

ATIVIDADE OVICIDA DE FRAÇÕES PROTEICAS DE *Myracrodruon urundeuva*

Robson R. V. Alves¹, Gabryella B. Prazeres¹, Euda M. G Santos¹, Abdênego R. Silva¹, Amanda O. Marinho¹, Nathália R. G. Silva¹, Jéssica S. Nascimento², Daniela M. A. F. Navarro², Pollyanna M. da Silva¹, Thiago H. Napoleão¹, Patrícia M. G. Paiva^{1*}

1. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco

2. Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco

* Orientador

Resumo

Proteínas vegetais apresentam atividade inseticida. Obter frações proteicas da entrecasca, cerne e folhas de *Myracrodruon urundeuva* a partir de extratos salinos e avaliar quanto a presença de lectina, protease e atividade ovicida. A presença de lectinas foi avaliada através do ensaio de hemaglutinação utilizando suspensão de eritrócitos de coelho. Atividade proteolítica foi determinada utilizando azocaseína como substrato. Ovos de *Aedes aegypti* foram selecionados utilizando estereomicroscópio. Ovos (50) foram incubados (25-27°C) com as frações (20 mL) e o número de larvas eclodidas foi determinado após 72 h. A concentração efetiva em reduzir a taxa de eclosão em 50% (CE₅₀) foi determinada. As frações da entrecasca, cerne e folhas apresentaram atividade hemaglutinante, proteolítica e ovicida. Os valores da CE₅₀ foram 0,022, 0,020 e 0,025 mg/mL, respectivamente. As frações proteicas de *M. urundeuva* contendo lectinas e proteases foram agentes ovicidas eficientes.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; Lectina; Protease.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES e FACEPE.

Introdução

A população de *Aedes aegypti* tem adquirido resistência aos inseticidas químicos utilizados para o seu controle (BELLINATO et al., 2016). As plantas contêm proteínas que participam em mecanismos de defesa contra a ação de insetos. As lectinas, proteínas hemaglutinantes que reconhecem carboidratos livres ou presentes em glicoconjugados, apresentam atividade inseticida contra *A. aegypti* (COELHO et al., 2009; SÁ et al., 2009; NAPOLEÃO et al., 2012; SANTOS et al., 2012; AGRA-NETO et al., 2014; ALVES et al., 2020).

Os ovos de *A. aegypti* são a principal forma de dispersão do mosquito. O revestimento dos ovos permite trocas gasosas com o meio externo e é formado por proteínas e quitina (FORATTINI, 2002; PEREIRA et al., 2006; LI; LI, 2006; MOREIRA et al., 2007; SUMAN et al., 2011). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2009), não existem produtos químicos disponíveis no mercado com ação ovicida para serem utilizados em campanhas de saúde pública. A lectina de sementes de *Moringa oleifera*, chamada WSMoL, apresentou atividade ovicida contra ovos frescos e estocados de *A. aegypti* e foi demonstrado que a lectina foi capaz de matar o embrião já formado presente em ovos estocados e inibiu o desenvolvimento do embrião em ovos frescos (SANTOS et al., 2012).

Myracrodruon urundeuva é uma planta distribuída no Brasil, sendo amplamente encontrada na Caatinga. Preparações de *M. urundeuva* são utilizadas na medicina tradicional (CARVALHO et al., 2017). A madeira desta planta apresenta notável resistência a degradação por microrganismos e a sua entrecasca, que é usada para tratar infecções, tem ação analgésica e anti-inflamatória. Na medicina tradicional é usada em forma de decocção, infusão em água e xaropes (CARVALHO et al., 2017). Uma lectina foi isolada do cerne de *M. urundeuva* e denominada MuHL (do inglês *M. urundeuva heartwood lectin*). MuHL, que reconhece N-acetilglicosamina e liga quitina, apresenta atividade larvicida contra larvas de *A. aegypti* no quarto estágio, sendo a concentração letal necessária para matar 50% das larvas (CL₅₀) de 0,04 mg/mL (SÁ et al., 2009; NAPOLEÃO et al., 2012).

O objetivo desse trabalho foi avaliar frações proteicas da entrecasca, cerne e folhas de *M. urundeuva* quanto a presença de lectina, protease e atividade ovicida contra *A. aegypti*.

Metodologia

Farinhas da entrecasca, do cerne e das folhas de *M. urundeuva* (10g) foram homogeneizadas (4°C por 16h) em 100 mL de NaCl 0,15 M. Em seguida, o homogenato foi filtrado, centrifugado (9.000g; 15min, 4°C) e o sobrenadante coletado correspondeu aos extratos salinos. As proteínas dos extratos foram precipitadas com sulfato de amônio a uma saturação de 20-40% (entrecasca), 40-60% (cerne) e 60-80% (folhas) e em seguida centrifugação (9.000g; 15min, 4°C) foi realizada. As frações obtidas (precipitada - frações entrecasca e folhas, e sobrenadante - fração cerne) foram dialisadas (em membrana de 3,5 kDa) contra NaCl

0,15 M (6h a 4°C). A quantificação protéica foi realizada de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando-se curva padrão de albumina sérica bovina (BSA).

A presença de lectinas nas preparações foi avaliada de acordo com Paiva e Coelho (1992). Alíquota de 50 µL da amostra foi serialmente diluída em NaCl 0,15 M antes da adição de 50 µL de suspensão (2,5% v/v) de eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído (BING et al., 1967). Uma unidade de atividade hemaglutinante (título⁻¹) foi definida como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu total hemaglutinação. A atividade hemaglutinante específica foi definida pela razão entre o título e a quantidade de proteínas (mg).

A atividade proteolítica foi determinada utilizando azocaseína como substrato, de acordo com Azeez et al. (2007). Alíquota (100 µL) da amostra foi incubada com 300 µL de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, contendo azocaseína a 0,6% (p/v). Após adição de 100 µL de Triton X-100 0,1% (v/v), a mistura foi incubada a 37°C por 3 h. A reação então foi interrompida com a adição de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v) e a mistura foi incubada a 4°C por 30 min. Em seguida, centrifugação (9.000g, 10 min) foi realizada e no sobrenadante foi determinada a absorbância a 366 nm. Os ensaios-controle diferiram dos ensaios-teste apenas no momento da adição do TCA. Os ensaios foram feitos em triplicata. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01. A atividade proteolítica específica foi definida pela razão entre o valor da unidade enzimática e a quantidade de proteínas (mg).

A atividade ovicida foi avaliada utilizando ovos de *A. aegypti* estocados (3 meses a 27± 2°C). Os ovos estocados foram selecionados com auxílio de lupas quanto à integridade e dispostos em papel de filtro antes de serem imersos em soluções contendo diferentes concentrações das frações proteicas ou água destilada (controle negativo). Em cada ensaio foram utilizados 50 ovos e o volume final de cada ensaio foi de 20 mL. Os ensaios foram realizados em quintuplicata e a contagem do número de larvas eclodidas foi realizada diariamente até um tempo final de 72 h. A concentração capaz de reduzir em 50% a taxa de eclosão (EC₅₀) foi calculado através da análise de probitos com intervalo de confiança de 95% pelo programa Statplus® 2006.

Resultados e Discussão

A tabela 1 mostra os dados da detecção de lectinas e proteases nas preparações proteicas de *M. urundeuva*. As amostras foram obtidas com rendimento satisfatório e alta atividade hemaglutinante e proteolítica.

Tabela 1. Dosagem de proteína, atividade hemaglutinante e proteolítica das frações da entrecasca, do cerne e das folhas de *M. urundeuva*.

Amostra	Proteína (mg/mL)	AH ⁻¹	AH específica (AH / proteína mg.mL ⁻¹)	AP (U)	AP específica (AP / proteína mg.mL ⁻¹)
Fração Entrecasca	5,0	256 ⁻¹	51,2	2,8	0,56
Fração Cerne	5,0	64 ⁻¹	12,8	7,1	1,42
Fração Folha	5,0	512 ⁻¹	102,4	21,5	4,30

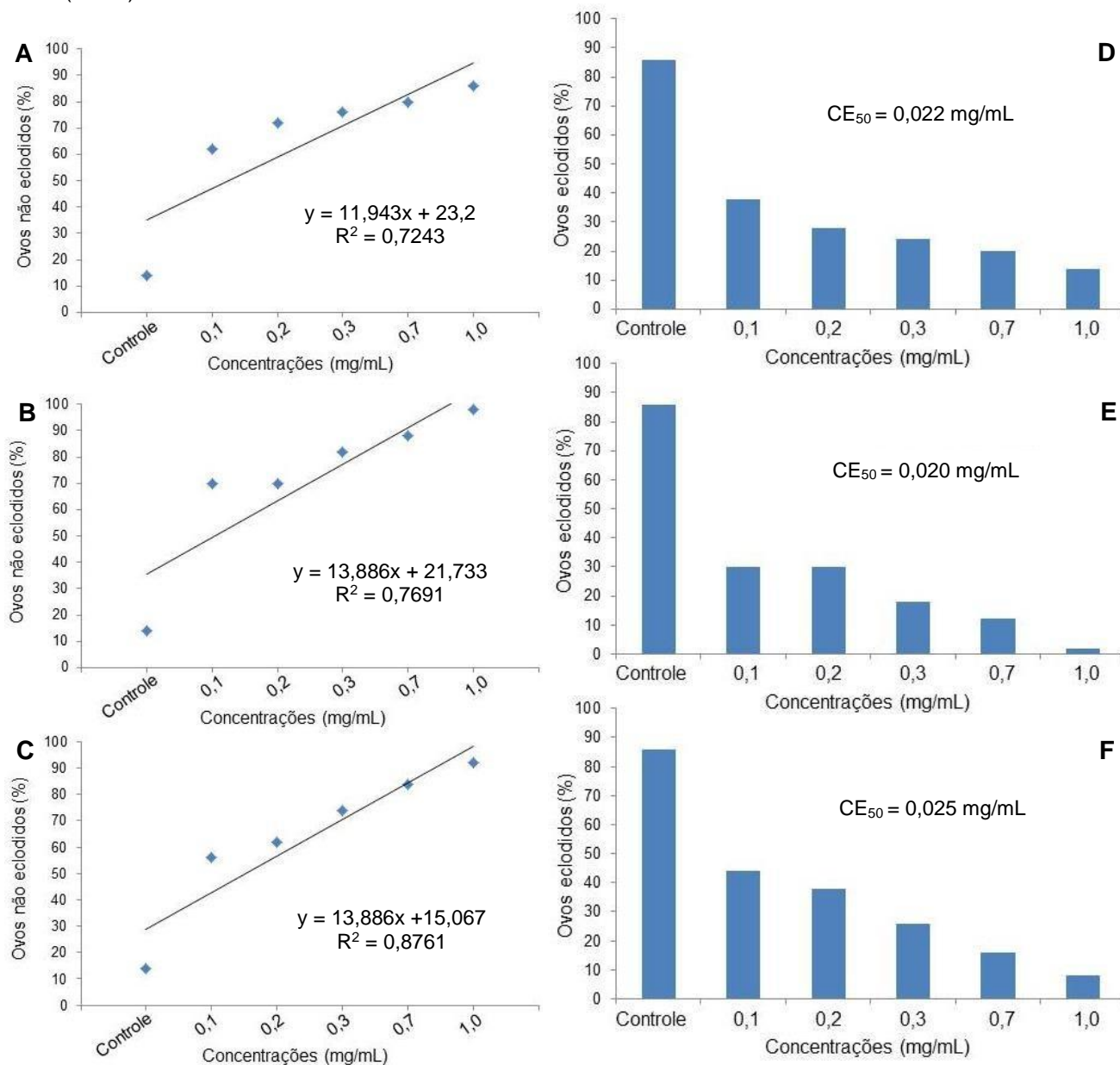
AH = Atividade Hemaglutinante; AP = Atividade Proteolítica

As frações proteicas da entrecasca, cerne e folhas foram agentes ovicidas em uma concentração eficaz capaz de impedir a eclosão em 50% (CE₅₀) dos ovos de *A. aegypti* de 0,022, 0,020 e 0,025 mg/mL, respectivamente (Figura 1). Atividade larvicida e ovicida de lectinas isoladas de *M. urundeuva* contra *A. aegypti* já foi determinada por Sá et al. (2009), Napoleão et al. (2011) e Alves et al. (2020).

A CE encontrada para cada fração de *M. urundeuva* foi mais baixa do que aquela determinada para as lectinas WSMoL, MuBL e MuHL que apresentaram CE₅₀ de 0,10, 0,26 e 0,80 mg/mL, respectivamente (SANTOS et al., 2012; ALVES et al., 2020).

Autores atribuíram atividades biológicas de lectinas contra insetos pela sua propriedade de reconhecer e se ligar a quitina ou pela desregulação de enzimas digestivas (OLIVEIRA et al., 2011; AGRA-NETO et al., 2014). Alves et al. (2020) utilizando conjugados lectina-FITC, demonstraram que as lectinas MuBL e MuHL de *M. urundeuva* e WSMoL de *Moringa oleifera* se ligaram especificamente as regiões da cabeça e matriz peritrófica de embriões de ovos descorados de *A. aegypti*, regiões essas que contêm quitina. Santos et al. (2012) mostraram que WSMoL interferiu no desenvolvimento embrionário em ovos recém-ovipositados e matou o embrião já formado em ovos estocados. Dessa forma, podemos atribuir a atividade ovicida à presença de lectinas nas frações proteicas de *M. urundeuva*.

Figura 1. Determinação da atividade ovicida e CE_{50} das frações da entrecasca (A e D), do cerne (B e E) e das folhas (C e F) de *M. urundeuva*.



Conclusões

As frações proteicas foram obtidas seguindo procedimento estabelecido por Sá et al. (2009) e Napoleão *et al.* (2011), com rendimento satisfatório e alta atividade hemaglutinante e proteolítica. As frações foram agentes ovicidas contra ovos estocados de *A. aegypti*, provavelmente devido a presença de lectinas.

Referências bibliográficas

- AGRA-NETO, A. C. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitology Research**, v. 113, p. 175–184, 2014.
- ALVES, R. R. V. et al. Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Management Science**, v. 76, n. 2, p. 730-736, 2020.
- AZEEZ, A. et al. Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 10, p. 1352-1357, 2007.
- BELLINATO, D. F. et al. Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* populations. **Biomed Research International**, v. 2016.
- BING, D. H. et al. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 124, n. 4, p. 1166-1170, 1967.

- CARVALHO, C. E. S. et al. Anti-Leishmania activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action. **Experimental Parasitology**, v. 175, 2017.
- COELHO, J. S. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934-938, 2009.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: Identificação, biologia**. Epidemiologia. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo. v. 2: 864 p, 2002.
- LI, J. S.; LI, J.. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 36, n. 12, p. 954-964, 2006.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.
- MOREIRA, M. F. et al. A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 12, p. 1249-1261, 2007.
- NAPOLEÃO, T. H. et al. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 52-59, 2011.
- NAPOLEÃO, T. H. et al. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, v. 110, p. 609-616, 2012.
- OLIVEIRA, C. F. R. et al. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 498-504, 2011.
- PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart.(camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 113-118, 1992.
- PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural Proteomics of Dengue Virus. **Current Opinion in Microbiology**, v.11, n.4, p. 369-377, 2006.
- SÁ, R. A. et al. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 149, p. 300-306, 2009.
- SANTOS, N. D. L. et al. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, v. 7, e44840, 2012.
- SUMAN, D. S. et al. Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with egg surface morphology and morphometrics using scanning electron microscopy. **Arthropod Structure & Development**, v. 40, p. 479-483, 2011.