE *Aedes aegypti***

NATALY DINIZ DE LIMA SANTOS

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Daniela Maria do Amaral F. Navarro**

**RECIFE
2009**

NATALY DINIZ DE LIMA SANTOS

EFEITO DA LECTINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* (WSMoL) SOBRE O
DESENVOLVIMENTO LARVAL E MORTALIDADE DE *Aedes aegypti*

ORIENTADORA: Profa. Dra. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. DANIELA MARIA A. F. NAVARRO

RECIFE
2009

Santos, Nataly Diniz de Lima

**Efeito da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL)
sobre o desenvolvimento larval e mortalidade de *Aedes aegypti* /
Nataly Diniz de Lima Santos. – Recife: O Autor, 2009.**

73 folhas : il., fig., tab.

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Bioquímica e Fisiologia, 2009.**

Inclui bibliografia.

**1. Proteínas 2. Lectinas 3. *Moringa oleifera* 4. *Aedes aegypti* 5.
Atividade larvívica I Título.**

572.6 CDD (22.ed.)

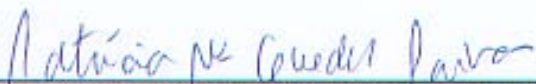
UFPE/CCB-2009-169

NATALY DINIZ DE LIMA SANTOS

"Efeito da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) sobre o desenvolvimento larval e mortalidade 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. Vera Lúcia de Menezes Lima



Prof. Dr. Roberto Araújo Sá

Data: 26 / 08 / 2009

***Dedico este trabalho a minha família e
em especial ao meu noivo João Carlos,
com muito amor.***

*De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando....
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...*

*Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...*

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1. Dengue	18
2.2. O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	19
2.2.1 Controle da população de mosquitos <i>A. aegypti</i>	25
2.2.1.1 Controle químico	27
2.2.1.2 Controle alternativo: inseticidas naturais	29
2.3. Lectinas	34
2.3.1 Generalidades	34
2.3.2. Purificação e caracterização	35
2.3.3 Aplicações biotecnológicas e atividades biológicas	37
2.3.4. Papel fisiológico	39
2.3.5. Lectinas com atividade inseticida	40
2.4. A espécie <i>Moringa oleifera</i>	42
2.4.1 Lectinas de sementes de <i>Moringa oleifera</i>	44
3.OBJETIVOS	45
3.1. Objetivo Geral	45
3.2. Objetivos Específicos	45
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
5. ARTIGO	67
“Effect of <i>Moringa oleifera</i> lectin on development and mortality of <i>Aedes aegypti</i> larvae”.	
6. CONCLUSÃO	73

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder mais uma realização profissional, me iluminando com força, saúde e paciência, em todos os dias da minha vida.

À minha orientadora, Prof^a Patrícia Paiva, pela amizade, confiança, energia positiva e maravilhosa orientação. Seus ensinamentos foram fontes de fortalecimento e motivação durante todo o período de realização dessa pesquisa.

À professora Daniela Navarro, pelo acolhimento em seu laboratório, e pela intensa orientação. Obrigada pela sua amizade, carinho e palavras de apoio nos momentos mais importantes da pesquisa.

Às professoras Luana Coelho e Tereza Correia, pela colaboração, apoio e estímulo à investigação científica.

Ao pesquisador e amigo, Roberto Sá, pelo despertar do trabalho científico, estando sempre presente, me ensinando e motivando na realização de toda pesquisa científica.

Aos meus eternos companheiros, Francis e Thiago pela linda amizade, por toda caminhada que foi construída, a partir da graduação, durante o mestrado e em futuras etapas da nossa vida científica.

À todos os amigos, Giselly, Lidiane, Thamara, Thâmarah, Maiara, Emmanuel, Fernando, Felipe, Andréa, Luciana, Tatiana e Michele que fazem parte do Laboratório de Glicoproteínas, pelo apoio e carinho. Pelos momentos cheios de alegria e motivação.

À Maria Reis e João Virgínio, pelos ensinamentos e amizade essencial para o amadurecimento na pesquisa.

Às colegas, Clécia, Camila, Geane e Luana do Laboratório de Ecologia Química por sempre estarem disponíveis com muita paciência e dedicação durante a realização dos bioensaios.

Ao meu sogro, Manoel de Jesus, pelas palavras de carinho e admiração, e a minha sogra Lanusa, pelo seu amor e carisma.

As minhas queridas cunhadas, Elisa e Veruska, pelo amor, admiração e carinho constantes.

Ao meu noivo, João, pela participação intensa, mesmo à distância, sempre acompanhava todas as etapas e estágios da minha pesquisa. Sua admiração e principalmente seu amor foram essenciais na concretização desse sonho e planejamento de outros objetivos.

Aos meus tios, Mônica e Urbano pela grande participação na minha vida, pelo carinho e contante incentivo na continuidade da vida acadêmica. Obrigada!!!

As minhas eternas amigas, Camilla, Conceição, Eline, Luana, Patrícia e Priscilla pelo afeto, apoio e companheirismo incondicional.

A minha família: meu avô, José Urbano, minhas tias, Madalena, Matilde, Maria Elena, Marineide e Marise, aos primos, Wallace e Carlos Henrique, e ao mais novo primo da família, Rafael e Raquel por tornar meus dias mais felizes e por estarem sempre presentes, apesar da distância física, me incentivando e me dando coragem nos meus estudos, com carinho e amor.

A minha querida mãe, Marly, por acreditar em mim, pela confiança, amor, zelo e admiração e por presenciar mais uma etapa de realização profissional.

Ao suporte financeiro, FACEPE.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo biológico de <i>A. aegypti</i> .	20
Figura 2. Imagem do abdome da fêmea do <i>A. aegypti</i> durante a saída dos ovos (A), (Acervo do Oswaldo Cruz). (B) Esquema do ovo.	21
Figura 3. Larvas (A), pupas (B) e adulto (C) de <i>A. aegypti</i> .	22
Figura 4. <i>Moringa oleifera</i> . (A) Aspecto geral. (B) Flores. (C) Folhas. (D) Sementes.	43

ARTIGO

Fig. 1. Larval instar (%) at 24 (A), 48 (B), and 72 h (C) in control distilled water and <i>M. oleifera</i> seed extracts MoE ₁ , MoE ₃ , MoE ₆ , and MoE ₁₅ . The bars are the mean ± S.D. Data were analyzed with a Fisher's exact test (SPSS 11.5 for Windows [®]) to determine significant differences (p<0.05) among treatments. The different letters indicate significant differences between treatments.	70
Fig. 2. <i>A. aegypti</i> photomicrography (100x) of anterior midgut from live (control distilled water, A, and MoE ₁ , B, after 72 h of incubation) and dead UE, underlying epithelium; S, segments	71

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

	Página
Table 1. Characterization of <i>Moringa oleifera</i> seed extracts and WSMoL.	70
Table 2. Larvicidal activity of WSMoL on <i>A. aegypti</i> fourth-stage larvae.	71

RESUMO

Larvas de *Aedes aegypti* têm desenvolvido tolerância a muitos inseticidas usados para controle do mosquito. Sementes de *Moringa oleifera* contêm uma lectina solúvel em água (WSMoL) e este trabalho relata o efeito de extratos de sementes (MoE_{1 a 15}) e WSMoL sobre o desenvolvimento e sobrevivência das larvas de *A. aegypti*. Peptídeo da digestão em gel por tripsina de WSMoL é também descrito. MoE_{1 a 15} mostraram atividade hemaglutinante e WSMoL teve similaridade com proteínas floculantes de sementes de *M. oleifera*. MoE₁ e MoE₃ atrasaram o desenvolvimento larval o qual foi parado no terceiro ínstar (L₃) em MoE₆ e MoE₁₅. Significante ($p < 0.0001$) mortalidade larval foi somente detectado em MoE₁₅. WSMoL nativa mostrou atividade larvívica (CL₅₀ 0,197 mg.mL⁻¹) e a lectina aquecida, sem atividade hemaglutinante, não matou larvas L₄. Microscopia óptica mostrou que L₄ vivas de MoE₁ apresentaram camada epitelial, aumentado lúmen intestinal e segmentos hipertróficos; L₄ mortas de WSMoL foram ausentes de camada epitelial, tiveram aumentado lúmen intestinal e segmentos hipertróficos. A presença de atividade hemaglutinante nos extratos sugere que a lectina solúvel promoveu atraso do desenvolvimento larval e mortalidade; ausência de atividade larvívica em WSMoL desnaturada por calor reforça o envolvimento da lectina neste mecanismo.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; atividade larvívica; espectrometria de massas; *Moringa oleifera*; morfologia.

ABSTRACT

Aedes aegypti larvae have developed tolerance to many insecticides used for mosquito control. *Moringa oleifera* seeds contain a water-soluble lectin (WSMoL) and this work reports the effect of *M. oleifera* seed extracts (MoE_{1 to 15}) and WSMoL on development and survival of *A. aegypti* larvae. WSMoL peptide from in-gel trypsin digestion is also described. MoE_{1 to 15} showed hemagglutinating activity and WSMoL had similarity with flocculating proteins from *M. oleifera* seeds. MoE₁ and MoE₃ delayed larval development which stopped in the third instar (L₃) in MoE₆ and MoE₁₅. Significant ($p < 0.0001$) larval mortality was only detected in MoE₁₅. Native WSMoL showed larvicidal activity (LC₅₀ 0.197 mg mL⁻¹) and heated lectin, without hemagglutinating activity, did not kill fourth instar (L₄) larvae. Optical microscopy showed that alive L₄ from MoE₁ presented underlying epithelium, increased gut lumen and hypertrophic segments; dead L₄ from WSMoL were absent of underlying epithelium, had increased gut lumen and hypertrophic segments. The presence of hemagglutinating activity in the extracts suggests that soluble lectin promoted delay of larval development and mortality; absence of larvicidal activity in heat-denatured WSMoL strengthens the involvement of lectin in this activity mechanism.

Keywords: *Aedes aegypti*; larvicidal activity; mass spectrometry; *Moringa oleifera*; morphology.

1. INTRODUÇÃO

Os insetos são um dos grupos mais abundantes e diversos entre os animais. A Ordem Diptera, é formada por insetos populares, como as moscas e os mosquitos, sendo estes os principais responsáveis pela disseminação de muitas doenças em regiões tropicais. Interesse particular é dado à espécie *Aedes aegypti* (Culicidae), por ser o principal vetor de muitas arboviroses (virose transmitida por artrópodes, principalmente insetos ou ácaros) como a febre amarela e a febre de dengue (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; LEHANE, 2005).

O dengue é a arbovirose de maior incidência no mundo, sendo endêmica em todos os continentes, exceto na Europa. Atualmente, é uma das doenças infecciosas mais freqüentes encontradas nos países em desenvolvimento, e as taxas de soroprevalência estão acima de 50% em países endêmicos (TAUIL *et al.*, 2002). É uma infecção reemergente causada por diferentes sorotipos virais e que se manifesta de diferentes formas clínicas, algumas graves e letais, como a febre de dengue hemorrágica. O dengue vem preocupando as autoridades sanitárias de todo o mundo, em virtude de sua ampla circulação em regiões tropicais e subtropicais (MICIELI & CAMPOS, 2003).

Mundialmente, 2,5 bilhões de pessoas estão em risco de adquirir a doença e 50 a 100 milhões são infectadas anualmente, com mais de 20 mil mortes, caracterizando uma pandemia (WHO, 2008). Nas primeiras 15 semanas de 2009 (1º de janeiro até 11 de abril), já foram registrados no Brasil, 226.513 casos de dengue. No mesmo período de 2008, o total chegou a 440.360 casos, representando uma redução de 49% em relação ao ano passado (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2009).

A distribuição e a abundância dessa doença são fortemente influenciadas pela urbanização descontrolada, sistemas de distribuição de água e gestão de resíduos inadequados, promovendo altas densidades e dispersão dos mosquitos vetores entre diferentes áreas

geográficas (WEAVER & VASILAKIS, 2009). Como não há vacinas nem agentes terapêuticos efetivos para prevenir a infecção da dengue ou combater essa doença em pessoas infectadas, o controle do vetor é a única solução disponível e mais comumente escolhida para redução da transmissão desse vírus (CHAPAGAIN *et al.*, 2008).

A febre amarela é uma doença infecciosa aguda que se manifesta por insuficiência hepática e renal, podendo matar em uma semana. A doença pode apresentar-se sob duas modalidades: urbana e silvestre. O *A. aegypti* transmite a febre amarela urbana, enquanto os mosquitos *Haemogogus* e *Sabethes* infectados transmitem a febre amarela silvestre. A prevenção é feita através da vacina. No Brasil, a febre amarela urbana está erradicada desde 1942, quando foi registrado o último caso no Acre. Em 1996, ocorreram 14 casos de febre amarela silvestre no Brasil, com 12 óbitos (OPAS, 2003; MONATH, 2008).

Com o surgimento de formas resistentes do mosquito aos inseticidas convencionais utilizados, têm crescido a procura por extratos vegetais e substâncias naturais que sejam efetivas no combate ao mosquito adulto e/ou à larva de *A. aegypti* e que sejam isentas de toxicidade para o meio ambiente. Resistência a inseticidas convencionais é um dos principais obstáculos ao controle de insetos pestes de importância na agricultura e na medicina. A resistência implica no aumento da frequência de aplicação de inseticidas, dosagens crescentes, rendimentos diminuídos, danos ambientais e surgimento de doenças, quando os vetores não podem ser controlados (SIMAS *et al.*, 2004).

As plantas possuem suas próprias defesas que as protegem de outras plantas, insetos fitófagos e herbívoros predadores de uma maneira geral. Os tipos de defesa desenvolvidos pelas plantas são constitutiva (direta) e induzida (indireta). Além dos produtos diretamente envolvidos nas funções primárias como a fotossíntese, respiração e crescimento, as plantas produzem uma grande variedade de outros compostos, os quais são denominados metabólitos secundários. Acredita-se que, durante a evolução, essas substâncias se manifestaram

inicialmente como uma resposta das plantas às pressões exercidas pelos herbívoros e quando liberadas no ambiente foram envolvidas nas interações planta/planta e planta/animal (WHITTAKER, 1983; PRICE, 1984).

Os vegetais também desenvolveram mecanismos de defesa contra patógenos (vírus, bactérias, fungos e insetos). Desde a década de 60, esses mecanismos são conhecidos, mas somente nos últimos anos, os patologistas vegetais vêm-se dedicando ao estudo das bases moleculares e genéticas deste fenômeno. (PINTO *et al.*, 2002).

Estas defesas podem ser de natureza física ou química. Os mecanismos de defesa físicos contra herbívoros são facilmente observados e estão relacionados com a presença de depósitos cuticulares na epiderme, espinhos, tricomas entre outros, que afetam diretamente a performance do inseto (BALDWIN *et al.*, 2001). Por outro lado, as defesas químicas, normalmente, envolvem substâncias do metabolismo secundário como toxinas, repelentes ou um outro tipo de composto encontrado no interior da própria planta. Essas toxinas têm tido e continuam a ter um papel chave na proteção das plantas contra os predadores (HARBORNE, 1993; PINTO *et al.*, 2002).

As plantas também sintetizam e liberam inúmeros compostos voláteis (ácidos, aldeídos e terpenos) para atrair polinizadores ou se defenderem de herbívoros (PICHERSKY & GERSHENZON, 2002). No que concerne à defesa contra herbívoros, na defesa direta estão envolvidas substâncias como metabólitos secundários, enzimas e proteínas. Na defesa indireta estão envolvidas substâncias produzidas pela planta, que atraem parasitas e/ou predadores de insetos fitófagos (BALDWIN *et al.*, 2001).

Segundo Lara (1991), algumas plantas possuem compostos ou substâncias que podem afetar a biologia, o desenvolvimento e a reprodução dos insetos. A síntese dessas substâncias pode estar relacionada a uma função auto-ecológica da planta contra a dessecação, salinidade ou raios ultravioletas (STRONG, 1984). As funções dos produtos naturais das plantas podem

ser múltiplas, envolvendo elementos do metabolismo primário e secundário (SEIGLER, 1976). Atualmente, sabe-se que esses compostos, os quais compreendem antibióticos, alcalóides, terpenos e proteínas, são encontrados em vários tecidos vegetais. Entre as proteínas, estão incluídas enzimas (tais como as quitinases), as lectinas e os inibidores de enzimas digestivas. Recentemente, genes que conferem resistência a insetos podem ser introduzidos em plantas de interesse para reduzir sua suscetibilidade ao ataque por microrganismos e insetos devido à maior expressão dessas proteínas. Esses genes podem ser obtidos de plantas, bactérias ou de outra origem (FRANCO *et al.*, 1999).

A co-evolução existente entre plantas, insetos e outros microorganismos tem sido explorada na busca por fontes naturais de substâncias inseticidas, já que as mesmas são produzidas pelo vegetal em resposta a um ataque. Inúmeras substâncias são produzidas pelo vegetal para garantir sua defesa contra fitopatógenos. Um dos mecanismos de defesa das plantas está relacionado, supostamente, à presença de proteínas tais como as lectinas (proteínas que ligam carboidratos), as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) dos tipos I e II (SHU *et al.*, 2009), os inibidores de proteases e as glicohidrolases (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). Outras proteínas também envolvidas são as arcelinas (OSBORN *et al.*, 1988), as quitinases (COHEN, 1993), a canatoxina (CARLINI *et al.*, 1997) e as diferentes formas de proteínas de reserva (SALES *et al.*, 2000).

A espécie *Moringa oleifera* pertencente à família das Moringaceae é uma planta nativa da Índia, amplamente cultivada nos trópicos de todo o mundo, com interesse industrial, econômico e medicinal (MAKKAR & BECKER, 1996; KARADI *et al.*, 2006). Suas sementes possuem propriedade coagulante (OKUDA *et al.*, 2001) e têm sido utilizadas no Nordeste brasileiro para purificação de águas para consumo humano.

Sementes de *M. oleifera* contêm lectinas e proteínas coagulantes (SANTOS *et al.*, 2005, KATRE *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009). A alta solubilidade em água da lectina

WSMoL (do inglês *water soluble Moringa oleifera lectin*) estimulou a avaliação do efeito da mesma sobre o ciclo biológico do mosquito *Aedes aegypti*, que ocorre na água. O trabalho teve como objetivos avaliar a ação de WSMoL sobre o desenvolvimento e mortalidade das larvas (L₄) de *A. aegypti*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Dengue

Diferentemente da febre amarela, não há vacina contra o vírus da dengue, sendo o controle do vetor essencial para o controle da doença. O mosquito *A. aegypti* é o principal vetor da dengue nos países tropicais e nas Américas (HALSTEAD, 2007). Apresenta-se como uma doença febril aguda, caracterizada em sua forma clássica, por dores musculares e articulares intensas. O agente etiológico da dengue é o arbovírus DEN, da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, do qual existem quatro sorotipos diferentes: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (OMS, 2002; TAUIL, 2002). A infecção por um desses sorotipos virais confere proteção permanente para o mesmo sorotipo e imunidade parcial e temporária para os outros três. No momento, 3 dos 4 sorotipos (DEN-1, DEN-2 e DEN- 3) circulam concomitantemente no Brasil, os quais são responsáveis por 80% dos casos notificados nas Américas (DE SIMONE *et al.*, 2004).

Trata-se, caracteristicamente, de uma enfermidade presente em áreas tropicais e subtropicais, uma vez, que as condições ambientais favorecem o desenvolvimento dos vetores. Várias espécies de mosquitos do gênero *Aedes* podem servir como transmissores do vírus do dengue (OMS, 1997). No Brasil, duas delas estão hoje instaladas em alta densidade: *A. aegypti* e *A. albopictus* (JOHNSON *et al.*, 2002).

A transmissão da doença é iniciada quando a fêmea, da espécie vetora, é contaminada, quando realiza um repasto sangüíneo em um indivíduo infectado, estando na fase virêmica da doença, tornando-se, após um período de 10 a 14 dias, capaz de transmitir o vírus por toda sua vida (transmissão transovariana) através de suas picadas. As infecções pelo vírus do dengue

causam desde a forma clássica (sintomática ou assintomática), a formas graves e letais, como a febre hemorrágica do dengue (ARAÚJO *et al.*, 2009).

A forma clássica é uma doença de baixa letalidade, mesmo sem tratamento específico. No entanto, incapacita temporariamente as pessoas para o trabalho. Na febre hemorrágica do dengue a febre é alta, com manifestações hemorrágicas, hepatomegalia e insuficiência circulatória. A letalidade é significativamente maior do que na forma clássica, dependendo da capacidade de atendimento médico-hospitalar da localidade (MELTZER & SCHWARTZ, 2009).

2.2 O mosquito *Aedes aegypti*

O mosquito *A. aegypti* Linnaeus pertence ao Filo Arthropoda (pés articulados), Classe Hexapoda (três pares de patas), Ordem Diptera (um par de asas anterior funcional e um par posterior transformado em halteres), Família Culicidae. É um vetor de diversos patógenos, incluindo o vírus da dengue e o vírus da família Flaviviridae, que causa a febre amarela. É um mosquito de hábito doméstico e diurno, utilizando-se preferencialmente de depósitos de água limpa para oviposição. É uma espécie cosmopolita, com ampla ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, mas é originário do norte da África (FORATTINI & BRITO, 2003).

É essencialmente, um mosquito urbano, por sua estreita associação com o homem, encontrado em maior abundância em cidades, vilas e povoados. Entretanto, no Brasil, México e Colômbia, já foram localizados em zonas rurais, provavelmente transportado de áreas urbanas em vasos domésticos, onde se encontravam ovos e larvas (OPAS, 1987; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; BRAKS *et al.*, 2004).

Os mosquitos se desenvolvem através de metamorfose completa (holometabolia), e o ciclo de vida do *A. aegypti* compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estágios larvários,

denominados L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Figura 1). Em condições favoráveis de temperatura, umidade e disponibilidade de alimento, o tempo transcorrido entre o estágio de ovo a adulto varia em média de 10 a 13 dias (FORATTINI, 1965). Os ovos medem, aproximadamente 1mm de comprimento, apresentando um contorno alongado e fusiforme. São depositados pela fêmea, individualmente, nas paredes internas dos depósitos que servem como criadouros, próximos à superfície da água. No momento da postura os ovos são brancos (Figura 2A), mas, rapidamente, adquirem a cor negra brilhante (Figura 2B) (FORATTINI, 1962).

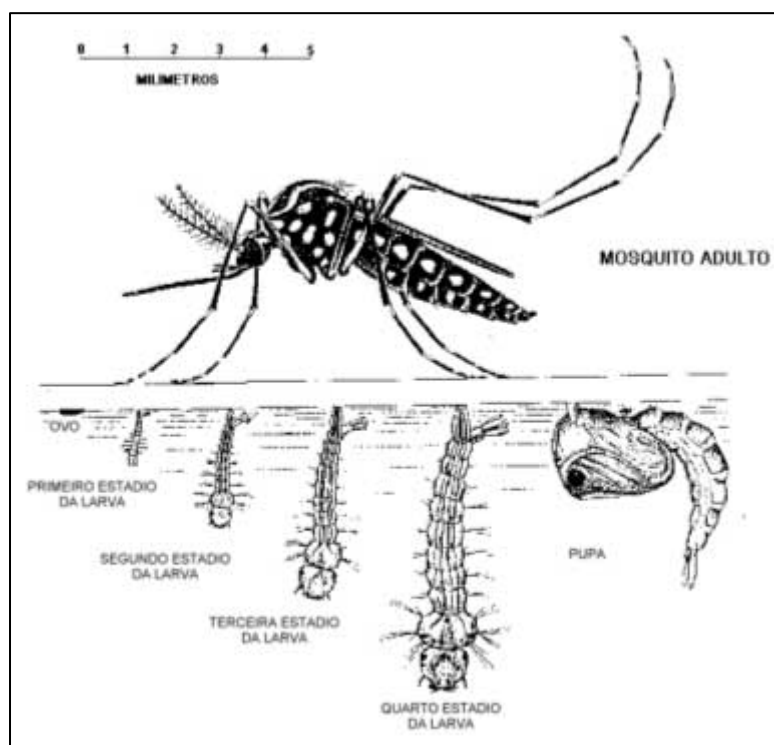


Figura 1. Ciclo biológico de *A. aegypti* (SECRETARIA DE SAÚDE E DEFESA CIVIL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2007).

A fecundação se dá durante a postura e o desenvolvimento do embrião se completa em 48 horas, em condições favoráveis de umidade e temperatura. Após o término do desenvolvimento embrionário, os ovos são capazes de resistir a longos períodos de

dessecação, que podem prolongar-se por mais de um ano. A capacidade de resistência dos ovos à dessecação é um sério obstáculo para sua erradicação e um importante fator de adaptação. Esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias (dispersão passiva), em recipientes secos, tornando-se assim o principal meio de dispersão do inseto (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

A fase larvária caracteriza o período de alimentação e crescimento. As larvas passam a maior parte do tempo alimentando-se principalmente de material orgânico acumulado nas paredes e fundo dos depósitos. O desenvolvimento larvário pode apresentar variações no tempo de duração, dependendo de fatores ambientais como umidade relativa do ar, temperatura, luz, pH da água do criadouro, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro.

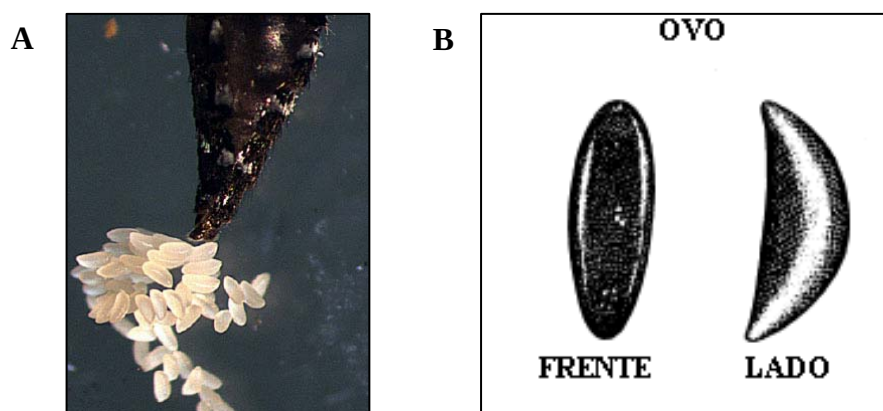


Figura 2. Imagem do abdome da fêmea do *A. aegypti* durante a saída dos ovos (A), (Acervo do Oswaldo Cruz). (B) Esquema do ovo. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Em condições ótimas, o período entre a eclosão e a pupação pode não exceder a cinco dias. Contudo, em baixa temperatura e escassez de alimento, o 4º estágio larvário pode prolongar-se por várias semanas, antes de sua transformação em pupa. A larva do *A. aegypti* é composta de cabeça, tórax e abdômen. Na L₄, o abdômen é dividido em oito segmentos

(Figura 3A). O segmento posterior e anal do abdômen tem quatro brânquias lobuladas para regulação osmótica e um sifão ou tubo de ar para a respiração na superfície da água. O sifão é curto, grosso e mais escuro que o corpo (Figura 3A). Para respirar, a larva vem à superfície, onde fica em posição quase vertical. Movimenta-se em forma de serpente, fazendo um S, em seu deslocamento. É sensível a movimentos bruscos na água e, sob feixe de luz, desloca-se com rapidez, buscando refúgio no fundo do recipiente (fotofobia) (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Após a fase larvária, surgem as pupas (Figura 3B), que não se alimentam. É nesta fase que ocorre a metamorfose do estágio larval para o adulto. Quando inativas se mantêm na superfície da água, flutuando, o que facilita a emergência do inseto adulto. O estado pupal dura, geralmente, de dois a três dias. O corpo da pupa é dividido em cefalotórax (cabeça e tórax unidos) e abdômen. Lateralmente, possui uma aparência em forma de uma vírgula (Figura 3B). A pupa tem um par de tubos respiratórios ou trompetas, que atravessam a água e permitem a respiração (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

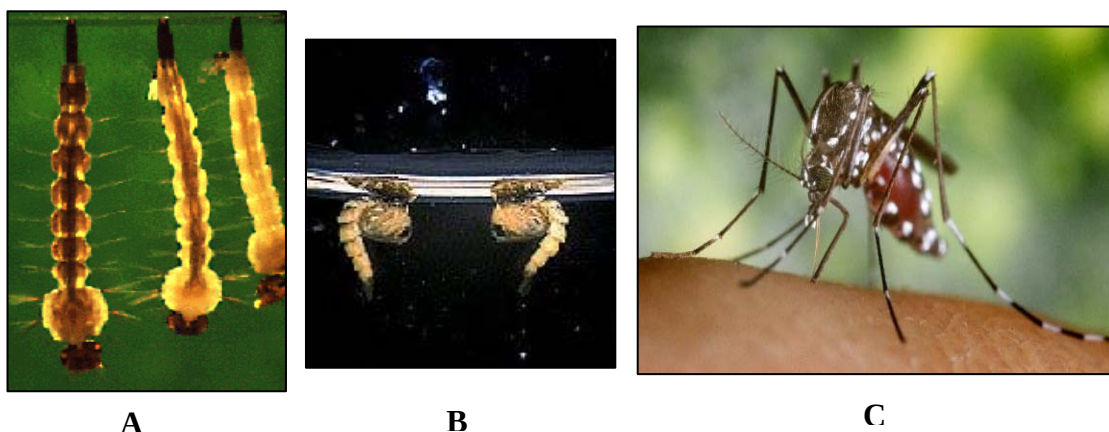


Figura 3. Larvas (A), pupas (B) e adulto (C) de *A. aegypti*.

Fonte: (A) www.sabbatini.com (B) www.abc.net.au/science/news/health (C)

www.infoescola.com

Em seguida ocorre a emergência do adulto (Figura 3C), que representa a fase reprodutora do inseto. Como ocorre em outros insetos alados, o adulto representa um importante vetor de dispersão. Entretanto, com o *A. aegypti* é provável que haja mais transporte passivo de ovos e larvas em recipientes do que dispersão ativa pelo inseto adulto. Apresenta uma coloração escura, com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um desenho em forma de lira no mesonoto. Nos espécimes mais velhos, o desenho da lira pode desaparecer, mas dois tufo de escamas branco-prateadas no clipeo, escamas claras nos tarsos e palpos permitem a identificação da espécie (SERVICE, 1996; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

O macho se distingue essencialmente da fêmea por possuir antenas plumosas e palpos mais longos. Logo após emergir do estágio pupal, o inseto adulto procura pousar sobre as paredes do recipiente, assim permanecendo durante várias horas, o que permite o endurecimento do exoesqueleto, das asas e, no caso dos machos, a rotação da genitália em 180°. Dentro de 24 horas, após emergirem, podem acasalar, sendo válido para ambos os sexos. O acasalamento geralmente se dá durante o voo, mas, ocasionalmente, pode ser realizado sobre uma superfície, vertical ou horizontal. Uma única inseminação é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante sua vida (SERVICE, 1996).

As fêmeas se alimentam mais frequentemente de sangue (repasto sangüíneo) e a maior parte dos animais vertebrados atuam como fonte de repasto, mas há uma grande afinidade pelo homem, demonstrando ser uma espécie altamente antropofílica. O repasto sangüíneo das fêmeas fornece proteínas para o desenvolvimento dos ovos e ocorre quase sempre durante o dia, nas primeiras horas da manhã e ao anoitecer. O macho alimenta-se de carboidratos extraídos dos vegetais. As fêmeas também se alimentam da seiva das plantas. Em geral, a fêmea faz uma postura após cada repasto sangüíneo e o intervalo entre a alimentação sangüínea e a postura é, em regra, de três dias, em condições de temperatura satisfatórias.

Frequentemente, a fêmea se alimenta mais de uma vez, entre duas sucessivas posturas. Este fato resulta na variação de hospedeiros, disseminando o vírus a vários deles.

A oviposição, postura dos ovos pela fêmea, ocorre mais frequentemente no fim da tarde, uma vez que a fêmea grávida é atraída por recipientes escuros ou sombreados, de preferência aqueles preenchidos por água das chuvas, aqueles utilizados para armazenamento de água para uso doméstico, e com preferência por água limpa e cristalina ao invés de água suja ou poluída por matéria orgânica, nas quais deposita os ovos (CLEMENTS, 1992; BARATA *et al.*, 2001).

A capacidade de dispersão do *A. aegypti* pelo vôo é pequena, quando comparada com a de outras espécies. Não é raro que a fêmea passe toda sua vida nas proximidades do local de onde eclodiu, desde que haja hospedeiros. Quando não estão em acasalamento, procurando fontes de alimentação ou em dispersão, os mosquitos buscam locais escuros e quietos para repousar. A domesticidade do *A. aegypti* é ressaltada pelo fato de que ambos os sexos são encontrados em proporções semelhantes dentro das casas (endofilia). Quando em repouso, é encontrado nas habitações, nos quartos, nos banheiros e na cozinha e, só ocasionalmente, no peridomicílio. As superfícies preferidas para o repouso são as paredes, mobília, peças de roupas penduradas e mosquiteiros (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Quando o *A. aegypti* está infectado pelo vírus do dengue ou da febre amarela, pode haver transmissão transovariana destes, de maneira que, em variável percentual, as fêmeas filhas de um espécime portador nascem já infectadas (OPAS, 1987).

2.2.1 Controle da população de mosquitos *A. aegypti*

Na tentativa de manter a incidência das enfermidades transmitidas por insetos sob controle, são destinadas, continuamente, quantias significativas de recursos para programas contra os vetores. Porém, epidemias de dengue são freqüentes, devido à ampla circulação dos quatro sorotipos virais no continente. Além disso, outros fatores intimamente relacionados à biologia e ao comportamento do vetor, somados a problemas típicos dos centros urbanos, como pobreza e alta densidade populacional, contribuem para a ocorrência de surtos. A água é um elemento indispensável à sobrevivência das populações, mas quando se torna escassa, a única forma de obtê-la é através do armazenamento em depósitos domésticos, que servem como criadouros do vetor (CLARO *et al.*, 2004; BRAGA & VALLE, 2007).

As altas densidades dos mosquitos estão relacionadas ao comportamento sinantrópico e ao hábito antropofílico dessa espécie. Além disso, sua atividade hematofágica diurna e a complexidade dos centros urbanos têm maximizado os problemas do combate por aplicações espaciais de inseticidas (MONATH, 1994; SILVA *et al.*, 2004).

O controle de culicídeos utilizando inseticidas, como Temephos, Malathion e Fenitrothion, constitui a principal medida adotada pelos Programas de Saúde Pública. Entretanto, em diferentes partes do mundo e no Brasil, tem sido registrada a resistência desses dípteros a esses inseticidas convencionais (CARVALHO *et al.*, 2004; JANTAN *et al.*, 2005).

As armadilhas para controle e monitoramento de insetos consistem, geralmente, de combinações de atrativos aos quais os insetos respondem. Diferentes espécies não são igualmente atraídas pelos mesmos estímulos (LEHTONEN & PAHLONEN, 2004). Os atrativos podem ser de natureza química, como os feromônios sintéticos ou naturais e os cairomônios, física, como a transparência da água, luminosidade e temperatura, e biológica, como a utilização de iscas animais e humanas (BARBOSA *et al.*, 2007). Segundo Vargas

(2002), tais armadilhas podem ser utilizadas para capturar ovos (ovitrampas), larvas (larvitrampas) e os adultos (armadilhas adesivas, luminosas e iscas).

Grandes esforços têm sido realizados para controlar mosquitos vetores e a vasta literatura tem acumulado operações de controle. O controle específico para o mosquito *A. aegypti* pode ser direcionado aos estágios imaturos aquáticos, para os adultos, ou para ambos simultaneamente (SERVICE, 1996). O método ideal para controlar e prevenir a infestação de mosquitos ocorre através do uso de larvicidas (CEPLEANU, 1983; GLUBER, 1989). É muito mais fácil controlar populações de mosquitos no estágio larval comparado com o adulto, pois isto pode reduzir a aplicação total de pesticidas necessários para este fim.

Em estratégias para os estágios imaturos, pode-se utilizar o controle biológico, através de organismos predadores, patógenos e parasitas naturais, capazes de parasitar ou preda os mosquitos em várias fases evolutivas. Algumas linhagens de bactérias entomopatogênicas, do gênero *Bacillus*, produzem toxinas protéicas com um alto grau de especificidade a insetos vetores que, quando ingeridas, provocam mortalidade das larvas. As duas espécies mais utilizadas como larvicidas são o *Bacillus sphaericus* (Bs) e *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* (Bti). O Bti é utilizado principalmente para controle de espécies do gênero *Aedes* (ARAÚJO *et al.*, 2007). Esta especificidade e não-toxicidade para vertebrados têm levado ao seu sucesso comercial. No entanto, os insetos podem desenvolver resistência a este valioso recurso de controle biológico (TABASHNIK, 2001; JAYARAMAN *et al.*, 2005).

O controle genético também pode ser utilizado através da produção de machos híbridos e estéreis, ou pelo uso de citoplasmas incompatíveis, translocações, introdução de genes letais ou genes que tornem os mosquitos refratários como vetores, produzindo, por meio da divisão meiótica, um número excessivo de machos (ESTEVA & YANG, 2005).

O controle físico, mais conhecido como controle ambiental ou mecânico consiste na substituição, drenagem ou redução dos locais de reprodução dos insetos. A participação da

população é fundamental na localização e eliminação dos criadouros, principalmente intradomiciliares e peridomiciliares, que funcionam como os principais focos para proliferação desse inseto (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; HEMME *et al.*, 2009).

O controle químico, um dos métodos mais antigos a ser utilizado consiste na aplicação de substâncias químicas como larvicidas, óleos, repelentes, organofosfatos, organofosforados e piretróides, entre outros (LUNA *et al.*, 2004; CHUNG *et al.*, 2009).

Por outro lado, o controle direcionado aos estágios adultos ocorre através de materiais de proteção pessoal, como o uso de janelas, portas, ventiladores e telas contra os mosquitos, ou ainda, pela aplicação de vapores de óleos, aerossóis, névoas e neblinas ou aplicações em pequenas quantidades de inseticidas concentrados como Malathion e outros piretróides (LUCIA *et al.*, 2009; SERVICE, 1996).

Tendo em vista a grande flora brasileira, a busca por um controle químico alternativo, derivado de fontes naturais tem aumentado e estimula a descoberta de novas substâncias com potencial larvicida contra o vetor *A. aegypti* (OMENA *et al.*, 2007).

2.2.1.1 Controle químico

O controle químico direcionado a contenção de insetos ou populações de insetos, consiste na aplicação direta ou indireta de compostos químicos, em concentrações adequadas para produzir mortalidade. Os programas de controle direcionados a mosquitos vetores, com exceção do vetor da malária, consiste da aplicação de larvicidas químicos (GALLO *et al.*, 1988; BRAGA & VALLE, 2007).

Os inseticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides têm sido empregados em várias regiões do mundo para o controle de mosquitos. No Brasil, o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) é ainda o inseticida químico mais largamente empregado para

esse fim. Trata-se de um produto relativamente barato, com elevado poder residual, moderadamente tóxico e de baixa absorção cutânea, por outro lado não é biodegradável, sendo acumulativo no tecido adiposo de animais; podendo interferir no metabolismo do sódio e potássio e mostrou-se carcinogênico em camundongos (ALDRIDGE *apud* CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

O poder tóxico de um inseticida é determinado estabelecendo-se a dose mínima necessária para matar o inseto. Esta dose por sua vez é variável, de acordo com produtos existentes e das diferentes reações fisiológicas em cada inseto (GALLO *et al.*, 1988). Os produtos naturais inseticidas foram muito utilizados até a década de 40, quando os produtos sintéticos passaram a ganhar espaço a partir da II Guerra Mundial, devido a pesquisas com produtos biocidas. Estes mostraram-se muito mais potentes e menos específicos que os naturais, até então utilizados no controle de pragas agrícolas, e foram quase totalmente substituídos. A utilização de inseticidas pode ser vista de forma bastante genérica no século XX, segundo três fases. Durante os primeiros 50 anos predominaram os produtos inseticidas de origem orgânica e inorgânica. Os inorgânicos mais utilizados foram os arseniados de cálcio e chumbo (verde Paris), cupratos (calda bordalesa), enxofre em pó, vários sulfatos, cal, fluorsilicato de bário, aminosselenossulfito de potássio (criolite) e óleos minerais. Destes, os arseniados mostraram-se extremamente tóxicos ao homem, animais superiores e ambiente como um todo. Dentre os orgânicos de origem natural, foram muito utilizados os alcalóides como a nicotina, nor-nicotina e anabasina, os piretróides como a piretrina, aletrina, deltametrina, os rotenóides tendo a rotenona como principal exemplo, e em menor escala alguns quassinóides como a quassina (LARINI, 1979; MARICONI, 1981; ADDOR, 1994; VIEIRA & FERNANDES, 1999).

Após a II Guerra Mundial, ocorreu uma explosão no desenvolvimento da síntese orgânica, inclusive de produtos com atividade inseticida. Passaram a ser utilizados o

hexacloroexano (HCH), DDT, Aldrin, Dieldrin e Clordano. A resistência adquirida e a poluição ambiental, devido à aplicação repetida de inseticidas sintéticos persistentes, têm levado a um aumento no interesse por novos produtos químicos para o controle de pragas (BUGHIO & WILKINS, 2004). Inseticidas sintéticos, incluindo hidrocarbonetos clorados, ésteres organofosforados, carbamatos e piretróides sintéticos continuam a contribuir para a produção mundial de alimentos nas últimas décadas. Além disso, o uso contínuo de quase 200 mil toneladas destes produtos, predominantemente na área agrícola, tem sido problemático, pois muitas espécies-chave têm-se tornado resistentes a estas substâncias, enquanto que espécies secundárias estão em risco de dizimação dos seus predadores naturais, em virtude da ação neurotóxica inespecífica dos produtos utilizados (VIEGAS JR, 2003). Por outro lado, estas substâncias algumas vezes persistem no ambiente como resíduos tóxicos, muito além do tempo desejado. Além disso, muitos inseticidas disponíveis no mercado, incluindo o hexacloro benzeno, toxafeno, compostos organofosforados e carbamatos são tóxicos aos rebanhos e extremamente caros, principalmente considerando os produtores primários de países do terceiro mundo (NDUMU *et al.*, 1999).

Novas substâncias são necessárias, portanto, para o controle efetivo de pragas, oferecendo maior segurança, biodegradabilidade, seletividade, viabilidade econômica e aplicabilidade em programas integrados de controle de insetos com baixo impacto ambiental (PINTO *et al.*, 2002; DHARMAGADDA *et al.*, 2005).

2.2.1.2 Controle alternativo: inseticidas naturais

Tradicionalmente, produtos derivados de plantas têm sido utilizados por comunidades humanas em muitas partes do mundo contra vetores. Os fitoquímicos derivados de fontes

vegetais podem agir como larvicidas, inibidores do crescimento, desreguladores do desenvolvimento, repelentes e atrativos para oviposição (BABU & MURUGAN, 1998).

Os metabólitos produzidos pelas plantas para proteção contra microrganismos e insetos predadores são candidatos naturais na descoberta de novos produtos no combate a insetos-praga e vetores de doenças, como o *A. aegypti*. Muitos estudos têm apresentado a atividade de produtos naturais, como inseticidas e larvicidas, para o controle de mosquitos do gênero *Aedes* (LUNA *et al.*, 2005; KIRAN *et al.*, 2006; OMENA *et al.*, 2007; CHAPAGAIN *et al.*, 2008; CHENG *et al.*, 2008; AUTRAN *et al.*, 2009; MELO-SANTOS *et al.*, 2009).

As plantas podem ser fontes alternativas para repelentes de mosquitos porque elas constituem uma fonte potencial de químicos bioativos e tipicamente são livres de perigo ou prejuízo ambiental (LUNA *et al.*, 2005; OMENA *et al.*, 2007). Por causa disso, muito interesse tem sido direcionado a extratos de plantas, ou óleos essenciais como potenciais agentes repelentes de mosquitos (YANG *et al.*, 2004) e atividades deterrentes foram observadas por muitos pesquisadores.

A grande variedade de substâncias presentes na flora continua sendo um enorme atrativo na área de controle de insetos, principalmente levando em consideração que apenas uma pequena quantidade dessas plantas foi investigada com tal finalidade. O estudo dos mecanismos de defesa das plantas é uma rica fonte na busca por compostos naturais que preencham os requisitos de eficácia, segurança e seletividade.

A busca por inseticidas naturais ganhou enorme impulso depois da descoberta dos efeitos indesejáveis aos ecossistemas dos inseticidas sintéticos, que utilizava em larga escala, o DDT (PINTO *et al.*, 2002). Assim, novos compostos com atividades larvicida e inseticida se tornam importantes devido ao aumento dramático da incidência de doenças transmitidas por insetos (OMENA *et al.*, 2007).

O uso indiscriminado de inseticidas sintéticos está criando problemas multifatoriais como poluição dos rios, da água e do ar, resistência aos inseticidas e toxicidade para humanos. Mundialmente, existe uma necessidade para encontrar alternativas para estes inseticidas sintéticos e grandes esforços têm sido realizados para superar esses problemas. Ênfase tem sido dada recentemente em metodologias viáveis tanto ambientalmente como economicamente no controle desses insetos, considerados pragas. Inseticidas botânicos são promissores em sua eficácia, facilmente biodegradáveis, contribuindo com o ambiente e também de baixo custo financeiro (DHARMAGADDA *et al.*, 2005 ; KIRAN *et al.*, 2006).

Muitas plantas produzem metabólitos secundários que inibem o crescimento de insetos. Terpenos, como os limonóides, e fenilpropanóides voláteis sintetizados por espécies vegetais podem ter diferentes propriedades, dependendo da espécie de inseto em estudo. Essas propriedades podem ser atrativas (alimentação, polinização), deterrentes ou inseticidas (KAINULAINEN *et al.*, 1998; VIEGAS JR, 2002).

Extratos das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* contêm o piretro, o primeiro composto natural a ser utilizado extensivamente contra mosquitos adultos, e ainda o inseticida mais conhecido e largamente utilizado. Os inseticidas naturais parecem não ter qualquer efeito sobre as populações não-alvo e são biodegradáveis, além de ser localmente disponível em muitas partes do mundo, mais afetadas por doenças transmitidas por mosquitos. Atuam interferindo no crescimento e na reprodução das pragas e são eficazes contra as diferentes fases de seu crescimento (SUKUMAR *et al.*, 1991).

Uma estratégia viável para a redução das populações de insetos é o uso de extratos de plantas, associado a outros métodos de controle, uma vez que sistemas auto-sustentáveis de produção requerem metodologias menos agressivas que, preferencialmente, sejam parte do agroecossistema e, assim, mais duradouras (CAVALCANTE *et al.*, 2006). Extratos de plantas vêm sendo utilizados pelo homem desde a Idade Antiga, numa prática que persiste até hoje,

com mais de 2000 espécies de plantas conhecidas por suas propriedades inseticidas (KAINULAINEN *et al.*, 1998).

Em anos recentes, o uso de extratos botânicos e biodegradáveis é considerado uma importante estratégia alternativa e viável economicamente para o controle de mosquitos vetores (JACKSON *et al.*, 1990). A descoberta por novos métodos para o controle da espécie *A. aegypti* é um parâmetro importante e o controle do vetor, não é um mecanismo fácil, visto que o mosquito apresenta uma alta plasticidade genética e fácil adaptação a condições ambientais adversas (LUNA *et al.*, 2005). Muitos trabalhos citam derivados químicos de plantas no controle de vários estágios e espécies de mosquitos.

Extrato hexânico de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) foi eficiente contra o terceiro estágio larval de *A. aegypti* (SIMAS *et al.*, 2004). Extratos metanólicos de folhas, cascas, alburno e cerne da criptoméria (*Cryptomeria japonica*) foram também analisados contra o quarto estágio larval (L₄) de *A. aegypti* e *Ae. albopictus*. Os resultados dos testes larvicidas demonstraram que a fração n-hexano do extrato metanólico do alburno teve um excelente efeito inibitório, provocando 100% de mortalidade das larvas em 24 h, numa concentração de 400 µg/mL, diferentemente dos extratos que foram obtidos das outras partes da planta (CHENG *et al.*, 2008). Extratos brutos etanólicos de cascas do tingui (*Magonia pubescens*) mostraram atividade larvicida para *A. aegypti* e *A. albopictus* (SILVA *et al.*, 2004). Estudos recentes têm apontado o tingui como uma fonte natural de agente larvicida por causa da presença de atividades larvicidas em extratos e frações ricas em saponinas de vários tecidos dessa planta, tais como frutos, raízes, cascas e folhas (WIESMAN & CHAPAGAIN, 2003; CHAPAGAIN, 2006). Extratos etanólicos obtidos de frutos e folhas de *Melia azedarach* têm mostrado efeitos larvicida e deterrente contra *A. aegypti* (WANDSCHEER *et al.*, 2004; CORIA *et al.*, 2008).

Óleos essenciais também têm sido bastante utilizados como larvicidas, devido a sua natureza lipofílica, que interfere diretamente nas funções do metabolismo básico, bioquímico, fisiológico e comportamental dos insetos (NISHIMURA, 2001). Por exemplo, os óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Satureja hortensis* e *Thymus satureioides* mostraram ser eficazes sobre a mortalidade larval de *Culex quinquefasciatus*, com valores de CL_{50} menores que 50 g/ml (PAVELA, 2009); óleo essencial extraído de flores de *Dendropanax morbifera*, com efeito tóxico sobre quarto estágio larval de *A. aegypti*, apresentou CL_{50} de 62,32 ppm (CHUNG *et al.*, 2009) enquanto que o óleo derivado da inflorescência de *Piper marginatum* exibiu uma potente ação larvicida em pequenas concentrações sobre estágio L₄ de *A. aegypti* num valor de CL_{50} de 20 ppm (AUTRAN *et al.*, 2009).

Efeitos larvicidas sobre *A. aegypti* e *Ae. albopictus* também foram detectados em óleos essenciais extraídos de folhas de *Cryptomeria japonica* em diferentes idades da planta (58, 42 e 26 anos), e as folhas de maior idade foram mais eficazes na atividade larvicida (CHENG *et al.*, 2009). Óleos essenciais e compostos isolados de folhas e caule de *Chloroxylon swietenia* tiveram atividade larvicida determinada para as espécies *A. aegypti* e *Anopheles stephensi*, sendo os compostos isolados mais tóxicos para as larvas de *Anopheles stephensi* (KIRAN *et al.*, 2006).

Estudos morfológicos que esclarecem os efeitos tóxicos de extratos de plantas sobre larvas de *A. aegypti*, auxiliam na compreensão das diversas formas de ação desses compostos (ARRUDA *et al.*, 2003; GUSMÃO *et al.*, 2002). A demonstração do local de atuação e da forma de ação tem grande importância para a potencialização de seus efeitos e para o desenvolvimento de produtos insetidas.

2.3. Lectinas

2.3.1 Generalidades

As lectinas são uma de classe de proteínas ou glicoproteínas hemaglutinantes estruturalmente diversa e contêm pelo menos um domínio de ligação a carboidratos, tais como monossacarídeos e oligossacarídeos as quais se ligam com alta especificidade e de forma reversível (PEUMANS *et al.*, 2001; SHARON & LIS, 2004 SHARON, 2007; CORREIA *et al.*, 2008).

Apresentam uma ampla distribuição na natureza (RATANAPO *et al.*, 2001) e centenas dessas moléculas têm sido isoladas de diferentes microrganismos como vírus, bactérias e fungos (TRIGUEIROS *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2009) de invertebrados (WANG *et al.*, 2009) e vertebrados (KILPATRICK, 2002) incluindo os mamíferos.

Em plantas, as lectinas têm sido isoladas de sementes (SANTOS *et al.*, 2009), folhas (GHOSH, 2008), flores (ITO, 1986), frutos (THAKUR *et al.*, 2007), líquens (SILVA *et al.*, 2009), entrecascas (NASCIMENTO *et al.*, 2008), rizomas (LIN *et al.*, 2008), cerne (SÁ *et al.*, 2009) e raízes (WANG & NG, 2006).

As lectinas diferem entre si pela composição e sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica, quanto ao número de subunidades na estrutura protéica, quanto à necessidade de presença de metais para a AH, bem como especificidade do sítio de ligação a carboidratos (CORREIA *et al.*, 2008).

A detecção de lectinas em material biológico inicia-se a partir de ensaios de aglutinação, na qual estas proteínas interagem com os carboidratos da superfície celular do eritrócito por meio dos seus sítios de ligação, formando ligações reversíveis entre células (SANTOS *et al.*, 2005). O ensaio da atividade hemaglutinante (AH) é comumente realizado

pela técnica de diluições seriadas da lectina e posterior incubação com eritrócitos (SANTOS *et al.*, 2005). A presença de uma lectina na amostra, como agente aglutinante é confirmada através dos ensaios de inibição da AH com uma solução do carboidrato ligante ou glicoproteína (TRINDADE *et al.*, 2006). A detecção, identificação e quantificação de lectinas também podem ser realizadas através de análise proteômica e de seqüenciamento por espectrometria de massas para futuras aplicações em processos bioquímicos, imunológicos e toxicológicos (NASI *et al.*, 2009).

2.3.2. Purificação e caracterização

Na purificação de lectinas estão envolvidas técnicas comuns a protocolos de isolamento de proteínas. A etapa inicial do isolamento consiste de preparações de extratos em solução aquosa (SANTOS *et al.*, 2005), salina (KONOZY *et al.*, 2003) ou em tampões (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Para purificação parcial, realiza-se uma precipitação protéica desses extratos brutos utilizando um sal, como o sulfato de amônio. Em seguida, as proteínas são precipitadas em frações distintas mantendo sua conformação nativa (COELHO & SILVA, 2000). As lectinas são geralmente nomeadas de acordo com a planta da qual elas foram extraídas.

A purificação parcial de lectinas através de fracionamento salino, utilizando o sulfato de amônio tornou-se um dos procedimentos mais utilizados, pois as proteínas possuem muitos grupos carregados e por isso, a sua solubilidade depende da concentração dos sais dissolvidos (LEHNINGER, 2006), a solubilidade aumenta com o acréscimo de sais (*salting in*) e volta a decrescer à medida que mais sal é adicionado (*salting out*).

Após o fracionamento salino, as lectinas são normalmente submetidas a processos de diálise em membranas semipermeáveis, seguida de processos cromatográficos, tais como

troca iônica (LAM & NG, 2008), gel filtração ou exclusão molecular (REGO *et al.*, 2002; JUNG *et al.*, 2007; POHLEVEN *et al.*, 2009) e de afinidade (TATENO *et al.*, 2003; SANTANA *et al.*, 2008).

A técnica de cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (HPLC) têm sido amplamente utilizada como um processo final na purificação de lectinas após a utilização de outros métodos cromatográficos, além de ser um meio de caracterização da massa molecular destas proteínas quando ocorre em uma matriz de gel filtração (NG *et al.*, 2003; WONG & NG, 2003; JIANG *et al.*, 2009).

A cromatografia de afinidade é uma técnica amplamente utilizada, e tem como critérios de separação a habilidade de ligação das lectinas a suportes polissacarídicos através de ligações não-covalentes. A proteína desejada é obtida com um alto grau de pureza (YE & NG, 2002), alterando as condições de pH (DATTA *et al.*, 2001) ou força iônica (FREIRE *et al.*, 2002).

A caracterização é realizada por meio da determinação de diferentes propriedades físico-químicas da lectina e envolve métodos diversos como inibição da AH por carboidratos e/ou glicoconjugados (YANG *et al.*, 2007), avaliação da AH com eritrócitos de diferentes espécies de animais (por exemplo: coelho, galinha, sistema sanguíneo humano A, B, AB e O), em presença de íons e em diferentes valores de pH e temperatura (SANTOS *et al.*, 2009).

Técnicas eletroforéticas, mono ou bidimensional, são eficientes para definir a natureza da carga líquida da proteína e o peso molecular das subunidades, bem como para avaliar a pureza da preparação obtida (NASI *et al.*, 2009).

A combinação de análises cromatográficas de lectinas com espectrometria de massas (MS) tem revelado uma definição estrutural de proteínas, principalmente de glicoproteínas por superar as limitações decorrentes da heterogeneidade dos açúcares (KUBOTA *et al.*, 2008).

A espectrometria de massas (técnica de detecção da massa de íons quando esses atravessam um campo magnético) é utilizada para a identificação das proteínas, devido à sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados, utilizando pequenas quantidade de amostra (GERMEINER *et al.*, 2009). A técnica de espectrometria de massas denominada MALDI-TOF, no MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ ionization*), as proteínas são misturadas a uma matriz, que é geralmente um ácido fraco (como por exemplo o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico). Após a cristalização da matriz, um laser é incidido sobre a matriz contendo os fragmentos da proteína, que são então ionizados, atravessando um campo elétrico. Como, nessa técnica, geralmente os fragmentos de proteínas adquirem apenas uma carga, a velocidade com que migram está relacionada com a massa do fragmento. O aparelho então determina essa massa através do tempo de voo (TOF, *time of flight*) de cada fragmento. Os valores das massas dos peptídeos (fragmentos) gerados por uma determinada proteína após a hidrólise enzimática são então avaliados utilizando bancos de dados. Na técnica de *peptide mass fingerprint* (PMF), o conjunto de massas dos peptídeos gerados pela fragmentação de uma proteína obtido por MALDI-TOF-MS são comparados com um banco de dados contendo seqüências de proteínas conhecidas ou o genoma. O banco de dados realiza uma clivagem “teórica” dessas proteínas pela enzima utilizada (no caso, a tripsina) e compara as massas teóricas dos peptídeos com as obtidas na espectrometria de massas. (COELHO *et al.*, 2004; KUBOTA *et al.*, 2008; NASI *et al.*, 2009).

2.3.3 Aplicações biotecnológicas e atividades biológicas

A específica interação das lectinas a glicoconjugados em solução ou na superfície celular dota estas moléculas de diversas atividades biológicas e as tornam ferramentas valiosas em diferentes aplicações biotecnológicas (CORREIA *et al.*, 2008). Lectinas possuem

várias atividades incluindo antimicrobiana, antitumoral, reconhecimento de carboidratos ou glicoconjugados presentes na superfície das células de diferentes animais, como também ação inseticida.

Lectinas purificadas podem ser utilizadas para diversos fins. Podem ser utilizadas em estudos citoquímicos e histoquímicos na detecção de resíduos glicosilados em superfícies teciduais de humanos e animais (PEDINI *et al.*, 2002), como moléculas de reconhecimento para diferenciação de tumores malignos e benignos (GORELIK *et al.*, 2001), como moléculas bioadesivas no endereçamento de drogas (BIES *et al.*, 2004), indução de apoptose celular (LIU *et al.*, 2009) e isolamento de glicoconjugados quando imobilizados em suportes insolúveis (FRANCO-FRAGUAS *et al.*, 2003; BANERJEE *et al.*, 2004). Assim, são proteínas amplamente versáteis.

As lectinas de plantas têm sido escolhidas para estudos das bases moleculares nos eventos de reconhecimento dos processos de infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasíticas; endereçamento de células e componentes solúveis; fertilização, metástases, crescimento e diferenciação celular (LORIS *et al.*, 1998; KEYAERTS *et al.*, 2007). Algumas lectinas de plantas estimulam o sistema imune por ativação não específica de células T ou atuam influenciando a divisão celular. Outras causam aglutinação de células, como os eritrócitos. As lectinas de *Viscum album* já estão sendo aplicadas na terapia do câncer (HARTMANN *et al.*, 2006). As lectinas também são usadas em procedimentos de diagnóstico e estudos das funções do sistema imune, tais como indução de linfócitos, produção e proliferação de interferons e citocinas, asma e inflamação e outros efeitos imunoestimulatórios (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; STAUDER & KREUSER, 2002).

2.3.4 Papel fisiológico

Em humanos, as lectinas atuam como receptores e desempenham um papel no tráfego extracelular de glicoproteínas, mediadores de reconhecimento celular em vários processos biológicos, adesão celular, interações celulares e imunidade inata (LEFFLER, 2004; HSU, 2004; NASI *et al.*, 2009). Enquanto em microorganismos, as lectinas desempenham papéis de simbiose responsáveis pela associação específica entre bactérias da flora intestinal e da mucosa humana (SULAGNA, 2004).

Funcionam também como determinantes da transmissão de patógenos por artrópodes (GRUBHOFFER & HYPSE VAND VOLF, 1997), estando envolvidas nos mecanismos de interação inseto-parasita (PEREIRA *et al.*, 1981; INGRAM & MOLYNEUX, 1991; JACOBSON & DOYLE, 1996; GRUBHOFFER & HYPSE VAND VOLF, 1997). O primeiro artigo de lectinas em tecidos específicos de vetores foi publicado em *Rhodnius prolixus* segundo Pereira et al. (1981). Entretanto, dados de lectinas em vetores têm surgido de pesquisas com os mosquitos tsé-tsé e têm mostrado que lectinas em tecidos específicos podem atuar no papel crucial de controle de moscas tsé-tsé na infecção por tripanossomas africanos (MAUDLIN, 1991).

Existem evidências indicando que a biossíntese de lectinas em insetos ocorre principalmente no corpo gorduroso, embora aglutininas são também relatadas serem produzidas pelos órgãos sexuais (STILES *et al.*, 1988), hemócitos (AMIRANTE, 1976) e em alguns casos estão associados com a membrana celular (BRADLEY *et al.*, 1989; MAUCHAMP, 1982).

Tem sido mostrado que lectinas de insetos atuam com uma variedade de funções, principalmente, no reconhecimento do não próprio (INGRAM & MOLYNEUX, 1991), e também estão envolvidas na fagocitose, encapsulamento, melanização e coagulação

(GRUBHOFFER & HYPSE VAND VOLF, 1997). Então, lectinas com distintas especificidades a açúcares envolvem papéis no reconhecimento e proteção do sistema imune contra protozoários e patógenos microbianos (BARREAU *et al.*, 1995).

Em plantas, sugere-se que as lectinas possuem diferentes papéis fisiológicos, incluindo transporte de carboidratos, estocagem e mobilização de proteínas de reserva e carboidratos, alongamento da parede celular, interação entre plantas e microorganismos e defesa contra o ataque de fungos, vírus e insetos (KENNEDY *et al.*, 1995; ISIDRO *et al.*, 2001; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; PAES *et al.*, 2002; LIMPENS & BISSELING, 2003).

2.3.5 Lectinas com atividade inseticida

Várias compostos isolados de plantas têm mostrado efeitos entomotóxicos a insetos das ordens Coleoptera, Homoptera e Lepidoptera quando esses se alimentam. Dentre estes compostos inserimos as lectinas como proteínas vegetais, e com potencial atividade para serem avaliadas em estudos larvicidas (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; VASCONCELOS & OLIVEIRA, 2004; SÁ *et al.*, 2009). A lectina isolada de leguminosa, *Canavalia ensiformis*, mostrou ser altamente tóxica para o coleóptero *Callosobruchus maculatus* (CARLINI & UDEDIBIE, 1997) e uma lectina com especificidade à manose (TEL) purificada de sementes de *Talisia esculenta*, também foi tóxica para esse coleóptero quando aplicadas em dieta artificial. TEL, também apresentou toxicidade para larvas de *Zabrotes subfasciatus* (MACEDO *et al.*, 2002). Lectinas de plantas foram avaliadas em ensaios de oviposição contra coleóptero o *Callosobruchus maculatus*; a PHA, lectina de *Phaseolus vulgaris*, apresentou atividade de 78% comparada às demais lectinas (SADEGHI *et al.*, 2006).

Tem sido demonstrado que algumas lectinas ligam-se às vilosidades do epitélio intestinal dos insetos, promovendo uma disfunção das células epiteliais, responsáveis pela assimilação de nutrientes para as células e absorção de substâncias potencialmente perigosas. No caso das lectinas ligadoras de quitina, ocorre a ligação à membrana peritrófica da região intestinal, prevenindo ou aumentando os movimentos entre o espaço endoperitrófico e exoperitrófico (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991; PEUMANS & VAN DAMME, 1995; ZHU-SALZMAN & SALZMAN, 2001; MACEDO *et al.*, 2003; TRIGUEIROS *et al.*, 2003).

Outra possibilidade do efeito tóxico inclui a ligação das lectinas as enzimas digestivas glicosiladas presentes no intestino dos insetos. Entretanto, o mecanismo preciso da ação das lectinas em insetos é ainda desconhecido. Potente atividade inseticida foi demonstrada pelas lectinas ligadoras de quitina WGA (do trigo, *Triticum aestivum*), PHA (do feijão comum, *Phaseolus vulgaris*) e BmoLL (da pata-de-vaca, *Bauhinia monandra*) (MURDOCK *et al.*, 1990; CARLINI E GROSSI-DE-SÁ, 2002; MACEDO *et al.*, 2002; MACEDO *et al.*, 2007). A BmoLL, mostrou ação inseticida para larvas de *C. maculatus*, *Zabrotes subfasciatus* e *Anagasta kuehniella* (MACEDO *et al.*, 2007). A atividade inseticida também foi descrita para as duas lectinas recombinantes de alho, ASAI e ASAII produzidas na levedura *Pichia pastoris*, ambas promoveram a mortalidade de afídeos simbióticos e tratados com antibióticos (FITCHES *et al.*, 2008).

A lectina isolada do fungo *Xerocomus chrysenteron*, denominada XCL, apresentou propriedade inseticida, sendo tóxica para o díptero *Drosophila melanogaster* e para o hemíptero *Acyrtosiphon pisum*. XCL apresentou alta atividade inseticida comparada à lectina de leguminosa *Lathyrus ochru* (TRIGUEIROS *et al.*, 2003).

Extratos salinos, frações e lectinas purificadas do cerne (MuHL) e da casca (MuBL) de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira do sertão) promoveram a mortalidade do quarto estágio

larval de *Aedes aegypti* (SÁ *et al.*, 2009) e a lectina purificada do líquen *Cladonia verticillaris* promoveu a mortalidade de cupins da espécie *Nasutitermes corniger* (SILVA *et al.*, 2009).

2.4 A espécie *Moringa oleifera*

A família Moringaceae, possui um único gênero denominado *Moringa*, constituído apenas por quatorze espécies, incluindo a *Moringa oleifera*. A moringa, uma planta tropical, de porte arbóreo, entre 7 e 12 m de altura, originária do continente asiático, no noroeste da Índia, é uma hortaliça perene, com baixo custo de produção e é bastante cultivada devido a adaptação à regiões de secas prolongadas, sobrevivendo a grandes períodos em solos pobres e com baixo teor de umidade (MCCONNACHIE *et al.*, 1999).

Muitas propriedades têm sido identificadas em diferentes partes de *Moringa oleifera* (Figura 4): as folhas, frutos verdes, flores e sementes possuem valor alimentar devido à presença de quantidades representativas de cálcio, ferro, proteínas e também podem ser utilizadas como suplemento alimentar por apresentarem potássio, vitaminas do complexo B e cobre (JOLY, 1998; OKUDA, 2001).

O extrato das folhas é uma fonte potencial de antioxidantes (ARABSHAHI *et al.*, 2007) e efeitos hipocolesterolêmicos têm também sido descrito (CHUMARK *et al.*, 2009) e as sementes contém atividade hipotensiva (FAIZI *et al.*, 1995), forte atividade antioxidante e propriedade quelante contra toxicidade pelo arsênio (GUPTA *et al.*, 2005). As sementes de moringa são muito utilizadas para tratamento de água (KATAYON *et al.*, 2006; GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005) e também promovem ação descontaminante em águas contaminadas por arsênio podendo ser utilizadas em áreas domésticas como tecnologia segura e viável ao meio ambiente (KUMARI *et al.*, 2006).

As folhas, frutos, raízes e sementes também possuem propriedades medicinais, sendo tradicionalmente utilizadas para o tratamento de tumores abdominais, escorbuto, ataques paralíticos, problemas de bexiga e próstata, úlceras e infecções cutâneas (FUGLIE, 1999).

As sementes de moringa apresentam compostos bioativos com ação coagulante, e essa propriedade está relacionada à presença de diferentes proteínas coagulantes, incluindo entre elas, a lectina coagulante de sementes de *Moringa oleifera* (cMoL) que participa do processo de tratamento da água, através da remoção da turbidez, tornando-a própria para consumo pelas populações (SANTOS *et al.*, 2009).

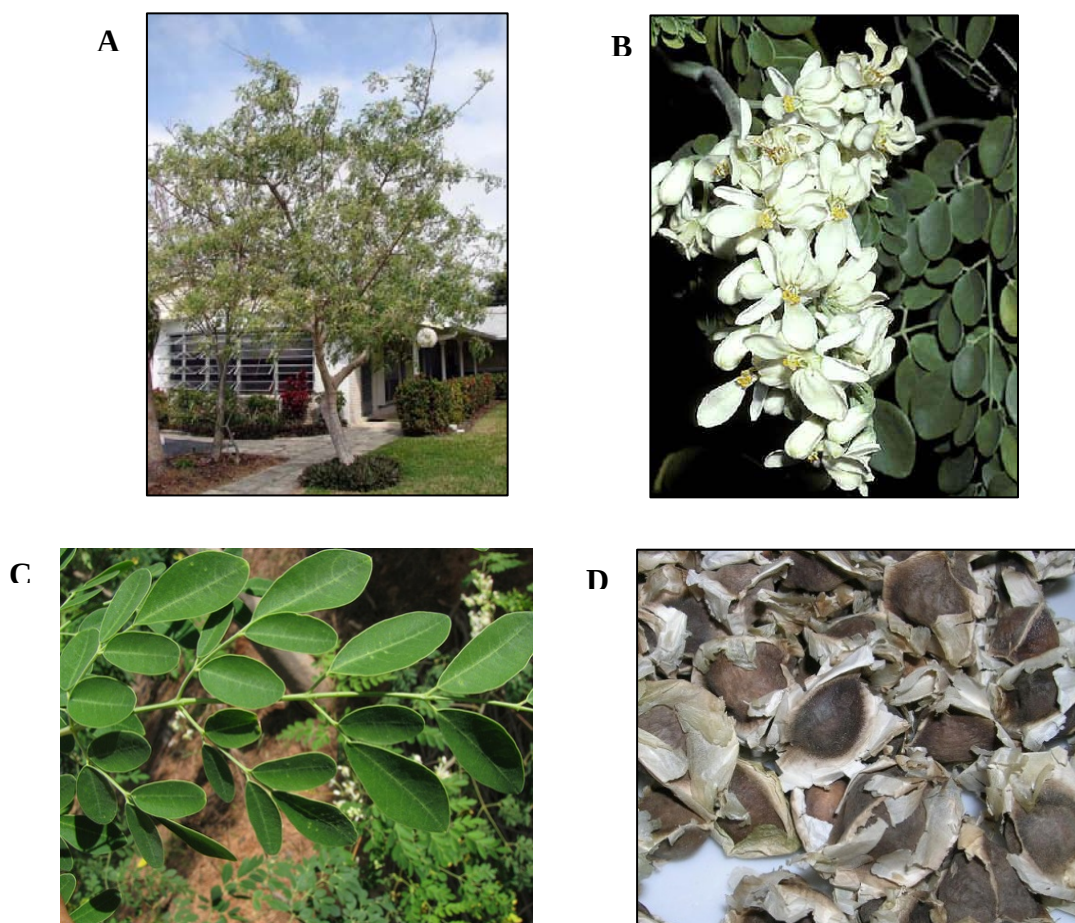


Figura 4. *Moringa oleifera*. (A) Aspecto geral. (B) Flores. (C) Folhas. (D) Sementes.

2.4.1 Lectinas de sementes de *Moringa oleifera*

Três lectinas foram identificadas em sementes de *M. oleifera* sendo denominadas MoL (do inglês *M. oleifera lectin*), cMoL (do inglês *coagulant M. oleifera lectin*) e WSMoL (do inglês *water-soluble M. oleifera lectin*). MoL é uma lectina catiônica formada por subunidades de 7,1 kDa que foi isolada por cromatografias em DEAE-Celulose e CM-Sephadex (KATRE *et al.*, 2008). A lectina cMoL também de natureza catiônica, apresentou a atividade coagulante e é formada por subunidades de 26,5 e 14,9 kDa (SANTOS *et al.*, 2009). WSMoL foi detectada em extratos aquosos obtidos após 5, 15 e 37 h (SANTOS *et al.*, 2005) e Rolim (2007) estabeleu o protocolo de purificação e caracterização dessa lectina.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito da lectina WSMoL sobre o desenvolvimento larval e mortalidade de *A. aegypti*.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos aquosos de sementes de *M. oleifera*.
- Purificar WSMoL de acordo com o protocolo já estabelecido.
- Determinar a AH e o efeito do monossacarídeo N-acetilglicosamina na AH.
- Determinar a concentração de proteínas de extratos e WSMoL.
- Caracterizar WSMoL por análise de espectrometria de massas.
- Avaliar o efeito de extratos aquosos de sementes de moringa e WSMoL sobre o desenvolvimento de *A. aegypti*.
- Avaliar a atividade larvívica da lectina sobre o quarto estágio larval (L₄) de *A. aegypti*.
- Determinar os valores de CL₅₀ (concentração de proteínas necessária para promover a mortalidade das larvas em 50%) para a lectina.
- Realizar análise por microscopia óptica em larvas tratadas ou não com WSMoL.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDOR, R. W. Insecticides. In: GODFERY, C. R. A. (ed.). *Agrochemicals from Natural Products*. New York: Marcel Dekker Inc., 1994. p. 1-62.

AMIRANTE, G. A. Production of heteroagglutinins in haemocytes of *Leucophaea maderae* L. **Journal Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 32, n. 4, p. 526-528, 1976.

ARABSHAHI, D. S, DEVI, D.V, UROOJ, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. **Food Chem**, v.100, p.1100–1105. 2007.

ARAÚJO, A. P., DE MELO-SANTOS, M. A. V., CARLOS, S.O., RIOS,E. M. M. M., REGIS, L. Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis sorovar. israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera:Culicidae). **Biological Control**, v. 41, p.339–347, 2007

ARAÚJO, J.M.G., SCHATZMAYR, H.G., DE FILIPPIS, A. M. B., SANTOS, F.B., CARDOSO, M. A., CONSTANC, A BRITTO, JANICE M.C. OLIVEIRA COELHO, RITA MARIA RIBEIRO NOGUEIRA. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. **Journal of Virological Methods**, v. 155, p.34–38, 2009.

ARRUDA, W., OLIVEIRA, G.M.C., SILVA, I.G. Alterações morfológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) submetidas à ação do extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens* St. Hil. **Entomol. Vect**, v.10, p.47-60, 2003.

AUTRAN, E.S., NEVES, I.A., SILVA, C.S.B., SANTOS, G.K.N., CÂMARA,C.A.G., NAVARRO, D.M.A.F. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v.100, p. 2284-2288, 2009.

BABU, R.; MURUGAN, K. Interactive effect of neem seed kernel and neem gum extracts on the control of *Culex quinquefasciatus* Say. **Neem Newsletter**, v. 15, n. 2, p. 9–11, 1998.

BALDWIN, I. T. et al. Review: Merging molecular and ecological approaches in plant–insect interactions. **Journal Current Opinion Plant Biology**, v. 4, n. 4, p. 351-358, 2001.

BANERJEE, S. et al. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 421, p. 125-134, 2004.

BARATA, E. A. M. F. et al. População de *Aedes aegypti* I (L.) em área endêmica de dengue, sudeste do Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 35, p. 237-242, 2001.

BARBOSA, R. M. R. et al. Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 5, p. 523-529, 2007.

BARREAU, C. et al. Plasmodium gallinaceum; sporozoite invasion of *Aedes aegypti* salivary glands is inhibited by anti-gland antibodies and by lectins. **Experimental Parasitology**, v. 81, p. 332-43, 1995.

BIES, C.; LEHR, C. M.; WOODLEY, J. F. Lectin – mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 425-435, 2004.

BRADLEY, R. S. et al. **Journal of Insect Physiology**, v. 35, p. 353-361, 1989.

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

BRAKS, M. A. H. et al. Interspecific competition between two invasive species of container mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazil. **Ann Entomology Soc Am**, v. 97, p.130-139, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor : manual de normas técnicas. - 3. ed., rev. - Brasília : Ministério da Saúde : Fundação Nacional de Saúde, 2001.

BRASIL. SECRETARIA DA SAÚDE E DEFESA CIVIL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. Coordenação de Vigilância Ambiental em Saúde. Ciclo do *Aedes aegypti*. Disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br/images/cvas/ciclo.jpg>.

BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Balanço Dengue: Semana Epidemiológica 1 a 15 de 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>. Ministério da Saúde, Brasília. Acesso em 15/06/2009.

BUGHIO, F. M.; WILKINS, R. M. Influence of malathion resistance status on survival and growth of *Tribolium castaneum* (Coleoptera:Tenebrionidae), when fed on flour from insect-resistant and susceptible grain rice cultivars. *Journal of Stored Products Research*, v. 40, n. 1, p. 65-75, 2004.

CARLINI, C. R., UDEDIBIE, A. B. Comparative effects of processing methods on hemagglutinating and antitryptic activities of *Canavalia ensiformis* and *Canavalia braziliensis* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 45, n.11, p.4372–4377, 1997.

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.

CARVALHO et al., Susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida Temephos no Distrito Federal. **Revista Saúde Pública**, v. 38, p.623-629, 2004.

CAVALCANTE, G. M.; MOREIRA, A. F. C.; VASCONCELOS, S. D. Potencialidade de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 1, p. 9-14, 2006.

CEPLEANU, F. Validation and application of three benchtop bioassays for screening of crude plant extracts and subsequent activity-guided isolation. Tese de Doutorado, Faculte des Sciences, Universite de Lausanne, Lausanne, 1983.

CHAPAGAIN, B. P. Characterization on the desert date (*Balanites aegyptiaca* L.) saponins and their biological activities. PhD dissertation. Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel, 2006.

CHAPAGAIN, B. P.; SAHARAN, V.; WIESMAN, Z. Larvicidal activity of saponins from *Balanites aegyptiaca* callus against *Aedes aegypti* mosquito. **Bioresource Technology**, v. 99, n.5, p. 1165-1168, 2008.

CHENG, S-S. et al. Larvicidal activity of tectoquinone isolated from red heartwood-type *Cryptomeria japonica* against two mosquito species. *Bioresource Technology*, v.99, n. 9, p.3617-3622, 2008.

CHENG, SEN-SUNG., CHUA, MENG-THONG., CHANG, ED-HAUN., HUANG, CHING-LI., CHEN, WEI-JUNE., CHANG, SHANG-TZEN. Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. **Bioresource Technology**, v.100, p.465–470, 2009.

CHRISPEELS, M.J., RAIKHELB, N.V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **Plant Cell**, v.3, p.1–9, 1991.

CHUMARK, P., K., PONGRAPEEPORN, Y., SANVARINTA, S., PHORNCHIRASILP, P., KHUNAWAT, L., PHIVTHONG-NGAM. UP regulation of mRNA level of low density lipoprotein receptors in hep g2 cells treated with water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Atherosclerosis Supplement*, v. 10, n.2, 2009.

CHUNG, ILL-MIN., SEO, SU-HYUN, KANG, EUN-YOUNG., PARK, SUN-DONG., PARK, WON-HWAN., MOON, HYUNG-IN. Chemical composition and larvicidal effects of essential oil of *Dendropanax morbifera* against *Aedes aegypti* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, in press, 2009.

CLARO, L. B. L.; TOMASSINI, H. C. B.; ROSA, M. L. G. Dengue prevention and control: a review of studies on knowledge, beliefs, and practices. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 20, n. 6, p.1447-1457, 2004.

CLEMENTS, A. N. The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction. Chapman & Hall, pp. 536, 1992.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify miligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*, v. 11, p. 295-300, 2000.

COELHO, A., SANTOS, E.O., FARIA, M.L.H., CARVALHO, D.P., SOARES, M. R., VON KRUGER, W. M. A., BISCH, P. M. A proteome reference map for *Vibrio cholerae* El Tor. *Proteomics*, v.4, n.5, p. 1491 – 1501, 2004.

COHEN, E. Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 22, n.1-2, p. 245–261. 1993.

CONSOLI, R. A. G. B., OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, p.225, 1994.

CORIA, C. et al. 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.

CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B, PAIVA, P.M.G. Lectins carbohydrate recognition molecules: are they toxic? In: Siddique YH, editor. Recent trends in toxicology, vol. 37. Kerala, India: Transworld Research Network; 2008. p. 47–59.

DATTA, K. et al. A comparative study of the winged bean protease inhibitors and their interaction with proteases. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 949- 959, 2001.

DE SIMONE, T.S., NOGUEIRA, R.M.R., ARAÚJO, E.S.M., GUIMARÃES, F.R., SANTOS, F.B., SCHATZMAYR, H.G., SOUZA, R.V., TEIXEIRA FILHO, G., MIAGOSTOVICH, M.P. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.98, p.553-562, 2004.

DHARMAGADDA, V. S. S. et al. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1235–1240, 2005.

ESTADOS UNIDOS. ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. Dengue hemorrágica: diagnóstico, tratamento e controle, 1987.

ESTADOS UNIDOS. ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. Novos focos de vírus do Nilo, SRAS e febre amarela. OPAS/PAO/WHO, 2003.

ESTEVA, L., YANG, H. M. Mathematical model to assess the control of *Aedes aegypti* mosquitoes by the sterile insect technique. **Mathematical Biosciences**, v.198, p.132–147, 2005.

FAIZI, S., SIDDIQUI, B.S., SALEEM, R., SIDDIQUI, S., AFTAB, K., GILANI, A.H. Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard oil glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure. **J. Nat. Products**, v.57, n.9, p.1256-1261, 1995.

FITCHES, E., WILES, D., DOUGLAS, A. E., HINCHLIFFE, G., AUDSLEY, N., GATEHOUSE, J. A. The insecticidal activity of recombinant garlic lectins towards aphids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38, n.10, p. 905-915, 2008.

FORATTINI, O. P. Entomologia Médica. São Paulo, USP. v.1, 662p., 1962.

FORATTINI, O. P. Entomologia Médica. São Paulo, Faculdade de Saúde pública, v.2 416p, 1965.

FORATTINI, O. P.; BRITO, M. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde pública*, v. 37, p. 676-677, 2003.

FRANCO, O. L.; MELO, F. R.; SILVA, M. C. M. et al. Resistência de plantas a insetos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n.11, p. 36-40, 1999.

FRANCO-FRAGUAS, L. et al. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. **Journal of Chromatography B**, v. 790, p. 365-372, 2003.

FREIRE, M. G. M. et al. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

FUGLIE, L.J., The Miracle Tree: *Moringa oleifera*: Natural Nutrition for the Tropics, Church World Service, Dakar, p. 68; Revised in 2001 and Published as The Miracle Tree: The Multiple Attributes of Moringa, p. 172. 1999.

GALLO et al., Manual de Entomologia Agrícola. Ed. Agronomia Ceres, São Paulo cap. 8 Métodos de Controle de Pragas. p. 172-293, 1988.

GEMEINER, PETER., DANICA MISLOVIČOVÁ., JÁN TKÁČ., JURAJ ŠVITEL B,1, VLADIMÍR PÄTOPRSTÝ C, EVA HRABÁROVÁ, GRIGORIJ KOGAN, TIBOR KOŽÁR E. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances**, v.27, p.1–15, 2009.

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 Res**, v.39, p.2338–44. 2005.

GLUBER, D. Aedes aegypti and Aedes aegypti-borne disease control in the 1990_s: top down or bottom up. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 40, p.571–578, 1989.

GORELIK, E., GALILI, U., RAZ, A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis, **Cancer Metast. Rev.** v.20, p.245–277, 2001.

GHOSH, M. Purification of a lectin-like antifungal protein from the medicinal herb, *Withania somnifera*. **Fitoterapia**, 2008.

GRUBHOFFER, L.; HYPSA, V. V. P. Lectins (hemagglutinins) in the gut of the important disease vectors. **Parasite**, v.4, n. 3, p. 203-216, 1997.

GUSMÃO, D.S., PÁSCOA, V., MATHIAS, L., VIEIRA, I.J.C., BRAZ-FILHO, R., LEMOS, F.J.A. Derris (Lonchocarpus) urucu (Leguminosae) Extract Modifies the Peritrophic Matrix

Struture of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.97, p.371-375, 2002.

GUPTA, R., KANNAM, M.G., SHARMA, M., FLORA, S.J.S. Therapeutic effects of *Moringa oleifera* on arsenic-induzed toxicity in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.20, n.3, p.456-464, 2005.

HALSTEAD, S. B. Dengue. *The Lancet*, v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, 2007.

HARBORNE, J. B. Ecologycal Biochemistry. ed. London: Academic Press, 1993.

HARTMANN, M.; NIKITIN, P.; KEUSGEN, M. Innovative analytical system for screening on lectins. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 28–34, 2006.

HEMME, R R., TANK, J. L., CHADEE, D.D., SEVERSON, D.W. Environmental conditions in water storage drums and influences on *Aedes aegypti* in Trinidad,West Indies. **Acta Tropica**, v.112, p.59–66, 2009.

HSU, D. K.; LIU, F. T. Regulation of cellular homeostasis by galectins. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, p. 507-515, 2004.

INGRAM, G. A.; MOLYNEUX, D. H. Insect lectins: role in parasite-vector interactions. *Lectin Reviews*, v. 1, p. 103-127, 1991.

ISIDRO, R et al. Ação de lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. sobre o comportamento da saúva do Nordeste (*Atta opaciceps* Borgmeier, 1939). **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 27, p. 77-89, 2001.

ITO, Y. Occurence of lectins in leaves and flowers of *Sophora japonica* . **Plant Science**, v. 47, n. 2, p. 77-82, 1986.

JACKSON, F. L. C. et al. Larvicidal effects of grain sorghum (*Sorghum bicolor*) seedling extracts upon *Culex pipiens* larvae. **Journal of American Mosquito Control Association**, v. 6, n. 3, p. 500-503, 1990.

JACOBSON, R. L.; DOYLE, R. J. Lectin-parasite interactions. **Parasitology Today**, v.12, n.2 p.55-60, 1996.

JANTAN, I., YALVEMA, M.F., AHMAD, N.W., JAMAL, J.A. Insecticidal activities of the leaf oils of eight *Cinnamomum* species against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Pharmaceutical Biol**, v.43, p.526–532, 2005.

JAYARAMAN, K. S. et al. Indian Bt gene monoculture, potential time bomb. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 158, 2005.

JIANG, L.; PENG, L.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; ZHANG, D.; LIANG, S. Expression, purification and characterization of a group of lectin-like peptides from the spider *Ornithoctonus huwena*. **Peptides**, v. 30, n.4, p.669-674, 2009.

JOHNSON, B. W., CHAMBERS, TRUDY V., CRABTREE, MARY B., FILIPPIS, ANA M. B., VILARINHOS, PAULO T. R., RESENDE, MARCELO C., MACORIS, MARIA DE LOURDES G., MILLERET, BARRY R. Vector competence of Brazilian *Aedes aegypti* and *A. albopictus* for a Brazilian yellow fever virus isolate. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 6, p. 611-613, 2002.

JOLY, A. B.. Botânica – Introdução à Taxonomia Vegetal. 1998.

JUNG, E. C.; KIM, K. D.; BAE, C. H.; KIM, J. C.; KIM, D. K.; KIM, H. H. A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 833–838, 2007.

KAINULAINEN, P. et al. Foliar and emission composition of essential oil in two carrot varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 46, n. 9, p. 3780-3784, 1998.

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

KATAYON, S., MEGAT MOHD NOOR, M.J., ASMA, M., ABDUL GHANI A, L.A., THAMER, A.M., AZNI, I., AHMAD, J., KHOR, B.C., SULEYMAN, A.M. Effects of storage conditions of *Moringa oleifera* seeds on its performance in coagulation. **Bioresource Technology**, v.97, p.1455–1460, 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.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

KEYAERTS, E., VIJGEN, L., PANNECOUQUE, C., VAN DAMME, E., PEUMANS, W., EGBERINK, H., BALZARINI, J., RANST, M. V. Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. *Antiviral Research*, v.75, p.179–187, 2007.

KILPATRICK, D. C. Review Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 187– 197, 2002.

KIRAN, S. R. et al. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2481-2484, 2006.

KONOZY, E. H. et al. Isolation, purification and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Eritrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n. 410, p.222-229, 2003.

KUBOTA, K., SATO, Y., SUZUKI, Y., GOTO-INOUE N, TODA T, SUZUKI M, et al. Analysis of glycopeptides using lectin affinity chromatography with MALDI-TOF mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.80, p.3693–3698, 2008.

KUMARI, P., SHARMA, P., SRIVASTAVA, S., SRIVASTAVA, M.M. Biosorption studies on shelled *Moringa oleifera* Lamarck seed powder: removal and recovery of arsenic from aqueous system. **Int J Miner Process**, v.78, p.131–139, 2006.

LAM, S. K.; NG, T. B. A protein with antiproliferative, antifungal and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from caper (*Capparis spinosa*) seeds. **Phytomedicine**, v.16, n.5, p.444-450, 2008.

LARA, F. M. Princípios de resistência de plantas a insetos. São Paulo: Ícone, 1991. 336p.

LARINI, L. Toxicologia dos Inseticidas. São Paulo: Ed. Sarvier, 1979.

LEFFLER, A. L. Princípios de Bioquímica. São Paulo, ed. Sarvier, Cap. 5, p. 87-119, 2004.

LEHANE, M.J. (2005). The biology of blood-sucking in insects. Cambridge University Press.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. Sarvier, 4ª ed., São Paulo, 2006.

LEHTONEN, R.; PAHLONEN, E. Practical methods for design and analysis of complex surveys. 2ª ed. John Wiley & Sons, New York, 2004.

LIMPENS, E.; BISSELING, T. Signaling in symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 343-350, 2003.

LIN, L.; LU, J.; ZENG, H.; LIANG, Z.; ZHOU, Y.; LIN, J.; SUN, X.; TANG, K. Molecular cloning and characterization of a mannose-binding lectin gene from *Pinellia cordata*. **Molecular Biology Reports**, v.35, n.4, p. 641–647 2008.

LIU, BO., BIAN, HE-JIAO, BAO, JIN-KU. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters*, (2009) in press.

LORIS, R. et al. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, p. 9-36, 1998.

LUCIA, A., LICASTRO, S., ZERBA, E., AUDINO, P. G., MASUH, H. Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of Eucalyptus essential oils. **Bioresource Technology**, in press, 2009.

LUNA, J.E.D., MARTINS, M.F., ANJOS, A.T., KUWABARO, E.F., NAVARRO-SILVA, M.A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.38, p.842-843, 2004.

LUNA, J. de S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p.199-206, 2005.

MACCONHACHIE, G. L.; FOLKARD, G. K.; MTAWALI, M. A.; SUTHERLAND, J. P. Fiels trials of appropriate hydraulic flocculation processes. *Water Research*, v.33, p.1425-1434, 1999.

MACEDO, M. L. R. et al. Talisia esculenta lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1571, n. 2, p.83-88, 2002.

MACEDO, M. L. R. et al. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from *Koelreuteria paniculata* seeds and its effect on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2980-2986, 2003.

MACEDO, M. L. R. et al. Inseticidal action of Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculates* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 2007.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutricional value and antinutricional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera*, **Animal Feed Science and Technology**, v.63, p. 211-228, 1996.

MARICONI, F. A. M. Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas. 5. ed.. São Paulo: Nobel, 1981.

MAUCHAMP, B. Purification of an N-acetyl-Dglucosamine specific lectin (P.B.A.) from epidermal cell membranes of *Pieris brassica*. *Biochimie*, v. 64, p.1001-1008, 1982.

MAUDLIN, I. Transmission of African trypanosomiasis: interactions among tsetse immune system, synbiont and parasites. In: *Advances in Disease Vector Research*, Harris K.F. (Ed), Springer-Verlag, New York, Inc, p. 117-48, 1991.

MELTZER, E., SCHWARTZ, E. A travel medicine view of dengue and dengue hemorrhagic fever. **Travel Medicine and Infectious Disease**, (2009), article in press.

MELO-SANTOS, M.A.V., ARAÚJO, A.P., RIOS, E.M.M., REGIS, L. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. **Biological Control**, v.49, p.186–19, 2009.

MICIELI, M. V.; CAMPOS, R. E. Oviposition activity and seasonal pattern of a population of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) (Diptera:Culicidae) in subtropical Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 659-663, 2003.

MONATH, T. P. Dengue: The risk to developed and developing countries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 91, p. 2395-2400, 1994.

MONATH, T. P. Treatment of yellow fever. **Antiviral Research**, v. 78, n.1, p.116-124, 2008.

MURDOCK, L. L. et al. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry*, v. 29, n. 1, p. 85-89, 1990.

NASCIMENTO, C. O.; COSTA, R. M. P. B.; ARAÚJO, R. M. S.; CHAVES, M. E. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G.; TEIXEIRA, J. A.; CORREIA, M. T. S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Optimized extraction of a lectin from *Crataeva tapia* bark using AOT in isooctane reversed micelles. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 779–782, 2008.

NASI, A., PICARIELLO, G., FERRANTI, P. Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. **Journal of Proteomics**, v.72, p.527-538, 2009.

NDUMU, P. A.; GEORGE, J. B. D.; CHOUDHURY, M. K. Toxicity of neem seed oil (*Azadiracta indica*) against the larvae of *Amblyomma variegatum* a three-host tick in cattle. **Phytotherapy research** v. 13, n. 6, p. 532-534, 1999.

NG, T. B.; LAM, Y. W.; WOO, N. Y. S. The immunostimulatory activity and stability of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) roe lectin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 94, p. 105-112, 2003.

NISHIMURA, H. Aroma constituents in plants and their repellent activities against mosquitoes. **Aroma Research**, v. 2, p. 257–267, 2001.

OKUDA, T., BAES, A.U., NISHIJIMA, W., OKADA, M. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. **Water Research**, v.35, p. 405-410, 2001.

OLIVEIRA, J. T. A. et al. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 301- 310, 2002.

OMENA, M. C. et al. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2549-2556, 2007.

OSBORN, T. C., ALEXANDER, D. C., SUN, S. S. M., CARDONA, C., BLISS, F. A. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. **Science**, v. 240, n.4849, p. 207–210, 1988.

PAES, J. B.; MORAIS, V. M.; LIMA, C. R. Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos, em condições de laboratório. *Floresta e Ambiente*, v. 9, p.135-144, 2002.

PAVELA, R. Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Industrial Crops and Products**, v. 30, p.311–315, 2009.

PEDINI, V. et al. Glycoconjugate characterization in the intestine of *Umbrina cirrosa* by means of lectin histochemistry. **Journal of Fish Biology**, v. 61, p. 1363-1372, 2002.

PEREIRA, M. E.; ANDRADE, A. F. B.; RIBEIRO, J. M. C. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science*, v. 211, p. 597-99, 1981.

PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Lectin as plant defense proteins. **Plant-Physiology**. v.109, n. 2, p. 347–352, 1995.

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J., BARRE, A., ROUGE, P., Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins, **Adv. Exp. Med. Biol**, v.491, p.27–54, 2001.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Review: The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Journal Current Opinion in Plant Biology**, v.5, n.3, p. 237- 243, 2002.

PINTO, A. C. et al., Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

POHLEVEN, J.; OBERMAJER, N.; SABOTIČ, J.; ANŽLOVAR, S.; SEPČIĆ, K.; KOS, J.; KRALJ, B.; ŠTRUKELJ, B.; BRZIN, J. Purification, characterization and cloning of a ricin

B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells, **Biochimica et Biophysica Acta**, *article in press*, 2009.

PRICE, P.W. Insect ecology. New York: Wiley- Interscience, 387p, 1984.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori* . **Plant Science**, v.160, n. 739–744, 2001.

REGO, E. J. L.; CARVALHO, D. D.; MAGANRONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (Smooth rattlebox). **Phytochemistry**, v. 60, p. 441-447, 2002.

ROLIM, L. A. D. M. M. (2007). Purificação da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) e avaliação da genotoxicidade. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 67 folhas (Dissertação de Mestrado).

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, Toxicology & Pharmacology**, v.149, p.300 - 306, 2009.

SADEGHI, A. et al. Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. **Phytochemistry**, v.67, p. 2078-2084, 2006.

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

SANTANA, M. A.; SANTOS, A. M. C.; OLIVEIRA, M. E.; OLIVEIRA, J. S.; BABA, E .H.; SANTORO, M. M.; ANDRADE, M. H. G. A novel and efficient and low-cost methodology

for purification of *Macrotyloma axillare* (Leguminosae) seed lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 352–358, 2008.

SANTOS, A. F. S. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v. 39, p. 975–980, 2005.

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.

SEIGLER, D.; PRICE, P. W. Secondary compounds in plants: primary functions. *American Natural*, v.110 p.101-105, 1976.

SERVICE, M. W. Medical entomology for students. 1ed. Chapman & Hall, London, 278p, 1996.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53-62, 2004.

SHARON, N., Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules, **J. Biol. Chem**, v.282, p.2753–2764, 2007.

SHU, S-H, XIE, G-Z., GUO, X-L., WANG, M. Purification and characterization of a novel ribosome-inactivating protein from seeds of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. **Protein Expression and Purification**, v.67, p.120–125, 2009.

SILVA, H. H. G. et al. Atividade larvica de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 396-399, 2004.

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 & Biodegradation**, v. 63, p.334–340, 2009.

SIMAS, N. K. et al., Produtos Naturais para o controle da Transmissão da Dengue – Atividade Larvica de *Myroxylon balsamum* (Óleo Vermelho) e de Terpenóides e Fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 46-49, 2004.

STAUDER, H.; KREUSER, E.D. Mistletoe extracts standardised in terms of mistletoe lectins (MLI) in oncology: **Current State of Clinical Research**. *Onkologie*, v. 25, n. 4, p. 374–380, 2002.

STILES, B. et al. Site of synthesis of the haemolymph agglutinin of *Melanoplus differentialis* (Acrididae: Orthoptera). **Journal of Insect Physiology**, v. 34, p.1077-85, 1988.

STRONG, D. R.; LAWTON, J. H.; SOUTHWOOD, R. Insects on plants. Community patterns and mechanisms. Cambridge: Harvard University Press, 523p. 1984.

SUIÇA. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue bulletin: Epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever: A global public health problem in the 21st century. 1997.

SUIÇA. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet N°117. Geneva: World Health Organization, 2002.

SUKUMAR, K.; PERICH, M. J.; BOOBAR, L. R. Botanical derivatives in mosquito control: a review. **Journal of American Mosquito Control Association**, v.7, p.210–237, 1991.

SULAGNA, B. A. S. et al. A biologically active lectin of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Biochimie**, v. 86, p. 657-666, 2004.

TABASHNIK, B. E. Breaking the code of resistance. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 922–924, 2001.

TATENO H.; Purification, characterization molecular and expression of novel members of jacalin-related lectins from rhizomes of the true fern *Plebidium aureum* (L.) J. Smith (Polypodiaceae). **Journal Biology Chemistry**, v. 278, p.10891-10899, 2003.

TAUIL, P. L. (2002). Aspectos clínicos do controle do dengue no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.18, p. 867-871.

THAKUR, A.; RANA, M.; LAKHANPAL, T. N.; AHMAD, A.; KHAN, M. I. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 1404–1412, 2007.

TRIGUEIROS, V.; et al. Xerocomus chrysenteron lectin: identification of a new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1621, p. 292-298, 2003.

TRINDADE, M. B. et al. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 146-152, 2006.

VARGAS, M. V. Uso de ovitrampas en los programas de prevención y control del dengue. **Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica**, v. 8, n. 5, p. 122-124, 2002.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, p. 1737–1747, 2004.

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

VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Plantas inseticidas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (eds). *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento* 1. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Ed. UFSC e UFRGS, 1999.

WANDSCHEER, C. B. et al. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azederach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Toxicon**, v. 44, p. 829-835, 2004.

WANG, H. X.; NG, T. B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 349-353, 2006.

WANG, X-W., ZHANG, X-W., XU, W-T., ZHAO, X-F., WANG, J-X. A novel C-type lectin (FcLec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* in vivo in Chinese white shrimp. **Developmental & Comparative Immunology**, v.33, p.1039-1047, 2009.

WEAVER, S. C., VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p.523–540, 2009.

WHITTAKER, R. H. The biochemical ecology of higher plants. In: SONDHEIMER, E.; et al. Nochoice study of plant-insect interactions for *Heliothis zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) on selected cottons. **Environmental Entomology**, v.12, p.1833- 1836, 1983.

WHO, 2008. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

WISMAN, Z.; CHAPAGAIN, B. P. Laboratory evaluation of natural saponin as a bioactive agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Dengue Bulletin**, v. 27, p.168-173, 2003.

WONG, J. H.; NG, T. B. Purification of a trypsin-stable with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, p. 545-550, 2003.

YANG, Y.-C. et al. Repellency of aromatic medicinal plant extracts and a steam distillate to *Aedes aegypti*. **Journal of American Mosquito Control Association**, v.20, n. 2, p. 146–149, 2004.

YANG, H.; LUO, T.; LI, F.; LI, S.; XU, X. Purification and characterization of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of the shrimp *Penaeus japonicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 22, p.88-97, 2007.

YE, X. Y.; NG, T. B. Isolation of a new cyclophilin-like protein from chickpeas with mitogenic, antifungal and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities. **Life Sciences**, v. 70, p. 1129- 1138, 2002.

ZHAO, J.K., WANG, H.X., NG, T.B. Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrinella*. **Toxicon** v.53, p.360–366, 2009.

ZHU-SALZMAN, K., SALZMAN, R.A. Functional mechanics of the plant defensive *Griffonia simplicifolia* lectin II: resistance to proteolysis is independent of glycoconjugate binding in the insect gut. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p. 1280–1284, 2001.

5. ARTIGO

**“Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of
Aedes aegypti larvae”**

ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO “Chemosphere” (Impacto 3.054)

ARTICLE IN PRESS

Chemosphere xxx (2009) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphereEffect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae

Julienne S. Coelho^a, Nataly D.L. Santos^a, Thiago H. Napoleão^a, Francis S. Gomes^a, Rodrigo S. Ferreira^a,
Russolina B. Zingali^b, Luana C.B.B. Coelho^a, Sônia P. Leite^c, Daniela M.A.F. Navarro^d, Patrícia M.G. Paiva^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil

^b Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 January 2009

Received in revised form 10 August 2009

Accepted 15 August 2009

Available online xxx

Keywords:

Aedes aegypti

Larvicidal activity

Mass spectrometry

Moringa oleifera

Morphology

ABSTRACT

Aedes aegypti larvae have developed tolerance to many insecticides used for mosquito control. *Moringa oleifera* seeds contain a water-soluble lectin (WSMoL) and this paper reports the effect of *M. oleifera* seed extracts (MoE_{1–15}) and WSMoL on development and survival of *A. aegypti* larvae. WSMoL peptide from in-gel trypsin digestion is also described. MoE_{1–15} showed hemagglutinating activity and WSMoL had similarity with flocculating proteins from *M. oleifera* seeds. MoE₁ and MoE₃ delayed larval development which stopped in the third instar (L3) in MoE₆ and MoE₁₅. Significant ($p < 0.0001$) larval mortality was only detected in MoE₁₅. Native WSMoL showed larvicidal activity (LC₅₀ 0.197 mg mL⁻¹) and heated lectin, without hemagglutinating activity, did not kill fourth instar (L4) larvae. Optical microscopy showed that live L4 from MoE₃ presented underlying epithelium, increased gut lumen and hypertrophic segments; dead L4 from WSMoL were absent of underlying epithelium, had increased gut lumen and hypertrophic segments. The presence of hemagglutinating activity in the extracts suggests that soluble lectin promotes the delay of larval development and mortality; furthermore, the absence of larvicidal activity in heat-denatured WSMoL strengthens the involvement of lectin in this activity mechanism.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The incidence of classical and hemorrhagic dengue fever in 2007 registered by the Brazilian Federal Organ was 559 954 cases, with 158 deaths (<http://portal.saude.gov.br>) in the country. The distribution and abundance of the dengue vector *Aedes aegypti* is strongly influenced by the human presence and level of population living in or below poverty line (Forattini et al., 1993). A dengue vaccine is still under development and vector control is the only practical measure towards the reduction of dengue disease. The organophosphate Temephos is widely used in Brazil to control *A. aegypti* Linnaeus, a mosquito that promotes the spreading of four serotypes of dengue virus. However, a decrease in its effectiveness has been described due to larval tolerance (Poupardin et al., 2008). The search for environmental safety and biodegradability stimulate the evaluation of bioinsecticides against the mosquito. The toxin Bti from Gram-positive bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* has plant lectin-like domain that binds to carbohydrate and larvicidal activity (LC₅₀ of 0.26 mg L⁻¹) on *A. aegypti* (Boonserm et al., 2006; Araújo et al., 2007). Plants have been evaluated as sources

of natural insecticides against *A. aegypti*, and larvicidal bioassays have been conducted using third (L3) and fourth (L4) instars or comparing the effect of plant extracts on larval development of L1–L4 (Luna et al., 2005; Kiran et al., 2006; Murugan et al., 2007). Saponins and essential oils with larvicidal, repellent, or oviposition deterrent effects on *A. aegypti* have been described (Murugan et al., 2007; Chapagain et al., 2008; Coria et al., 2008; Silva et al., 2008). Ferreira et al. (2009) reported larvicidal activity (LC₅₀ of 1260 µg mL⁻¹) on *A. aegypti* L3 of seed extract from *Moringa oleifera* Lamarck and also demonstrated the low toxicity of extract on *Daphnia magna*, *Mus musculus* and *Rattus norvegicus*.

Plant lectins, hemagglutinating proteins that contain carbohydrate-binding sites able to interact with free saccharides or carbohydrate moiety in glycoconjugates, with entomotoxic activity on Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, and Isoptera have already been reported (Kaur et al., 2006; Macedo et al., 2007; Sã et al., 2008). According to Sauvion et al. (2004), binding of insecticide lectin concanavalin A to glycosylated receptors at the surface of stomach epithelial cells of *Acyrtosiphon pisum* nymphs induced epithelial cell distention, enlargement, and shedding in the midgut region. Bark and heartwood lectins from *Myracrodruon urundeuva* showed larvicidal activity on *A. aegypti* L4 with LC₅₀ values of 0.125 and 0.04 mg mL⁻¹, respectively; it was suggested that lectin binding

* Corresponding author. Tel.: +55 8121268540; fax: +55 8121268576.
E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br (P.M.G. Paiva).

ARTICLE IN PRESS

2

J.S. Coelho et al. / Chemosphere xxx (2009) xxx–xxx

to larvae peritrophic matrix was involved in the larvicidal activity (Sá et al., 2009).

The peritrophic matrix of insects is constituted by proteins, glycoproteins, proteoglycans, and chitin (Miller and Lehane, 1993), and its integrity is important for digestive processes as well as for protection against invasion by microorganisms and parasites (Tellam et al., 1999). It has been demonstrated that insect gut is the target of many insecticidal compounds. Transmission electron microscopy of *A. aegypti* larvae treated with an aqueous extract of *Derris urucu* showed histological alterations in the midgut, and larval mortality was associated with peritrophic matrix damage (Gusmão et al., 2002). Recently, it has been demonstrated that inhibition of chitin synthesis by the insect growth regulator Lufenuron promoted mortality of *A. aegypti* larvae; thus, their use was suggested to control the mosquito population (Moreira et al., 2007).

Seeds of *M. oleifera* contain coagulant proteins (Gassenschmidt et al., 1995) and are used for water turbidity removal in northeastern Brazilian regions of difficult access to potable water. Santos et al. (2005) detected a water-soluble lectin (WSMoL) in water obtained after soaking intact *M. oleifera* seeds and, recently, the isolation of lectins MoL (Katre et al., 2008) and cMoL (Santos et al., 2009) have been described. The high water solubility of WSMoL stimulated the evaluation of insecticide activity of *M. oleifera* seeds on *A. aegypti*. The purpose of this study was to investigate the activity of *M. oleifera* seed extracts and WSMoL on *A. aegypti* larval development and mortality.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

M. oleifera belongs to the Family Moringaceae and some of its vernacular names are “moringa” in Portuguese, “árbol del ben” in Spanish, and horseradish tree in English. Seeds were collected in Recife City, State of Pernambuco, northeastern Brazil, and stored at -20°C . A sample of the collected material is archived as voucher specimen number 73 345, IPA, at the herbarium “Dárdano de Andrade Lima” (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Brazil).

2.2. *M. oleifera* extracts

Macerated shelled seeds (one, three, six, or 15) were added to distilled water (1 L) and agitated for 5 min. To each water/moringa mixture an additional 1 L distilled water was added; after agitation (6 min) and rest (15 min), the supernatants (extract) from each mixture were collected and named MoE₁, MoE₃, MoE₆, and MoE₁₅. The numeric index corresponded to the number of seeds used in the extraction step.

2.3. Isolation of WSMoL and mass spectrometry analysis

Seeds were milled to a fine powder. The powder (10 g) was homogenized in 100 mL of distilled water with the aid of a magnetic stirrer (16 h at 4°C), filtered through gauze, and centrifuged at 3000g (15 min). The supernatant was then submitted to ammonium sulphate fractionation (saturation of 60%) and the precipitated protein (0–60 fraction) was collected by centrifugation (Green and Hughes, 1955). The 0–60 fraction was dissolved in 0.15 M NaCl and after dialysis (3.5 kDa cut-off membrane) against 0.15 M NaCl (6 h at 4°C) was applied (80 mg of proteins) onto a chitin column (18 $\times$ 1.5 cm) equilibrated (0.3 mL/min flow rate) with 0.15 M NaCl. After washing with the equilibrating solution (90 mL), WSMoL was recovered by elution with 1.0 M acetic acid (80 mL) and dialysed (3.5 kDa cut-off membrane) against distilled

water (4 h) and 0.15 M NaCl (4 h) at 4°C for eluent elimination and evaluated for protein content and hemagglutinating activity.

WSMoL reduced with 10 mM dithiothreitol was submitted to electrophoresis on 17.5% SDS–polyacrylamide gels as described by Laemmli (1970). The gel spot was cut and washed three times with 25 mM ammonium bicarbonate/acetonitrile 1:1 (v/v). Then it was covered with 100% acetonitrile, which was removed after a few seconds and replaced by 10 mM dithiothreitol in 25 mM ammonium bicarbonate for 45 min at 56°C . It was then incubated with 55 mM iodoacetamide in 25 mM ammonium bicarbonate for 45 min at 25°C in the dark. A digestion buffer containing 10 mg mL^{-1} trypsin in 25 mM ammonium bicarbonate was added to the gel, incubated for 45 min, and then washed in 50 mM ammonium bicarbonate without trypsin. The samples were incubated at 37°C overnight and the remaining supernatant was removed. The peptides were extracted from the gel pieces by incubation in 5% trifluoroacetic acid/acetonitrile 1:1 (v/v) for 30 min, when the remaining supernatant was removed and stored. The extraction step was repeated twice and all fractions were pooled and lyophilized to a final volume of 10 μL . The peptides were analyzed by MALDI-TOF/TOF. Extracted peptide (0.5 μL) was mixed with 0.5 μL of matrix solution (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 0.1% trifluoroacetic acid and 50% acetonitrile) and spotted on stainless steel MALDI sample plates. The spectrum of peptides were performed by MASCOT ions search program databases (<http://www.matrixscience.com>). The parameter used in the search was NCBI nr database.

2.4. Protein content

The protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin ($31\text{--}500\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) as standard.

2.5. Hemagglutinating activity

Hemagglutinating activity was assessed in microtiter plates (Kartell S.P.A., Italy) according to Paiva and Coelho (1992) using suspension (2.5% v/v) of rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde (Bing et al., 1967). Hemagglutinating activity (titer), the reciprocal of the highest dilution of the sample promoting full agglutination of erythrocytes, was defined as one hemagglutination unit (Chumkhunthod et al., 2006). Specific hemagglutinating activity was defined as the ratio between the titer and protein concentration (unit mg^{-1}).

2.6. Bioassays with *A. aegypti*

A. aegypti L., whose common name is dengue mosquito, belongs to the Arthropoda Phylum, Hexapoda Class, Diptera Order, and Culicidae Family. The effect of extracts (MoE_{1–15}) on the larval development of *A. aegypti* was assayed as recommended by the World Health Organization (1996). Eggs of *A. aegypti* were hatched in distilled water at $25\text{--}27^{\circ}\text{C}$.

Five first instar larvae (L1) were placed into disposable plastic cups containing the extracts (20 mL) or distilled water (20 mL) and incubation was performed for 24, 48, and 72 h at 27°C . Larvae were fed daily with cat food (Whiskas®). The larval development and mortality were observed at the start of the experiment (T_0) and 24, 48, and 72 h thereafter. 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. The aspects observed were color of the anterior region (head) and length of larvae (L1: $0.11\text{ cm} \pm 0.02$; L2: $0.39\text{ cm} \pm 0.02$; L3: $0.47\text{ cm} \pm 0.04$; L4: $0.63\text{ cm} \pm 0.03$). The number of dead larvae in each sample was counted to evaluate the mortality rate.

ARTICLE IN PRESS

J.S. Coelho et al. / Chemosphere xxx (2009) xxx–xxx

3

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, 1996). Six independent experiments were run in quadruplicate.

Larvicidal activity was determined using an adaptation of the World Health Organization (1981) method described by Navarro et al. (2003). Groups of 25 L4 were exposed to 0.15 M NaCl (control), 0.170–0.230 mg mL⁻¹ WSMoL, and 0.197 mg mL⁻¹ WSMoL without hemagglutinating activity after heating (100 °C for 5 h plus overnight incubation at 37 °C). The final volume of each assay was 20 mL. Mortality rate (%) was determined after 24 h of incubation at 27 ± 2 °C and 12–12 (light–dark) photoperiod. Three independent experiments were run in triplicate.

2.7. Optical microscopy analysis

Twenty live larvae (L4) from the control and MoE₁ (72 h of incubation) treatment groups or ten dead larvae from the 0.197 mg mL⁻¹ WSMoL (24 h of incubation) treatment group were successively fixed with alcohol and xylol in different concentrations (70–100%) for 1 h at 27 °C and mounted on glass slides with entellan. The larvae were observed with the inverted microscope Leica DM IL, and details (gut lumen, gut content, segments, and presence or absence of underlying epithelium) were photographed with a Leica DFC 280 camera. Leica system software was employed to display the image on the monitor.

2.8. Statistical analysis

Data from larval development assay were analyzed with a Fisher's exact test (SPSS 11.5 for Windows®) to determine significant differences ($p < 0.05$) among treatments. The data of mortality rate were analyzed using the Chi-square test (SPSS 11.5 for Windows®) to determine significant differences ($p < 0.0001$) among treatments.

Software StatPlus® 2006 (AnalystSoft, Canada) was used for statistical analysis of data from WSMoL larvicidal assay. The lethal protein concentrations required to kill 16% (LC₁₆), 50% (LC₅₀), and 84% (LC₈₄) of larvae in 24 h was calculated by probit analysis with a reliability interval of 95%.

3. Results and discussion

The high WSMoL solubility in water stimulated the investigation of the lectin effect on the water biological cycle of *A. aegypti*. Protein was not detected in seed extract MoE₁; however, MoE₃, MoE₆, and MoE₁₅ contained protein with hemagglutinating activity; the highest protein concentration (MoE₆ and MoE₁₅) showed the highest activity (Table 1).

WSMoL (3.4 mg of protein) was isolated through chromatography on chitin column with specific hemagglutinating activity higher than MoE₃, MoE₆, and MoE₁₅ (Table 1); the lectin revealed a single peptide band on SDS–PAGE. MALDI–TOF/TOF analysis was performed to search peptide sequence from WSMoL after in-gel

trypsin digestion. The sequence of peptide mass (2130.10) was QAVQLTHQQGQVGPQQVR, which compared with known sequences in the NCBI database showed significant (score 70%) similarity with M02.1 and M02.2 (identification number gi|127215) proteins from *M. oleifera* seeds (Gassenschmidt et al., 1995). Ghebremichael et al. (2005) isolated from *M. oleifera* seeds a coagulant protein fraction that consisted of a protein mixture. These authors searched

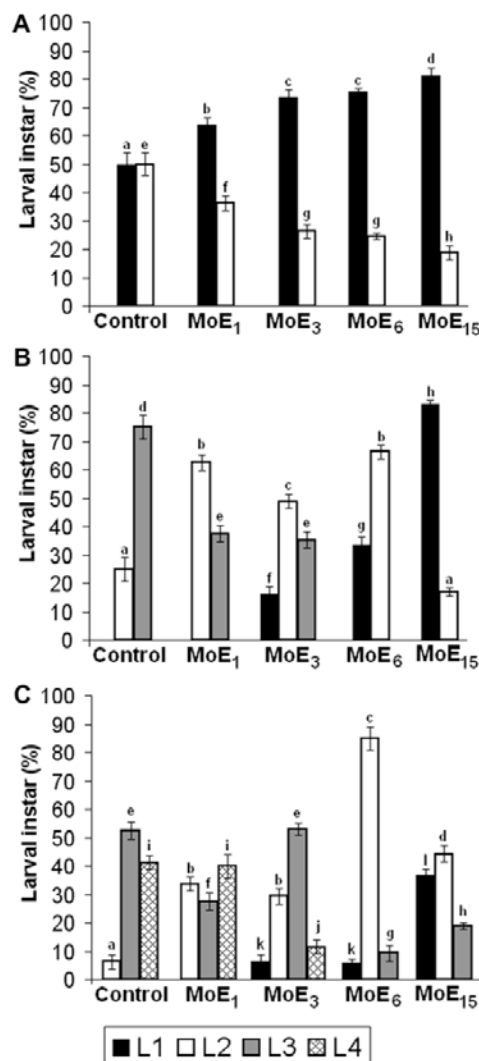


Fig. 1. Larval instar (%) at 24 (A), 48 (B), and 72 h (C) in control distilled water and *M. oleifera* seed extracts MoE₁, MoE₃, MoE₆, and MoE₁₅. The bars are the mean ± S.D. Data were analyzed with a Fisher's exact test (SPSS 11.5 for Windows®) to determine significant differences ($p < 0.05$) among treatments. The different letters indicate significant differences between treatments.

Table 1
Characterization of *M. oleifera* seed extracts and WSMoL.

Sample	Number of seeds	Protein (mg mL ⁻¹)	Titer ⁻¹	Specific hemagglutinating activity
MoE ₁	1	ND	8	–
MoE ₃	3	0.08	8	100
MoE ₆	6	0.17	16	94.1
MoE ₁₅	15	0.5	64	128
WSMoL	–	0.197	512	2598

Titer was defined as the lowest lectin concentration able to produce visible hemagglutination. Specific hemagglutinating activity was calculated from the ratio between titer and protein concentration (mg mL⁻¹). ND, not detected.

ARTICLE IN PRESS

4

J.S. Coelho et al. / Chemosphere xxx (2009) xxx–xxx

Table 2

Larvicidal activity of WSMoL on *A. aegypti* fourth-stage larvae.

Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mortality (%) ^a	Probits
180	35.0	4.6151
190	45.0	4.8746
200	52.5	5.0632
210	60.0	5.2529
220	68.0	5.4673
230	80.0	5.8415

Curve of probit analysis calculated using Statplus® 2006 software with a significance level of 95% was $Y = 0.0229x + 0.4847$ (Y = probit value and X = concentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$).

^a Mean of three independent experiments run in triplicate.

five peptide sequences when peptides from in-gel trypsin digestions of SDS–PAGE samples were analyzed by mass spectrometry. One of them (2130.28 peptide mass) was identical to M02.1 and M02.2 sequences, and three (2087.09, 2100.18, 2122.12 peptide masses) were very similar, changing only one or two amino acid residues.

Fig. 1 shows larvae instars in MoE₁, MoE₃, MoE₆, MoE₁₅, or distilled water (control) at 24, 48, and 72 h. After incubation for 24 h, the lowest number of L1 was already detected in the control and L2 was found in all treatment groups (Fig. 1A). L1 and L3 were the main larval instars, respectively, in MoE₁₅ and the control at 48 h (Fig. 1B). L4 was detected in the control, MoE₁, and MoE₃ at 72 h (Fig. 1C). The data shows that extracts with the lowest hemagglutinating activity (MoE₁ and MoE₃) delayed the *A. aegypti* larval development, and development was stopped in the third instar in MoE₆ and MoE₁₅. The data therefore showed that a correlation existed between hemagglutinating activity and promoted effect as well as that MoE₆ and MoE₁₅ prolonged mainly the first two stages of development (L1 and L2). The correlation between larval stage and sensitivity to the active principle was also reported by Murugan et al. (2007), who identified plant extracts with more activity on *A. aegypti* L1.

Larvae mortality (45%) was significant ($p < 0.0001$) only in MoE₁₅, and this mortality rate was found to be higher than that determined for ethanolic extract from *Schinus terebinthifolius* stem (35%) and lower than the *Annona glabra* roots extract (100%) on *A. aegypti* (Mendonça et al., 2005). Ferreira et al. (2009) showed that larvicidal activity of water extract of *M. oleifera* seeds on *A. aegypti* L3 was lost after being heated to 80 °C for 10 min; the authors suggested that protein might be involved in the larvicidal activity.

Larvicidal assay of WSMoL revealed that 0.230 mg mL⁻¹ was more efficient than the all-lowest concentrations tested (Table 2). The values of LC₁₆, LC₅₀, and LC₈₄ were 0.153, 0.197, and 0.240 mg mL⁻¹, respectively. WSMoL was less efficient in promot-

ing larval mortality than chitin-binding lectins isolated from bark (LC₅₀ of 0.125 mg mL⁻¹) and heartwood (LC₅₀ of 0.04 mg mL⁻¹) of *M. urundeuva* (Sá et al., 2009). It is possible that WSMoL interacts differently with *A. aegypti* cells although it has carbohydrate specificity similar to *M. urundeuva* lectins. Similarly, Macedo et al. (2002, 2003, 2007) reported that chitin-binding proteins from *Bauhinia monandra*, *Koeleria paniculata*, and *Talisia esculenta* showed different values of lethal dose (LD₅₀) on *Callosobruchus maculatus*. Binding of N-acetyl-D-galactosamine-specific lectins to distinct cell surface receptors of human peripheral blood lymphocytes was also described (Munske et al., 1981).

Heated WSMoL did not show hemagglutinating or larvicidal activities. High temperature is a powerful denaturing agent leading to protein unfolding through breaking of hydrogen bonds that maintain protein structure (Daggett and Levitt, 1992). Absence of hemagglutinating activity indicated that WSMoL lost the ability to bind carbohydrate; undetected larvicidal activity suggests that WSMoL native structure was required for larval mortality. Boonserm et al. (2006) demonstrated the importance of interaction between Bti and glycoprotein receptor at the target insect membrane for *A. aegypti* mortality when significant loss of toxicity was detected after mutation in the domain that binds carbohydrate moiety.

Live L4 from the control (Fig. 2A) and MoE₁ (Fig. 2B) treatment groups where L4 were detected in similar amounts after 72 h (Fig. 1C) were evaluated using inverted optical microscope. L4 from MoE₁ showed increased gut lumen, segments with hypertrophic aspects, and absence of lumen gut content in comparison with L4 from the control. Microscopy analyses were also made with dead L4 from 0.197 mg mL⁻¹ WSMoL (Fig. 2C); morphological changes revealed increased gut lumen, segments with hypertrophic aspects, and no visualization of underlying epithelium.

The mechanism of insecticide action of plant lectins is not fully understood but it has been suggested that it may be due to inhibition of digestive glycosylated enzymes, binding to glycosylated receptors at the stomach epithelial cell surface and binding to the peritrophic matrix (Fitches and Gatehouse, 1998; Harper et al., 1998; Sauvion et al., 2004; Macedo et al., 2007). The peritrophic matrix separates the contents of gut lumen from digestive epithelial cells and is composed of proteins and glycosaminoglycans embedded in a chitinous matrix (Tellam et al., 1999). The absence of underlying epithelium in dead L4 from WSMoL treatment may indicate that lectin larvicidal activity was probably due to damage in the *A. aegypti* midgut. Additional research is currently being conducted in our laboratory to identify WSMoL receptors. In fact, it has been demonstrated that chitin-binding lectins interfere with the integrity of the peritrophic matrix (Macedo et al., 2007), which is important for larval development and mortality in *A. aegypti* (Gusmão et al., 2002).

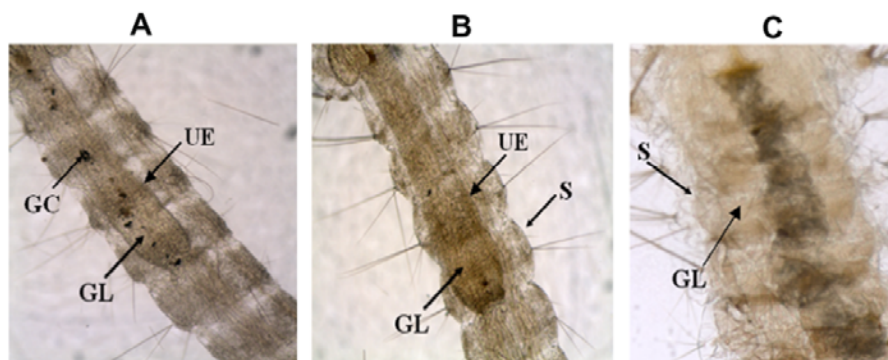


Fig. 2. *A. aegypti* photomicrography (100 $\times$) of anterior midgut from live (control distilled water, A, and MoE₁, B, after 72 h of incubation) and dead L4 (C) in WSMoL (0.197 mg mL⁻¹). GC, gut content; GL, gut lumen; UE, underlying epithelium; S, segments.

ARTICLE IN PRESS

J.S. Coelho et al. / Chemosphere xxx (2009) xxx–xxx

5

The high water solubility of WSMoL may indicate that the lectin is an environmentally safe compound for dengue control acting on aquatic immature forms. The effect of WSMoL on *A. aegypti* oviposition is already being evaluated in our laboratory to determine the efficiency of lectin as insecticide by reduction in egg deposition.

4. Conclusions

The *A. aegypti* bioassays were made during the phagoperiod of the biological cycle; the delay of larval development and larvicidal activity were due to ingestion of WSMoL. The ability of lectin to bind chitin, and the absence of underlying epithelium in dead L4 treated with WSMoL is a sign that chitinous structures at the peritrophic matrix and/or receptors at epithelial cells present in *A. aegypti* midgut were the WSMoL targets.

Acknowledgements

The authors are deeply grateful to the technical assistance of Mr. André Aires, Ms. Clécia Sipriano Borges da Silva, and Mrs. Maria Barbosa Reis da Silva. We thank Glenn Hawes for English editing. This work was supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE).

References

- Araújo, A.P., Melo-Santos, M.A.V., Carlos, S.O., Rios, E.M.M.M., Regis, L., 2007. Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar *Israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *Biol. Control* 41, 339–347.
- 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.
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C., Lescar, J., 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Ångström resolution. *J. Bacteriol.* 188, 3391–3401.
- Chapagain, B.P., Saharan, V., Wiesman, Z., 2008. Larvicidal activity of saponins from *Balanites aegyptiaca* callus against *Aedes aegypti* mosquito. *Bioresour. Technol.* 99, 1165–1168.
- Chumkhunthod, P., Rodtong, S., Lambert, S.J., Fordham-Skelton, A.P., Rizkallah, P.J., Wilkinson, M.C., Reynolds, C.D., 2006. Purification and characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 326–332.
- 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.
- Daggett, V., Levitt, M., 1992. Molecular dynamics simulations of helix denaturation. *J. Mol. Biol.* 223, 1121–1138.
- Ferreira, P.M.P., Carvalho, A.F.U., Farias, D.F., Cariolano, N.G., Melo, V.M.M., Queiroz, M.G.R., Martins, A.M.C., Machado-Neto, J.G., 2009. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. *Anais Acad. Brasil. Ciênc.* 81, 207–216.
- Fitches, E., Gatehouse, J.A., 1998. A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). *J. Insect Physiol.* 44, 1213–1224.
- Forattini, O.P., Kakitani, I., Massad, E., Marucci, D., 1993. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 4-Survey of resting adult and synanthropic behaviour in Southeastern, Brazil. *Rev. Saúde Pública* 27, 398–411.
- Gassenschmidt, U., Jany, K.D., Tauscher, B., Nierbergall, H., 1995. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. *Biochim. Biophys. Acta* 1243, 477–481.
- Ghebremichael, K.A., Gunaratna, K.R., Henriksson, H., Brumer, H., Dalhammar, G., 2005. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water Res.* 39, 2338–2344.
- 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.
- Gusmão, D.S., Páscoa, V., Mathias, L., Vieira, J.C., Braz-Filho, R., Lemos, F.J.A., 2002. *Derris* (*Lonchocarpus*) *urucu* (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 371–375.
- Harper, M.S., Hopkins, T.L., Czaplá, T.H., 1998. Effect of wheat germ agglutinin on formation and structure of the peritrophic membrane in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) larvae. *Tissue Cell* 30, 166–176.
- Katre, U.V., Suresh, C.G., Khan, M.I., Gaikwad, S.M., 2008. Structure-activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. *Int. J. Biol. Macromol.* 42, 203–207.
- Kaur, M., Singh, K., Rup, P.J., Saxena, A.K., Khan, R.H., Ashraf, M.T., Kamboj, S.S., Singh, J., 2006. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell. *Arch. Biochem. Biophys.* 445, 156–165.
- Kiran, S.R., Bavhani, K., Devi, P.S., Rao, B.R.R., Reddy, K.J., 2006. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Bioresour. Technol.* 97, 2481–2484.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- 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.
- Luna, J.S., Santos, A.F., Lima, M.R.F., Omena, M.C., Mendonça, F.A.C., Bieber, L.W., Sant'Ana, A.E.G., 2005. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 97, 199–206.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Novello, J.C., Marangoni, S., 2002. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochim. Biophys. Acta* 1571, 83–88.
- Macedo, M.L.R., Damico, D.C.S., Freire, M.G.M., Toyama, M.H., Marangoni, S., Novello, J.C., 2003. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from *Koelerutera paniculata* seeds and its effect on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Agric. Food Chem.* 51, 2980–2986.
- 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.
- Mendonça, F.A.C., Silva, K.F.S., Santos, K.K., Junior, K.A.L.R., Sant'Ana, A.E.G., 2005. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* 76, 629–636.
- Miller, N., Lehane, M.J., 1993. Peritrophic membranes, cell surface molecules and parasite tropisms within arthropod vectors. *Parasitol. Today* 9, 45–50.
- Moreira, M.F., Santos, A.S., Marotta, H.R., Mansur, J.F., Ramos, I.B., Machado, E.A., Souza, G.H.M.F., Eberlin, M.N., Kaiser, C.R., Kramer, K.J., Muthukrishnan, S., Vasconcellos, A.M.H., 2007. A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1249–1261.
- Munske, G.R., Pandolfino, E.R., Magnuson, J.A., 1981. A comparison of the interactions of the mitogenic and nonmitogenic lima bean lectins with human lymphocytes. *J. Immunol.* 127, 607–1610.
- Murugan, K., Murugan, P., Noortheen, A., 2007. Larvicidal and repellent potential of *Albizia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta: Culicidae). *Bioresour. Technol.* 98, 198–201.
- 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 (camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36, 113–118.
- Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J., David, J.P., 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 540–551.
- Sá, R.A., Napoleão, T.H., Santos, N.D.L., Gomes, F.S., Albuquerque, A.C., Xavier, H.S., Coelho, L.C.B.B., Bieber, L.W., Paiva, P.M.G., 2008. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. *Int. Biodeter. Biodegr.* 62, 460–464.
- 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.
- Sauvion, N., Nardonn, G., Febvay, G., Gatehouse, A.M.R., Rahbé, Y., 2004. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. *J. Insect Physiol.* 50, 1137–1150.
- Silva, W.J., Dória, G.A.A., Maia, R.T., Nunes, R.S., Carvalho, G.A., Blank, A.F., Alves, P.B., Marçal, R.M., Cavalcanti, S.C.H., 2008. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresour. Technol.* 99, 3251–3255.
- Tellam, R.L., Wijffels, G., Wiladsen, P., 1999. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 87–101.
- World Health Organization, 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC/81.807, pp. 1–6.
- World Health Organization, 1996. Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides. CTD/WHOPES/IC/96.1, p. 69.

6. CONCLUSÃO

O atraso no desenvolvimento larval e a atividade larvicidal detectada foi provavelmente devida a ingestão de WSMoL, desde que os bioensaios foram realizados durante a fase do ciclo biológico em que as larvas se alimentam. Os resultados indicam WSMoL como um composto natural para controle da dengue atuando sobre os estágios larvais de *A. aegypti*.

A capacidade de WSMoL ligar quitina e a ausência da camada epitelial que limita o trato digestivo nas L4 mortas tratadas com a lectina pode indicar que a quitina, constituinte da matriz peritrófica, e/ou receptores na superfície das células epiteliais presentes no intestino de *A. aegypti* são os alvos de WSMoL.