

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE OVICIDA DE LECTINAS LIGADORAS
DE QUITINA CONTRA *Aedes aegypti***

ROBSON RAION DE VASCONCELOS ALVES

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
COORIENTADOR: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão**

**RECIFE
2018**

ROBSON RAION DE VASCONCELOS ALVES

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE OVICIDA DE LECTINAS LIGADORAS
DE QUITINA CONTRA *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas para o cumprimento das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

**RECIFE
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Alves, Robson Raion de Vasconcelos

Avaliação de atividade ovocida de lectinas ligadoras de quitina contra *Aedes aegypti*/ Robson Raion de Vasconcelos Alves- 2018.

56 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador: Thiago Henrique Napoleão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Lectinas 2. *Moringa oleifera* 3. *Aedes aegypti* I. Paiva, Patrícia Maria Guedes (orient.) II. Napoleão, Thiago Henrique (coorient.) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-150

ROBSON RAION DE VASCONCELOS ALVES

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE OVICIDA DE LECTINAS LIGADORAS
DE QUITINA CONTRA *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas para o cumprimento das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA:

Aprovado em 26 / 02 / 2018

PROF^a DRA. PATRICIA MARIA GUEDES PAIVA (ORIENTADORA)
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
MEMBRO INTERNO - PRESIDENTE

PROF DR. THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
MEMBRO INTERNO

DRA. TATIANA SOARES
CENTRO DE TECNOLOGIAS ESTRATÉGICAS DO NORDESTE - CETENE
MEMBRO EXTERNO

À minha querida família. A vocês dedico não só este trabalho, mas todos os meus princípios.

AGRADECIMENTOS

Nasci! Forma um tanto estranha de se começar um texto e mais estranha ainda de se iniciar um agradecimento, você não acha? Mas é exatamente isso que eu tenho a agradecer. Calma! Não sou daqueles que se exaltam e acabam se tornando narcisistas nada humildes (Não, eu não sou assim!). Essa é uma dissertação “normal”, de um “cara normal”, com sonhos nada normais em um mundo inusitado. Já imaginou o que é sintetizar agradecimentos de vinte e seis anos em pouco mais de uma lauda e meia? Espero não esquecer ninguém.

Quero agradecer, primeiramente, a Deus pela saúde, esperança, felicidade, paciência (muita paciência mesmo) e força de vontade para conquistar tudo o que busquei (com êxito ou não), bem como os auxílios nos momentos bons e difíceis. Primeiramente, ainda, agradeço aos meus pais, Seu Ronnie Raion e Dona Lenilda pelas primeiras palavras, pelo primeiro e verdadeiro amor, pela criação e educação, os ensinamentos de vida, pela ajuda nas escolhas, pelas conversas e conselhos, pela amizade, pelo carinho e até os puxões de orelha, a voz exaltada e os castigos, pois sei que isso contribuiu e contribui para o que eu sou hoje. Muito obrigado por terem acreditado que valeria a pena investir em meus sonhos. Agradeço também aos meus irmãos, Rose Llayanne e Liedson Lamon, pois sem eles para aturar esse “Binho chato” eu não conseguiria chegar aonde cheguei. Agradeço a toda minha família. Eu não sei o que seria de mim sem vocês. ESSA CONQUISTA É NOSSA!

Grande Professora Dra Patrícia Maria Guedes Paiva, nome de peso no vastíssimo mundo da bioquímica, você não faz ideia de como sou grato pelos seus ensinamentos, pelos acompanhamentos e orientações. Sem suas sábias palavras e seus conhecimentos o desenrolar deste trabalho não haveria de se concluir. À Senhora, deixo muito mais do que um simples obrigado, deixo a minha mão amiga sempre estendida, a minha admiração, e um parágrafo só seu, é claro!

Desenvolver um projeto não é tarefa nada fácil. É necessário tempo para pensar, ler, escrever, ler um pouco mais, corrigir o que você escreveu e escrever mais ainda e isso requer paciência (lembra que agradeci a Deus no comecinho?). Meu Muitíssimo obrigado ao Professor Dr Thiago Napoleão (O cara!) que sempre se dispôs a me ensinar e tirar todas as dúvidas (não foram poucas) que surgiram durante a execução deste trabalho. Sou seu fã!

Aos meus amigos: Kleyton, François, Luiz, Pablo, Cássio, Gabi e Vanessinha que de alguma forma aturaram minhas “conversas acadêmicas” sobre purificação de lectinas, vocês têm um lugar guardado no meu coração (risos).

Aos amigos que conquistei na vida de mestrando ou pela cidade que decidi morar, não pensem que me esqueci de vocês; Obrigado ao BIOPROT, local onde fui bem acolhido, em especial a Carlos Bob, Poli, Caio, Livia, Zé Davi (Dayvid), Suellen, Yasmin, Bruninha, Danilo, Berna, Poly, Jainaldo Jajá, Stellinha, Benny, Alcides, Cláudio e Bia que me acompanharam por todos os dias nesses dois anos: vocês são “show”! Aos meus alunos de iniciação científica: Ricardo, Bárbara e Marcele - obrigado por me ajudarem nessa dura tarefa e por confiarem em mim... ♥

Agradeço a todos que fazem parte do Departamento de Bioquímica e Coordenação do PPGCB: Seu João, Alex, Dona Helena, Miron, Adenilda (lindona), Marcelo e a todos os professores do programa e a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação. Obrigado!

Agradeço ao CETENE, em especial a Dra Tatiana Soares, por todo apoio científico para a realização deste trabalho.

A todas as agências de fomento, em especial à FACEPE, pelo financiamento indispensável à realização desse projeto de mestrado. Obrigado!

No mais para o momento, encerro aqui as minhas palavras agradecendo a quem se dispôs a ganhar, perdendo alguns minutos do seu importantíssimo tempo.

Muito Obrigado!

*“Não te aflijas com a pétala que voa:
também é ser, deixar de ser assim.
Rosas verá, só de cinzas franzidas,
mortas, intactas pelo teu jardim.
Eu deixo aroma até nos meus espinhos
ao longe, o vento vai falando de mim.
E por perder-me é que vão me lembrando,
por desfolhar-me é que não tenho fim”.*

Cecília Meireles

RESUMO

As lectinas, proteínas de ligação a carboidratos, isoladas a partir de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL), bem como da entrecasca (MuBL), cerne (MuHL) e folha (MuLL) de *Myracrodruon urundeuva* são agentes larvicidas contra *Aedes aegypti*. WSMoL também foi relatada como agente ovicida contra este mosquito e a sua concentração necessária para reduzir a taxa de eclosão em 50% (EC_{50}) é de 0,1 mg/mL. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade ovicida de MuBL, MuHL e MuLL, bem como avaliar os locais de ligação de WSMoL e MuBL nos ovos de *A. aegypti*. As lectinas foram isoladas seguindo protocolos previamente estabelecidos que incluíram extração das proteínas da farinha (10 g) do tecido vegetal com 100 mL de água destilada (WSMoL) ou NaCl 0,15 M (MuHL, MuBL, MuLL), precipitação de proteínas com sulfato de amônio (0-60%, WSMoL; 20-40%, MuBL; 40-60%, MuHL; 60-80%, MuLL) e cromatografias em colunas de quitina equilibradas (0,6 mL/min) com NaCl 0,15 M e eluídas com ácido Acético 1,0 M. As lectinas isoladas foram dialisadas (6h em água destilada) para a eliminação do eluente. Os ovos em papel de filtro foram selecionados considerando a sua integridade utilizando um estereomicroscópio. Cada ensaio ovicida correspondeu a 20 mL de solução de lectina onde foram imersos 50 ovos. O número de larvas eclodidas foi determinado após 72 h de incubação a 25-27 °C e a EC_{50} foi determinada pela análise de probit. Os conjugados WSMoL-FITC e MuBL-FITC (na EC_{50}) foram utilizados para avaliar os locais de ligação das lectinas utilizando um microscópio de fluorescência. Os controles contendo apenas os ovos ou ovos incubados apenas com o FITC também foram realizados. MuBL, MuHL e MuLL foram agentes ovicidas e os valores de EC_{50} foram 0,26, 0,80 e 0,88 mg/mL, respectivamente. Com base nos melhores valores da EC_{50} , WSMoL e MuBL foram selecionados para análise de microscopia de fluorescência. Em comparação com os controles, as imagens revelaram a presença de WSMoL-FITC na cabeça, proventriculo e intestino de embriões. A marcação MuBL-FITC foi observada na cabeça e no trato digestivo. Em conclusão, as lectinas de *M. urundeuva* também são agentes ovicidas contra *A. aegypti* e a atividade ovicida de WSMoL e MuBL está ligada à penetração dessas proteínas no ovo e interação com o trato digestivo do embrião em desenvolvimento.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*. *Myracrodruon urundeuva*. Atividade insecticida. Mosquito da dengue. Microscopia de fluorescência.

ABSTRACT

Lectins, carbohydrate-binding proteins, isolated from seeds of *Moringa oleifera* (WSMoL) as well as bark (MuBL), heartwood (MuHL) and leaf (MuLL) of *Myracrodruon urundeuva* are larvicidal agents against *Aedes aegypti*. WSMoL was also reported as an ovicidal agent against this mosquito and the concentration of this lectin required to reduce the hatching rate in 50% (EC₅₀) is 0.1 mg/mL. This work aimed to evaluate the ovicidal activity of MuBL, MuHL and MuLL as well as to evaluate the binding sites of WSMoL and MuBL in the eggs. The lectins were isolated following previously established protocols which included extraction of proteins from tissue (10 g) plants with 100 mL of distilled water (WSMoL) or 0.15 M NaCl (MuHL, MuBL and MuLL), ammonium sulfate protein precipitation (0-60%, WSMoL; 20-40%, MuBL; 40-60%, MuHL; 60-80%, MuLL) and chromatography on chitin columns (0.6 mL/min) equilibrated with 0.15 M NaCl and eluted with 1.0 M acetic acid. The isolated lectins were dialyzed (6h in distilled water) for the removal of the eluent. Eggs on filter papers were selected by considering their integrity using a stereomicroscope. Each ovicidal assay corresponded to 20 mL of lectin solution in which were immersed 50 eggs. The number of hatched larvae was determined after 72 h of incubation at 25-27 °C and the EC₅₀ was determined by probit analysis. WSMoL-FITC and MuBL-FITC conjugates (at EC₅₀) were used to evaluate binding sites of the lectins using a fluorescence microscope. Controls contained only the eggs and eggs incubated only with FITC were performed. MuBL, MuHL and MuLL were ovicidal agents and the EC₅₀ values were 0.26, 0.80 and 0.88 mg/mL, respectively. Based on the best EC₅₀ values, WSMoL and MuBL were selected for fluorescence microscopy analysis. Compared with controls, the images revealed the presence of WSMoL-FITC in the head, proventriculus, and gut of embryos. MuBL-FITC labeling was observed in the head and digestive tract. In conclusion, *M. urundeuva* lectins are also ovicidal agents against *A. aegypti* and the ovicidal activity of WSMoL and MuBL is linked to penetration of these proteins in the egg and interaction of them with the digestive tract of the embryo in development.

Key words: *Moringa oleifera*. *Myracrodruon urundeuva*. Insecticidal activity. Dengue mosquito. Fluorescence microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .	19
Figura 2 - Formação das camadas dos ovos de <i>A. aegypti</i> após a postura em relação ao tempo e sua resistência à dissecação quando em comparação com ovos de mosquitos de outras espécies.	20
Figura 3 - Representação da atividade hemaglutinante de lectinas e inibição da aglutinação por carboidratos livres em solução.	22
Figura 4 - <i>Moringa oleifera</i> .	24
Figura 5 - <i>Myracrodruon urundeuva</i> .	27
Figura 6 - Estrutura molecular do isotiocianato de fluoroceína e sua reatividade com grupamentos tióis e aminas.	29

ARTIGO: CHITIN-BINDING LECTINS WITH OVICIDAL ACTIVITY ON *Aedes aegypti* BIND TO EMBRYO INTO THE EGGS

Figure 1 - Percentage of unhatched eggs after incubation with MuBL, MuHL and MuLL for 72h.	39
Figure 2 - Chromatography on Sephadex G-25 of WSMoL-FITC (A) and MuBL-FITC (B) conjugates. The fractions were monitored for absorbance at 280 nm (protein detection) and 495 nm (FITC detection).	40
Figure 3 - Fluorescence microscopy of <i>Aedes aegypti</i> eggs non-treated and incubated with FITC, WSMoL-FITC and MuBL-FITC for 24, 48 and 72 h.	41
Figure 4 - Fluorescence microscopy of <i>Aedes aegypti</i> eggs after clearing of the pigmented chorion with sodium hypochlorite. Non-treated eggs and eggs incubated with FITC, WSMoL-FITC and MuBL-FITC for 24, 48 and 72 h.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AHE	Atividade hemaglutinante específica
B16-F10	Células de melanoma murino
CD	Cluster de diferenciação
CHIKV	Arbovírus Chikungunya
CL₅₀	Concentração capaz de matar 50% da população
cMoL	Lectina coagulante de <i>Moringa oleifera</i>
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
DEAE	Dietilaminoetil
DENV-1, 2, 3, 4	Vírus Dengue (sorotipos)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC₅₀	Concentração capaz de impedir a eclosão em 50%
Fn	Glicoproteína fibronectina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
H9	Linhagem de células tronco embrionárias humanas
HepG2	Células de carcinoma hepatocelular
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
K_{em}	Constante de emissão
K_{ex}	Constante de excitação
K_i	Constante de inibição
L-1, 2, 3, 4	Estágio larval de <i>Aedes aegypti</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MCF7	Células isoladas de câncer mamário
MoL	Lectina de <i>Moringa oleifera</i>
MuBL	Lectina da entrecasca de <i>Myracrodruon urundeuva</i>
MuHL	Lectina do cerne de <i>Myracrodruon urundeuva</i>
MuLL	Lectina da folha de <i>Myracrodruon urundeuva</i>
MvFL	Lectina da folha de <i>Microgramma vacciniifolia</i>
MvRL	Lectina do rizoma de <i>Microgramma vacciniifolia</i>
NCI-H292	Células de carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano
PAGE	Técnica de separação de proteínas em gel de eletroforese de Poliacrilamida
PBMCs	Células monoclonais de sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
pKa	Constante de Dissociação ácida
RNA	Ácido ribonucleico

ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS-PAGE	Gel de eletroforese de Poliacrilamida com o detergente Dodecil sulfato de sódio
Th2	Límfócito T - Helper 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
WGA	Lectina aglutinina de gérmen de trigo
WSMoL	Lectina solúvel em água de sementes de <i>Moringa oleifera</i>
WSMoL_C	Lectina obtida da torta de sementes de <i>M. oleifera</i> após extração do óleo das sementes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 ARBOVIROSES E O <i>Aedes aegypti</i>	17
3.2 LECTINAS VEGETAIS.....	21
3.2.1 Lectinas de semente de <i>Moringa oleifera</i>	23
3.2.2 Lectinas de entrecasca, cerne e folha de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	26
3.3 APLICAÇÕES COM ISOTIOCIANATO DE FLUOROCEÍNA (FITC).....	28
4 ARTIGO: CHITIN-BINDING LECTINS WITH OVICIDAL ACTIVITY ON <i>Aedes aegypti</i> BIND TO EMBRYO INTO THE EGGS.....	30
5 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti*, pertencente à Ordem Diptera e à Família Culicidae, é considerado um dos vetores responsáveis pela transmissão do vírus da dengue, bem como dos vírus causadores da febre amarela, da febre Chikungunya e da febre Zika (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009; CALJON *et al.*, 2013; SALVADOR *et al.*, 2015). A disseminação do *A. aegypti* está associada ao crescimento desordenado das cidades e à falta de saneamento básico e habitação, favorecendo criadouros do mosquito (BRAGA; VALLE, 2007; GONZAGA *et al.*, 2016).

Os ovos de *A. aegypti* são elípticos e não ultrapassam 1,0 mm de comprimento. Após a postura, a membrana externa dos ovos, que é flexível e de cor clara, torna-se rígida e negra, o que protege da ação de patógenos e inseticidas, confere proteção mecânica e evita a perda excessiva de água pelo embrião nele contido. O revestimento dos ovos é formado por proteínas e quitina e permite trocas gasosas com o meio externo (FORATTINI, 2002; PEREIRA *et al.*, 2006; LI; LI, 2006; MOREIRA *et al.*, 2007; SUMAN *et al.*, 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o controle do mosquito é a estratégia no combate da dengue devido à indisponibilidade de vacinas para os sorotipos virais da doença, bem como para os vírus das febres Chikungunya e Zika. Segundo Zara e colaboradores (2016), não existem produtos químicos disponíveis no mercado com ação ovicida sobre *A. aegypti* para serem utilizados em campanhas de saúde pública. Adicionalmente, a população de *A. aegypti* tem adquirido resistência aos inseticidas químicos utilizados, sendo necessárias aplicações crescentes para o controle efetivo do mosquito, o que acarreta um aumento de risco de intoxicação para a população, animais e meio ambiente.

As plantas dispõem de mecanismos contra a ação de insetos fitopatógenos, como a capacidade de sintetizar metabólitos e proteínas que agem como toxinas e, portanto, são fontes de moléculas alternativas para controle de insetos (STANGARLIN *et al.*, 2011). Diversas proteínas de origem vegetal têm sido investigadas quanto à atividade inseticida contra *A. aegypti*, como as lectinas, proteínas que contêm pelo menos um domínio de ligação reversível a carboidratos (COELHO *et al.*, 2009).

Lectinas com atividade larvica contra *A. aegypti* foram isoladas do cerne (MuHL, do inglês *M. urundeuva heartwood lectin*), entrecasca (MuBL, do inglês *M. urundeuva bark lectin*) e folhas (MuLL, do inglês *M. urundeuva leaf lectin*) de *Myracrodruon urundeuva* (SÁ *et al.*, 2008; SÁ *et al.*, 2009; NAPOLEÃO *et al.*, 2012). No entanto, os efeitos das lectinas de *M. urundeuva* em ovos de *A. aegypti* ainda não foram determinados.

As sementes de *Moringa oleifera*, que são utilizadas no tratamento de água por sua ação coagulante (MORETI *et al.*, 2013; ARANTES *et al.*, 2015), contêm uma lectina ligadora de quitina denominada WSMoL (do inglês *water soluble Moringa oleifera lectin*) que possui atividade larvívora sobre larvas no quarto estágio (L4) de *A. aegypti* e ovívora contra ovos frescos e estocados desse inseto (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012). Os autores demonstraram que WSMoL foi capaz de impedir o desenvolvimento do embrião nos ovos frescos e matar o embrião já formado dentro dos ovos estocados, no entanto, pouco ainda se sabe sobre o mecanismo de ação ovívora de WSMoL contra *A. aegypti*.

Desta forma, o propósito deste trabalho foi investigar lectinas ligadoras de quitina isoladas de entrecasca, cerne e folhas de *Myracrodruon urundeuva* e de sementes de *Moringa oleifera* quanto à atividade ovívora contra *Aedes aegypti* e possíveis mecanismos de ação envolvidos na ação das lectinas mais eficientes

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar lectinas ligadoras de quitina isoladas de entrecasca, cerne e folhas de *Myracrodruon urundeuva* e de sementes de *Moringa oleifera* quanto à atividade ovicida contra *Aedes aegypti* e possíveis mecanismos de ação envolvidos na ação das lectinas mais eficientes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar as lectinas de sementes de *M. oleifera* (WSMoL), cerne, entrecasca e folhas de *Myracrodruon urundeuva* (MuHL, MuBL e MuLL, respectivamente) de acordo com procedimentos preestabelecidos;
- Determinar a atividade ovicida de MuHL, MuBL e MuLL sobre ovos estocados de *Aedes aegypti*;
- Conjugar WSMoL e MuBL ao marcador fluorescente Isotiocianato de Fluoresceína (FITC);
- Definir sítios de ligação das lectinas nos ovos de *A. aegypti* utilizando os conjugados lectina-FITC e microscopia de fluorescência.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ARBOVIROSES E O *Aedes aegypti*

Os mosquitos, dentre os insetos, constituem um grupo altamente diversificado e relevante na transmissão de diferentes patógenos causadores de doenças à saúde humana (CALJON *et al.*, 2013). O *Aedes aegypti* é o mosquito vetor de quatro das principais arboviroses que despertam interesse aos órgãos públicos de saúde: a febre Chikungunya, a febre amarela, a dengue e, mais recentemente, a febre Zika.

A febre Chikungunya é causada pelo vírus chikungunya (CHIKV), um vírus de RNA fita simples pertencente à família Togaviridae, gênero *Alphavirus*. A doença foi descrita pela primeira vez na Índia em 1824 e já foram relatadas epidemias em várias áreas da África, Ásia e Europa onde a doença é considerada endêmica. Quanto a sua terminologia, significa “aqueles que se dobram” e se refere às fortes dores que a doença causa nas articulações (KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012). Apesar de ser de baixa letalidade, possui manifestações clínicas e sintomáticas que deixam os pacientes debilitados principalmente pela presença de febre alta e de dores intensas nas articulações na fase aguda, podendo desencadear artrite crônica, alterações neurológicas e hematológicas (BIRENDRA *et al.*, 2012).

A febre amarela, causada por um arbovírus da família Flaviviridae do gênero *Flavivirus*, é uma doença infecciosa aguda e de gravidade variável sendo mais incidente em países da África e das Américas Central e do Sul e pode apresentar-se sob duas modalidades: urbana (transmitida por *A. aegypti*) e silvestre (transmitida por *Haemagogus* e *Sabethes*) (TOMORI, 2002). No Brasil, a febre amarela urbana foi erradicada desde 1954, mas a presença do mosquito mantém o risco de epidemia. Diferentemente da febre Chikungunya, há vacina disponível para a prevenção da febre amarela (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2012) a dengue é considerada um dos maiores problemas de Saúde Pública, devido aos inúmeros índices de casos registrados anualmente, como também pela elevada letalidade. Segundo Gubler (2002) as condições ambientais e características socioeconômicas dos centros urbanos de regiões tropicais e subtropicais favorecem a proliferação e o desenvolvimento do vetor. A doença é causada por um vírus RNA, fita simples e de polaridade positiva, com genoma de aproximadamente 11kb, do gênero *Flavivirus*, encontrado em quatro sorotipos diferentes: DENV-1, DENV-2, DENV-

3, DENV-4. Esses quatro sorotipos circulam concomitantemente no Brasil. A infecção por um desses sorotipos virais confere proteção permanente para o mesmo sorotipo (PERERA; KURN, 2008; WILDER-SMITH *et al.*, 2010). Os diferentes sorotipos virais podem manifestar-se clinicamente sob a forma clássica (sintomática ou assintomática) e as formas graves e letais (ARAÚJO *et al.*, 2009). O principal vetor nas Américas são as fêmeas do mosquito *A. aegypti*, que se contaminam ao realizar um repasto sanguíneo em um indivíduo infectado que esteja na fase virêmica da doença. Após replicar-se, espalha-se através da hemolinfa e se replica novamente e, finalmente, 10 a 14 dias, tornam-se capazes de transmitir o vírus, devido a infecção de suas glândulas salivares, através de suas picadas (SALAZAR *et al.*, 2007; RIBEIRO; ARCA, 2009). O *A. albopictus* pode atuar como vetor secundário e ambos estão presentes em alta densidade no continente americano (JOHNSON *et al.*, 2002; SIM; RAMIREZ; DIMOPOLUOS, 2012). Devido ao hábito antropofílico do vetor, o homem e outros primatas são os hospedeiros vertebrados do vírus (GUBLER, 2002; ANGEL; JOSHI, 2008).

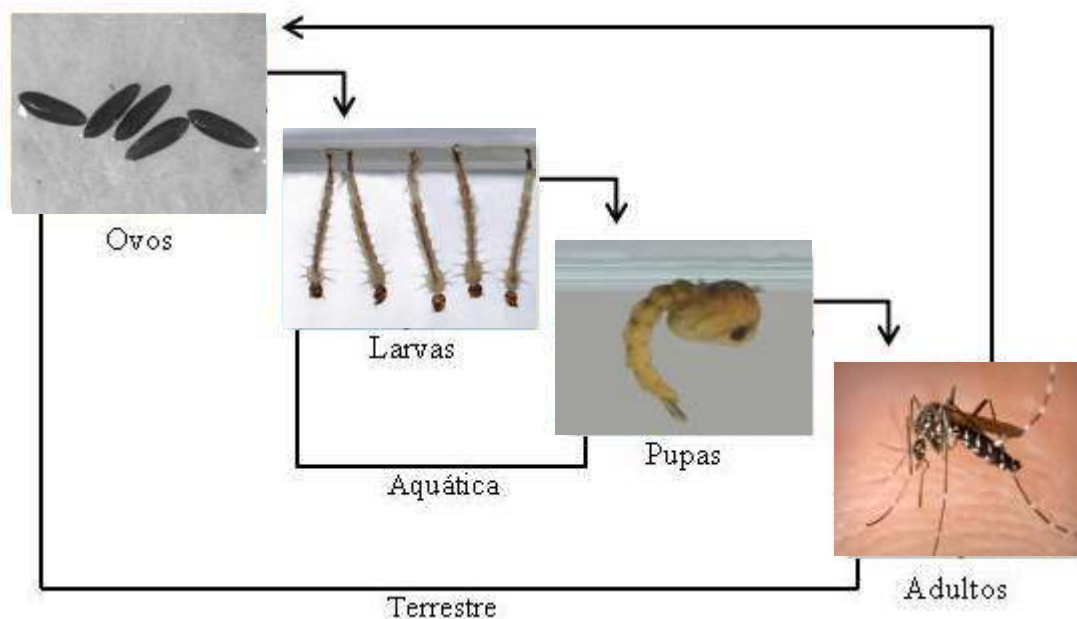
Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a vacina dengue Dengvaxia[®] foi registrada com a indicação de prevenção da dengue causada pelos sorotipos 1, 2, 3 e 4 do vírus da dengue em indivíduos dos 9 aos 45 anos de idade que moram em áreas endêmicas. Dados iniciais indicaram benefício para a população geral, sendo este maior em indivíduos com exposição prévia ao vírus da dengue (soropositivos). Para os indivíduos soronegativos foi demonstrado um benefício menor, mas sem risco aumentado de reações adversas graves.

O *A. aegypti* pertence à Ordem Diptera, Família Culicidae. É uma espécie cosmopolita originária do norte da África (FORATTINI; BRITO, 2003). O mosquito se reproduz principalmente nas paredes de recipientes domésticos com água parada e a fêmea precisa de grandes quantidades de sangue para realizar postura de ovos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; CANTANE *et al.*, 2016). É essencialmente um mosquito urbano, entretanto já foi localizado em zonas rurais em decorrência do transporte de áreas urbanas em vasos domésticos onde se encontravam ovos e larvas (BRAKS *et al.*, 2004; CANTANE *et al.*, 2016).

Devido à alta plasticidade, a espécie é capaz de se adaptar a diferentes situações ambientais, tendo sido encontrados adultos em altitudes elevadas e larvas em águas poluídas. Tal característica e os diferentes criadouros artificiais, como pneus e garrafas plásticas entre outros, têm favorecido o aumento da densidade populacional do vetor (TAUIL, 2002; CHAVES *et al.*, 2013).

O ciclo de vida do *A. aegypti* (Figura 1) compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estágios: L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (LOZOVEI, 2001). O tempo transcorrido entre o estágio de ovo a adulto varia em média de 10 a 13 dias, em condições favoráveis de temperatura, umidade e disponibilidade de alimento (FORATTINI, 2002).

Figura 1 - Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*



Fonte: Adaptado de brasil.gov.br

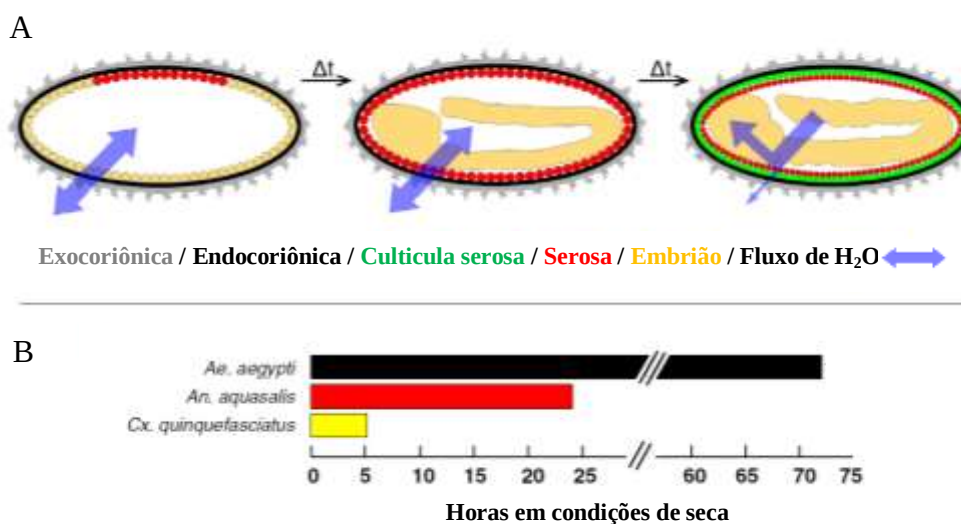
Ovos, larvas e pupas são os estágios imaturos e dependentes de água, enquanto na forma adulta o inseto se apresenta na forma alada. Os adultos possuem o corpo coberto por escamas escuras e prateadas e possuem hábitos diurnos (CÔNSOLI; OLIVEIRA, 1998; FORATTINI, 2002).

De acordo com Farnesi e colaboradores (2015), os ovos dos insetos podem ser classificados em três grupos: os que necessitam apenas de oxigênio para sobreviver, os que precisam de oxigênio e água e os ovos que precisam de oxigênio, água e nutrientes. Os ovos de *A. aegypti* pertencem ao segundo grupo e são colocados em locais próximos a água. Devido à absorção de água, os ovos recém ovipositados sofrem alterações de tamanho (REZENDE *et al.*, 2008; FARNESI *et al.*, 2015).

A casca dos ovos tem a função de proteger o embrião durante o desenvolvimento e manter o equilíbrio hídrico. A casca é formada por três camadas: a camada exocoriônica, endocoriônica e a cutícula serosa (Figura 2) (CLEMENTS, 1992). As camadas endocoriônicas e exocoriônicas são produzidas pelas células foliculares durante a coriogênese, logo, essas

células já estão presentes no momento da postura dos ovos (CLEMENTS, 1992; MONNERAT *et al.*, 1999). A cutícula serosa é produzida pela matriz extracelular durante as primeiras 16 h da embriogênese e a formação dessa cutícula aumenta a impermeabilidade da casca do ovo, tornando-os viáveis por longos períodos (REZENDE *et al.*, 2008; GOLTSEV *et al.*, 2009; VARGAS *et al.*, 2014). No final da embriogênese, os ovos de *A. aegypti* possuem altos níveis de resistência à dessecação (VARGAS *et al.*, 2014).

Figura 2 - Formação das camadas dos ovos de *A. aegypti* após a postura em relação ao tempo (A) e sua resistência a dissecação quando em comparação com ovos de mosquitos de outras espécies (B).



Fonte: Adaptado de FARNESI *et al.* (2015).

Em virtude da importância epidemiológica, torna-se necessário o incentivo e a utilização de estratégias de manejo deste inseto, visando diminuir a incidência dessas doenças, as sequelas e números de óbitos registrados (GUBLER, 2011). Desta forma é possível a utilização de três tipos de mecanismos contra o *A. aegypti*: o controle mecânico, que consiste em reduzir o contato com o homem, envolvendo proteção, destruição ou drenagem de criadouros e instalação de telas (MANRIQUE-SAIDE *et al.*, 2015; ZARA *et al.*, 2016); o controle biológico, baseado na utilização de predadores ou patógenos com potencial para promover redução da população vetorial, como os peixes e invertebrados aquáticos, bactérias, fungos e parasitas que secretam toxinas (SHULSE; SEMLITSCH; TRAUTH, 2013; ZARA *et al.*, 2016) e o controle químico, com a utilização de produtos químicos voltados para larvas e insetos adultos (BRAGA; VALLE, 2007; ZARA *et al.*, 2016).

A população do mosquito *A. aegypti* tem adquirido resistência aos inseticidas químicos utilizados, sendo necessárias aplicações crescentes para o controle. Dentre os mecanismos de defesa das plantas contra a ação de insetos está a síntese de metabólitos secundários e proteínas (incluindo as lectinas) que interferem no desenvolvimento e sobrevivência dos mesmos (STANGARLIN *et al.*, 2011; ZARA *et al.*, 2016).

Compostos naturais, como os óleos essenciais de plantas, surgem como uma alternativa ao controle químico. Características de alguns grupamentos químicos estruturais ou combinados entre eles conferem aumento da atividade larvicida contra *A. aegypti* (SANTOS *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2014).

3.2 LECTINAS VEGETAIS

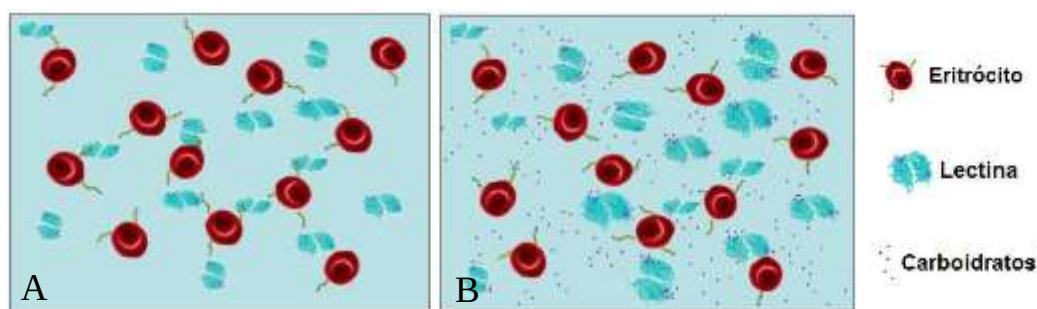
O estudo de proteínas extraídas de plantas com propriedades de aglutinar hemácias (hemaglutininas) se deu por volta do século XIX, com Peter Hermann, que isolou uma proteína tóxica de *Ricinus communis* (popularmente conhecida como mamona), denominando-a de ricina (SHARON; LIS, 2004). As lectinas podem ser encontradas e extraídas na natureza a partir de sementes, cascas ou frutos e demais tecidos, ou ser expressas em laboratório através de técnicas recombinantes (ZHANG *et al.*, 2009; LAM; NG, 2011).

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas, de origem não imune, que ligam monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos e a porção oligossacarídica de glicoconjugados de forma reversível (Figura 3). Quanto à especificidade, as lectinas que ligam monossacarídeos podem ser classificadas de acordo com o açúcar ao qual possui maior afinidade: manose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina, fucose e ácido N-acetilneuramínico (LIS; SHARON, 1998). Glicosídios aromáticos ligam-se de maneira mais forte a lectinas que os alifáticos, confirmando a presença de regiões hidrofóbicas fechadas para sítios de ligação a carboidratos (SHARON; LIS, 2004). Algumas lectinas possuem uma melhor interação com alguns tipos de oligossacarídeos, pelo fato de serem moléculas flexíveis com considerável liberdade de rotação em torno das ligações glicosídicas. A ligação a esses carboidratos é de essencial importância, uma vez que, do ponto de vista funcional, eles são, provavelmente, os ligantes naturais de lectinas (LIS; SHARON, 1998).

As lectinas também podem ser classificadas em merolectinas quando possuem um único domínio de ligação a carboidratos; hololectinas, quando apresentam dois ou mais sítios de ligação, com domínios idênticos ou homólogos; quimerolectinas, (proteínas de fusão), quando possuem um domínio de ligação a carboidratos e outro domínio com função catalítica

ou biológica; e superlectina, que corresponde àquelas lectinas com dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, cujos domínios possuem especificidades diferentes (PEUMAS; VAN DAMME, 1995; SULÁK *et al.*, 2011).

Figura 3 - Representação da atividade hemaglutinante de lectinas (A) e inibição da aglutinação por carboidratos livres em solução (B)



Fonte: Adaptado de PAIVA *et al.* (2011).

A interação das lectinas com carboidratos faz com que estas proteínas possam ser utilizadas como ferramentas em pesquisas. Lectinas conjugadas à enzima peroxidase e a compostos fluorescentes e quimiluminescentes têm sido empregadas em histoquímica para avaliar a mudança de glicosilação em neoplasias, na avaliação de granulomas hepáticos e como sondas bioquímicas na identificação de glicoconjugados. A revelação da interação lectina-carboidrato é feita pela utilização do substrato da peroxidase, através de microscopia de fluorescência ou em luminômetro (CAMPOS *et al.*, 2006; MELO-JUNIOR *et al.*, 2008; LARA; GARCÍA-CAMPAÑA; AARON, 2010; ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2011; BRUSTEIN *et al.*, 2012). Lectinas podem ser imobilizadas em suportes insolúveis visando à produção de matrizes cromatográficas para isolamento de glicoconjugados (BEZERRA, 2014).

As lectinas apresentam diversas propriedades biológicas. A lectina de tubérculo de *Arisaema jacquemontii*, incorporada a uma dieta artificial, afetou o desenvolvimento de larvas de *Bactrocera cucurbitae* pela diminuição da atividade de fosfatases alcalinas e ácidas (KAUR *et al.*, 2006). Lectinas isoladas do cogumelo *Ganoderma lucidum* (GIRJAL; NEELAGUND; KRISHNAPPA, 2011) e do líquen *Cladonia verticillares* (ClaveLL) (RAMOS *et al.*, 2014) mostraram atividade contra fungos de interesse médico.

Atividade antiviral também já foi reportada. De acordo com Botos, Wlodawer (2005) e Balzarini (2006) a capacidade das lectinas de se ligar a oligossacarídeos pode estar relacionada à atividade antiviral dessas proteínas, uma vez que a superfície dos envelopes virais é rica em manose, bloqueando a entrada do vírus nas células alvo (HUSKENS;

SCHOLS, 2012). Lectinas das algas *Oscillatoria agardhii* (FÈRIR *et al.*, 2014), *Kappaphycus alvarezzi* (HIRAYAMA *et al.*, 2016) e *Griffithsia* sp (ALEXANDRE *et al.*, 2010; ALEXANDRE *et al.*, 2012), possuem alta capacidade de ação contra o vírus HIV.

A lectina extraída da *Canavalia brasiliensis* (ConBr) apresentou atividade imunomodulatória em indivíduos com infecção ativa ou não ativa de *Schistosoma mansoni* e promoveu aumento de IL-5 e inibiu a resposta Th2, típica da esquistossomose mansônica (BARRAL-NETO *et al.*, 1996; REIS *et al.*, 2008).

3.2.1 Lectinas de sementes de *Moringa oleifera*

A *Moringa oleifera* (família Moringaceae) é uma espécie nativa da África e Ásia, sendo conhecida popularmente como lírio branco, quiabo-de-quina ou simplesmente moringa. Árvore perene e de crescimento rápido, pode ser encontrada em regiões tropicais e semi-áridas, tolerando condições climáticas inóspitas (Figura 4) (ANWAR *et al.*, 2007; SOUZA; LORENZI, 2008; MARACAJÁ *et al.*, 2010).

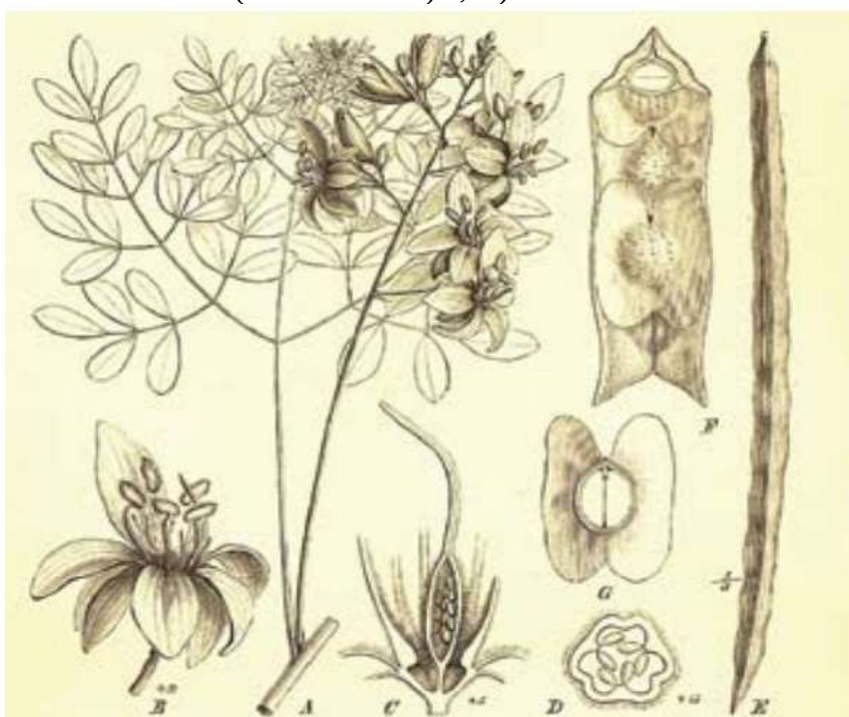
M. oleifera é tida como uma “árvore multi-uso” devido aos diversos fins a ela atribuídos, como por exemplo: forragem animal (folhas e sementes), produção de biogás (folhas), componente de fertilizantes (semente) e de adubo verde (folhas), complemento nutricional (suco das folhas), aplicação no tratamento da água (sementes), para fins ornamentais e na indústria cosmética. Estudos atribuem diversas propriedades biológicas à *M. oleifera*, como atividades coagulante (sementes), inseticida (flor, folhas e sementes), antitumoral (sementes), antinoceptiva (sementes), anti-inflamatória (folhas), antimicrobiana (sementes), antidiabética (folhas), antioxidante (folhas) e antiespasmódica (folhas) (COELHO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012; PANDA *et al.*, 2013; PEREIRA, 2014; FREIRE *et al.*, 2017).

As sementes são fontes das lectinas MoL (do inglês, *M. oleifera lectin*), cMoL (do inglês, *coagulant M. oleifera lectin*) e WSMoL (do inglês, *water-soluble M. oleifera lectin*) que foram isoladas utilizando diferentes procedimentos experimentais e apresentaram características extruturais e físico-químicas, bem como propriedades biológicas diferentes (SANTOS *et al.*, 2005; KATRE *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009).

A lectina MoL possui atividade hemaglutinante para eritrócitos humanos e de coelho. MoL é inibida pelas glicoproteínas fetuína, tiroglobulina e holotransferina, o que indica a especificidade para carboidratos complexos. Possui massa molecular de 7,1 kDa, na presença de 2-mercaptoetanol, com duas subunidades homodímeras, ligadas covalentemente por pontes

dissulfeto. Estruturalmente é formada por 28% de α -hélice, 23% de β -folhas, 20% de voltas- β e 28% de regiões não ordenadas. Alta temperatura e pH extremo não afetaram a estrutura secundária da MoL, indicando que as ligações dissulfeto mantêm a conformação nativa da proteína (KATRE *et al.*, 2008)

Figura 4 - *Moringa oleifera*: A) Pedaco de ramo em florescência; B) Uma única flor; C) Flor (corte longitudinal); D) Fruto (corte transversal); E) Fruto, F) Uma peça de fruta madura (vista de frente) e; G) Semente.



Fonte: ENGLER *et al.* (1888)

A lectina cMoL foi extraída com NaCl 0,15 M e isolada através de cromatografia em coluna de gel de guar. Luz e colaboradores (2013) caracterizaram a cMoL como uma proteína composta por 101 aminoácidos, de natureza básica (pI 11,67) e pertencente à classe de proteínas α/β quanto à sua estrutura terciária sendo a sua estrutura secundária composta por α -hélices (46%), folhas β (12%), voltas β (17%) e estruturas desordenadas (25%).

A lectina cMoL tem atividade coagulante e é capaz de remover ácidos húmicos presentes na água (SANTOS *et al.*, 2012). Oliveira e colaboradores (2011) demonstraram que cMoL promoveu mortalidade de pupas de *Anagasta kuehniellae* e atribuíram tal fato à sua propriedade de reconhecer e ligar quitina. Paiva e colaboradores (2011) reportaram a atividade inseticida de cMoL (1,5 mg/mL) contra a casta de operários de cupins da espécie *Nasutitermes corniger*. A lectina cMoL ainda foi capaz de aumentar a produção de ROS

mitocondriais desencadeando ativação de caspases em células de melanoma (LUZ *et al.*, 2017).

A lectina WSMoL foi extraída com água destilada e isolada por cromatografia em coluna de quitina. A WSMoL apresentou massa molecular nativa ácida de 60 kDa, ponto isoelétrico de 5,5 e, em SDS-PAGE, três bandas polipeptídicas de 30, 20 e 10 kDa (MOURA *et al.*, 2016).

Essa lectina mostrou-se eficiente para coagulação e mortalidade de bactérias presentes em águas, não apresentando efeito mutagênico nem genotóxico nas concentrações de 0,0125 a 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, indicando uma utilização segura desta lectina, nesta faixa de concentração para o tratamento de água voltado para o consumo humano (FERREIRA *et al.*, 2011; ROLIM *et al.*, 2011). A WSMoL não foi citotóxica para células mononucleares de sangue periférico humano e não hemolítica para eritrócitos murinos. A lectina, na concentração de 6,25 g/mL, exibiu atividade antiinflamatória em macrófagos de murinos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), regulando a produção de óxido nítrico, TNF- α e IL-1 (ARAÚJO *et al.*, 2013).

A lectina WSMoL também foi eficiente na remoção de metais pesados presentes na água, no entanto, essa interação foi prejudicada após exposição aos metais, danificando os sítio de ligação ao carboidrato da lectina e, conseqüentemente, a atividade antibacteriana nas cepas testadas (FREITAS *et al.*, 2016).

WSMoL foi ativa contra as bactérias *Bacillus* sp., *Bacillus pumillus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens* e *Serratia marcescens* afetando a permeabilidade celular. A lectina também interferiu na perda de integridade da membrana de *S. marcescens*, e indicou atividade anti-biofilme (MOURA *et al.*, 2015).

WSMoL liga-se parcialmente à membrana peritrófica de *Anagasta kuehniella*, causando bloqueio dos poros, interferindo na circulação e na atividade de enzimas digestivas impedindo o ganho de peso e evolução no estágio larval (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Mecanismo larvicida de WSMoL em larvas de *A. aegypti* susceptíveis a organofosforados, analisado por Agra-Neto e colaboradores (2014), remete a desregulação de enzimas digestivas.

A WSMoL apresentou atividade inseticida contra *Aedes aegypti* (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012). A lectina foi larvicida (CL_{50} = 0,197 mg/mL) contra o quarto estágio larval promovendo alterações morfológicas no trato digestivo da larva (COELHO *et al.*, 2009) e foi um agente ovicida (EC_{50} = 0,1 mg/mL) interferindo no desenvolvimento embrionário em ovos recém-ovipositados e matando o embrião já formado em ovos estocados (SANTOS *et al.*, 2012). No entanto, WSMoL nas concentrações larvicidas para *A. aegypti*

provocou efeitos letais e subletais em embriões e larvas de *zebrafish* (*Danio rerio*), não sendo recomendado o seu uso em locais com outros organismos vivos (SILVA *et al.*, 2017). Adicionalmente a lectina apresentou efeito estimulante sobre a oviposição em condições de laboratório e de campo simulado (SANTOS *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2014).

A lectina WSMoL_C foi obtida a partir da torta de sementes de *M. oleifera* (um subproduto da extração do óleo das sementes). A WSMoL_C exerceu efeito deletério em larvas (LC₅₀= 0,89 mg/mL) e ovos (EC₅₀= 0,14 mg/mL) de *A. aegypti* e foi estimulante de oviposição na concentração de 0,1 mg/mL (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

3.2.2 Lectinas de entrecasca, cerne e folha de *Myracrodruon urundeuva*

Myracrodruon urundeuva, popularmente conhecida no Brasil como aroeira, aroeira-do-sertão, aroeira-preta, aroeira-do-campo ou aroeira-verdadeira, é considerada madeira de lei pela sua elevada resistência a fitopatógenos (MONTEIRO *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2017) e pela característica de incorruptibilidade em água, remetendo ao termo guarani *urundeuva* (Figura 5) (LORENZI, 2008). A entrecasca de *M. urundeuva* é bastante utilizada no tratamento de infecções de garganta, pele e do trato genitourinário (BRAGA, 1976; MONTEIRO *et al.*, 2006; SILVINO *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2017). Extratos da casca também apresentaram antiulcerogênica, anticolinérgica (MENEZES; RAO, FONTELES, 1986), antiinflamatória (RAO *et al.*, 1986) e antidiarréica e analgésica (ALMEIDA-CORTEZ *et al.*, 2007). Os extratos de folhas possuem capacidade de inibir o crescimento bacteriano (BIANCO, 2004) e ação fungicida contra os fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Corynespora cassiicola* (NARUZAWA; PAPA, 2011).

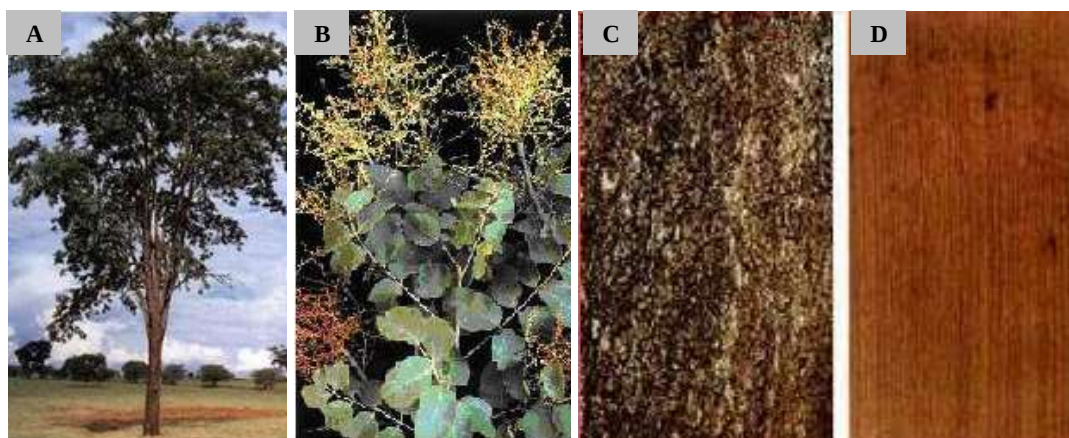
A aroeira-do-sertão, planta característica de terrenos secos e rochosos, típica de regiões da Caatinga e Cerrado, também pode ser encontrada em regiões mais úmidas como as florestas pluviais. Amplamente distribuída no Brasil, é mais frequente nas Regiões Sudeste e Centro-Oeste. Seu tronco mede em torno de 50 a 80 cm de diâmetro, podendo chegar até 25 m de altura em condições favoráveis de clima e solo (GARRIDO; POGGIANI, 1979; LORENZI, 2008). Suas folhas são ovaladas com comprimento variando de 10 a 30 cm. O fruto é do tipo drupa, com estrutura carnosa e sementes pequenas (FAO, 1986; LEITE, 2002).

A parte interna do tronco de *M. urundeuva* possui dois tecidos bem distintos em termos de coloração: uma parte mais escura e central denominada de cerne - tecido morto e sem atividade vegetativa, e uma parte mais clara, o alburno - responsável por processos metabólicos como a respiração e transporte de seiva bruta até as folhas. A transformação de

alburno em cerne não ocorre por condições externas, mas sim por morte celular com desaparecimento do núcleo e do protoplasma e alterações químicas. Circundando o alburno encontramos a entrecasca e a casca externa, que é considerada a primeira barreira de defesa contra fitopatógenos (MAINIERI; CHIMELO, 1989; SILVA, 2002; RAVEN *et al.*, 2004).

A interpretação dada à durabilidade natural atribuída à madeira de algumas plantas pode ser interpretada como a capacidade de resistência à ação deteriorante de agentes físicos, químicos e biológicos. Tal resistência explica-se, evolutivamente, pelo desenvolvimento de mecanismos de respostas relacionados à defesa e proteção no intuito de sobrevivência a adversidades (SOARES; MACHADO, 2007).

Figura 5 - *Myracrodruon urundeuva*: Parte aérea (A), folhas (B), casca (C) e cerne (D)



Fonte: LORENZI (2000)

Lectinas com distintas características estruturais e propriedades biológicas já foram isoladas do cerne (MuHL), entrecasca (MuBL) e folhas (MuLL) de *M. urundeuva*. Estas proteínas possuem padrão nativo básico, com peso molecular de 14,0 kDa (MuBL), 14,4 kDa (MuHL) (SÁ *et al.*, 2009) e 14,2 kDa (MuLL) (NAPOLEÃO *et al.*, 2011), são glicosiladas e termoestáveis (até 100°C) (NAPOLEÃO *et al.*, 2011). As lectinas de *M. urundeuva* mostraram diferentes especificidades de ligação aos hidratos de carbono, uma vez que MuLL reconhece apenas polissacarídeos e glicoconjugados, enquanto o MuBL se liga à *N*-acetilglucosamina e MuHL se liga a glicose, galactose e *N*-acetilglucosamina (SÁ *et al.*, 2009; NAPOLEÃO *et al.*, 2011).

A lectina MuHL apresentou atividade antifúngica sobre *Fusarium fusarioides*, *F. lateritium*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. solani* e *F. verticiloides* e antibacteriana para bactérias Gram negativas e positivas. MuHL induziu a mortalidade de *N. corniger* com CL₅₀

de 0,248 mg/mL para operários e 0,199 mg/mL para soldados e não induziu efeito de rejeição por parte dos insetos (SÁ *et al.*, 2008).

MuBL induziu atividade termicida em *N. corniger* com CL₅₀ de 0,974 mg/mL para operários e 0,787 mg/mL para soldados e MuLL nas concentrações de 0,374 mg/mL para operários e 0,432 mg/mL para soldados. MuBL e MuHL foram agentes bactericidas mais eficientes que MuLL (CBM de 125 mg/mL contra 250 mg/mL) sobre bactérias do intestinais de operários e atividade semelhante foi encontrada para bactérias do intestino de soldados (NAPOLEÃO *et al.*, 2011).

Ensaio larvicida contra *A. aegypti*, para as lectinas do cerne (MuHL) e da entrecasca (MuBL) de *M. urundeuva* foi eficiente nas CL₅₀ de 0,04 mg/mL e 0,125 mg/mL, respectivamente, sendo este o primeiro relato de atividade larvicida de lectinas contra *A. aegypti* (SÁ *et al.*, 2009).

N. corniger foram submetidos à dieta artificial enriquecida com as concentrações letais das lectinas MuBL, MuHL e MuLL. Em microscopia de fluorescência foi revelado uma diminuição no número de células digestivas e proliferativas nos indivíduos tratados com a lectina. Apoptose foi confirmada pela marcação para caspase-3. Também foi vista uma elevação da peroxidase, o que sugeriu que as lectinas causavam estresse oxidativo (LIMA *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2018).

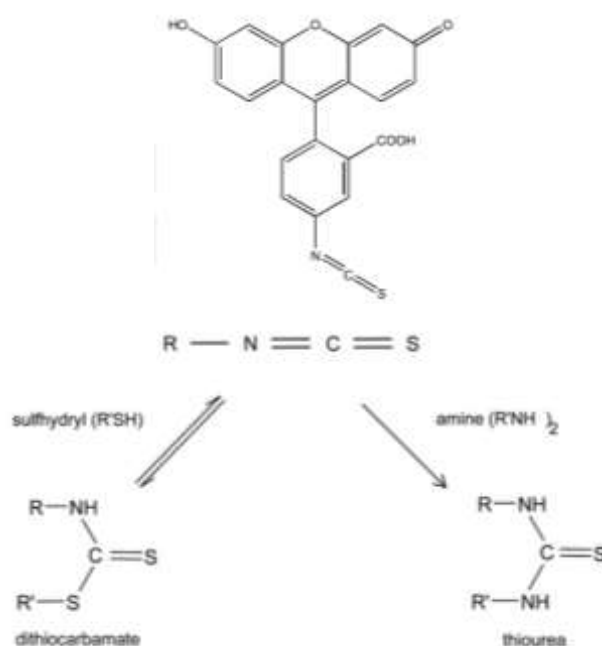
3.3 APLICAÇÕES DO ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA

Métodos de detecção baseados em fluorescência e biotina são sensíveis, seletivos e rápidos (GARY, 2006). O isotiocianato de fluoresceína (FITC) é superior à biotina pelo fato que ele não está presente em nenhum tecido e possuir menor peso molecular o que permite uma melhor permeabilidade no tecido (NAKURA *et al.*, 2002; TAKAI *et al.*, 2011).

O grupamento isotiocianato é capaz de se ligar covalentemente às proteínas. Esta propriedade é utilizada em pesquisas para marcação de proteínas com compostos tais como isotiocianato de fluoresceína, por meio da reação de isotiocianato com a região amina N-terminal de péptidos e proteínas, como as lectinas (ZHANG, 2004; FIMOIGNARI; HRELIA, 2007; CAVELL *et al.*, 2011). O carbono central do grupamento isotiocianato sofre rápidas reações com a adição de nucleófilos, particularmente, aminas e tióis. A reação com aminas gera derivados estáveis da tioureia, enquanto as reações com os grupos tióis produzem derivados de ditiocarbamato (Figura 6). As reações com os grupos tióis são até dez mil vezes mais rápidas do que com grupos aminos, o que proporciona aos resíduos estruturais e

funcionais de cisteína, alvos sensíveis para modificações (DROBNICA; KRISTIAN; AUGUSTIN, 1997). A reatividade dos grupamentos amins e tióis depende de seus valores de pKa e aumenta em condições básicas. São necessários tampões alcalino para otimizar as reações (PODHRADSKY; DROBNICA; KRISTIAN, 1979; KONIEV; WAGNER, 2015).

Figura 6 - Estrutura molecular do isotiocianato de fluoresceína e sua reatividade com grupamentos tióis e amins.



Fonte: Adaptado de KIM *et al.* (2004)

Lectinas conjugadas com FITC, a exemplo da Con A (isolada de sementes de *Canavalia ensiformis*) são especialmente úteis na visualização e caracterização bioquímica de polissacarídeos em biomoléculas (STRATHMANN; WINGENDER; FLEMMING, 2002; ZHANG *et al.*, 2015). O conjugado ConA-FITC provou ser útil para aplicações de imunolocalização de oncogenes, enzimas intracelulares, componentes do citoesqueleto e marcar células endoteliais hepáticas humanas (KIM *et al.*, 2004; GONG *et al.*, 2015).

4 ARTIGO: CHITIN-BINDING LECTINS WITH OVICIDAL ACTIVITY ON *Aedes aegypti* BIND TO EMBRYO INTO THE EGGS.

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO “Chemosphere”



ISSN: 0045-6535
Fator de Impacto: 4.208
Qualis Capes: A2 (CBI)

Chitin-binding lectins with ovicidal activity on *Aedes aegypti* bind to embryo into the eggs

Robson Raion de Vasconcelos Alves^a, Ricardo Salas Roldan-Filho^a, Bárbara Stefany da Silva Souza^a, Marcele Kalliane Nunes de Lima^a, Jéssica da Silva Nascimento^b, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Roberto Araújo Sá^c, Thâmarah de Albuquerque Lima^a, Tatiana Soares^d, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

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

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

^c*Centro Acadêmico do Agreste, Universidade Federal de Pernambuco, Nova Caruaru, 55002-970, Caruaru, Pernambuco, Brazil.*

^d*Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Cidade Universitária 50740-545, Recife, Pernambuco, Brazil.*

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

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

Abstract

Lectins, carbohydrate-binding proteins, isolated from seeds of *Moringa oleifera* (WSMoL) as well as bark (MuBL), heartwood (MuHL) and leaf (MuLL) of *Myracrodruon urundeuva* are larvicidal agents against *Aedes aegypti*. WSMoL was also reported as an ovicidal agent against this mosquito and the concentration of this lectin required to reduce the hatching rate in 50% (EC₅₀) is 0.1 mg/mL. This work aimed to evaluate the ovicidal activity of MuBL, MuHL and MuLL as well as to evaluate the binding sites of WSMoL and MuBL in the eggs. The lectins were isolated following previously established protocols. Eggs on filter papers were selected by considering their integrity using a stereomicroscope. Each ovicidal assay corresponded to 20 mL of lectin solution in which were immersed 50 eggs. The number of hatched larvae was determined after 72 h of incubation at 25-27 °C. The EC₅₀ was determined by probit analysis. WSMoL-FITC and MuBL-FITC conjugates (at EC₅₀) were used to evaluate binding sites of the lectins using a fluorescence microscope. Controls contained only the eggs and eggs incubated only with FITC. MuBL, MuHL and MuLL were ovicidal agents and the EC₅₀ values were 0.26, 0.80 and 0.88 mg/mL, respectively. Based on the best EC₅₀ values, WSMoL and MuBL were selected for fluorescence microscopy analysis. Compared with controls, the images revealed the presence of WSMoL-FITC in the head, proventriculus, and gut of embryos. MuBL-FITC labeling was observed in the head and digestive tract. In conclusion, *M. urundeuva* lectins are also ovicidal agents against *A. aegypti* and the ovicidal activity of WSMoL and MuBL is linked to penetration of these proteins in the egg reaching the digestive tract of the embryo in development.

Key words: *Moringa oleifera*; *Myracrodruon urundeuva*; insecticidal activity; dengue mosquito; fluorescence microscopy.

1. Introduction

The mosquito *Aedes aegypti*, vector of important arboviruses like dengue, chikungunya and Zika virus fevers, can adapt to different environmental conditions, which favors the increase of the population density (Chaves et al., 2013). Due to its epidemiological importance, management strategies for controlling this insect are needed (Gubler, 2011). Populations of this mosquito have acquired resistance to several of the chemical insecticides used, leading to the need of using increasing amounts for control and there are no ovicidal agents available (Zara et al. 2016). This scenario, together with the environmental toxicity of synthetic pesticides, stimulates the search for alternative insecticides for *A. aegypti* control.

Plants are sources of lectins, proteins able to bind monosaccharides, oligosaccharides and polysaccharides as well as glycan moieties in glycoconjugates (Sharon; Lis, 2004). WSMoL (water-soluble *Moringa oleifera* lectin), is an acidic and oligomeric protein isolated from seeds of this plant, able to bind chitin and fructose; MuBL, MuHL and MuLL are chitin-binding lectins isolated from *Myracrodruon urundeuva* bark, heartwood and leaf, respectively, and are basic proteins composed by single polypeptide chains (Sá et al., 2009; Napoleão et al., 2011; Moura et al., 2016). The *M. urundeuva* lectins showed different carbohydrate-binding specificity since MuLL only recognize polysaccharides and glycoconjugates whereas MuBL binds to *N*-acetylglucosamine and MuHL binds to glucose, galactose and *N*-acetylglucosamine (Sá et al., 2009; Napoleão et al., 2011).

Insecticidal activity of lectins against immature and adult forms usually results from a combination of mechanisms. Chronic effects of *Dioclea violacea* lectin on *Anagasta kuehniella*, from neonates to the fourth instar, include decrease of larval mass, delay in development, and inhibitory action on trypsin-like, chymotrypsin-like, and α -amylase activities from insect gut (Oliveira et al., 2015). The termiticidal activity of *M. urundeuva* lectins against *Nasutitermes corniger* is linked to modulation of digestive enzyme activities, binding to transport proteins, and induction of tissue injuries, oxidative stress and cell death in the termite midgut; in addition, these lectins have antimicrobial activity against gut bacterial symbionts (Napoleão et al., 2011; Lima et al., 2017, 2018).

Lectins conjugated to the enzyme peroxidase or fluorescent and chemiluminescent compounds have been used as tools in research investigating insecticidal activity of lectins. Conjugation with fluorescein isothiocyanate (FITC) revealed that the *D. violacea* binds to peritrophic matrix of *A. kuehniella* larvae (Oliveira et al., 2015) and that *Rhizoctonia solani*

lectin penetrates through the peritrophic matrix of *Tribolium castaneum* (Walski et al., 2014). The conjugation of FITC with proteins to detect the localization of them in tissues and organs is an efficient strategy because this fluorescent probe is not present in any biological tissue and has low molecular weight, which facilitates its permeability (Takai et al., 2011).

WSMoL, MuBL, MuHL and MuLL are larvicidal agents against *A. aegypti* (Coelho et al., 2009; Sá et al., 2009; Napoleão et al., 2012). WSMoL causes structural damages to larval gut and is able to modulate the activity of digestive enzymes; MuLL is resistant to proteolysis at larvae gut and is able to inhibit protease and trypsin activities as well as stimulate α -amylase activity (Coelho et al., 2009; Napoleão et al., 2012; Agra-Neto et al., 2014). WSMoL also showed ovicidal activity against *A. aegypti* by delaying embryonic development in fresh eggs and causing the death of embryo inside stored eggs (Santos et al., 2012). It is possible that the ovicidal activity of WSMoL is due to the binding of the lectin to the chitin present in the eggs. The effects of *M. urundeuva* lectins on *A. aegypti* eggs have not yet been determined.

This work reports the ovicidal activity of *M. urundeuva* lectins on *A. aegypti* as well as binding sites of WSMoL and MuBL (the most efficient ovicidal lectins) on embryos using lectin-FITC conjugates.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Plant materials were collected with authorization (no. 38690) of the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* from Brazilian Ministry of Environment. The seeds of *M. oleifera* were collected at the campus of the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE) at Recife, Pernambuco, Brazil and a voucher specimen (no. 73,345) is deposited at the herbarium *Dárdano de Andrade Lima* from the *Instituto Agrônomo de Pernambuco* (Recife). Leaves, heartwood and bark of *M. urundeuva* were collected at Caxias, Maranhão, Brazil, and the voucher specimen was deposited under the number 054 at the herbarium *Aluísio Bittencourt* from the *Universidade Estadual do Maranhão*.

2.2. Isolation of lectins

WSMoL, MuHL, MuBL, and MuLL were isolated following the protocols established by Coelho et al. (2009), Sá et al. (2008), Sá et al. (2009), and Napoleão et al. (2011), respectively. In general terms, protein extracts were obtained by homogenization of tissue powder in distilled water (*M. oleifera* seeds) or 0.15 M NaCl (*M. urundeuva* tissues), in proportion of 10% (w/v), for 16 h at 25 °C. Next, the extracts were treated with ammonium sulphate and fractions enriched in lectin were loaded onto chitin (Sigma-Aldrich, MO, USA) columns (7.5 × 1.5 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl at a flow rate of 0.3 mL/min. After washing with equilibrating solution, the lectins were eluted with 1.0 M acetic acid and dialyzed (6 h, two liquid changes) against distilled water for eluent removal. Protein concentration was determined according Bradford (1976).

Hemagglutinating activity (HA) assay was used to detect the carbohydrate-binding ability of the lectins. The assay was performed according to Paiva and Coelho (1992) using a suspension (2.5%, v/v) of rabbit erythrocytes in 0.15 M NaCl. The HA was quantified as the reciprocal of the highest sample dilution that promoted full agglutination of erythrocytes. Specific HA (SHA) was defined as the ratio between HA and the protein concentration (mg/mL). The erythrocytes were collected as approved by the Ethics Committee on Animal Use of the *Universidade Federal de Pernambuco* (process 23076.033782/2015-70).

2.3. Ovicidal assay

The ovicidal assay was performed according to Prajapati et al. (2005) adapted to Santos et al. (2012) using *A. aegypti* eggs stored at 27±2 °C for a maximum of 3 months at the *Laboratório de Ecologia Química* of UFPE. Intact eggs were selected using a Leica KL300 stereomicroscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). MuHL, MuBL and MuLL lectins were diluted in filtered tap water to provide test solutions within the following concentration ranges: 0.1–0.4 mg/mL for MuBL and 0.5–1.0 mg/mL for MuHL and MuLL. The final volume of each assay was 20 mL of test solution. The eggs (50 per assay), placed on filter paper, were immersed in the solutions. Controls contained distilled water, in a volume equivalent to that of the sample used to reach each concentration, completed to 20 mL with filtered tap water. The experiments were carried out in triplicate, observed daily, and after 72 h of incubation, it was recorded the number of hatched larvae. The concentrations capable of reducing the hatching rates by 50% (EC₅₀) were determined.

2.4. Conjugation of WSMoL and MuBL with fluorescein isothiocyanate (FITC)

A stock solution of FITC at 5.0 mg/mL in dimethyl sulfoxide (DMSO) was prepared according to the manufacturer's instructions. The lectin (1.0 mg/mL) was dialyzed overnight against an inhibition buffer (0.1 M bicarbonate/carbonate pH 9.0, containing 0.1 M glucose). Next, the dialyzed lectin (25 mg/mL) was mixed with the FITC solution (1.25 mL) (K_{ex} = 495 nm, K_{em} = 525 nm) and 0.1 M sodium bicarbonate/carbonate buffer, pH 9.0. After mixing the solutions, the reaction tube was covered with an aluminum foil and kept in a dark environment during 2 h at room temperature under constant stirring. The reaction mixture was then loaded onto a Sephadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) column (20 cm × 1.9 cm) previously equilibrated (0.5 mL/min) with phosphate buffered saline (PBS) in order to separate FITC-conjugated proteins from unconjugated proteins. The molar ratio between fluorescence and protein (F/P) corresponded to the ratio between the absorbances at 495 and 280 nm. The F/P ratio must be between 5 and 10 (Lyerla and Hierholzer, 1975). The conjugated proteins were dialyzed against distilled water for removal of the inhibitory carbohydrate and stored at 4 °C.

2.5. Visualization of eggs by fluorescence microscopy

Intact eggs (10 per assay) were incubated with the WSMoL-FITC and MuBL-FITC complexes at the respective EC_{50} for 24, 48, and 72 h. After the incubation period, the eggs were washed with distilled water for the removal of unbound complexes. Some eggs were placed in 5% sodium hypochlorite solution for complete dissolution of the chorion, leaving the vitelline membrane intact, favoring visualization of the embryo (Mortenson, 1950). The eggs were then rinsed with distilled water to avoid complete dissolution by the sodium hypochlorite.

Slides containing the eggs were observed in a fluorescence microscope (Axio Observer Z.1, Apotome Zeiss, Göttingen, Germany) using the Green/Alexa filter at wavelength 488 nm. Control slides (CEC = control for eggs with corium, CEH = control for eggs treated with hypochlorite, CFITC = control for eggs incubated only with FITC) were also prepared.

2.6. Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard deviations (SD), calculated using GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). The EC₅₀ values were calculated by probit analysis with a 95% confidence interval using MedCalc (MedCalc Software bvba, Belgium).

3. Result and discussion

All the lectins investigated in this work are chitin-binding proteins but, as commented before, they differ in net charge, structural organization and biological properties. WSMoL, MuBL, MuHL, and MuLL were isolated according the procedures already established and showed SHA values of 594.5, 32.0, 703.8, and 144.2 respectively. The hemagglutinating activity shows that the carbohydrate-binding sites of lectins were working after isolation procedures. The differences in SHA values show that the lectins of *M. oleifera* and *M. urundeuva*, although having in common the property of recognizing chitin, differ in the ability to interact with the carbohydrates present at the surface of rabbit erythrocytes.

The ovicidal activity of WSMoL against *A. aegypti* was previously reported, with EC₅₀ of 0.1 mg/mL for 72-h treatment (Santos et al., 2012), but only larvicidal activity was determined for the *M. urundeuva* lectins (Sá et al., 2009; Napoleão et al., 2012). In the present work, we found that MuBL, MuHL and MuLL are also ovicidal agents (Figures 1A, 1B, and 1C) and the EC₅₀ values were 0.26, 0.80 and 0.88 mg/mL, respectively. Similarly, all the lectins studied here were larvicidal agents against *A. aegypti* with different efficiencies (Coelho et al., 2009; Sá et al., 2009; Napoleão et al., 2012). The distinct insecticidal activity of WSMoL, MuBL, MuHL and MuLL can be due to differences in their carbohydrate-binding sites, as evidenced by the different specificities (Rolim et al., 2011; Napoleão et al., 2011).

Insecticidal activity of chitin-binding lectins has been associated to interaction of them with chitin or its monosaccharide constituent *N*-acetylglucosamine (Oliveira et al., 2017). *A. aegypti* eggs contain chitin in the exochorion and serosal cuticle (Farnesi et al., 2015) and the ovicidal activity of the lectins can be due to their interaction with these structures. Medeiros et al. (2018) reported the ovicidal activity of WSMoL against gastrointestinal parasites from goats and suggested that this was due to lectin interaction with chitin.

Ovicidal activity linked to interference in embryonic development has also been reported for insect growth regulators (Suman et al., 2013) and Santos et al. (2012) demonstrated that embryo development was impaired in *A. aegypti* fresh eggs laid in WSMoL solution. With regard the stored eggs, WSMoL could have penetrated the egg and promoted

the death of the embryo. This may also occur with the *M. urundeuva* lectins studied here. Aiming to investigate this more deeply, the lectins WSMoL and MuBL (lectins with the lowest EC₅₀ values) were conjugated with FITC and then the conjugates WSMoL-FITC and MuBL-FITC were used to evaluate the localization of these lectins in treated eggs.

WSMoL and MuBL were efficiently conjugated to the fluorescent marker (F/P ratio: 10) and the chromatographic profiles at 280 nm (protein detection) and 495 nm (FITC detection) from gel filtration chromatography showed single and overlapping peaks (Figures 2A and 2B). Lectin-FITC conjugates have also been used to identify glycan moiety in biomolecules, components of the cytoskeleton and receptors on human endothelial cells (Zhang et al., 2015; Gong et al., 2015). Also, Medeiros et al. (2018) showed that WSMoL-FITC conjugate was able to bind to gastrointestinal parasite embryo into the eggs.

A. aegypti eggs untreated or treated with FITC, WSMoL-FITC or MuBL-FITC for 24, 48, and 72 h were evaluated by fluorescence microscopy (Figure 3). The autofluorescence emitted by chitin present in the exochorionic cells was detected in the eggs without treatment (Figure 3A) and uniform fluorescent labeling was visualized in the whole egg after incubation with FITC (Figure 3B). On the other hand, fluorescence was mainly visualized at the lateral surface of the eggs treated with WSMoL-FITC or MuBL-FITC (Figures 3C and 3D) and therefore in the region where the autofluorescence of chitin was detected.

The chorion of *A. aegypti* eggs without treatment or treated with FITC, WSMoL-FITC or MuBL-FITC for 24, 48, and 72 h was removed aiming to investigate whether the conjugates would be able to penetrate the egg and interact with the embryo. Autofluorescence was again detected in the untreated eggs but it was more intense in the serosal cuticle and embryo head (Figure 4A) while unspecific labeling was visualized in FITC-treated eggs (Figure 4B). Fluorescence in WSMoL-FITC-treated eggs by 24 and 48 h was concentrated in the head and proventriculus of the embryo and after 72 h incubation, in the head and digestive tract (Figure 4C). Differently, fluorescence in MuBL-FITC-treated eggs for 24 h was visualized in the head and upper portion of the gastrointestinal tract and after 48 and 72 h in the head and digestive tract. Comparison of the fluorescence observed in the embryo of untreated and lectin-treated eggs reveals that the labeling of the digestive tract was detected only in eggs treated with the lectin conjugates while head staining was detected in both treated and untreated eggs. Also, it was observed that the increase in the incubation time led to enlargement of the marked area in the digestive tract.

The fact that the fluorescence in eggs treated with the conjugates is localized specifically in the digestive tract of the embryo indicates that the ovicidal activity of WSMoL

and MuBL can be due to embryotoxic action at gut level. It has been reported that chitin-binding lectins are active against insects by promoting morphological alterations in the intestinal tract, inhibiting or stimulating digestive enzymes, inducing apoptosis and oxidative stress in digestive cells as well as interacting with transport proteins (Coelho et al., 2009; Agra-Neto et al, 2014; Lima et al., 2017, 2018). Damage to the digestive process has been associated with larvicidal and insecticidal activities of WSMoL against *A. aegypti* and *Anagasta kuehniella*, respectively as well as insecticidal activity of MuBL against *Nasutitermes corniger* (Santos et al., 2012; Lima et al., 2017; Oliveira et al., 2017).

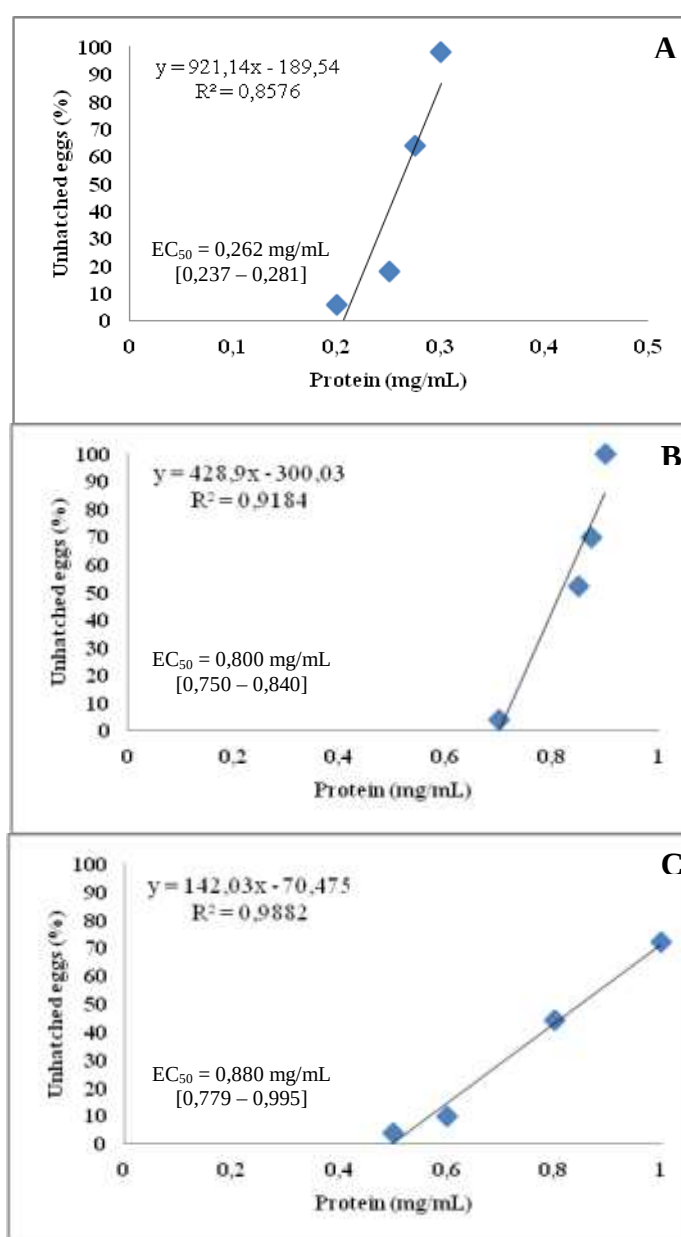


Figure 1 - Percentage of unhatched eggs after incubation with MuBL (A), MuHL (B) and MuLL (C) for 72h.

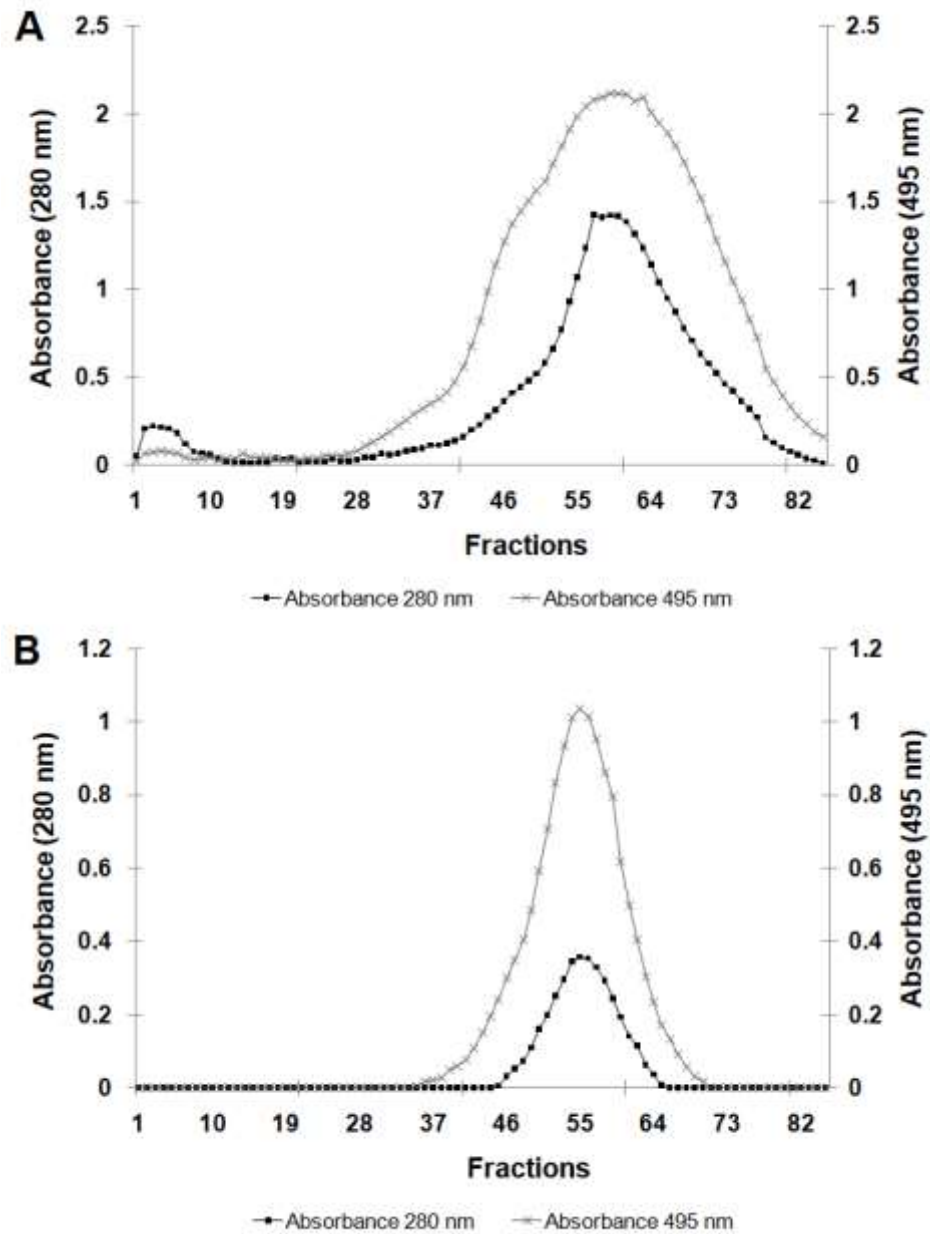


Figure 2 - Chromatography on Sephadex G-75 of WSMoL-FITC (A) and MuBL-FITC (B) conjugates. The fractions were monitored for absorbance at 280 nm (protein detection) and 495 nm (FITC detection).

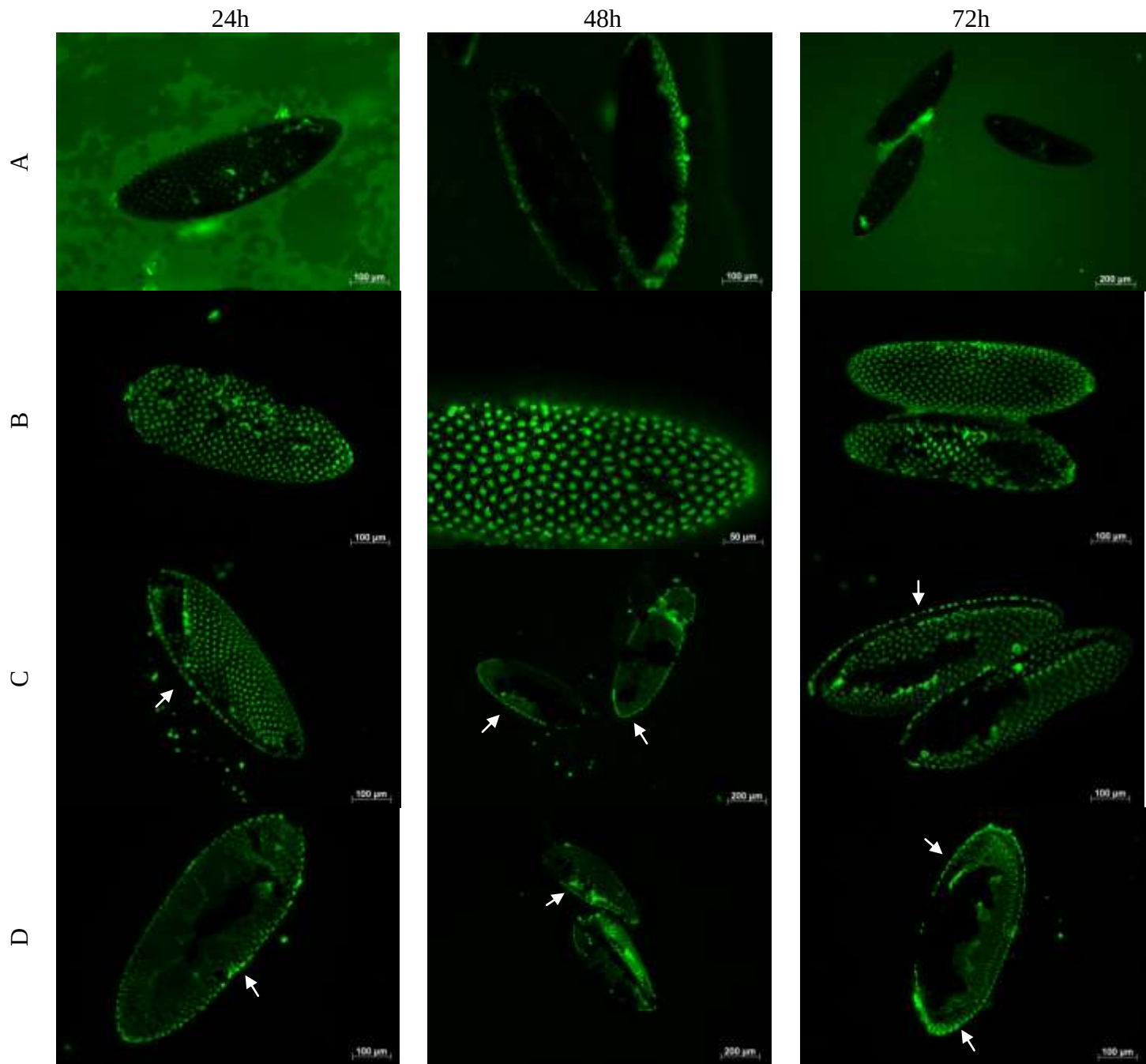


Figure 3 - Fluorescence microscopy of *Aedes aegypti* eggs non-treated (A) and incubated with FITC (B), WSMoL-FITC and MuBL-FITC for 24, 48 and 72 h. Arrows indicate a higher intensity of fluorescence on the lateral sides of the eggs.

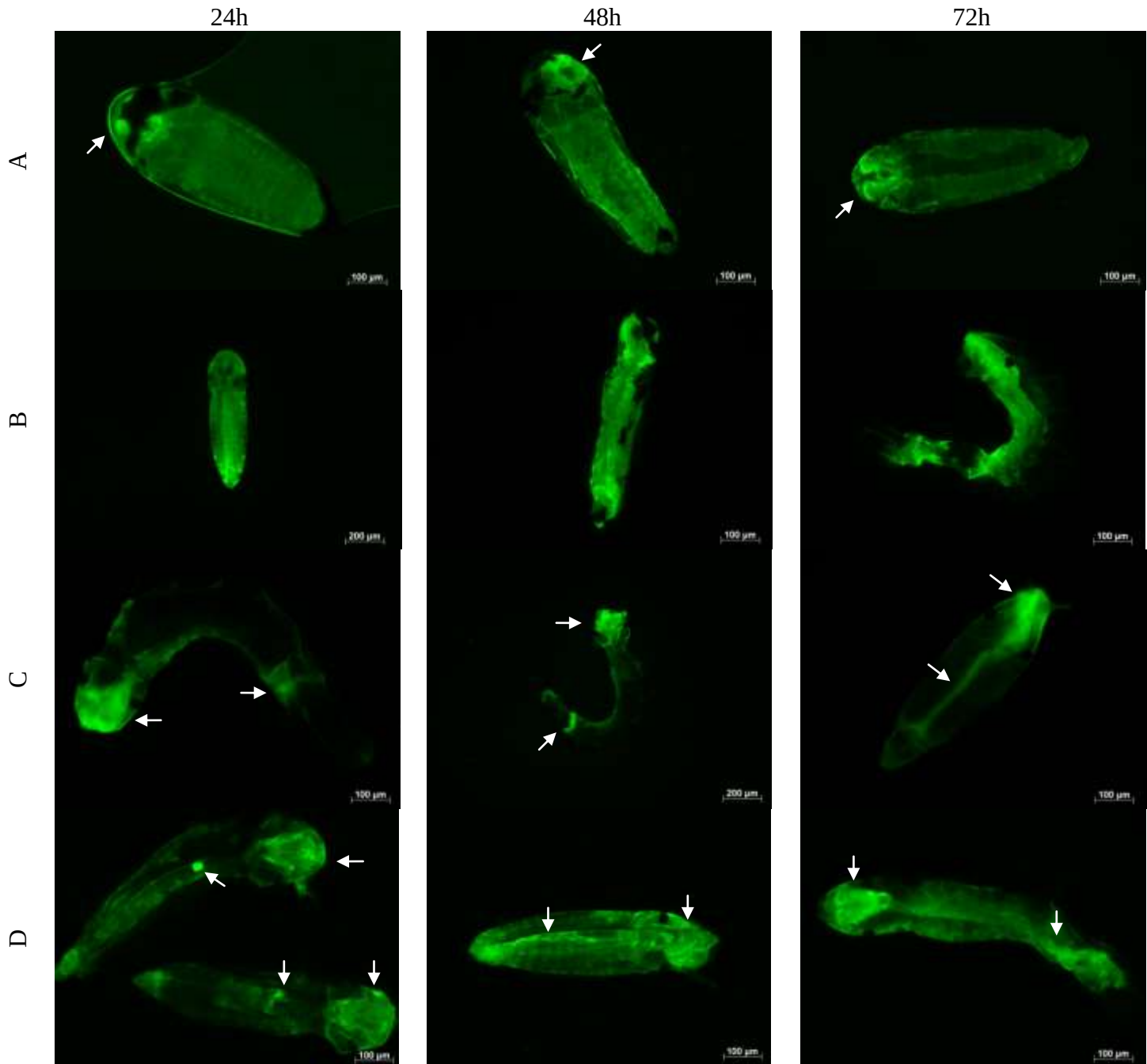


Figure 4 – Fluorescence microscopy of *Aedes aegypti* eggs after clearing of the pigmented chorion with sodium hypochlorite. Non-treated eggs (A) and eggs incubated with FITC (B), WSMoL-FITC and MuBL-FITC for 24, 48 and 72 h. Arrows indicate regions with higher intensity of fluorescence, which were: embryo head in untreated eggs (A); head and proventricular regions in eggs treated with WSMoL-FITC (C) for 24 and 48 h; head and gut in larvae treated with WSMoL-FITC (C) for 72 h; head and gut in larvae treated with MuBL-FITC (D).

4. Conclusion

The study reports the ovicidal activity of *M. urundeuva* lectins against *A. aegypti* with different efficiencies. WSMoL and MuBL are able to penetrate inside the eggs and bind to the head and digestive tract of the embryos.

5. Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants and fellowships (LCBBC, THN and PMGP). We are also grateful to the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE), the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and *Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação* (MCTI) for financial support. R.R.V. Alves would like to thank FACEPE for graduate scholarship. We thank Carlos Eduardo Sales da Silva for technical assistance.

Referências

- AGRA-NETO, A. C. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitology Research** v. 113, p. 175–184, 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CHAVES, L. F. et al. Hot temperatures can force delayed mosquito outbreaks via sequential changes in *Aedes aegypti* demographic parameters in autocorrelated environments. **Acta Tropica**, 2013.
- COELHO, J. S. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934-938, 2009.
- FARNESI, L. C. et al. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. **Journal of insect physiology**, v. 83, p. 43-52, 2015.
- GLUBER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The unholy Trinity of the 21st Century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, p. 3-11, 2011.

GONG, W. G. et al. Paeoniflorin diminishes ConA-induced IL-8 production in primary human hepatic sinusoidal endothelial cells in the involvement of ERK1/2 and Akt phosphorylation. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 62, p. 93-100, 2015.

LIMA, T. A. et al. Termiticidal lectins from *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) cause midgut damage when ingested by *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) workers. **Pest management science**, v. 73, 2017

LIMA, T. A. et al. Binding targets of termiticidal lectins from the bark and leaf of *Myracrodruon urundeuva* in the gut of *Nasutitermes corniger* workers. **Pest management science**, 2018.

LYERLA, H. C.; HIERHOLZER, J. C. Physicochemical and serological characteristics of respiratory virus fluorescein-isothiocyanate conjugates for fluorescent-antibody diagnosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 1, n. 5, p. 451-461, 1975.

MEDEIROS, M. L. S. et al. Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*. **International journal of biological macromolecules**, 2018.

MORTENSON, E W. et al. The Use of Sodium Hypochlorite to Study *Aedes nigromaculis* (Ludlow) Embryos.(Díptera: Culicidae.). **Mosquito News**, v. 10, n. 4, p. 211-12, 1950.

MOURA, K. S. et al. Coagulant Activity of Water-Soluble *Moringa oleifera* Lectin Is Linked to Lowering of Electrical Resistance and Inhibited by Monosaccharides and Magnesium Ions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, 2016.

NAPOLEÃO, T. H. et al. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.

NAPOLEÃO, T. H. et al. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, v. 110, p. 609-616, 2012.

OLIVEIRA, C. T. et al. Entomotoxic properties of *Dioclea violacea* lectin and its effects on digestive enzymes of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). **Journal of insect physiology**, v. 81, p. 81-89, 2015.

OLIVEIRA, C. F. R. et al. A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. / **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2017.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart.(camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 113-118, 1992.

PRAJAPATI, V. et al. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Bioresource technology**, v. 96, n. 16, p. 1749-1757, 2005.

ROLIM, L. A. D. M. M. et al. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, 2011.

SÁ, R. A. et al. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p. 460–464, 2008.

SÁ, R. A. et al. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 149, p. 300-306, 2009.

SANTOS, A. S. F. et al. Coagulant properties of *Moringa oleifera* protein preparations: application to humic acid removal. **Journal Environmental Technology**, v. 33, 2012.

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

SUMAN, D. S. et al. Ovicidal activity of three insect growth regulators against *Aedes* and *Culex* mosquitoes. **Acta tropica**, v. 128, n. 1, p. 103-109, 2013.

TAKAI, H. et al. The importance of characterization of FITC-labeled antibodies used in tissue cross-reactivity studies. **Acta Histochemica** v. 113, p. 472–476, 2011.

WALSKI, T. et al. Penetration through the peritrophic matrix is a key to lectin toxicity against *Tribolium castaneum*. **Journal of insect physiology**, v. 70, p. 94-101, 2014.

ZARA, A. L. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

ZHANG, R. Y. et al. Use of lectins to in situ visualize glycoconjugates of extracellular polymeric substances in acidophilic archaeal biofilms. **Microbial biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 448-461, 2015.

5 CONCLUSÕES

- As lectinas WSMoL, MuBL, MuHL e MuLL foram purificadas com rendimento e atividade hemaglutinante específica (AHE) que viabilizou a realização do ensaio de atividade ovicida;
- As lectinas MuBL, MuHL e MuLL foram agentes ovicidas contras ovos estocados de *Aedes aegypti*;
- WSMoL e MuBL foram conjugadas eficientemente ao FITC. Essas lectinas se difundiram pelo tecido e marcaram regiões específicas o que desencadeou a atividade ovicida;
- O conjugado WSMoL-FITC se ligou na cabeça, proventriculo e intestino de embriões. A marcação MuBL-FITC foi observada na cabeça e no trato digestivo;
- A atividade ovicida de WSMoL e MuBL pode estar ligada à penetração dessas proteínas no ovo que atingem o trato digestivo do embrião.

REFERÊNCIAS

- AGRA-NETO, A. C. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitol Res**, v. 113, p. 175–184, 2014.
- ALEXANDRE, K., B. et al. Mannose-rich glycosylation patterns on HIV-1 subtype C gp120 and sensitivity to the lectinsm Griffithsin, Cyanovirin-N and Scytovirin. **Virology Africa** v. 402, p. 187-196, April 2010.
- ALEXANDRE, K., B. et al. the lectins griffithsin, cyanovirin-N and Scytovirin inhibit HIV-1 binding to the DC-SING receptor and transfer to CD4+ cells. **Virology Africa** v. 423, p. 175-186, January 2012.
- ALMEIDA-CORTEZ, J. S. et al. **Caatinga**. Coleção Biomas do Brasil. 1ª ed. São Paulo: Harbra, 2007
- ANGEL, B.; JOSHI, V. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in *Aedes* mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 45, p. 56–59, 2008
- ANWAR, F. et al. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 17-25, 2007.
- ARANTES, C. C. et al. Diferentes formas de aplicação da semente de *Moringa oleifera* no tratamento de água. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 19, n. 3, 2015.
- ARAÚJO-FILHO, J. L. S. et al. Potential applications of the chemiluminescent methods in tumoral diseases investigation. **Int. J. Pharma. Bio Sci.**, v. 2, p. 392-400, 2011.
- ARAÚJO, J. M. G. et al. 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.
- ARAÚJO, L. C. C. et al. Evaluation of Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities of Extracts and Lectins from *Moringa oleifera* Seeds. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.
- BALZARINI, J. Large-molecular-weight carbohydrate-binding agents as HIV entry inhibitors targeting glycoprotein gp120. **Current Opinion HIV AIDS**, v. 1, n. 5, p.355–360, 2006.
- BARRAL-NETTO, M. et al. *In vivo* protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica** v. 60, p.237–250, 1996.
- BEZERRA, L. P. **Glicoproteínas séricas ligantes de lectinas de *Dioclea altíssima* no estudo de doenças prostáticas**. [Dissertação] Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Universidade Federal do Ceará - UFC. 2014.

BIANCO, K. G. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais da savana brasileira sobre *Streptococcus mutans* e a sua capacidade de desmineralização e a adesão à superfície de vidro.** [Dissertação] (Mestrado-Área de Concentração em Odontopediatria) Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista, Araçatuba, 2004

BIRENDRA, V. K. et al. A review on chikungunya virus. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, 2012.

BOTOS, I; WLODAWER, A. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 2, 2005.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 3ªed. **ESAM**. Fortaleza. v. 42, p. 540. 1976.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiol Serv Saude**. abrjun, v. 16, n. 2, p. 113–8, 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. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, p.130-139, 2004.

BRUSTEIN, V. P. et al. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. **Appl Biochem Biotechnol**, 2011.

CALJON, G.; VOOGHT, L. D.; ABBEELE, J. V. D. Options for the delivery of anti-pathogen molecules in arthropod vectors. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. S75-S82, 2013.

CAMPOS, L. M. et al. Acridinium Ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. **Biomarkers**, v. 11, p. 480 – 484, 2006

CANTANE, D. R. et al. **O Desenvolvimento da População do *Aedes aegypti* Aplicado ao Modelo de Otimização no Controle da Dengue.** 2016.

CARVALHO, C. E. S. et al. Anti-Leishmania activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action. **Experimental Parasitology**, v. 175, 2017

CAVELL, B. E. et al. Anti-angiogenic effects of dietary isothiocyanates: mechanisms of action and implications for human health, **Biochem. Pharmacol.** v. 81, p. 327–336, 2011.

CHAVES, L. F. et al. Hot temperatures can force delayed mosquito outbreaks via sequential changes in *Aedes aegypti* demographic parameters in autocorrelated environments. **Acta Tropica**, 2013.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction** vol. 1. Wallingford: CAB International, 1992.

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

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. **Fundação Oswaldo Cruz**. v. 228 p. 1998.

DROBNICA, L.; KRISTIAN, P.; AUGUSTIN, J. The chemistry of the \NCS group, *in*: PATAI, S. (Ed.), **The Chemistry of Cyanates and Their Thio Derivatives**, vol. 2, John Wiley & Sons, 1977.

FAO. Databook on endangered tree and shrub species and provenances. **FAO Forestry Paper** v. 77. Roma, 1986.

FARNESI, L. C. et al. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. **Journal of insect physiology**, v. 83, p. 43-52, 2015.

FÉRIR, G. et al. Broad anti-HIV activity of the *Oscillatoria agardhii* agglutinin homologue lectin family. **Journal Antimicrob. Chemother**, v. 69, p. 2746–2758, 2014.

FERREIRA, R. S. et al. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, P. 186-192, 2011.

FIMOGNARI, C.; HRELIA, P. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer, **Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.** v. 635, p. 90–104, 2007.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: Identificação, biologia**. Epidemiologia. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo. v. 2: 864 p, 2002.

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

FREIRE, J. E. C. et al. Análise cariotípica da planta [*Moringa oleifera* (LAM.)], um membro da família moringaceae, obtida no Campus do Pici–Universidade Federal do Ceará. **Revista Diálogos Acadêmicos**, v. 5, n. 1, 2017.

FREITAS, J. H. E. S. et al. Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Lectin as a Metal Remover in Aqueous Solutions. **Protein & Peptide Letters**, v. 23, 2016.

GARRIDO, M. A. O.; POGGIANI, F. Características silviculturais de cinco espécies indígenas plantadas em povoamentos puros e misto. **Silvicultura em São Paulo**, v. 13, p. 33–48, 1979.

GARY, P. B. Fall Retreat focuses on nanotechnology, tissue crossreactivity studies, guidances on National Formulary reference terminology, statistical consults for carcinogenicity studies, Pharm/Tox Web Page, Education Subcommittee updates. **News Along the Pike**, v. 12, p. 9–12, 2006.

GIRJAL, V. U.; NEELAQUND, S.; KRISHNAPPA, M. *Ganoderma lucidum*: a source for novel bioactive lectin. **Protein & Peptide Letters**, v. 18, 2011.

GOLTSEV, Y. et al. Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. **Developmental biology**, v. 330, n. 2, p. 462-470, 2009.

GONG, W. G. et al. Paeoniflorin diminishes ConA-induced IL-8 production in primary human hepatic sinusoidal endothelial cells in the involvement of ERK1/2 and Akt phosphorylation. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 62, p. 93-100, 2015.

GONZAGA, G. B. M. et al. Produção e Descarte de Resíduos na Construção Civil: Uma Forma de Combate ao *Aedes Aegypti*. **Caderno de Graduação-Ciências Exatas e Tecnológicas-UNIT-ALAGOAS**, v. 3, n. 3, p. 185, 2017.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**, v. 10, p.100-103, 2002.

GLUBER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The unholy Trinity of the 21st Century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, p. 3-11, 2011.

HERRERO, L. J. et al. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. **Pharmacology & therapeutics**, v. 137, n. 2, p. 266-282, 2013.

HIRAYAMA, M. et al. HighMannose Specific Lectin and Its Recombinants from a *Carrageenophyta Kappaphycus alvarezii* Represent a Potent Anti-HIV Activity Through High-Affinity Binding to the Viral Envelope Glycoprotein gp120. **Marine Biotechnolog**, v. 18, p.144–160, 2016

HUSKENS, D.; SCHOLS, D. Algal lectins as potential HIV microbicide candidates. **Marine drugs**, v. 10 p. 1476 -1497, 2012.

JOHNSON, B.W. et al. 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, p. 611-613, 2002.

KATRE, U. V. et al. Structure-activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 203-207, 2008.

KAUR, M. et al. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anticancer effect on human cancer cell lines. **Arch Biochem Biophys**. v. 445, p. 156–165, 2006.

KIM, P. S. G. et al. Soft X-ray excited optical luminescence (XEOL) studies of fluorescein isothiocyanate (FITC) and FITC-labeled proteins, **Chemical physics letters**, v. 392, n. 1, p. 44-49, 2004.

KONIEV, O.; WAGNER, A. Developments and recent advancements in the field of endogenous amino acid selective bond forming reactions for bioconjugation. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 15, p. 5495-5551, 2015.

KUCHARZ, E.J.; CEBULA-BYRSKA, I. Chikungunya fever. **European Journal of Internal Medicine**, v. 23, p.325-329, 2012.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.

LARA, F. J.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; AARON, J. J. Analytical applications of photoinduced chemiluminescence in flow systems - A review. **Anal. Chim. Acta**, v. 679, p. 17-30, 2010.

LEITE, E. J. State-of-knowledge on *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 5, n. 3, p. 193-206, 2002.

LI, J. S.; LI, J.. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 36, n. 12, p. 954-964, 2006.

LIMA, T. A. et al. Termiticidal lectins from *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) cause midgut damage when ingested by *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) workers. **Pest Manag Sci**, v. 73, 2016

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa. Plantarum, 2000.

LOUNIBOS, L. P. et al. Does temperature affect the outcome of larval competition between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*?. **Journal of Vector Ecology**, v. 27, p. 86-95, 2002.

LOZOVEI, A. L. Culicídeos (Mosquitos). In: MARCONDES, C.B. **Entomologia médica e veterinária vol. 1**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, p. 59-104, 2001.

LUZ, L. A. et al. Structural characterization of coagulant *Moringa oleifera* lectin and its effect on hemostatic parameters. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 31-36, 2013.

LUZ, L. A. et al. Cytotoxicity of the coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) to B16-F10 melanoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 44, 2017.

MAINIERI, C.; CHIMELO, J. P. **Fichas de características das madeiras brasileiras**. São Paulo: IPT, 1989.

MANRIQUE-SAIDE, P. et al. Use of insecticide-treated house screens to reduce infestations of dengue virus vectors, Mexico. **Emerg Infect Dis**, v. 21, n. 2, p. 308–11, 2015.

MARACAJA, P. B. et al. Efeito tóxico do extrato de flores de *Moringa oleifera* L. para abelhas *Apis mellifera* africanizadas, **ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.6, p. 33-37, 2010.

- MELO-JÚNIOR, M. R. et al. Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to *Helicobacter pylori*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 238-240, 2008.
- MENEZES, A. M. S.; RAO, V. S. N.; FONTELES, M. C. Anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva*. **Fitoterapia**, v. 57, p. 253–256, 1986
- MONNERAT, A. T. et al. *Anopheles albitarsis* eggs: ultrastructural analysis of chorion layers after permeabilization. **Journal of insect physiology**, v. 45, n. 10, p. 915-922, 1999.
- MONTANARI, R. M. et al. Exposure to anacardiácea volative oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells. **Molecules**, v. 17, p. 9728-9740, 2012.
- MONTEIRO, J. M. et al. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 173-186, 2006
- MOREIRA, M. F. et al. A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 12, p. 1249-1261, 2007.
- MORETI, L. O. R. et al. Emprego das sementes de *Moringa oleifera* LAM, como coagulante alternativo ao policloreto de alumínio (PAC), no tratamento de água para fins potáveis. **e-xacta**, v. 6, n. 1, p. 153-165, 2013.
- MOURA, M. C. et al. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **J Appl Microbiol**, v. 119, 2015.
- MOURA, K. S. et al. Coagulant Activity of Water-Soluble *Moringa oleifera* Lectin Is Linked to Lowering of Electrical Resistance and Inhibited by Monosaccharides and Magnesium Ions. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 180, 2016.
- NAPOLEÃO, T. H. et al. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.
- NAPOLEÃO, T. H. et al. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research** v. 110, 2012
- NAKURA, H. et al. High sensitive staining method. In: NAKURA H, NAGAMURA Y, TSUTSUMI Y, editors. **Watanabe–Nakano immunoenzymatic technique**. 4th ed. Tokyo: Gakusaikikaku Co., Ltd.; 2002. p. 136–62
- NARUZAWA, E. S.; PAPA, M. F. S. Atividade antifúngica de extratos de plantas do Cerrado brasileiro sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Corynespora cassiicola*. **Rev Bras Pl Med**, v. 13, n. 4, p. 408-412, 2011.

OLIVEIRA, C. F. R. et al. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 498-504, 2011.

OLIVEIRA, A. P. S. et al. Biotechnological value of *Moringa oleifera* seed cake as source of insecticidal lectin against *Aedes aegypti*. **Process Biochemistry**, v. 51, 2016.

OLIVEIRA, C. F. R. et al. A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. / **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2017.

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

PANDA, S. et al. Cardioprotective potential of N, α -L-rhamnopyranosyl vincosamide, an indole alkaloid, isolated from the leaves of *Moringa oleifera* in isoproterenol induced cardiotoxic rats: *in vivo* and *in vitro* studies. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 23, 2013.

PAIVA, P. M. G. et al. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 982- 989, 2011

PATRIOTA, L. L. S. et al. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 36–46, 2017.

PERERA, R.; KUHN, R.J. Structural Proteomics of Dengue Virus. **Current Opinion in Microbiology**, v.11, n.4, p. 369-377, 2008.

PEREIRA, M. L. **Aspectos estruturais, farmacológicos e toxicológicos de Mo-CBP4, uma proteína ligante à quitina de *Moringa oleifera* com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva via oral**. 2014. 211 f. [Tese] (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M Lectins as Plant Defense Proteins **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.

PODHRADSKY, D.; DROBNICA, L.; KRISTIAN, P. Reactions of cysteine, its derivatives, glutathione coenzyme A, and dihydrolipoic acid with isothiocyanates, **Experientia**, v. 35, p. 154–155, 1979.

RAMOS, D. B. M. et al. Antimicrobial Activity of *Cladonia verticillaris* Lichen Preparations on Bacteria and Fungi of Medical Importance. **Chinese Journal of Biology**, 2014.

RAO, V. S. N. et al. Effect of *Astronium urundeuva* Engl. (aroeira) in experimental colitis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.19, p. 568-569, 1986.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

REIS, E. A. G. et al. Potential immunomodulatory effects of plant lectins in *Schistosoma mansoni* Infection. **Acta Tropica**, v. 108, p. 160–165, 2008.

REZENDE, G. L. et al. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. **BMC developmental biology**, v. 8, n. 1, p. 82, 2008.

RIBEIRO J.; ARCA, B. From Sialomes to the Sialoverse: An insight into salivary potion of blood-feeding insects. In: **Advances in Insect Physiology**. London: Academic Press, pp. 59-118, 2009.

ROLIM, L. A. D. M. M. et al. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. **Journal of Food Science**, v. 76, p. T53-T58, 2011.

SÁ, R. A. et al. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p. 460–464, 2008.

SÁ, R. A. et al. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 149, p. 300-306, 2009.

SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC Microbiology**, v. 7, artigo 9, 2007.

SANTOS, A. F. S. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v. 39, n. 6, March 2005

SANTOS, A. F. S. et al. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504-508, 2009.

SANTOS, S. R. et al. Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 150-3, 2011.

SANTOS, A. S. F. et al. Coagulant properties of *Moringa oleifera* protein preparations: application to humic acid removal. **Journal Environmental Technology**, v. 33, 2012.

SANTOS, N. D. L. et al. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, v. 7, e0044840, 2014.

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

SILVA, A. C. **Madeiras da Amazônia: características Gerais, nome vulgar e usos**. Manaus: Sebrae, 2002.

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

SILVINO, P. P. et al. Uso de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (lentisco) por los agricultores en el tratamiento de enfermedades. **Rev. Cub Plant. Med.** v. 19, 2014.

SIM, S.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOLUOS, G. Dengue Virus Infection of the *Aedes aegypti* Salivary Gland and Chemosensory Apparatus Induces Genes that Modulate Infection and Blood-Feeding Behavior. **Plos Pathogens**, v.8, e1002631, 2012.

SHULSE, C. D.; SEMLITSCH, R. D.; TRAUTH, K. M. Mosquitofish dominate amphibian and invertebrate community development in experimental wetlands. **J Appl Ecol**. v. 50, n. 5, p. 1244–56, 2013.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n. 1, p. 9, 2007

SOUZA, V. C., LORENZI, V. C. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, ed. Instituto Plantarum, v. 2, p. 704, 2008.

SUMAN, D. S. et al. Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with egg surface morphology and morphometrics using scanning electron microscopy. **Arthropod structure & development**, v. 40, n. 5, p. 479-483, 2011.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18, 2011.

STRATHMANN, M; WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, n. 3, p. 237-248, 2002.

SULÁK, O. et al. *Burkholderia cenocepacia* BC2L-C Is a Super Lectin with Dual Specificity and Proinflammatory Activity. **Plos Pathogens**, v.7, p. 1-14, 2011

TAKAI, H. et al. The importance of characterization of FITC-labeled antibodies used in tissue cross-reactivity studies. **Acta Histochemica** v. 113, p. 472–476, 2011.

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

TOMORI, O. Yellow fever in Africa: public health impact and prospects for control in the 21st century. **Biomedica**, v. 22, p. 178-210, 2002.

URDANETA-MARQUEZ, L.; FAILLOUX, A. B. Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 253–261, 2011.

VARGAS, H. C. M. et al. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of insect physiology**, v. 62, p. 54-60, 2014.

WILDER-SMITH, A. et al. Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. **Current Infectious Disease Reports**, v.12, p.157-164, 2010.

ZARA, A. L. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

ZHANG, Y. S. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action, **Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.** v. 555, p. 173–190, 2004.

ZHANG, G. Q. et al. A novel lectin with antiproliferative activity from the medicinal mushroom *Pholiota adiposa*. **Acta Biochim Pol**, v. 56, p. 415–421, 2009

ZHANG, R. Y. et al. Use of lectins to in situ visualize glycoconjugates of extracellular polymeric substances in acidophilic archaeal biofilms. **Microbial biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 448-461, 2015.