

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AFONSO CORDEIRO AGRA NETO

**EFEITO DE LECTINAS DE *Moringa oleifera* NA SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE
DE ENZIMAS DE LARVAS DE *Aedes aegypti* SUSCEPTÍVEIS E RESISTENTES A
ORGANOFOSFORADO**

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA

CO-ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. LUANA C. B. B. COELHO

RECIFE

FEVEREIRO, 2012

AFONSO CORDEIRO AGRA NETO

**EFEITO DE LECTINAS DE *Moringa oleifera* NA SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE
DE ENZIMAS DE LARVAS DE *Aedes aegypti* SUSCEPTÍVEIS E RESISTENTES A
ORGANOFOSFORADO**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Co-orientadora: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

RECIFE

FEVEREIRO, 2012

Agra Neto, Afonso Cordeiro

Efeito de lectinas de *Moringa oleifera* na sobrevivência e atividade de enzimas de larvas de *Aedes aegypti* susceptíveis e resistentes a organosforado/ Afonso Cordeiro Agra Neto– Recife: O Autor, 2012.

68 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva

**Coorientadora: Luana Cassandra Breitenbach Barroso
Coelho**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. , 2012.**

Inclui bibliografia

- 1. Dengue 2. *Aedes aegypti* 3. Lectina I. Paiva, Patrícia Maria
Guedes II. Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso III.
Título.**

616.91852

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-139

**“EFEITO DE LECTINAS DE *Moringa oleifera* NA SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE
DE ENZIMAS DE LARVAS DE *Aedes aegypti* SUSCEPTÍVEIS E RESISTENTES A
ORGANOFOSFORADO”**

AFONSO CORDEIRO AGRA NETO

Banca Examinadora

PROF(A). DR^a. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA
ORIENTADORA/PRESIDENTE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PROF(A). DR^a. LUANA CASSANDRA BREITENBACH BARROSO COELHO
TITULAR
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PROF(A). DR^a. MÁRCIA VANUSA DA SILVA
TITULAR
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Dedico este trabalho à minha esposa
Andyara, pela paciência, incentivo e amor
durante os momentos de alegria e
dificuldades.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me fazer forte em momentos em que me senti fraco, por me dar sabedoria para compreender que a vontade é Dele e o querer também, pois para Ele nada é impossível, basta um querer e tudo é movido.

Aos meus queridos pais, Roberto e Leonize, pelos princípios e ensinamentos éticos transmitidos durante toda minha vida. Graças a educação que me deram, me tornei um homem digno e honesto.

À minha orientadora Patrícia, pela atenção e compreensão durante todo o curso de mestrado. Espero poder sempre retribuir a confiança em mim depositada. Sua simplicidade, carisma e competência foram, indubitavelmente, a mola propulsora para que eu continuasse determinado a alcançar meus objetivos.

Às minhas irmãs queridas, Manuella, Camilla e Melina, que sempre me apoiaram e comemoraram as minhas conquistas. Tenho orgulho das profissionais, mulheres e mães que se tornaram.

Aos meus sobrinhos e sobrinhas, pelo simples fato de existirem. Em momentos difíceis, a inocência deles me trouxe tranquilidade e esperança.

Aos meus sogros e cunhados, pela preocupação constante com minha vida acadêmica. Agradeço por tê-los como minha família.

Aos meus cunhados (esposos de minhas irmãs), que mesmo sem saberem, me ajudaram pelo simples fato de proporcionarem momentos de descontração.

Às professoras Luana Coelho e Márcia Vanusa, por estarem solícitas a todo instante e por aceitarem o convite para participar de um momento tão especial para mim.

Ao amigo Igor, que sempre proporcionou momentos de descontração com sua constante irreverência. E por sempre demonstrar preocupação ao me lembrar continuamente de assuntos burocráticos da Universidade.

Ao amigo Thiago Henrique, pela pessoa simples e prestativa que sempre foi durante todo o mestrado. Estou pra conhecer alguém mais prestativo.

À amiga Luciana, que durante minha chegada no Laboratório de Glicoproteínas ensinou-me paciente e didaticamente todas as técnicas desenvolvidas.

Aos meus amigos de laboratório: Emanuel, Lidiane, Nataly, Mayara, Kézia, Ana Patrícia, Thâmara, Fabiana (Lipídios), Livia, Gisele, Juan, Rayana, Francis e Idila, por proporcionarem momentos de alegria dentro e fora do Laboratório.

Aos meus amigos Alan, Marek e Lira, pela amizade sincera desde início do mestrado.

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia Química, em especial a professora Dr^o Daniela Navarro, pela cordialidade durante os experimentos desenvolvidos em parceria.

Ao pessoal do Departamento de Entomologia do Ageu Magalhães por me permitirem realizar parte dos experimentos em seus laboratórios.

RESUMO

O controle do vetor, *Aedes aegypti*, é a melhor estratégia para combater as epidemias de dengue. No entanto, o uso contínuo de inseticidas sintéticos tem levado ao aparecimento de populações resistentes. Sementes de *Moringa oleifera* contêm as lectinas WSMoL ((water-soluble *M. oleifera* lectin) and cMoL (coagulant *M. oleifera* lectin). WSMoL tem atividade larvívica (LC_{50} of 0.197 mg/ml) em larvas de *A. aegypti* de quarto estágio (L_4) susceptíveis a organofosforado (Rockefeller). Este estudo relata o efeito de cMoL (0.1–0.8 mg/ml) na sobrevivência de L_4 susceptíveis (Rockefeller), bem como, o efeito de WSMoL (0.1–0.8 mg/ml) e cMoL (0.1–0.8 mg/ml) em L_4 resistentes a organofosforado (Rec-R). Além disso, extratos de L_4 susceptíveis (Rockefeller) e L_4 resistentes a organofosforado (Rec-R) foram testados para enzimas digestivas (protease, tripsina e α -Amylase) e detoxificantes (superóxido dismutase e α - e β -esterases) na presença de WSMoL e cMoL. cMoL não foi agente larvívica para L_4 de Rockefeller. WSMoL e cMoL não promoveram mortalidade de Rec-R. WSMoL estimulou as atividades de protease, tripsina e α -Amylase de L_4 de Rockefeller, enquanto cMoL inibiu estas enzimas. WSMoL não teve nenhum efeito sobre atividade de tripsina em L_4 de Rec-R, porém inibiu atividade de protease e α -amylase. cMoL inibiu a atividade de tripsina, enquanto não interferiu nas proteases e α -amylase de Rec-R. cMoL inibiu atividade de SOD em Rockefeller e Rec-R mais que WSMoL., enquanto atividade de β -esterase de L_4 Rockefeller foi mais inibida por WSMoL. As lectinas promoveram baixo efeito (estimulação ou inibição) na atividade de α -esterase de ambas as populações. O estudo revela que WSMoL e cMoL afetam diferentemente a sobrevivência de L_4 de Rockefeller e enzimas de Rockefeller e Rec-R. A protease, tripsina e SOD foram as enzimas mais sensíveis para WSMoL e cMoL. Atividade larvívica de WSMoL em Rockefeller pode ser relacionada a estimulação da atividade de protease e tripsina.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*; *Aedes aegypti*; atividade larvívica; enzimas digestivas; enzimas detoxificantes; lectina.

ABSTRACT

The control of vector (*Aedes aegypti*) is the best strategy to combat dengue epidemics. However, the continuous use of synthetic insecticides has led to the emergence of resistant populations. *Moringa oleifera* seeds contain the lectins WSMoL (water-soluble *M. oleifera* lectin) and cMoL (coagulant *M. oleifera* lectin). WSMoL has larvicidal activity (LC₅₀ of 0.197 mg/ml) on *A. aegypti* organophosphate-susceptible (Rockfeller) fourth stage larvae (L₄). This study reports the effect of cMoL (0.1–0.8 mg/ml) on survival of Rockfeller L₄ as well as the effect of WSMoL and cMoL (0.1–0.8 mg/ml) on organophosphate-resistant (Rec-R) L₄. Also, extracts from Rockfeller and Rec-R L₄ were assayed for digestive (amylase, trypsin and protease) and detoxifying (superoxide dismutase – SOD –, as well as α - and β -esterases) enzymes in presence of WSMoL and cMoL. cMoL was not a larvicidal agent on Rockfeller L₄. WSMoL and cMoL did not promote mortality of Rec-R L₄. WSMoL stimulated protease, trypsin-like and α -amylase activities from Rockfeller L₄ while cMoL inhibited these enzymes. WSMoL had no effect on trypsin-like activity from Rec-R L₄ while inhibited protease and α -amylase activities. cMoL inhibited trypsin-like activity while did not interfere on proteases and α -amylase from Rec-R. cMoL inhibited SOD activities from Rockfeller and Rec-R L₄ more than WSMoL, while β -esterase activity from Rockfeller L₄ was more inhibited by WSMoL. The lectins promoted low effect (stimulation or inhibition) on α -esterase activities from both populations. The study reveals that WSMoL and cMoL differently affect survival of Rockfeller L₄ and enzymes from Rockfeller and Rec-R L₄. Protease, trypsin-like and SOD activities were the most sensible enzymes to WSMoL and cMoL. Larvicidal activity of WSMoL on Rockfeller L₄ can be related to stimulation of protease and trypsin-like activities.

Keywords: *Moringa oleifera*; *Aedes aegypti*; larvicidal activity; digestive enzymes; detoxifying enzymes; lectin.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Incidência de dengue por município no Brasil em 2008.	11
Figura 2. Taxa de Incidência de dengue no Brasil e suas grandes Regiões de 1990 até 2009.	15
Figura 3. Ciclo biológico do <i>Aedes aegypti</i> .	18
Figura 4. <i>Moringa oleifera</i> . Aspecto geral. Sementes.	27

ARTIGO

Table 1. Mortality rate (%) of <i>A. aegypti</i> Rockfeller and Rec-R L ₄ after incubation with WSMoL and cMoL	54
Figure 1. Effect of WSMoL and cMoL on digestive enzymes from <i>A. aegypti</i> Rockfeller L ₄	55
Figure 2. Effect of WSMoL and cMoL on digestive enzymes from <i>A. aegypti</i> Rec-R L ₄ .	56
Figure 3. Effect of WSMoL and cMoL on detoxificant enzymes from <i>A. aegypti</i> Rockfeller L ₄ .	59
Figure 4. Effect of WSMoL and cMoL on detoxificant enzymes from <i>A. aegypti</i> Rec-R L ₄ .	60

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	11
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1. Dengue	14
2.2. O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	16
2.3. Resistência a inseticidas	18
2.3.1. Atividade enzimática no desenvolvimento da resistência de <i>A. aegypti</i>	20
2.3.2. Populações resistentes de <i>A. aegypti</i> no Brasil	21
2.4. Produtos naturais como alternativas para o controle do <i>A. aegypti</i>	23
2.4.1. Lectinas	23
2.4.1.1. Caracteres gerais	23
2.4.1.2. Atividade inseticida de lectinas	24
2.5. <i>Moringa oleifera</i>	26
2.5.1. Lectinas de <i>M. oleifera</i>	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. REFERÊNCIAS	31
5. ARTIGO	42
6. CONCLUSÃO	68

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a dengue tornou-se uma doença viral de grande interesse para aos órgãos de saúde pública nacionais e internacionais. Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas no mundo vivem em áreas de risco de transmissão desta doença. Epidemias de dengue clássica e dengue hemorrágica vêm ressurgindo nos últimos 25 anos em regiões tropicais do planeta que apresentam clima quente, úmido e condições sócio-ambientais favoráveis para a proliferação do mosquito-vetor, o *Aedes aegypti* (SILVA *et al.*, 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). No Brasil, desde 1982 ocorrem epidemias de dengue periodicamente como, por exemplo, no ano 2008 (Figura 1), registrando-se em anos diferentes a circulação dos sorotipos virais, DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (BARRETO & TEIXEIRA, 2008).

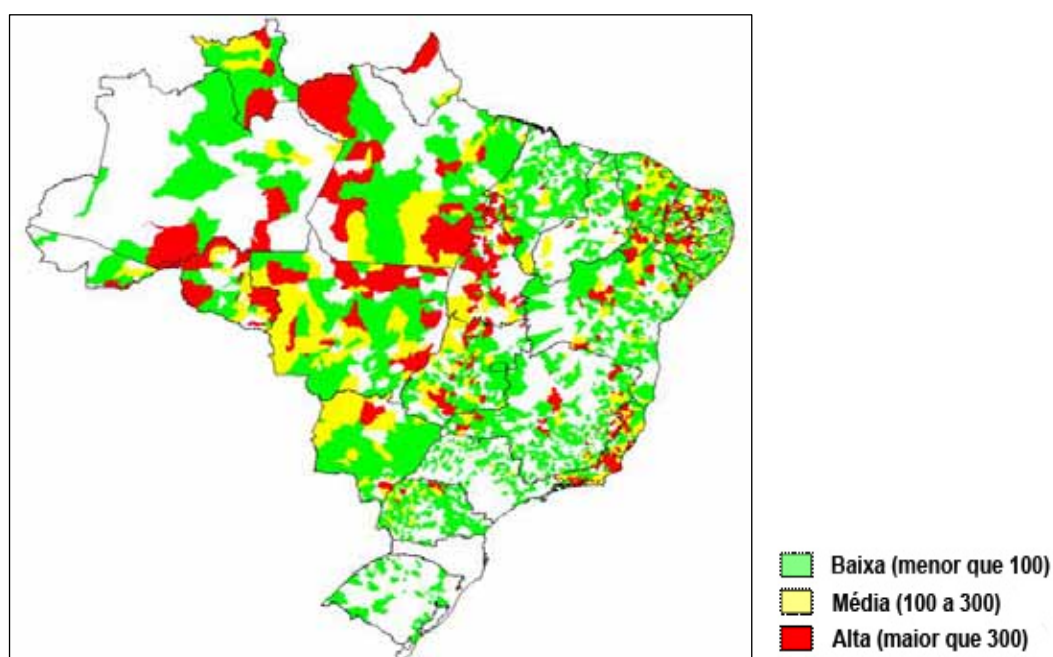


Figura 1. Incidência de dengue por município no Brasil em 2008.

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

Por não haver vacina contra os quatro sorotipos virais, o controle vetorial torna-se a estratégia mais viável no combate a dengue. (GUIRADO e BICUDO, 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). Este controle vem sendo realizado através de inseticidas sintéticos adulticidas e larvicidas (LUNA *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2006). No entanto, além do alto custo, o uso freqüente deles pode ocasionar contaminação ambiental, danos a saúde pública, e ainda, o aparecimento de populações resistentes (OGA, 2003; BRAGA & VALLE., 2007; SILVA *et al.*, 2008). A ocorrência destes problemas vem motivando pesquisas voltadas à descoberta de compostos bioativos de origem vegetal com potencial inseticida, pois os mesmos são biodegradáveis, possuem baixo impacto ambiental e retardam a mudança de susceptibilidade e resistência (MONTEIRO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2007; SIMAS *et al.*, 2007; GERIS *et al.*, 2008).

A resistência a inseticidas químicos resulta de um processo de evolução acelerada que ocorre em populações que estão submetidas continuamente a pressão seletiva. Dessa forma, ocorre a seleção e sobrevivência de indivíduos portadores de mutações aleatórias que condicionam fatores de resistência. Os mecanismos que estão provavelmente envolvidos na resistência aos compostos sintéticos são: diminuição da taxa de penetração pela cutícula, diminuição da sensibilidade do sítio-alvo e detoxificação metabólica aumentada (BRAGA & VALLE, 2007). É de grande interesse a descoberta de novos agentes inseticidas que promovam mortalidade de larvas de populações resistentes. Compostos de origem vegetal com atividade inseticida têm sido investigados quanto aos seus efeitos sobre enzimas detoxificantes de insetos, visando identificar agentes com efeito inibitório que possam ser utilizados como sinergistas visando aumentar ou reestabelecer a susceptibilidade aos inseticidas rotineiramente usados.

As lectinas são proteínas capazes de reconhecer e interagir com carboidratos e glicoconjugados presentes em superfícies celulares (CORREIA *et al.*, 2008) As lectinas de

plantas vêm sendo amplamente investigadas devido ao potencial inseticida contra espécies de diferentes ordens como Coleoptera, Diptera, Homoptera e Lepidoptera (LAM & NG, 2011).

Os mecanismos que explicam os efeitos entomotóxicos das lectinas ainda não são bem conhecidos. Alguns estudos indicam a estabilidade delas contra ação de proteases digestivas dos insetos (MACEDO *et al.*, 2007; NAPOLEÃO *et al.*, 2011), bem como, a ligação a gliconjugados do epitélio intestinal, quitina da matriz peritrófica, enzimas glicosiladas solúveis no intestino e componentes da hemolinfa (PEUMANS e VAN DAMME, 1995; FITCHES *et al.*, 2001; SÁ *et al.*, 2009; MICHIELS *et al.*, 2010).

A *Moringa oleifera* (Moringaceae), planta originária da Índia, vem despertando interesse devido ao seu potencial biotecnológico. Duas lectinas, denominadas cMoL (do inglês *coagulant M. oleifera* lectin) e WSMoL (do inglês *water-soluble M. oleifera* lectin) foram isoladas de suas sementes (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009). A primeira apresentou atividade coagulante e inseticida sobre *Anagasta kuehniella* (SANTOS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011). WSMoL retardou o desenvolvimento larval de *A. aegypti* e foi larvicida contra o quarto estágio larval deste inseto (COELHO *et al.*, 2009). Além disto, a WSMoL apresentou atividades antibacteriana e coagulante e não apresentou efeitos mutagênico e genotóxico nas concentrações de 0,0125 a 0,8 µg/ml, indicando a segurança de seu uso para tratar água para consumo humano (FERREIRA *et al.*, 2011; ROLIM *et al.*, 2011).

A atividade larvicida de WSMoL sobre larvas de *A. aegypti* estimulou a avaliação do seu efeito sobre uma população resistente a inseticidas organofosforado, bem como do potencial larvicida de cMoL. O presente trabalho tem por objetivos ainda determinar o efeito das lectinas sobre atividades de enzimas digestivas (protease, tripsina e α -amilase) e detoxificantes (superóxido dismutase, glutathione-S-transferases e esterases) em extratos das larvas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Dengue

A dengue é uma doença infecciosa que ocorre em áreas tropicais e subtropicais do mundo. Encontra-se disseminada em mais de 100 países das Américas, África, Sudeste da Ásia, ilhas do Pacífico e leste do Mediterrâneo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). Estas regiões, principalmente os países tropicais, apresentam clima quente, úmido e condições sócio-ambientais favoráveis para a proliferação do mosquito-vetor, o *A. aegypti*. Nos últimos 50 anos, a incidência de dengue aumentou 30 vezes devido à expansão geográfica para novos países e aumento de casos em áreas rurais. Por ser de rápida propagação, estima-se que 50 milhões de infecções ocorram anualmente no mundo, tornando-se assim, uma preocupação para segurança da saúde pública global (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009, SILVA *et al.*, 2008). No Brasil, entre 1990 e 2010 (Figura 2) verificou-se um aumento significativo da taxa de incidência de dengue, sendo registrados 40.279 casos em 1990, enquanto que em 2009 houve 393.583 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

O agente etiológico da dengue é um vírus de RNA pertencente à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*. Existem quatro sorotipos com alta variabilidade genotípica: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. Todos eles podem ser transmitidos através da picada do inseto contaminado, acometendo a população em geral (FORATTINI, 2002, RIBEIRO, 2006; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

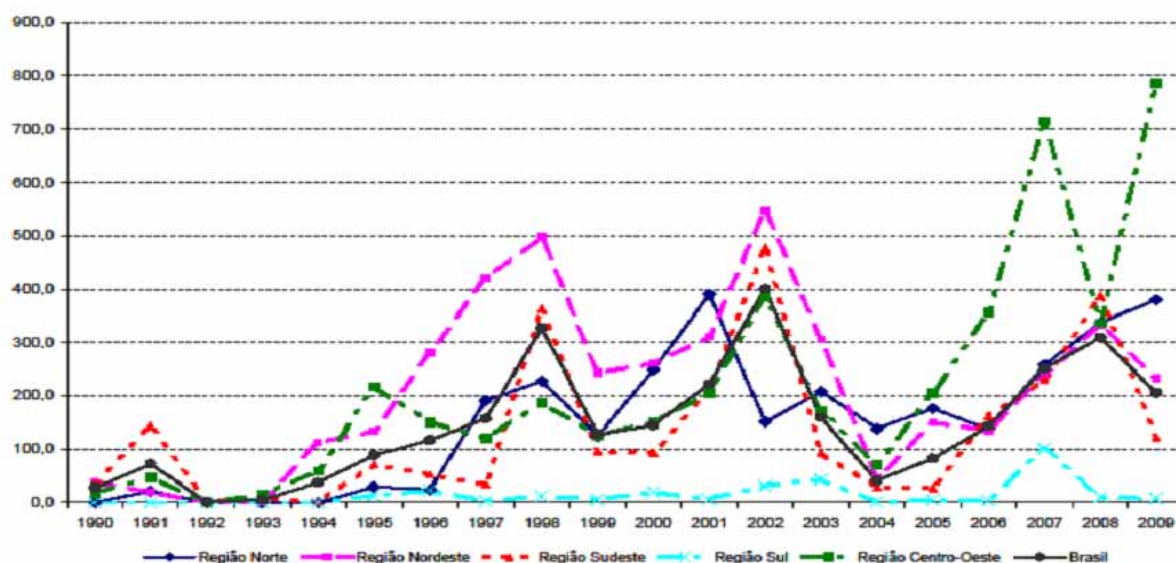


Figura 2. Taxa de Incidência de dengue no Brasil e suas grandes Regiões de 1990 até 2009.

Fonte: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011

Após 3 a 14 dias da picada, os sintomas da dengue clássica aparecem, envolvendo febre moderada à alta, fortes dores na cabeça, olhos, músculos e articulações. Manifestações mais graves podem ocorrer em casos de reinfecções, como por exemplo, hemorragias intensas e síndrome do choque devido à redução brusca da pressão arterial, caracterizando a forma severa da doença, a dengue hemorrágica. O tratamento na fase febril é sintomático, enquanto na fase crítica requer monitoramento contínuo da pressão arterial, hematócrito, contagem de plaquetas, débito urinário, manifestações hemorrágicas e grau de consciência. Tais procedimentos são de extrema importância para evitar aumento dos índices de mortalidade (SINGHI, 2007; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). Alguns dos fatores que dificultam o êxito das estratégias de controle e prevenção das epidemias de dengue são: a) a complexa dinâmica da infecção; b) as peculiaridades da resposta imune-humana; c) a eficiência vetorial; d) as características sociais, econômicas e ambientais; e) a inexistência de uma vacina; f) limitação dos atuais métodos de avaliação entomológica para a predição de ocorrência da transmissão de dengue; e g) a possibilidade da ocorrência de resistência do

vetor aos inseticidas em uso (BARRETO & TEIXEIRA., 2008; COELHO, 2008). O combate ao *A. aegypti* ainda é medida preventiva mais viável e aplicada, pois o vetor permanece como o único elo vulnerável na cadeia de transmissão da doença (TAUIL, 2002).

2.2 O mosquito *Aedes aegypti*

O *A. aegypti* (Linnaeus, 1762) é uma espécie tropical e subtropical originária provavelmente da África, pertencente à Ordem Diptera e à família dos culicídeos. Nesta família, os indivíduos desta espécie são os que mais estão associados ao homem apresentando comportamento antropofílico, doméstico, com atividade hematofágica diurna e utilizando-se preferencialmente de depósitos artificiais de água limpa para colocar seus ovos (HIRAGI *et al.*, 2009). Podem ser encontrados em todo o mundo, havendo predomínio em regiões com latitudes entre 35° N e 35° S e altitude abaixo de 1000 metros. Apresentam grande capacidade de adaptação a diferentes situações ambientais, já tendo sido encontrados adultos em altitudes elevadas e larvas em águas poluídas (BESERRA *et al.*, 2009).

No Brasil, o *A. aegypti* é conhecido desde o século XVII, a partir de uma epidemia de febre amarela, doença também transmitida pelo vetor, ocorrida em Recife em 1685 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Já o primeiro caso de dengue no país foi registrado em 1920, sendo a doença erradicada na década de 50 (NOGUEIRA *et al.*, 1999; TAUIL, 2002;). No entanto, a partir de 1976 o mosquito ressurgiu no Rio de Janeiro e Salvador e daí em diante houve dispersão para os demais estados (PONTES & RUFFINO-NETO, 1994). Em 1998, a infestação abrangia todos estados brasileiros e em 2001 e 2002 registrou-se grave epidemia com altos níveis de incidência; recentemente, o vetor ainda encontra-se intensamente distribuído, abrangendo 3970 municípios (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999, 2002, 2009). Tal proliferação no país, segundo Taui (2002), deve-se a múltiplos fatores

condicionantes, tais como: fluxo rural-urbano resultando em alta concentração populacional nas cidades, que por sua vez, gera más condições de habitação e saneamento básico associado com inadequadas formas de abastecimento de água e coleta de dejetos; o intenso uso industrial de embalagens descartáveis, que por serem coletados irregularmente propiciam a multiplicação do mosquito; e ainda o aumento da produção de veículos automotores, que consequentemente, gera uma quantidade maior de pneus usados dispostos irregularmente no meio ambiente, permitindo assim, a fácil oviposição e o transporte passivo de ovos e larvas.

O ciclo biológico do *A. aegypti* (Figura 3) compreende a fase de ovo, quatro estágios larvais (L₁, L₂, L₃ e L₄), pupa e adulto. Os ovos são bastante resistentes, mantêm-se viáveis por até 2 anos, suportando a ausência de água por 450 dias através de seu poder de quiescência. São depositados acima do nível da água nas paredes de recipientes e eclodem logo que entram em contato com a água (SILVA *et al.*, 1998; TAUILL., 2002). Já os estágios larvais são exclusivamente aquáticos e caracterizam-se por um período de crescimento e alimentação que tem duração dependente de fatores como temperatura, disponibilidade de alimento e densidade de indivíduos nos recipientes.

As larvas alimentam-se de material orgânico acumulado no fundo ou na parede destes recipientes. Em condições adequadas, o período entre a eclosão e a fase de pupa pode durar 5 dias, porém, normalmente apresenta duração entre 7 e 14 dias. A pupa, que possui duração de 2 a 3 dias (em condições ideais), também é aquática e encontra-se na superfície da água devido a sua capacidade de flutuação, favorecendo assim, a emergência do adulto (ALDAMA *et al.*, 2001; BESERRA *et al.*, 2006).

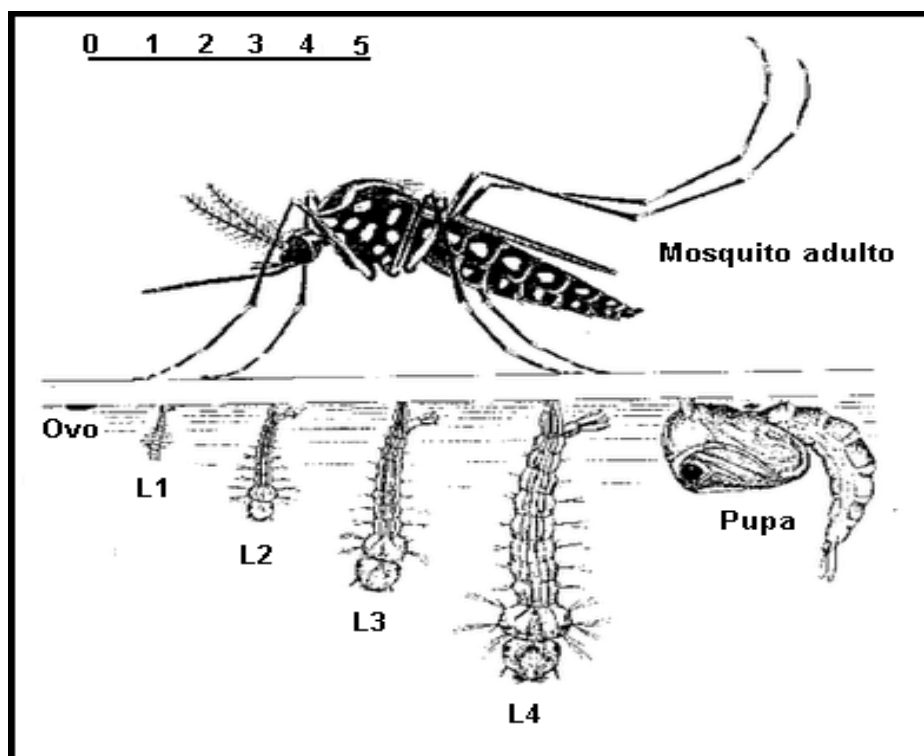


Figura 3. Ciclo biológico do *Aedes aegypti*

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

Os adultos, que representam a fase reprodutiva, sobrevivem vários meses em laboratório, porém em condições naturais duram apenas algumas semanas (30 a 35 dias, em média). Podem acasalar, geralmente durante o voo ou em superfície, 24 horas após a emergência. Tanto os machos quanto as fêmeas alimentam-se de seiva vegetal, sendo que elas nutrem-se frequentemente de sangue, adquirindo através do repasto sanguíneo proteínas necessárias para o desenvolvimento de seus ovos. Através deste comportamento hematofágico e antropofílico, a fêmea pode transmitir a dengue após 8 a 12 dias de um repasto contaminado (MONATH, 1994; GUBLER, 1998; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

2.3. Resistência a inseticidas

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a resistência a inseticidas químicos corresponde a habilidade que uma população de insetos possui em tolerar doses normalmente letais. Braga e Valle (2007) consideram a resistência a inseticidas como um processo de evolução acelerada que ocorre em populações que sofrem mutações aleatórias e estão submetidas continuamente a pressão seletiva, gerando assim, a sobrevivência e seleção de indivíduos portadores de alelos que condicionam tal resistência. Ainda neste contexto, esses autores afirmam que a modificação genética não é causada diretamente pelos inseticidas, mas pelo o uso contínuo destes. Os inseticidas químicos mais utilizados nos programas de controle pertencem aos grupos dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, todos atuantes no sistema nervoso central dos insetos (MELLON & GEORGHIOU, 1984; PALCHICK, 1996).

Os mecanismos que estão provavelmente envolvidos na resistência aos compostos sintéticos são: diminuição da taxa de penetração pela cutícula, diminuição da sensibilidade do sítio-alvo e detoxificação metabólica aumentada (CARINO *et al.*, 1994; FERRARI, 1996; PRIESTER *et al.*, 1980; RAYMOND *et al.*, 1998). Destes, o último é o mais estudado, sendo denominado de resistência metabólica, na qual ocorre aumento da expressão de enzimas detoxificantes capazes de impedir a interação do inseticida com seu respectivo alvo. Estas enzimas dividem-se em dois grupos: enzimas de fase 1, representadas pelas monooxigenases e esterases, capazes de adicionar um grupo polar reativo no composto exógeno tornando-o substrato para as enzimas de fase 2, representadas pelas glutathione-S-transferases, que detoxificam os inseticidas sintéticos catalisando a conjugação do grupo hidrofílico SH da glutathione reduzida (GSH) ao centro eletrofílico de compostos lipofílicos (HEMINGWAY & RANSON., 2000; BRAGA & VALLE, 2007, CARVALHO, 2008). A relação do metabolismo enzimático com a resistência a inseticidas sintéticos pode ser

evidenciada através de testes de atividade enzimática e bioensaios com inibidores sinergistas (como butóxido de piperonil) (BERGE, *et al.*, 1998, SCOTT, *et al.*, 1999).

O surgimento de populações resistentes decorre ainda de fatores operacionais, que correspondem ao uso inadequado dos produtos com relação à classe, formulação, concentração, método de aplicação e frequência de tratamento (CRUZ, 2002; CARVALHO *et al.*, 2004; BARRETO, 2005). Tal resistência é considerada, hoje, objeto central de estudos que tratam de vetores de doenças (LUNA *et al.*, 2004; GUIRADO & BICUDO, 2009).

2.3.1 Atividade enzimática no desenvolvimento de resistência em *A. aegypti*

Bisset *et al.* (2005) constataram elevada frequência de esterases (44%) em cepas de *A. aegypti* resistentes a carbamatos e organoclorados coletadas em Playa-Cuba e Rodriguez *et al.* (2004) detectaram elevada atividade destas enzimas em cepas resistentes de outro município cubano chamado Guanabacoa. Posteriormente, estes mesmos autores detectaram elevados níveis de esterases e glutathione-transferase (GST) em cepas resistentes (SAN-F6 e SAN-F12) a piretroides (RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

No Peru, não só as esterases, mas também as monooxigenases, glutathione-transferase (GST) e acetilcolinesterases alteradas (AChE) desempenharam importante papel em larvas resistentes a organofosforados (BISSET *et al.*, 2007). Na Colômbia, as esterases também apresentaram elevado metabolismo em larvas de *A. aegypti* resistentes ao piretróide lambdacialotrina (VARON *et al.*, 2010). Há ainda registros de populações com metabolismo enzimático associado a resistência aos piretróides permetrina no México e deltametrina em Cuba (LOGJAM *et al.*, 2005). Atividade aumentada de esterases foi detectada em indivíduos de populações de *A. aegypti* provenientes de municípios do interior de São Paulo (Araçatuba, Campinas, Marília e Santos) e Porto Velho-RO; a elevação da atividade de GST foi

constatada em mosquitos vindos de Porto Velho-RO; as monooxigenases tiveram sua atividade aumentada nos insetos originados de Araçatuba e Santos (BRAGA & VALLE., 2007). Em pesquisa desenvolvida no Brasil, entre 2001 e 2004, Montella *et al* (2007) constataram aumento crescente da atividade de GST e de esterases. Observa-se que no Brasil as cepas de *A. aegypti* resistentes apresentam maiores níveis de esterases vinculados a tolerância aos inseticidas químicos.

2.3.2 Populações resistentes de *A. aegypti* no Brasil

No Brasil, durante as campanhas nacionais contra a dengue, verifica-se que o combate ao *A. aegypti* continua sendo feito através do uso de inseticidas químicos sintéticos, principalmente organofosforados e piretróides. Estes inseticidas são utilizados frequentemente, o que tem ocasionado o surgimento de populações resistentes, dificultando ou inviabilizando os programas de controle. A ocorrência de populações resistentes de *A. aegypti* a estes compostos químicos vem, ao longo dos anos, sendo estudada e registrada em diferentes regiões do país.

Andrade e Modolo (1991), após detectarem sobrevivência de algumas larvas (coletadas em 1987 no município de Campinas-SP) tratadas com temefós nas concentrações de 0,025 ppm e 0,05 ppm sugeriram a possibilidade de resistência. Dez anos depois, submetidos ao mesmo organofosforado, larvas coletadas no mesmo município (campus da Unicamp) indicaram resistência potencial à concentração-diagnóstico (CD) de 0,04 ppm e sobrevivência de 24,5% no teste de concentração múltipla à concentração de 0,0125 ppm (CAMPOS & ANDRADE., 2001).

Em pesquisa realizada no Distrito Federal, entre 2000 e 2001, Carvalho *et al.* (2004) constataram, no primeiro ano, resistência em populações de *A. aegypti* nas cidades de

Taguatinga e Guará e no Núcleo Bandeirantes, havendo mortalidade larval entre 54,1% a 63,4%. No ano seguinte, registraram a presença de populações resistentes nestas mesmas localidades, como também, em outros municípios que não tinham apresentado tal característica, e com isso, concluíram que a susceptibilidade aos inseticidas no Distrito Federal vem se alterando progressivamente. Neste mesmo ano, Braga *et al.* (2004) ao avaliar os dados de 12 municípios pertencentes aos estados do Rio de Janeiro, Sergipe e Alagoas, detectaram a ocorrência de populações resistentes em todos eles.

Em 2003, Luna *et al.* (2004) realizaram estudo pioneiro sobre a susceptibilidade de populações de *A. aegypti* na cidade de Curitiba no estado do Paraná, no qual destacaram a ineficiência e inviabilidade do piretróide cipermetrina no controle das populações existentes neste município. No Ceará, Lima *et al.* (2006) detectaram razão de resistência ao temefós entre 8 e 16 em populações coletadas nos municípios de Fortaleza, Barbalha, Juazeiro do Norte e Crato. Na Paraíba, Beserra *et al.* (2007) constataram resistência moderada e média nos municípios de Lagoa do Mato, Capim de Cheiro, Boqueirão e Brejo dos Santos.

Macoris *et al.* (2003), ao estudarem diferentes cepas de *A. aegypti* em dez municípios paulistas, constataram resistência em baixo nível em cepas coletadas na cidade de Santos. Observaram também, resistência em populações de adultos da região de São Paulo a piretróides (cipermetrina e permetrina) após 10 anos de uso contínuo destes inseticidas nesta região. Recentemente, foram constatadas alterações no status de susceptibilidade em populações do vetor em alguns municípios do Paraná, destacando-se Foz do Iguaçu com comprovada resistência ao temefós nos setores Sul (77.50%) e Norte (75.94%) (PROPHIRO *et al.*, 2011). Em Minas Gerais, no município de Coronel Fabriciano, Horta *et al.* (2011) detectaram uma grande redução da mortalidade em população exposta a uma concentração diagnóstica de 0,012 mg/ml de temefós.

2.4. Produtos naturais como alternativas para o controle do *A. aegypti*

O uso freqüente e irracional de inseticidas sintéticos está associado a sérios problemas, como por exemplo: alto custo; desequilíbrio do meio ambiente através da eliminação de organismos não-alvo e contaminação do solo, água, atmosfera e seres vivos; danos à saúde pública causados pelo manuseio inadequado dos inseticidas e/ou excesso de exposição; desenvolvimento de resistência do mosquito mediante seleção dos indivíduos geneticamente resistentes (CARVALHO *et al*, 2004; BARRETO, 2005; BRAGA e VALLE, 2007). Este tipo de controle não tem obtido sucesso no Brasil por estes motivos e pelo fato do mosquito apresentar grande habilidade em adaptar-se a novos ambientes que surgem devido a urbanização acelerada (FUNASA, 2001; BRAGA & VALLE, 2007). Este cenário vem motivando pesquisadores a desenvolverem estudos em busca de produtos naturais que possam oferecer efetivo controle do *A. aegypti*, com maior segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica, aplicabilidade e baixo impacto ambiental. O potencial inseticida de diversas substâncias de origem vegetal tem sido demonstrado na literatura, incluindo as lectinas.

2.4.1 Lectinas

2.4.1.1. Caracteres Gerais

As lectinas são proteínas que se ligam reversível e seletivamente a resíduos específicos de carboidratos através de ligações de hidrogênio e pontes de Van der Waals entre as faces hidrofóbicas do açúcar e as cadeias laterais aromáticas de aminoácidos (FRANCO-FRAGUAS *et al.*, 2003; CORREIA *et al.*, 2008;). Essas proteínas estão presentes em vírus,

bactérias, animais e vegetais (VIJAYAN & CHANDRA., 1999). Nas plantas, podem ser encontradas em diferentes partes, podendo ser isoladas de sementes (SANTOS *et al.*, 2009), folhas (NAPOLEÃO *et al.*, 2011), cascas (SÁ *et al.*, 2009), raízes (SOUZA *et al.*, 2011) e flores (ITO, 1986). São encontradas em maior quantidade nas sementes e podem variar em sua estrutura e especificidade a carboidratos (CORREIA *et al.*, 2008; VAN DAMME *et al.*, 2008). As lectinas podem ser detectadas numa amostra através de um simples ensaio de hemaglutinação e isoladas por diferentes técnicas de purificação, incluindo cromatografias de afinidade, troca iônica, interação hidrofóbica, filtração em gel e outras (LAM & NG, 2011).

As lectinas apresentam um amplo espectro de especificidade em relação aos carboidratos, podendo reconhecer os simples e os mais complexos, como o *N*-acetilglicosamina e ácidos *N*-glucurônico, galacturônico, xilurônico, L-idurônico, siálico e *N*-acetilmurâmico (VAN DAMME *et al.*, 1996). Possuem em sua estrutura tridimensional uma sequência de resíduos conservados no sítio de ligação aos carboidratos que determina sua especificidade. Quando são monovalentes, isto é possuem apenas um domínio de ligação são classificadas como merolectinas; se tiverem ao menos dois domínios idênticos são chamadas de hololectinas; havendo um ou mais domínios de ligação e outro com função diferente são denominadas quimerolectinas; e as superlectinas possuem pelo menos dois domínios de ligação a açúcares diferentes (VAN DAMME *et al.*, 1996).

2.4.1.2. Atividade inseticida de lectinas

A diversidade de estruturas de glicanos encontrada em insetos permite que lectinas com diferentes especificidades interfiram em diferentes processos fisiológicos (MICHIELS *et al.*, 2010). O potencial inseticida tem sido detectado contra várias espécies, dentre elas: Coleoptera, Diptera, Homoptera e Lepidoptera. As lectinas interferem em diversos

parâmetros como peso larval, tamanho, coloração, mortalidade, alimentação, tempo total de desenvolvimento ou emergência e ainda fecundidade dos adultos. Alguns mecanismos que explicam o efeito entomotóxico vêm sendo sugeridos, e dentre eles destacam-se: ligação da lectina a gliconjugados expostos nas células superficiais do epitélio intestinal; ligação da lectina à quitina presente na membrana peritrófica, e interação com enzimas glicosiladas no trato digestivo (PEUMANS e VAN DAMME., 1995; SÁ *et al.*, 2009; MICHIELS *et al.*, 2010).

Powell *et al.* (1998), através de análises de imunolocalização, imunomarcção e microscopia eletrônica, detectaram alterações morfológicas no intestino da praga do arroz (*Nilaparvata lugens*) causadas pela lectina GNA (isolada de *Galanthus nivalis*) concentradas na superfície do intestino e na hemolinfa, indicando a ligação desta proteína aos carboidratos das células epiteliais e sua capacidade de atravessar a barreira epitelial, atingindo a circulação e causando possivelmente um efeito sistêmico. Outro estudo revelou que larvas de 3º e 4º instar de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera), quando alimentadas com dieta artificial contendo lectina de *Griffonia simplicifolia* (GSII), sofreram inibição e retardo no tempo de desenvolvimento, sendo sugerido que a lectina interagiu com a quitina presente na membrana peritrófica (ZHU-SALZMAN *et al.*, 1998). Duas lectinas, uma isolada de *Arisaema jacquemontii* e outra de *Arisaema helleborifolium* promoveram, respectivamente, retardo no desenvolvimento e mortalidade em larvas de *Bactrocera cucurbitae*. Observou-se ainda, após tratamento com as lectinas, uma redução da atividade de fosfatase alcalina e aumento da atividade de esterases e fosfatase ácida (KAUR *et al.*, 2006). Coelho *et al.* (2007) associaram a toxicidade da lectina de *Annona coriácea* contra *Anagasta kuehniella* a alterações da membrana intestinal e possivelmente a interrupção dos mecanismos enzimáticos digestivos. A lectina de *Caesalpinia ferrea* (Pau Ferro) ligou-se a gliconjugados e microvilosidades do

intestino de larvas de *Zabrotes subfasciatus*, causando redução de emergência de adultos. (LAGARDA-DIAZ *et al.*, 2009).

As lectinas de cerne, entrecasca e folha de *Myracrodruon urundeuva* (MuHL, MuBL, e MuLL, respectivamente) apresentaram atividade termiticida contra operários e soldados *Nasutitermes corniger* (cupim) que pode estar associada com a resistência a proteólise e ligação à quitina da matriz peritrófica (NAPOLEÃO *et al.*, 2011a). A lectina OfiL (isolada de cladódios de *Opuntia ficus indica*) apresentou atividade sobre operários dessa mesma espécie (PAIVA *et al.*, 2011). Através de estudo de histofluorescência, detectou-se que a lectina inseticida do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* teve como principal alvo a superfície intestinal do pulgão da ervilha (*Acyrtosiphon pisum*) e ainda promoveu inviabilidade das células desta região (HAMSHOU *et al.*, 2010). As lectinas isoladas das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Cratylia floribunda* (CFL) apresentaram efeitos deletérios contra *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) e *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae), reduzindo a porcentagem de emergência e ainda foram resistentes às enzimas digestivas destes insetos (FREITAS *et al.*, 2011).

As lectinas de *M. urundeuva* (MuHL, MuBL e MuLL) apresentaram também atividade larvicida sobre larvas de *A. aegypti* no quarto estágio (L₄) (SÁ *et al.*, 2009; NAPOLEÃO *et al.*, 2011b). MuLL foi resistente à degradação por proteases intestinais e apresentou efeitos inibitório sobre a atividade de tripsina e estimulatório sobre α -amilase larvais (NAPOLEÃO *et al.*, 2011b).

2.5. *Moringa oleifera*

A família Moringaceae, constituída de catorze espécies, sendo onze originárias da África, uma da Arábia e duas da Índia (SOUSA, 2001). A *Moringa oleifera* (Figura 4) é

originária da Índia e foi introduzida no Brasil para ornamentação e arborização de ruas e praças, sendo conhecida popularmente como lírio, quiabo-de-quina ou simplesmente moringa (MATOS, 2002; MARACAJÁ *et al.*, 2010).

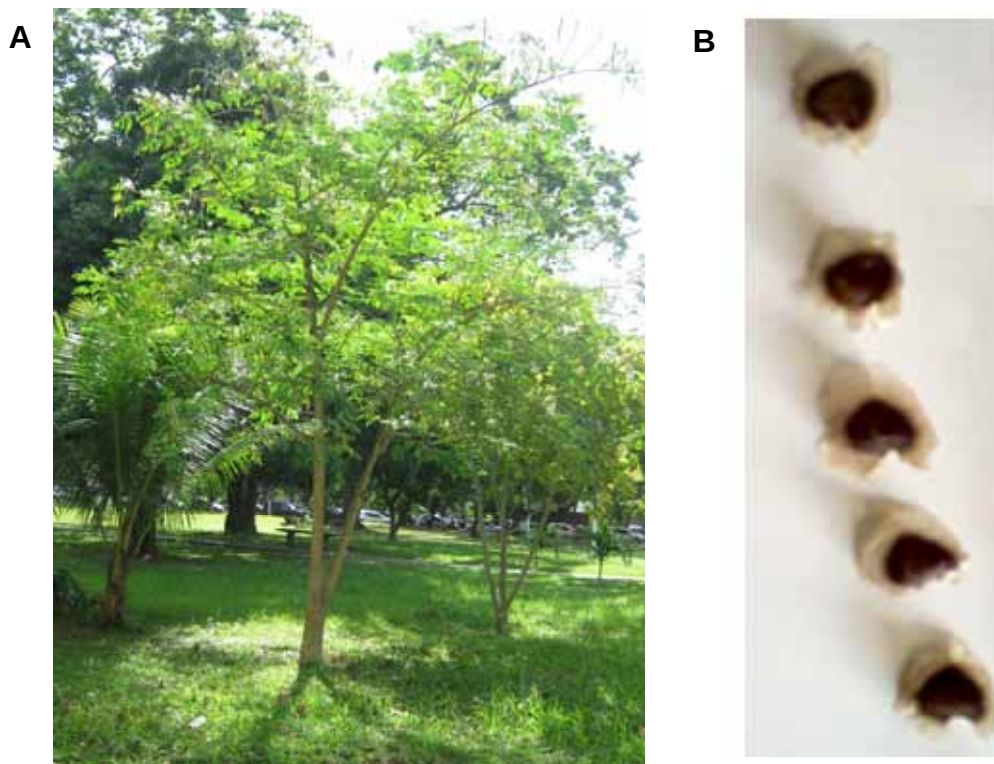


Figura 4. *Moringa oleifera*. (A) Aspecto geral. (B) Sementes

Fotos: (A) Maiara C. Moura. (B) Thiago H. Napoleão.

É uma planta rústica, de crescimento rápido e resistente à seca. Propaga-se por sementes e estas apresentam boa germinação quando colhidas em condições adequadas de umidade (BAKKE *et al.*, 2010). Apresenta caule espesso e alto; folhas longo-pecioladas com comprimento até 3 cm; frutos secos e comestíveis com coloração marrom escuro; as sementes são castanhas escuras e oleaginosas (SILVA & MATOS, 2008; RAMOS *et al.*, 2010). Distribui-se em regiões tropicais e semi-áridas, sendo tolerante às variações de precipitação, altas temperaturas e baixa umidade do solo (ANWAR *et al.*, 2007; SOUZA & LORENZI, 2008). Entre as árvores cultivadas, ela é uma das mais úteis para o ser humano, pois suas

partes são utilizadas para diferentes aplicações, inclusive como complemento alimentar em programas de desnutrição devido ao seu alto valor nutritivo (FERREIRA *et al.*, 2008). As folhas e sementes possuem excelente valor nutricional, pois são ricas em aminoácidos essenciais, proteínas e lipídios (MAKKAR & BECKER, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 1999; ABDULKARIM *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, vários estudos vêm evidenciando diferentes potencialidades das diferentes partes desta planta. As suas sementes são capazes de purificar e clarificar a água (OKUDA *et al.*, 2001; GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005; KUMARI *et al.*, 2006). O extrato aquoso das sementes apresentou atividade hipoglicemiante em ratos (JAISWAL *et al.*, 2009) e pó das sementes promoveu aumento do valor da hemoglobina e minimizou ataques asmáticos em pacientes tratados com doses semanais (AGRAWAL & MEHTA., 2008). Verificou-se ainda efeito antimicrobiano dos extratos aquosos e etanólicos das sementes contra *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli* (VIERA *et al.*, 2010). Ratos com fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono sofreram redução dos sintomas e danos no fígado quando tratados com extrato das sementes (HAMZA, 2010). Ruckmani *et al* (1998) também constataram efeito hepatoprotetor utilizando extratos aquosos e alcóolicos das flores. Sutar *et al.* (2009) constataram potente atividade analgésica do extrato alcoólico das sementes na concentração de 25mg/kg. O extrato aquoso das folhas apresentou atividades antinociceptiva e antiinflamatória em animais de laboratório (SULAIMAM *et al.*, 2008). Ratos tratados com o extrato das folhas de *M. oleifera* tiveram seus índices de colesterol e triacilglicerídeos reduzidos, indicando uma possível atividade hipolipemiante (JAIN *et al.*, 2010).

Várias outras propriedades são atribuídas a *M. oleifera*, como por exemplo: diurética, antitumoral, antipirética, antiepilética, antiespasmódica, estimulante cardíaco, antidiarréica, hipotensiva e inseticida, entre outras (MORTON, 1991; CACERES *et al.*, 1992; FAIZI *et al.*;

1994; FAIZI *et al.*, 1998; GUEVARA *et al.*, 1999; DANGI *et al.*, 2002; BENNET *et al.*, 2003; ANWAR *et al.*, 2007; COELHO *et al.*, 2009; PAIVA *et al.*, 2011).

2.5.1. Lectinas de *M. oleifera*

As lectinas cMoL (do inglês *coagulant M. oleifera* lectin) e WSMoL (do inglês *water-soluble M. oleifera* lectin) foram isoladas das sementes de *M. oleifera* (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009). cMoL é extraída em solução salina (NaCl 0,15 M) e isolada através de cromatografia em coluna de gel de guar; essa lectina apresentou atividade coagulante e foi capaz de remover ácidos húmicos presentes na água (SANTOS *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2011). Oliveira *et al.* (2011) detectaram efeitos deletérios de cMoL sobre larvas de *Anagasta kuehniella* e associaram tal fato à propriedade ligadora de quitina, à estabilização perante as enzimas digestivas e ligação a gliconjugados do intestino das lagartas. cMoL foi ainda capaz de matar as pupas dessa espécie.

WSMoL apresenta elevada solubilidade em água e é isolada através de cromatografia em coluna de quitina. Extrato de sementes de moringa contendo WSMoL retardou o desenvolvimento larval de *A. aegypti* e preparação contendo a lectina pura foi larvicida contra larvas no estágio (COELHO *et al.*, 2009). WSMoL apresentou atividades antibacteriana e coagulante, sendo capaz de promover a sedimentação de microorganismos presentes na água (FERREIRA *et al.*, 2011). Estudo avaliando a genotoxicidade dessa lectina revelou que WSMoL não apresentou efeitos mutagênicos nem promoveu quebras na molécula de DNA nas concentrações de 0,0125 a 0,8 µg/ml, indicando a segurança de seu uso para tratar água para consumo humano (ROLIM *et al.*, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos de lectinas de sementes de *M. oleifera* (WSMoL e cMoL) na sobrevivência de larvas de populações de *A. aegypti* susceptível (Rockfeller) e resistente (Rec-R) a organofosforado, bem como sobre a atividade de enzimas digestivas e detoxificantes presentes em extratos larvais.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar WSMoL através de cromatografia em coluna de quitina, seguindo protocolo previamente estabelecido.
- Isolar cMoL através de cromatografia em coluna de gel guar, seguindo protocolo previamente estabelecido.
- Determinar o efeito de cMoL na sobrevivência de larvas de *A. aegypti* (no estágio L₄) de população (Rockfeller) susceptível a organofosforado.
- Avaliar o efeito de WSMoL e cMoL na sobrevivência de larvas de *A. aegypti* (no estágio L₄) de população (Rec-R) resistente a organofosforado.
- Obter extratos em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 e acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 de intestinos de L₄ das populações Rockfeller e Rec-R.
- Obter extratos em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,9 de L₄ das populações Rockfeller e Rec-R.
- Determinar a atividade das enzimas digestivas: protease, tripsina e α -amilase em extratos de intestino de L₄ susceptíveis e resistentes a organofosforado.

- Determinar a atividade das enzimas detoxificantes superóxido dismutase, glutathione S-transferase e esterases em extratos de L₄ susceptíveis e resistentes a organofosforado.
- Determinar o efeito de WSMoL e cMoL sobre a atividade das enzimas digestivas e detoxificantes detectadas.

4. REFERÊNCIAS

ABDULKARIM, S. M., LONG, K., LAI, O. M., MUHAMMAD, S. K. S. GHAZALI, H. M. Some physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. **Food Chemistry**, v. 93, p. 253-63, 2005.

AGRAWAL, B., MEHTA, A. Antiasthmatic activity of *Moringa oleifera* Lam: A clinical study. **Indian Journal Pharmacology**, v. 40, p. 28–31, 2008.

ALDAMA, P. C., GARCIA, F. J. H., ESQUIVEL, R. D. C. O. Ciclo de vida del *Aedes aegypti* y manifestaciones clínicas del dengue. **Acta Pediátrica de México**, v. 22, p. 114-117, 2001.

ANDRADE, C. F. S., MODOLO, M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control. **Revista Saúde Pública**, v. 25, n. 3, p. 184-187, 1991.

ANWAR, F., LATIF, S., ASHRAF, M., GILANI, A. H. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 17-25, 2007.

BAKKE, I. A., SOUTO, J. S., SOUTO, P. C., BAKKE, O. A. Características de crescimento e valor forrageiro da *Moringa oleifera* submetida a diferentes adubos orgânicos e intervalos de corte. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 7, p. 133-144, 2010.

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

BARRETO, M. L., TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, p. 54-72, 2008.

BENNETT, R. N., MELLON, F. A., FOIDL, N. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, p. 3546–3553, 2003.

BERGE, J., FEYERENSEN, R., AMICHOT, M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. **Philosophical Transactions Royal Society London Series B: Biological Sciences**, v. 353, p. 1701-1705, 1998.

BESERRA, E. B., CASTRO-JUNIOR, F. P., SANTOS., J.W., SANTOS, T. S., FERNANDES, C. R. M. Biologia e Exigências Térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de Quatro Regiões Bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, n. 6, v. 35, p. 853-860, 2006.

BESERRA, E. B., C. R. M., QUEIROGA, M. F. C., CASTRO JUNIOR, F. P. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefôs na Paraíba. **Neotropical Entomology**, n. 2, v. 36, p. 1519-1566, 2007.

BESERRA, E. B., FREITAS, E. M., SOUZA, J. T., FERNANDES, C. R. M., SANTOS, K. D. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. *Iheringia, Série Zoologia*, n. 3, v. 99, p. 281-285, 2009

BISSET, J. A., RODRIGUEZ, M., ARMAS, Y. Comparación de 2 poblaciones de mosquitos *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba con diferente conducta de reposo. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 57, p. 143-150, 2005.

BISSET, J. A., RODRIGUEZ, M. M., FERNANDEZ, D., PALOMINO, M. Resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de 2 provincias del Perú. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 59, p. 202-208, 2007.

BRAGA, I. A., LIMA, J. B. P., SOARES, S. S., VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 199-203, 2004.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília, 1999.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. 3ªed. 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue**, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Boletim Epidemiológico 23**. Brasília, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Abril de 2008**, 2009.

Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_maio2008.pdf
Acesso em: 05 de Janeiro, 2011

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Gráfico da taxa de incidência de dengue. Brasil e grandes regiões, 1990-2008**,

Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27637.
Acesso em: 05 de Janeiro, 2011.

BROGDON, W. G., MCALLISTER, J. C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 605-613, 1998.

CACERES, A., SARAVIA, A., RIZZO, S., ZABALA, L., LEON, E. D., NAVE, F. Pharmacologic properties of *Moringa oleifera*: 2: Screening for antispasmodic, anti-inflammatory and diuretic activity. **Journal Ethnopharmacology**, v. 36, p. 233-237, 1992.

CAMPOS, J., ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista Saúde Pública**, v. 35, n. 3, p. 232-236, 2001.

CARINO, F. A., KOPENER, J. F., PLAPP, F. W., FEYREISEN, R. Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene CYP6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 24, p. 411-418, 1994.

CARVALHO, I. M. F. **Estudo dos mecanismos bioquímicos de resistência a inseticidas em diferentes populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) do Brasil**. Tese de Doutorado - Instituto Oswaldo Cruz, 2008.

CARVALHO, M. S. L., CALDAS, E. D., DEGALLIER, N., VILARINHOS, P. T. R., SOUSA, L. C. K. R., YOSHIZAWA, M. A. C., KNOX, M. B., OLIVEIRA, C. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 5, p. 623-629, 2004.

COELHO, G. E. Dengue: desafios atuais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.17, p. 231-233, 2008.

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

COELHO, M. B., MARANGONI, S., MACEDO, M. L. R. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 146, p. 406-414, 2007.

CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B, PAIVA, P.M.G. Lectins carbohydrate recognition molecules: are they toxic? In: SIDDIQUE, Y.H. (ed.) **Recent trends in toxicology**, vol. 37. Kerala, India: Transworld Research Network. pp. 47-59, 2008.

CRUZ, I. Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith). **Embrapa Milho e Sorgo**. Documento 21, p. 15, 2002.

DANGI, S. Y., JOLLY, C. I., NARAYANA, S. Antihypertensive activity of the total alkaloids from the leaves of *Moringa oleifera*. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, p. 144-148, 2002.

FAIZI, S., SIDDIQUI, B. S., SALEEM, R., AFTAB, K., SHAHEEN, F., GILANI, A. H.. Novel hypotensive agents, niazimin A, niazimin B, niazicin A and niazicin B from *Moringa*

oleifera: Isolation of first naturally occurring carbamates. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I**, p. 3035–3640, 1994.

FAIZI, S., SIDDIQUI, B. S., SALEEM, R., AFTAB, K., SHAHEEN, F., GILANI, A. H. Hypotensive constituents from the pods of *Moringa oleifera*. **Planta Medicinal**, v. 64, p. 225–228, 1998

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

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

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

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

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia**. São Paulo: Edusp; v. 2, 2002.

FRANCO-FRAGUAS, L., PLA, A., FERREIRA, F., MASSALDI, H., SUAREZ, N., VIEIRA, F. B. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation, **Journal of Chromatography B**, v. 790, p. 365–372, 2003.

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

FUNASA 2001. Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor. **Manual de normas técnicas**. Brasília, 2001.

GERIS, R., SILVA, I. G., SILVA, H. H. G., BARISON, A., RODRIGUES-FILHO, E., FERREIRA, A. G. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 25–28, 2008.

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

GUBLER, D. J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1998 to 2003: full circle? **Comparative. Immunology Microbiology Infectious Diseases**, v. 27, p. 319–330, 2004.

GUEVARA, A.P.; VARGAS, C.; SAKURAI, H.; FUJIWARA, Y.; HASHIMOTO, K.; MAOKA, T.; KOZUKA, M.; ITO, Y.; HARUKUNI, T.; NISHINO, H. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. **Mutation Research**, v. 440, p. 181-188, 1999.

GUIRADO, M. M., BICUDO, H. E. M. C. Some aspects of the population control and resistance to insecticides in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 64, p. 5-14, 2009.

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

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

HEMINGWAY, J., KARUNARATNE, S. H. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 1, p. 1-12, 1998.

HEMINGWAY, J., RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review on Entomology**, v. 45, p. 371-391, 2000.

HIRAGI, C. SIMÕES, K, MARTINS, E., QUEIROZ, P., LIMA, L., MONNERAT, R. Variabilidade genética em populações de *Aedes aegypti* (L.) (Díptera: Culicidae) utilizando marcadores de RAPD. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 542-547, 2009.

HORTA., CASTRO, F. I., ROSA, C. S., DANIEL, M. C., MELO, A. L. Resistanc of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temefhos in Brazil: A revision and new data for Minas Gerais state. v. 6, p. 1-6, 2011

JAIN, P. G., PATIL, S. D., HASWANI, N. G., GIRASE, M. V., SURANA, S. J. Atividade hipolipidêmica de *Moringa oleifera* Lam., Moringaceae, na hiperlipidemia induzida por dieta rica em gordura em ratos albinos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 969-973, 2010.

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

KAUR, M., SINGH, K., RUP, P. J., SAXENA, A. K., KHAN, R. H., ASHRAF, M. T., KAMBOJ, S. S., SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell lines, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 156–165, 2006.

KUMARI P., SHARMA P., SRIVASTAVA S., SRISVASTAVA M. M. Biosorption studies on shelled *Moringa oleifera* Lamarck seed powder: Removal and recovery of arsenic from aqueous system”. **International Journal of Mineral Process**, v. 78, p. 131-139, 2006.

LAGARDA-DIAZ, I., GUZMAN-PARTIDA, A. M., URBANO-HERNANDEZ, G., ORTEGA-NIEBLAS, M. M., ROBLES-BURGUENO, M. R., WINZERLING, J., VAZQUEZ-MORENO, L. Insecticidal action of PF2 lectin from *Olneya tesota* (Palo Fierro) against *Zabrotes subfasciatus* larvae and midgut glycoconjugate binding. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 57, p. 689–694, 2009.

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

LIMA, E. P., OLIVEIRA FILHO, A. M., LIMA, J. W. O., RAMOS, RAMOS JUNIOR, A. N., CAVALCANTI, L. P. G., PONTES, R. J. S. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefôs em Municípios do Estado do Ceará, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 259-263, 2006

LOGJAM, N., MCCARRAN, L., PRAPANTHADARA, L., HEMINGWAY, J., RANSON, H. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*, **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 35, p. 861-71, 2005.

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

MACEDO, M. L. R., FREIRE, M. G. M., SILVA, M. B. R., COELHO, L. C. B. B. Inseticidal action of Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.146, p. 486-498, 2007.

MACORIS, M. L. G., ANDRIGHETTI, M. T. M., TAKAKU, L., GLASSER, C. M., GARBELOTO, V. C., BRACCO, J. E. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 703-708, 2003.

MAKKAR, H. P. S., BECKER, K. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. **Journal of Agricultural Science and Technological**, v.128, p. 311-22, 1997.

MARACAJA, P. B., LEITE, D. T., FREIRE, M. S., SILVEIRA, D. C. 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.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 4ª ed. Fortaleza: UFC, SEBRAE/CE, 2002.

- MELLON, R. B., GEORGHIOU, G. P. Rotational use of insecticides in mosquito control programs. **Proceedings and papers of the fifty-second annual Conference of the California and Vector Control Association**, v. 2, p. 65-67, 1984.
- MICHIELS, K., VAN DAMME, SMAGGHE, G. Plant-Insect interactions: What can we learn from plant lectins? **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.73, p.193-212, 2010.
- MONATH, T. P. Dengue: The risk to developed and developing countries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 2395-2400, 1994.
- MONTEIRO, J. M., ALBUQUERQUE, U. P., ARAÚJO, E. L., CAVALCANTI, E. L. A. Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.
- MONTELLA, I. R., MARTINS, A. J., VIANA-MEDEIROS, A., LIMA, J. B. P., BRAGA, I. A., VALLE, D. Resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. **The American of Journal Tropical Medicine Hygiene**, v.77, p. 467-77, 2007.
- MORTON, J. F. The horseradish tree, *Moringa pterigosperma* (Moringaceae). A boon to arid lands. **Society for Economic Botany**, v. 45, p. 318–333, 1991.
- MUTERO, A., PRALAVORIO, M., BRIDE, J. M., FOURNIER, D. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v. 91, p. 5922-5926, 1994.
- NAPOLEÃO, T. H., GOMES, F.S., LIMA, T. A., SANTOS, N. D. L., SÁ, R. A., ALBUQUERQUE, A. C., COELHO, L. C. B. B., PAIVA, P. M. G. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011a.
- NAPOLEÃO, T. H., PONTUAL, E. V., LIMA, T. A., SANTOS, N. D. L., SÁ, R. A. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, doi: 10.1007/s00436-011-2529-7. 2011b.
- NOGUEIRA, R. M. MIAGOSTOVICH, M. P., SCHATZMAYR, H. G., SANTOS, F. B., ARAUJO, E. S. M., FILIPPIS, A. M. B., SOUSA, R. V., ZAGNE, S. M. O., NICOLAI, C., BARAN, M., TEIXEIRA-FILHO, G. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986 – 1998. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 3, p. 297-304, 1999.
- OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. Atheneu Editora, São Paulo, p. 437-458, 2003.
- OKUDA, T., BAES, A. U., NISHIJIMA, W., OKADA, M. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. **Water Research**, v. 35, p. 405-410, 2001.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue and dengue heamorrhagic fever**. Geneva, Switzerland, 2009.
- OLIVEIRA J. T. A., SILVEIRA, S. B., VASCONCELOS, K. M., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A. Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose

tree *Moringa oleifera* Lamarck. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 79, p. 815-20, 1999.

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

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

PALCHICK, S. Chemical Control of Vectors. In: **The Biology of Disease Vectors**, 1996.

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

PONTES, R. J. S.; RUFFINO-NETO, A. Dengue em localidade urbana da Região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, v.28, p.218-227, 1994.

POWELL, K.S., SPENCE, J., BHARATHI, M., GATEHOUSE, J.A., GATEHOUSE, A.M.R.. Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). **Journal of Insect Physiology**, v. 44, p. 529–539, 1998.

PRIESTER, T. M., GEORGHIOU, G. P. Penetration of permethrin and knockdown in larvae of pyrethroid-resistant and pyrethroid-susceptible strains of the sputhern house mosquito Diptera, Culicidae. **Journal of Economic Entomology**, v. 73, p.165-67, 1998.

PROPHIRO, J. S., SILVA, O. S., LUNA, J. E. D., PICCOLI, C. F., KANIS, L. A., SILVA, M. A. N. *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistência e susceptibilidade ao temephos, em municípios com ocorrência de casos de dengue e diferentes características de urbanização. **Revista da Sociedade Brasileira de. Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, 2011.

RAMOS, L. M., COSTAZ, R. S., MORO, F. V., SILVA, R. C. Morfologia de frutos e sementes e morfofunção de plântulas de *Moringa (Moringa oleifera Lam.)* **Comunicata Scientiae**. v. 1, p. 156-160, 2010.

RAYMOND, M., CHEVILLON, C., GUILLEMAUD, T., LENORMAND, T., PASTEUR, N. An overview of the evolution of overproduced esterases in the nosquito *Culex pipiens*. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 353, p. 1707-11, 1998 .

RIBEIRO, A. F., MARQUES, G. R. A. M., VOLTOLINI, J. C., CONDINO, M. L. F. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas, **Revista Saúde Pública**, v.40, p. 671-676, 2006.

RODRIGUEZ, M. M. Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 56, p. 83-88, n. 1, 2004.

RODRIGUEZ, M. M., BISSET, J. A., FERNANDEZ, D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from some latin-american countries. **Journal of American Mosquito Control Association**. v. 24, p. 420-429, 2007.

ROLIM, L. A., MACÊDO, M. F., SISENANDO, H. A., NAPOLEÃO, T. H., FELZENSZWALB, I., AIUB, C. A. F., COELHO, L. C., MEDEIROS, S. R., PAIVA, P. M. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 53-58, 2011.

RUCKMANI, K., KAVIMANI, S., ANANDAN, R., JAYKAR, B. Effect of *Moringa oleifera* Lam on paracetamol-induced hepatotoxicity. **Indian Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. 33-35, 1998.

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

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

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

SCOTT, J. G. Cytochromes P450 and insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 757-777, 1999.

SILVA, J. S., MARIANO, Z. F., SCOPEL, I. A Dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**. v. 3, p. 163-175, 1998.

SILVA, H. H. G., SANTOS, R. M. G., RODRIGUES-FILHO, E., ROCHA, C., SILVA, I. G. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae- Caesalpinoideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 264-267, 2007.

SILVA, F. J. A., MATOS, J. Sobre dispersões de *Moringa oleifera* para tratamento de água. **Revista Tecnologia**, v. 29, p. 157-163, 2008.

SILVA, W. J., DÓRIA, G. A. A., MAIA, R. T., NUNES, R. S., CARVALHO, G. A., BLANK, A. F., ALVES, P. B., MARÇAL, R. M., CAVALCANTI, S. C. H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3251-3255, 2008.

SIMAS, N. K., LIMA, E. C., KUSTER, R. M., LAGE, C. L. S., FILHO, A. M. O. Potential use of *Piper nigrum* ethanol extract against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* larvae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 405-407, 2007.

SINGHI, S., KISSOON, N., BANSAL, A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. **Journal of Pediatrics**, v. 83, p. 22-35, 2007.

SOUSA, E. *Moringa*. **Enciclopédia Luso-Brasileira de Cultura**, Ed. Século XXI, v. 20, Braga: Editorial Verbo, 2001.

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.

SOUZA, J.D., SILVA, M.B.R., ARGOLO, A.C.C., NAPOLEÃO, T.H., SÁ, R.A., CORREIA, M.T.S., PAIVA, P.M.G., SILVA, M.D.C. & COELHO, L.C.B.B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 696-702, 2011.

SULAIMAN, S., JEFFERY, J. The ecology of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in rubber state in Malasya. **Bulletin of Entomological Research**, v. 76, p. 553-557, 1986.

SUTAR, N. G., PATIL, V. V., DESHMUKH, T. A., JAWLE, N. M., PATIL, V. R., BHANGALE, S. C. Evaluation of anti-pyretic potential of seeds of *Moringa oleifera* Lam. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 3, p. 148-50, 2009.

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

VAN DAMME, E. J. M. BARRE, A., ROUGÉ, P., VAN LEUVEN, F., PEUMANS, W. J. The Neu-GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark type-2 ribosome-inactivating protein with an usual specificity and structure. **European Journal of Biochemistry**, v. 235, p. 128-137, 1996.

VAN DAMME, E. J. M., LANNOO, N., PEUMANS, W, J. Plant lectins. **Advances in Botanical Research**, v. 48, p.109–209, 2008.

VARON, L. S., CORDOBA, B. C., BROCHERO, H. L. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. **Revista Panamericana de Salud Publica**. v. 27, p. 66-73, 2010.

VAUGHAN, A., CHADE, D. D., FRENCH-CONSTANT, R. Biochemical monitoring of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, p. 318-21, 1998

VIERA, G. H. F., MOURÃO, J. A., ÂNGELO, A. M., COSTA, R. A., VIEIRA, R. H. S. F. Efeito antibacteriano (*in vitro*) de *Moringa oleifera* (moringa) e *Annona muricata* (graviola)

frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positiva. **Revista do. Instituto de Medicina Tropical**, v. 52, p. 129-132, 2010.

VIJAYAN, M. & CHANDRA, N. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, p. 707-714, 1999.

ZHU-SALZMAN, K., SOMBRA, R. E., KOIWA, H., SALZMAN, R. A., NARASINHAM, M., BRESAN, R. A., HASEGAWA, P. M., MURDOCK, L. L. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 15123-15128, 1998.

5. ARTIGO

Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and activity of enzymes from *Aedes aegypti* organophosphate-susceptible and resistant larvae

Afonso C. Agra-Neto^a, Emmanuel V. Pontual^a, Nataly D.L. Santos^a, Luciana A. Luz^a, Cláudia M.F. Oliveira^b, Maria Alice V. Melo-Santos^b, Daniela M.A.F. Navarro^c, Luana C.B.B. Coelho^a, Thiago H. Napoleão^a, Patrícia M.G. Paiva^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil.

^bDepartamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil.

^cDepartamento de Química Fundamental-CCEN, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 8121268540; fax: +55 8121268576.

E-mail: ppaivaufpe@yahoo.com.br

Abstract

The control of vector (*Aedes aegypti*) control is the best strategy to combat dengue epidemics. However, the continuous use of synthetic insecticides has led to the emergence of resistant populations. *Moringa oleifera* seeds contain the lectins WSMoL (water-soluble *M. oleifera* lectin) and cMoL (coagulant *M. oleifera* lectin). WSMoL has larvicidal activity (LC₅₀ of 0.197 mg/ml) on *A. aegypti* organophosphate-susceptible (Rockfeller) fourth stage larvae (L₄). This study reports the effect of cMoL (0.1–0.8 mg/ml) on survival of Rockfeller L₄ as well as the effect of WSMoL and cMoL (0.1–0.8 mg/ml) on organophosphate-resistant (Rec-R) L₄. Also, extracts from Rockfeller and Rec-R L₄ were assayed for digestive (amylase, trypsin and protease) and detoxifying (superoxide dismutase – SOD –, as well as α - and β -esterases) enzymes in presence of WSMoL and cMoL. cMoL was not a larvicidal agent on Rockfeller L₄. WSMoL and cMoL did not promote mortality of Rec-R L₄. WSMoL stimulated protease, trypsin-like and α -amylase activities from Rockfeller L₄ while cMoL inhibited these enzymes. WSMoL had no effect on trypsin-like activity from Rec-R L₄ while inhibited protease and α -amylase activities. cMoL inhibited trypsin-like activity while did not interfere on proteases and α -amylase from Rec-R. cMoL inhibited SOD activities from Rockfeller and Rec-R L₄ more than WSMoL, while β -esterase activity from Rockfeller L₄ was more inhibited by WSMoL. The lectins promoted low effect (stimulation or inhibition) on α -esterase activities from both populations. The study reveals that WSMoL and cMoL differently affect survival of Rockfeller L₄ and enzymes from Rockfeller and Rec-R L₄. Protease, trypsin-like and SOD activities were the most sensible enzymes to WSMoL and cMoL. Larvicidal activity of WSMoL on Rockfeller L₄ can be related to stimulation of protease and trypsin-like activities.

Keywords: *Moringa oleifera*; *Aedes aegypti*; larvicidal activity; digestive enzymes; detoxifying enzymes; lectin.

1. Introduction

The reduction of *Aedes aegypti* population is fundamental for dengue control (World Health Organization, 2011). Continuous use of synthetic insecticides led to emergence of insecticide-resistant populations (Carvalho et al., 2004; Luna et al., 2004, Lima et al., 2006, Beserra et al., 2007, Prophiro et al., 2011). In addition, these compounds cause negative environmental impacts by contaminating water and soil as well as by affecting non-target organisms (Carvalho et al., 2004; Barreto, 2005; Braga and Valle, 2007).

It has been reported resistance of *A. aegypti* to DDT, pyrethroids (permethrin and deltamethrin), and organophosphate (temephos). The development of resistance to temephos has been attributed to selection of individuals carrying genes that encode acetylcholinesterase forms insensitive to pesticide as well as detoxifying enzymes (glutathione S-transferases, superoxide dismutase and esterases) forms with increased activity (Lima et al., 2003; Braga and Valle, 2007; Melo-Santos et al., 2010).

Natural insecticides have been investigated for larvicidal effect on *A. aegypti* resistant strains since they can be easily available at low cost and the larvae usually do not have cross-resistance to them (Simas et al., 2007). Temephos-resistant population was susceptible to spinosad (a mixture of spinosyn A and spinosyn D produced by the bacterium *Saccharopolyspora spinosa*) and Bti (spores of *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* which release insecticidal proteins during sporulation) (Marcombe et al., 2011). In addition, plant compounds with insecticidal activity have been investigated for their effects on detoxifying enzymes of insects aiming at identify agents with an inhibitory effect that can be used as synergists for insecticides routinely used in control programs (Larson et al., 2010).

Lectins, hemagglutinating proteins that recognize carbohydrates, shows entomotoxic properties (Macedo et al., 2007, Sá et al., 2009, Napoleão et al., 2012). The molecular basis of

lectin toxicity on insects is still unknown but it has been suggested that the integrity and function of the peritrophic matrix can be altered by binding of lectin to chitin and *N*-acetylglucosamine residues. Also, lectins can bind to glycosylated enzymes in the digestive tract as well as can cross the intestinal epithelial barrier and reach the hemolymph and other organs of insect body (Peumans and van Damme, 1995; Fitches et al., 2001; Macedo et al., 2007; Michiels et al., 2010).

Seeds of *Moringa oleifera* (Moringaceae) contain the water-soluble *M. oleifera* lectin (WSMoL) as well as the coagulant *M. oleifera* lectin (cMoL) which have different structural characteristics such as monosaccharide specificity, molecular mass, and net charge (Santos et al., 2009; Rolim et al., 2011; Paiva et al., 2011). WSMoL and cMoL are chitin-binding lectins with insecticidal activity. WSMoL showed larvicidal activity (LC₅₀ of 0.197 mg/ml) against *A. aegypti* fourth-stage larvae (L₄) from an organophosphate-susceptible Rockfeller colony (Coelho et al., 2009). cMoL, when incorporated into artificial diet, promoted reduction in larval weight gain, decrease in dietary utilization and delay in development of *Anagasta kuehniella* larvae as well as reduction in weight and survival of pupae (Oliveira et al., 2011).

This work reports the determination of the effect of WSMoL and cMoL on *A. aegypti* organophosphate-resistant (Rec-R) L₄ as well as the effect of cMoL on Rockfeller L₄. Also, the effect of WSMoL and cMoL on digestive (protease, trypsin-like and α -amylase) and detoxifying (superoxide dismutase – SOD –, as well as α - and β -esterases) enzyme activities from Rockfeller and Rec-R L₄ was demonstrated.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

M. oleifera Lam. has the vernacular names “moringa” in Portuguese, “árbol del ben” in Spanish and horseradish tree or drumstick in English. Seeds were collected in Recife City, State of Pernambuco, northeastern Brazil. The seeds were air dried (28 °C, 48 h), powdered and stored at -20 °C. A voucher specimen is deposited under number 73345 at the herbarium “Dárdano de Andrade Lima” (*Instituto Agrônomo de Pernambuco*, Recife, Brazil).

2.2. Organophosphate-susceptible and resistant *A. aegypti* larvae

Colony of the Rockefeller L₄ is maintained in the *Laboratório de Ecologia Química* from *Departamento de Química Fundamental* of *Universidade Federal de Pernambuco*, Recife, Brazil. Rec-R L₄ established in laboratory (Melo-Santos et al., 2010) were also used. This colony is maintained in the *Departamento de Entomologia* from the *Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães* of *Fundação Oswaldo Cruz*, Recife, Brazil. The eggs hatched in distilled water at a temperature range of 25-27 °C and cat food (Whiskas®) was offered to larvae. When reaching the early fourth-stage (L₄), larvae were collected and used in bioassays.

2.3. Isolation of water-soluble (WSMoL) and coagulant (cMoL) *M. oleifera* seed lectins

WSMoL was isolated according to the procedure described by Coelho et al. (2009). Powdered seeds (10 g) were homogenized with distilled water (100 ml) in a magnetic stirrer (16 h, 4 °C). Next, the mixture was filtered through cotton gauze and centrifuged at 3000 g for 15 min. The crude extract was treated with a 60% saturated ammonium sulphate solution (Green and Hughes, 1955) and the precipitated fraction was collected after centrifugation (3000 g, 15 min), dissolved in 0.15 M NaCl and submitted to dialysis (3.5 kDa cut-off membrane) against 0.15 M NaCl (6 h at 4 °C). The dialyzed fraction (80 mg of proteins) was

then applied to a chitin column (18×1.5 cm) equilibrated (flow rate of 20 ml h^{-1}) with 0.15 M NaCl. After extensive washing with the equilibrating solution, WSMoL was eluted with 1.0 M acetic acid and dialyzed (3.5 kDa cut-off membrane) against distilled water (6 h at 4°C).

cMoL was isolated according to Santos et al. (2009). Powdered seeds (10 g) were homogenized with 0.15 M NaCl (100 ml) in a magnetic stirrer (6 h, 28°C). After, the mixture was filtered through cotton gauze and centrifuged at $3000 g$ for 15 min. The proteins in saline extract were precipitated using ammonium sulphate (60%) and the precipitated protein fraction was dialyzed against distilled water (4 h) and 0.15 M NaCl (16 h). The fraction was loaded (10 mg of protein) onto a guar gel column (10×1 cm) equilibrated (flow rate of 20 ml h^{-1}) with 0.15 M NaCl. cMoL was eluted with 1.0 M NaCl and dialyzed (3.5 kDa cut-off membrane) against 0.15 M NaCl (6 h at 4°C).

2.4. Protein content

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

2.5. Hemagglutinating activity

The assay was conducted in microtiter plates (Kartell S.P.A., Italy) according to Paiva and Coelho (1992) using a suspension (2.5% v/v) of rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde (Bing et al., 1967). Hemagglutinating activity was determined by mixing a twofold serial dilution of each sample (50 μl) with 0.15 M NaCl in microtiter plates. A 2.5% (v/v) suspension of erythrocytes (50 μl) was added to each well. Incubation at 27°C (45 min) ensued. One hemagglutination unit was defined as the reciprocal value of the highest dilution

of sample that promotes full agglutination of erythrocytes (Napoleão et al., 2012). Specific hemagglutinating activity was defined as the ratio between titer and protein concentration (unit mg^{-1}).

2.6. Larvicidal assays

Larvicidal activity was evaluated according the World Health Organization (1981) method. Stock solutions of WSMoL or cMoL were used to provide a series of test solutions (0.1–0.8 mg/ml) obtained by dilution with distilled water. The final volume of each larvicidal assay was 20 mL of test solution or negative control (distilled water or 0.15 M NaCl) and contained 20–25 larvae in early L_4 stage. Mortality rate (%) was determined after 24 h of incubation at 28 ± 2 °C and 12-12 (light-dark) photoperiodism. Three independent experiments were run in triplicate.

2.7. *A. aegypti* L_4 extracts

Groups of fifty *A. aegypti* L_4 were collected and immobilized by cooling at 4 °C for 10 min. The gut of each larva was removed using a needle (8 mm in length; 0.3 mm caliber) and immediately homogenized with 1 mL of acetate buffer (0.1 M sodium acetate pH 5.5 containing 0.02 M CaCl_2 and 0.15 M NaCl) or Tris buffer pH 8.0 (0.1 M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.02 M CaCl_2 and 0.15 M NaCl) using a 2 ml tissue grinder. The homogenates were centrifuged at 9000 g at 4 °C for 15 min and the supernatants (L_4 gut extracts) were collected and evaluated for protein concentration as well as for activity of digestive enzymes.

Extracts of whole larvae were prepared aiming at evaluate the activity of the detoxifying enzyme superoxide dismutase, glutathione S-transferase as well as α - and β -

esterases. Groups of 50 L₄ were immobilized by placing them at 4 °C for 10 min. After, they were homogenized in 2 ml tissue grinder with 1 ml of 0.05 M phosphate buffer pH 7.0, 0.1 M Tris-HCl pH 8.9 or 0.1 M phosphate potassium pH 7.2 containing 0.15 M NaCl. The whole body homogenates were centrifuged (9000 g, 4 °C, 15 min) and the supernatant (whole L₄ extract) was evaluated for protein concentration.

2.8. Digestive enzymes

2.8.1. Protease activity

Protease activity was determined using azocasein (Sigma-Aldrich, USA) as substrate according to Azeez et al. (2007). L₄ gut extracts in Tris buffer pH 8.0 (150 µg of protein) was mixed with 300 µl of 0.1 M sodium phosphate pH 7.5 containing 50 µl of 0.6% (w/v) azocasein. The mixture was supplemented with 100 µl of 0.1% (v/v) Triton X-100 and incubated at 37 °C for 3 h. The reaction was stopped by adding 200 µl of 10% (v/v) trichloroacetic acid and the assay was incubated at 4 °C for 30 min. Afterwards, centrifugation (9,000 g for 10 min) was performed and the absorbance of the supernatant at 366 nm was determined. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme that gave an increase of 0.01 in absorbance.

2.8.2. Trypsin-like activity

Trypsin activity was determined by incubating (30 min, 37 °C) L₄ gut extracts in Tris buffer pH 8.0 (33 µg of protein) with 8 mM N-benzoyl-DL-arginyl- ρ -nitroanilide (BAPNA, 5 µl) in Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 (160 µl). Trypsin activity was followed by measurement of

absorbance at 405 nm (Kakade et al., 1969). One unit of trypsin activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 μ mol of BApNA per minute. Substrate hydrolysis was controlled by incubating (60 min, 37 °C) bovine trypsin (5 μ g; Sigma-Aldrich, USA) with 8 mM BApNA (5 μ L).

2.8.3. α -Amylase activity

The assay was carried out based on the method described by Bernfeld (1955). L_4 gut extract in acetate buffer (100 μ L; 212 μ g of protein) was incubated at 50 °C for 10 min with 400 μ L of a 1% (w/v) soluble starch (Merck, Germany) solution in 0.1 M sodium acetate pH 5.5 containing 0.02 M CaCl_2 and 0.15 M NaCl. The reaction was stopped by adding 500 μ L of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). Next, the assays were heated at 100 °C in boiling water for 6 min and immediately cooled on ice for 15 min. Then, absorbance was measured at 540 nm. The amount of reducing sugars was determined using a standard curve of the reaction of different glucose concentrations with DNS ($Y=1.2365X-0.06$, where Y is the absorbance at 540 nm and X is the glucose concentration in mg/ml). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to generate 1 μ mol of glucose per minute. As positive control, the same procedure was carried out with 1.0 mg/ml α -amylase from hog pancreas (Sigma-Aldrich, USA). Reaction blanks were performed without starch.

2.9. Detoxifying enzymes

2.9.1. Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was determined using SOD determination kit purchased from Sigma-Aldrich (USA). In the presence of superoxide anion, the water-soluble tetrazolium salt WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] is reduced to a water-soluble formazan dye which shows a maximum absorbance at 440 nm. Since the amount of superoxide anion is linearly proportional to absorbance, the SOD activity can be quantified following the decrease in the color development at 440 nm (inhibition of the reduction of WST-1).

The assay used the enzyme xanthine oxidase for generation of superoxide anion by oxidation of xanthine. The whole-L₄ extract (20 μ L; 48 μ g of protein) in 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 was added to solution (20 μ L) containing xanthine oxidase and its substrate, followed by addition of WST-1 solution (200 μ L). The assay was incubated for 3 min at 28 °C and thus the absorbance at 440 nm was determined. One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme required to inhibit the increase of absorbance at 440 nm in 50%.

2.9.2. α - and β -esterase activities

For determination of α - and β -esterase activities, whole L₄ extracts in 0.1 M phosphate potassium pH 7.2 were used. The extract (30 μ L; 168 μ g of protein) was mixed with 500 μ L of a solution containing 0.3 mM α - or β -naphthyl acetate (Sigma-Aldrich, USA) in 0.1 M phosphate potassium pH 7.2 containing 1% acetone. The reaction mixture was incubated for 20 minutes at 30 °C. Following, 0.1 mL of a mixture containing 0.3% Fast Blue B (Sigma-Aldrich, USA) and 3.3% sodium dodecyl sulphate (Sigma-Aldrich, USA) was added. After centrifugation (3,000 g, 28 °C), the absorbance at 590 nm was recorded.

2.10. Effects of WSMoL and cMoL on activity of digestive and detoxifying enzymes from Rockefeller and Rec-R larvae

The effect of WSMoL and cMoL on protease activity was evaluated by incubating (30 min at 37 °C) L₄ gut extracts in Tris buffer (150 µg of protein) with lectin (20–300 µg) before determination of protease activity as described above. Control assay was performed by submitting preparations containing only lectin (20–300 µg) to the same reaction steps.

The activity of trypsin from L₄ gut extracts in Tris buffer (40 µg of protein) was determined after incubation (30 min, 37 °C) with WSMoL or cMoL (5–120 µg) in Tris buffer pH 8.0. Next, 8 mM BApNA (5 µl) was added and assay was incubated for 60 min at 37 °C.

The effect of lectins on α -amylase activity was evaluated by incubating (30 min at 27 °C) L₄ gut extract in acetate buffer (212 µg of protein) with WSMoL or cMoL (15–200 µg) before determination of α -amylase activity. Control assay was performed by submitting WSMoL (15–200 µg) in acetate buffer to the same reaction steps.

To determine the effect of lectins on SOD activity, the whole-L₄ extract (20 µL; 48 µg of protein) was incubated with WSMoL or cMoL (5–20 µg of protein) for 15 min at 28 °C. Next, the solution (20 µL) containing xanthine oxidase and its substrate was added to the mixture, followed by addition of WST-1 solution (20 µL). The assay was incubated for 3 min at 28 °C and thus the absorbance at 440 nm was determined. Control assay was performed by incubating the lectin (5–20 µg) with xanthine oxidase solution in absence of whole-L₄ extract to assure that the lectins did not interfere in xanthine oxidase activity.

The effect of WSMoL and cMoL on α - and β -esterase activities was evaluated by incubating (30 min at 27 °C) whole L₄ extracts with WSMoL or cMoL (20–50 µg) before determination of enzyme activities. Control assay were performed by submitting the lectin (15–200 µg) to the same reaction steps in absence of larval extract.

2.11. Statistical analysis

Standard deviations (SD) were calculated using GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA) and data were expressed as a mean of replicates $\pm$ SD. Significant differences between treatment groups were analysed by Student's t-test (significance at $p < 0.05$) using Origin 6.0 program. The lethal concentrations required to kill 16% (LC₁₆), 50% (LC₅₀) and 84% (LC₈₄) of larvae in 24 h were calculated by probit analysis with a reliability interval of 95% using the computer software StatPlus® 2006 (AnalystSoft, Canada).

3. Results and discussion

The indiscriminate use of synthetic insecticides to control *A. aegypti* has induced the development of resistant populations. Chitin-binding lectins have been investigated for larvicidal effect on *A. aegypti* and promising results were obtained. The lectins isolated from *Myracrodruon urundeuva* bark, heartwood and leaf as well as WSMoL from *M. oleifera* seeds killed *A. aegypti* L₄ with LC₅₀ of 0.125, 0.04, 0.202 and 0.197 mg/mL, respectively (Coelho et al., 2009; Sá et al., 2009; Napoleão et al., 2012).

In this work, the larvicidal activity of WSMoL on Rockfeller L₄ was re-evaluated using the lectin at LC₅₀ (0.197 mg/ml) previously reported by Coelho et al. (2009) and similar mortality ($51.6\% \pm 2.8$) was determined. Larvicidal activity was also evaluated for cMoL on Rockfeller L₄ as well as for WSMoL and cMoL on Rec-R L₄. Larval mortality was not detected (Table 1) revealing that only WSMoL presents the physico-chemical characteristics required to kill Rockfeller L₄ and that organophosphate-resistant L₄ were also resistant to WSMoL.

Table 1. Mortality rate (%) of *A. aegypti* Rockfeller and Rec-R L4 after incubation with WSMoL and cMoL

Lectin	Mortality (%)	
	Rockfeller	Rec-R
WSMoL (mg/mL)		
0.1	ND	0.0
0.197	51.6 ± 2.8	0.0
0.4	ND	0.0
0.8	ND	0.0
cMoL (mg/mL)		
0.1	0.0	0.0
0.2	0.0	0.0
0.4	5.0 ± 0.0	0.0
0.8	3.3 ± 2.8	0.0

ND: not determined.

The effect of WSMoL and cMoL on protease, trypsin-like and α -amylase activities from gut of Rockfeller and Rec-R L₄ was evaluated since it has been reported that lectins may affect insect metabolism by inhibiting or stimulating the activity of these digestive enzymes at insect midgut (Macedo et al., 2007; Napoleão et al., 2012).

Protease activity was determined measuring the increase in absorbance at 366 nm resulting of the release of trichloroacetic acid-soluble peptides derived from hydrolysis of azocasein. Extract from gut of Rec-R L₄ showed protease activity (309.4 U/mg) higher than gut extract from Rockfeller L₄ (73.3 U/mg), indicating that organophosphate-resistant L₄ expressed a large amount of these enzymes and/or a set of proteases different from that of Rockfeller larvae. When WSMoL and cMoL were incubated with gut extracts from Rockfeller and Rec-R L₄ in absence of azocasein, no increase in absorbance at 366 nm was detected, revealing that the lectins were resistant to proteolysis by extracts. An appropriate level of resistance against proteolysis in the insect gut is usually a pre-requisite for lectins exert their toxic effects (Macedo et al., 2007; Napoleão et al., 2012).

WSMoL promoted distinct effect on protease activity from susceptible and resistant *L*₄, increasing activity from Rockfeller *L*₄ (Figure 1A) and reducing activity from Rec-R larvae (Figure 2A). These results corroborates with the expression of different set of proteases by larvae. cMoL promoted slight reduction (30%) of protease activity from Rockfeller *L*₄ (Figure 1B) while not significant affected the activity from Rec-R *L*₄ (Figure 2B).

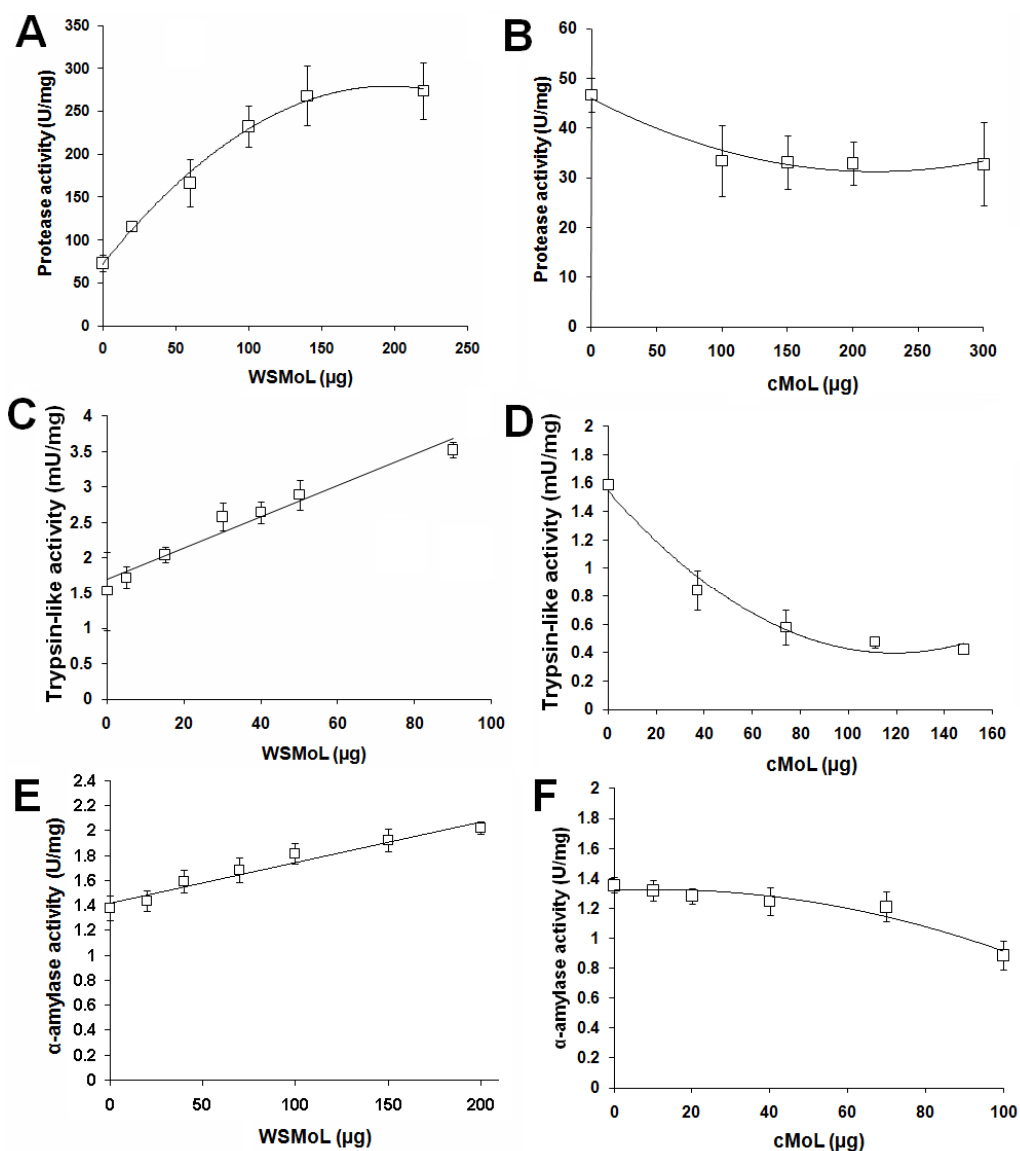


Fig. 1. Effect of WSMoL and cMoL on protease (A and B), trypsin-like (C and D) and α-amylase (E and F) activities from *A. aegypti* Rockfeller *L*₄.

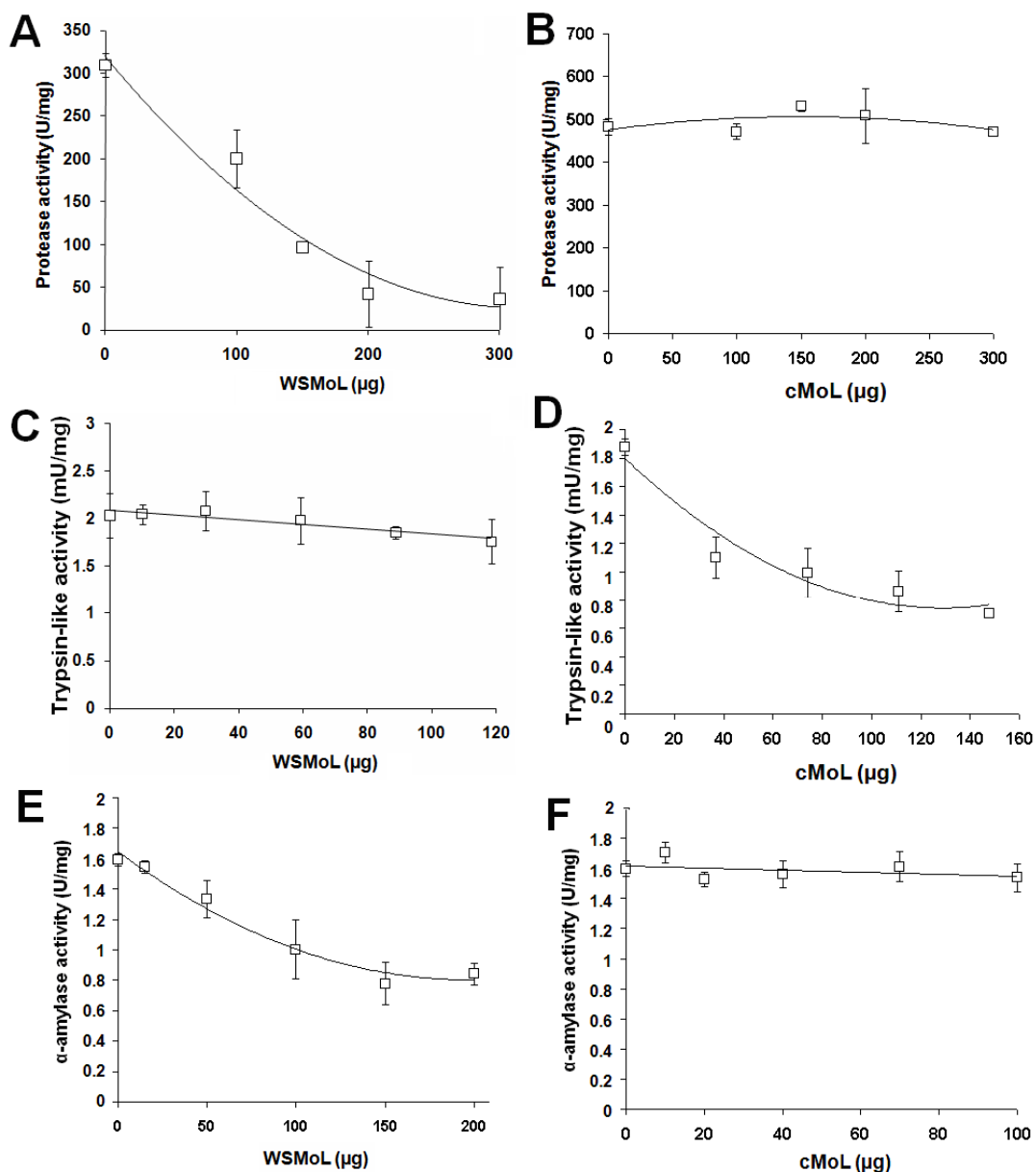


Fig. 2. Effect of WSMoL and cMoL on protease (A and B), trypsin-like (C and D) and α -amylase (E and F) activities from *A. aegypti* Rec-R L₄.

Trypsin-like activity from Rec-R L₄ (2.1 mU/mg), detected by the generation of p-nitroaniline resulting from the hydrolysis of BApNA, was also higher than that from Rockfeller L₄ (1.53 mU/mg). WSMoL promoted increase of trypsin-like activity from Rockfeller L₄ (Figure 1C) but had no significant effect ($p>0.05$) on this enzyme activity from Rec-R larvae (Figure 2C). cMoL strongly inhibited this enzyme activity from Rockfeller L₄ while the activity from Rec-R L₄ was reduced (Figures 1D and 2D).

Gut extracts from Rockfeller and Rec-R L₄ were able to hydrolyze starch releasing reducing sugars, showing α -amylase activities of 1.3 and 1.56 U/mg, respectively. In presence of WSMoL, the amylase activity from susceptible larvae was stimulated (Figure 1E) while that from Rec-R L₄ was inhibited (Figure 2E). cMoL slightly inhibited (34 %) amylase activity from Rockfeller L₄ (Figure 1F) but have no effect on activity from Rec-R L₄ (Figure 2F).

Macedo et al. (2007) reported that lectins can block enzyme activity by binding to protein or sugar moieties while stimulatory effect on enzyme activities may occur by increasing affinity of the enzyme to its substrate. The inhibition or stimulation of the activity of digestive enzymes in insects exposed to plant entomotoxic proteins may result in metabolic imbalance, damage to growth and induction of mortality (Macedo et al., 2007; Babu and Subrahmanyam, 2010; Napoleão et al., 2012).

The results indicate that Rockfeller L₄ mortality may be linked to stimulation of digestive enzyme activities by WSMoL. Interestingly, WSMoL showed opposite effects (inhibition) on digestive enzymes from Rec-R larvae, which were not killed by lectin. It is possible that the excessive proteolytic activity induced by WSMoL may result in imbalance of proteolysis at gut lumen of Rockfeller larvae and degradation of important proteins, which may be related with the morphological damages at gut level reported by Coelho et al. (2009). Similar to WSMoL, the larvicidal lectin from *Myracrodruon urundeuva* leaf (MuLL) showed an *in vitro* stimulatory effect on α -amylase activity from *A. aegypti* L₄ (Napoleão et al., 2012).

cMoL showed a pronounced effect only on trypsin-like activity from Rockfeller larvae but it seems that its inhibitory activity against this enzyme was not sufficient to impair larvae survival. The absence of very significative changes promoted by cMoL on the other digestive enzyme activities from both populations is probably due to molecular characteristics of this lectin and may be a reason for its unefectiveness on *A. aegypti* larvae mortality.

Detoxifying enzymes are involved in the development of insect resistance (Nivsarkar et al., 1991; Carino et al., 1994; Raymond et al., 1998; Guirado and Bicudo, 2009; Müller et al., 2007). The identification of compounds with inhibitory effect on this group of enzymes may help to increase or restore the susceptibility to the insecticides used routinely, overpassing the metabolic resistance (Larson et al., 2010). The secondary metabolite α -mangostin from *Garcinia mangostana* decreased the LC_{50} of temephos on Rockfeller *A. aegypti* larvae because it was able to inhibit the activity of detoxifying esterases (Larson et al., 2010). In this sense, this work determined whether WSMoL and cMoL could interfere with the activity of detoxifying enzymes from Rockfeller and Rec-R L_4 (Figure 3 and 4) and therefore it would have potential as synergists for insecticides routinely used in control programs.

SOD activity was significantly ($p < 0.05$) higher in Rec-R (29.1 U/mg) than Rockfeller larvae (21.7 U/mg). SOD activity of *A. aegypti* larvae has been detected in the anal gills playing some important role in providing resistance to mosquito larvae against harmful oxygen derivatives (Nivsarkar et al., 1991). It has been showed that enzyme level increases with the maturation of the larvae from instar 1 to instar 4 and that elevated levels of SOD might increase pyrethroid resistance (Nivsarkar et al., 1991; Müller et al., 2007). WSMoL interfered slightly in SOD activity from larvae of both populations (Figure 3A and 4A), while cMoL showed a high inhibitory effect on enzyme from Rockfeller L_4 (Figure 3B) and neutralized the activity from Rec-R L_4 (Figure 4B). SOD inhibition by cMoL, although it can lead to an oxidative stress due to impairment of superoxide radical detoxification, did not promote larval mortality.

Rockfeller and Rec-R L_4 showed a higher level of α -esterase (absorbance increase of 0.720 and 1.170, respectively) than β -esterase (absorbance increase of 0.264 and 0.420, respectively). Also, Rec-R larvae showed esterase activities higher than Rockfeller L_4 . This

fact is probably associated with their resistance to temephos since increased levels of these enzymes have been reported for larvae resistant to this pesticide (Flores et al 2005; Melo-Santos et al 2010; Polson et al 2011)

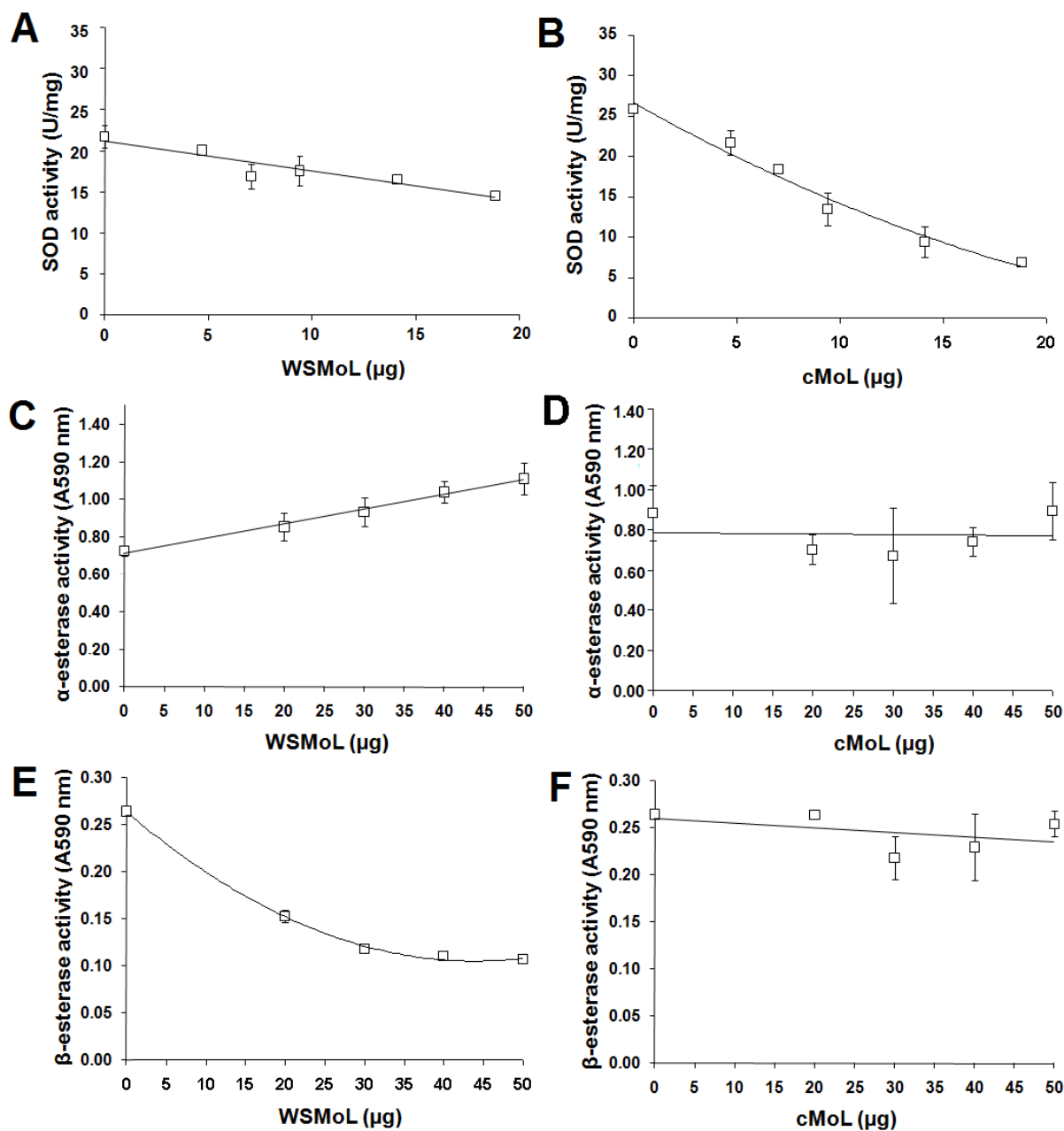


Fig. 3. Effect of WSMoL and cMoL on SOD (A and B), α -esterase (C and D) and β -esterase (E and F) activities from *A. aegypti* Rockfeller L₄.

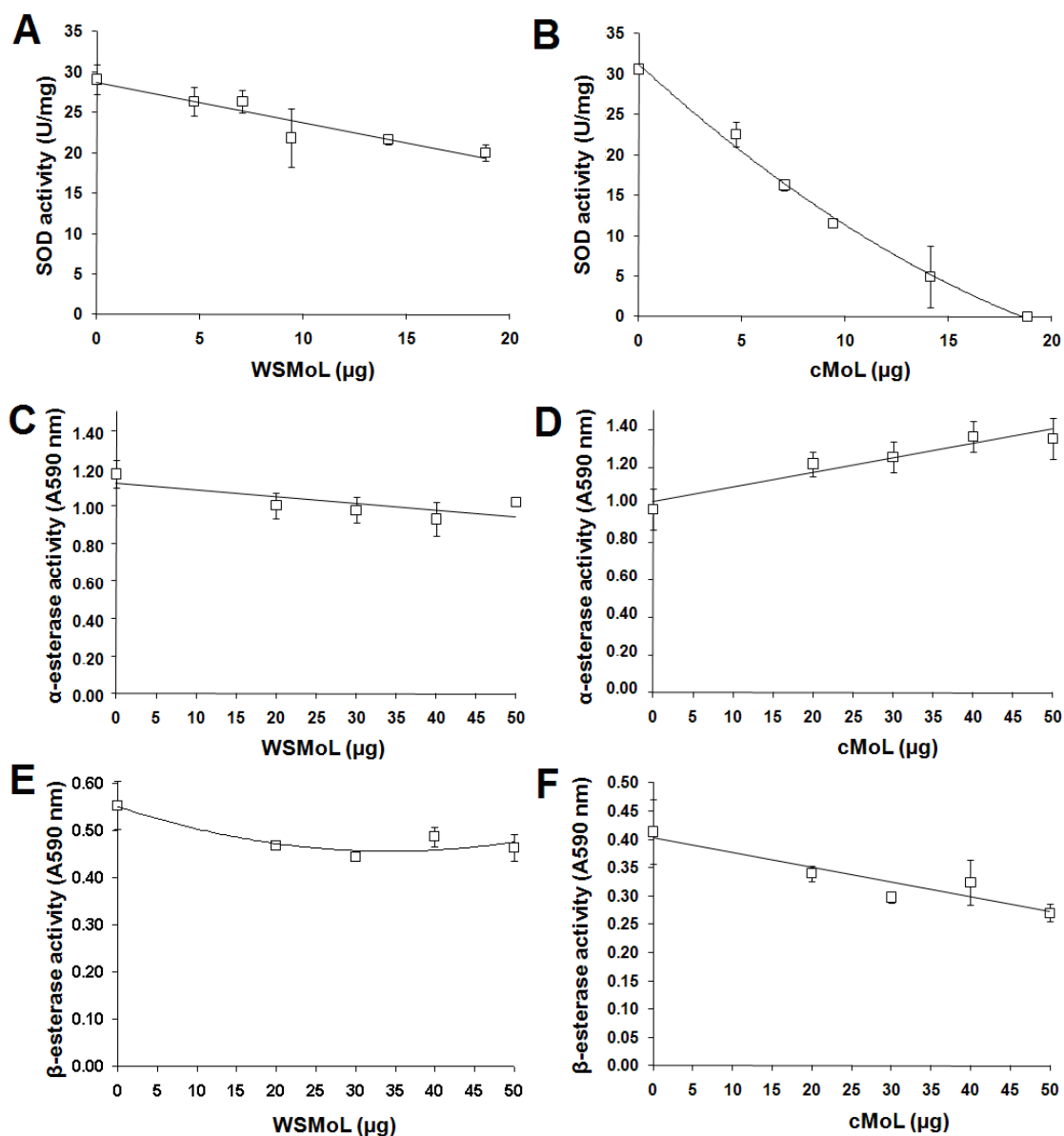


Fig. 4. Effect of WSMoL and cMoL on SOD (A and B), α -esterase (C and D) and β -esterase (E and F) activities from *A. aegypti* Rec-R L₄.

WSMoL stimulated activity of α -esterase from Rockfeller larvae (Figure 3C) but did not promote significant changes in this activity from Rec-R larvae (Figure 4C). cMoL did not affect the α -esterase from Rockfeller L₄ (Figure 3D) but promote increase of this activity from Rec-R L₄ (Figure 4D). The β -esterase activity from Rockfeller larvae was inhibited by WSMoL (Figure 3E), while cMoL did not promote significant alterations (Figure 3F).

WSMoL did not affect β -esterase activity from Rec-R L₄ (Figure 4E) and cMoL slight reduced this activity (Figure 4F).

Although WSMoL and cMoL promoted reduction in β -esterase activity from Rec-R L₄, the inhibitory effect was slight and was probably not sufficient to promote an overpass of larval resistance to insecticide. In addition, the lectins showed no effect on α -esterase, which was the most active form detected.

4. Conclusion

The results showed that WSMoL, although is able to kill organophosphate-susceptible (Rockfeller) larvae of *A. aegypti*, did not promote mortality of organophosphate-resistant (Rec-R) larvae. The absence of larvicidal activity of cMoL on Rockfeller larvae is another distinct characteristic of *M. oleifera* insecticidal lectins. The mechanism of larvicidal activity of WSMoL on Rockfeller larvae may involve stimulation of larval digestive enzymes (protease, trypsin and α -amylase) and inhibition of β -esterase activity. The lectins did not show strong inhibitory effects on Rec-R esterases indicating that, at this point of view, they would not have potential as synergists to temephos.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants and fellowships (CMFO, LCBBC and PMGP). We are also grateful to the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE) and the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for financial support and graduate scholarships (ACAN, EVP, NDLS, LAL and THN). We thank Maria Barbosa Reis da Silva for technical assistance.

References

- Azeez, A., Sane, A. P., Bhatnagar, D., Nath, P., 2007. Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. *Phytochemistry*, 68, 1352–1357.
- Babu, S.R., Subrahmanyam, B., 2010. Bio-potency of serine proteinase inhibitors from *Acacia senegal* seeds on digestive proteinases, larval growth and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98, 349-358.
- Barreto, C.F., 2005. *Aedes aegypti* – Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos*, 1, 62-73.
- Bernfeld, P., 1955. Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*, 1, 149–158.
- Beserra, E.B., 2007. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. *Neotropical Entomology*, 36, 1519-1566,
- Bing, D.H., Weyand, J.G., Stavinsky, A.B., 1967. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124, 1166-1170.
- Braga I.A., Valle D., 2007. *Aedes aegypti*: surveillance, resistance monitoring, and control alternatives in Brazil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16, 295-302.
- Carino FA, Kopener JF, Plapp FW, Feyreisen R. Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene CYP6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochem Mol Biol.* 1994; 24: 411-418.
- Carvalho, M.S.L. Degallier, N., Vilarinhos, P.T.R., Sousa, L.C.K.R., Yoshizawa, M.A.C., Knox, M.B., Oliveira, C.2004. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. *Revista de Saúde Pública*, 38, 623-629.
- Coelho, J.S., Santos, N.D.L., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Ferreira, R.S., Zingali, R.B., Coelho, L.C.B.B., Leite, S.P., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., 2009. Effect of

- Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. Chemosphere, 77, 934-938.
- Cheng, S.S., Chang, H.T., Chang, S.T., Tsai, K.H., Chen, W.J., 2003. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. Bioresour. Technol. 89, 99–102.
- Fitches, E., Woodhouse, S.D., Edwards, J.P., Gatehouse, J.A., 2001. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; ConA) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae: mechanisms of insecticidal action. Journal of Insect Physiology, 47, 777–787.
- Flores, A.E., Albeldaño-Vázquez, W., Salas, I.F., Badii, M.H., Becerra, H.L., Garcia, G.P., Fuentes, S.L., Brogdon, W.G., Black, W.C., Beaty, B. 2005. Elevated α -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Pesticide Biochemistry and Physiology, 82, 66-78.
- Green, A.A., Hughes, L., 1955. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents. In: Colowick, S., Kaplan, N. (Eds.), Methods in Enzymology. Academic Press, New York, 67–90.
- Guirado, M.M., Bicudo, H.E.M.C, 2009. Alguns aspectos do controle populacional e da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). BEPA, Boletim. Epidemiológico, 6, 64.
- Kakade, M. L., Simons, N., Liener, I. E., 1969. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. Cereal Chemistry, 46, 518–526.
- Ketterman, A.J., Prommeenate, P., Boonchaay, C., Chanama, U., Leetachewa, S., Promtet, N., Prapanthadara, L., 2001. Single amino acid changes outside the active site significantly affect activity of glutathione S-transferases. Insect Biochemistry. Molecular. Biologic. 31, 65–74.

- Larson, R.T., Lorch, J.M., Pridgeon, J.W., Becnel, J.J., Clark, G.G., Lan. Q., 2010. The biological activity of α -Mangostin, a larvicidal botanic mosquito sterol carrier Protein-2 Inhibitor. *Journal of Medical Entomology*, 47, 249-257.
- Lima, E.P., Oliveira filho, A.M., Lima, J.W.O. Ramos Junior, A.N., Cavalcanti, L. P. G., Pontes, R.J.S., 2006. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em Municípios do Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39, 259-263.
- Lima, J.B.P., Cunha M.P., da Silva Jr., R.C., Galardo, A.K.R., Soares. S. da S., Braga, I.A, Ramos R.P., Valle, D., 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68, 329-333.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Luna, J.E.D., Martins, M.F., Anjos, A.F., Kuwabara, E.F., Navarro-Silva, M. A. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temefos e cipermetrina, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 38, 842-843.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M, Silva, M.B.R., Coelho, L.C.B.B., 2007. Inseticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 146, 486-498.
- Marcombe, S., Darriet, F., Agnew, P., Etienne, M., Yp-Tcha, M-M., Yébakima, A., Corbel, V., 2011. Field efficacy of new larvicide products for control of multi-resistant *Aedes aegypti* populations in Martinique (French West Indies). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84, 118-126.
- Melo-Santos, M.A.V., Varjal-Melo, J.J.M., Araújo, A.P., Gomes T.C.S., Paiva, M.H.S., Regis, L.N., Furtado, A.F., Magalhães, T., Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T.M.,

- Ayres, C.F.J., 2010. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Tropica*, 113, 180–189.
- Michiels, K., Van Damme, Smagghe, G., 2010. Plant-Insect interactions: What can we learn from plant lectins? *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 73, 193-212.
- Müller, G.J., Lassmann, H., Johansen, F.F., 2007. Anti-apoptotic signaling and failure of apoptosis in the ischemic rat hippocampus. *Neurobiology of Disease* 25, 582–593.
- Napoleão, T.H., Pontual, E.V., Lima, T.A., Santos, N.D.L., Sá, R.A., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., 2012. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitology Research*, 110, 609-616.
- Nivsarkar, M., Kumar, G.P., Laloraya, M., Laloraya, M.M., 1991. Superoxide dismutase in the anal gills of the mosquito larvae of *Aedes aegypti*: its inhibition by alpha-terthienyl. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 16, 249-255
- Oliveira, F.R., Luz, L.A., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B. Marangoni, S., Macedo, M. L.R., 2011. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. *Process Biochemistry*, 46, 498-504.
- Polson, K.A., Brogdon, W.G., Rawlins, S.C., Chadee, D.D., 2011. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Tropica*, 117, 31-38
- Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 36, 113-118.
- Paiva, P.M.G., Santana, G.M.S., Souza, I.F.A.C., Albuquerque, L.P., Agra-Neto, A.C., Albuquerque, A.C., Luz, L.A., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B., 2011. Effect of

- lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. International Biodegradation and Biodeterioration, 65, p. 982-989.
- Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M. 1995. Lectin as plant defense proteins. Plant Physiology, 109, 347–352.
- Prophiro, J.S., Silva, O. S., Luna, J.E.D., Piccoli, C.F., Kanis, L.A., Silva, M.A.N., 2011. *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistência e susceptibilidade ao temephos, em municípios com ocorrência de casos de dengue e diferentes características de urbanização. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 44, 300-305.
- Raymond M, Chevillon C, Guillemaud T, Lenormand T, Pasteur N. 1998 An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. Phil Trans R Soc B. 1998;353:1707-11.
- Rolim, L.A.D.M.M., Macêdo, M.F.S., Sisenando, H.A., Napoleão, T.H., Felzenszwalb, I., Aiub, C.A.F., Coelho, L.C.B.B., Medeiros, S.R.B., Paiva, P.M.G., 2011. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. Journal of Food Science, 76, T53–T58.
- Santos, A.F.S., Luz, L.A., Argolo, A.C.C., Teixeira, J.A., Paiva, P.M.G. Coelho, L.C.B.B., 2009. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. Process Biochemistry, 44, 504-508.
- Sá, R.A., Santos, N.D.L., Silva, C.S.B., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Cavada, B.S., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Bieber, L.W., Paiva, P.M.G., 2009. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. Comp. Biochem. Physiol. C, 149, 300-306.

- Simas, N.K., Lima, E.C., Kuster, R.M., Lage, C.L.S., Filho, A.M.O., 2007. Potential use of *Piper nigrum* ethanol extract against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* larvae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40, 405-407.
- World Health Organization, 1981 Instructions for Determining the Susceptibility or Resistance of Mosquito Larvae to Insecticides, WHO/VBC/81.807, p. 1–6.
- World Health Organization, 2012. Dengue and severe dengue. Fact Sheet 117.

6. CONCLUSÃO

Os resultados revelam que WSMoL, embora seja capaz de matar larvas de *A. aegypti* susceptíveis (Rockfeller) a organofosforado, não promoveu mortalidade de larvas resistentes (Rec-R). A ausência de atividade larvicida de cMoL sobre as larvas Rockfeller é uma outra característica distinta das lectinas inseticidas de *M. oleifera*. O mecanismo da ação larvicida de WSMoL nas larvas Rockfeller pode envolver a estimulação da atividade de enzimas digestivas (protease, tripsina e α -amilase) e inibição de β -esterase. As lectinas não apresentaram potente efeito inibitório sobre as esterases de Rec-R indicando que, desse ponto de vista, elas não apresentam potencial como sinergista do temefós.