

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE INSETICIDA DA LECTINA DE *STRYPHNODEDRON ADSTRINGENS* COMO AGENTE INSETICIDA CONTRA *Aedes aegypti* (CULICIDAE).

Andrezza e Silva Melo¹; Roberto Araújo Sá²

¹Estudante do Curso de licenciatura em Química - CAA – UFPE; E-mail: asm.ufpe@gmail.com,

²Docente/pesquisador do Núcleo de Formação Docente – CAA - UFPE. E-mail: sa_araujo@yahoo.com.br.

Sumário: O presente trabalho relata a investigação de lectinas na entrecasca de *Stryphnodendron adstringens* e a avaliação da atividade inseticida de seu extrato salino (ES₈), fração proteica (F₄) e do pico proteico ativo (PII) frente à espécie *Aedes aegypti*. Lectinas foram detectadas em entrecascas de *S. adstringens*, ES₈ e F₄ aglutinaram eritrócitos de todos os tipos sanguíneos do sistema ABO assim como eritrócitos glutarizados de coelho e demonstraram boa termoestabilidade. F₄ (60-80%) apresentou maior AHE e foi inibida com N-acetilglicosamina, o que estimulou sua purificação através de cromatografia de afinidade em coluna de quitina, resultando no pico proteico ativo (PII). ES₈ e F₄ exibiram uma ótima atividade inseticida, com LC₅₀ de aproximadamente 4 e 8 ppm, respectivamente. PII induziu a mortalidade das larvas a partir dos 10 ppm, sendo necessária a ampliação dos pontos testados para estimar a LC₅₀ desta preparação.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; lectinas; *Stryphnodendron adstringens*

INTRODUÇÃO

A atividade inseticida de lectinas é geralmente avaliada através de bioensaios que incorporam a mesma em dietas artificiais oferecidas aos insetos, os quais morrem por privação nutricional. Os mecanismos exatos envolvidos no efeito entomotóxico ainda não são totalmente conhecidos. Tem sido demonstrado que as lectinas inseticidas são resistentes a proteases presentes no trato digestivo do inseto. No entanto, estudos apontam possíveis interações envolvidas: ligação da lectina a glicoconjugados 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). Lectinas podem cruzar a barreira do epitélio intestinal por transcitose, entrando no sistema circulatório e resultando em ação tóxica, interagindo com compostos presentes na hemolinfa (FITCHES *et al.*, 2008). A preocupação com o uso de substâncias químicas de alta toxicidade ao ambiente tem levado à busca por substâncias naturais com ação sobre organismos xilófagos, não-tóxicas ao homem e a outros animais (AHMED *et al.*, 2006), tais como as lectinas. As lectinas são proteínas que interagem seletiva e reversivelmente com monossacarídeos e glicoconjugados (LIS & SHARON, 1986), comumente extraídas de folhas, sementes e entrecascas de vegetais. Segundo Van Damme *et al.* (1998), em função de sua especificidade, as lectinas apresentam várias propriedades biológicas (inseticida, antifúngica, antimicrobiana e antitumoral, p. ex.). Assim como os metabólitos secundários, elas possuem diversas aplicações, como na fitoterapia, na indústria de cosméticos, de alimentos e demais segmentos (PLETSCH, 1998). *Stryphnodendron adstringens* (Leguminosae-Mimosoidae), o "barbatimão", é uma árvore de pequeno porte, nativa do cerrado brasileiro, e se destaca pelo elevado teor de taninos presentes em sua casca (DI STASI *et al.*, 2002). Na medicina popular, a infusão de sua casca é utilizada externamente como antiinflamatória e cicatrizante, e internamente na cura de úlceras (LORENZI & MATOS, 2002). Deste modo, objetivou-se avaliar a ação

inseticida das preparações lectínicas de *Stryphnodendron adstringens* frente às larvas de estágio larval L₄ de *Aedes aegypti*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cerca de 10 g de farinha da entrecasca de *S. adstringens* foram submetidos à extração de proteínas em NaCl 0,15 M por 8h (ES₈). A atividade lectínica de ES₈ foi realizada em placas de microtitulação. Foram colocados 50µl de NaCl 0,15M em cada poço; em seguida, foram adicionados ao segundo poço 50 µl da amostra a ser avaliada. Após uma diluição seriada, 50µl de eritrócitos de coelhos foram adicionados em todos os poços e as placas foram incubadas por 45 minutos. EB₈ foi avaliado quanto à presença de proteínas por espectrofotometria através do método de LOWRY *et al.* (1951). A purificação inicial foi realizada com o fracionamento das proteínas de ES₈ com (NH₄)₂SO₄ segundo GREEN & HUGHES (1955). Em seguida, F₄ foi submetido à diálise exaustiva com H₂O e NaCl 0,15 M por 4h cada, e posteriormente avaliado na presença de carboidratos e glicoproteínas. Em seguida, F₄ foi aplicado em coluna de quitina, equilibrada com NaCl 0,15 M. O pico proteico ativo (PII), denominado Lectina de *S. adstringens*, foi eluído com Ácido acético 1,0 M, submetido à diálise exaustiva com H₂O (4h) e liofilização. Em seguida, PII foi submetida à eletroforese em gel de Poli(acrilamida). A atividade inseticida foi realizada de acordo com o método de NAVARRO *et al.* (2003) para lectinas, utilizando faixas de concentrações preliminares e, posteriormente, específicas de ES₈, F₄ e PII. A mortalidade de 20 larvas no estágio larval L₄ submetidas ao contato com uma solução contendo cada uma das amostras proteicas foi avaliada após 24h e 48h do início do teste. Cada ensaio foi acompanhado por um controle negativo composto por larvas tratadas com água destilada e solução salina (NaCl 0,15 M). A LC₅₀ foi calculada através de análise de próbitos (MCLAUGHLIN *et al.*, 1993) com intervalo de confiança de 95%, utilizando o programa *Probit Analysis* (Statplus, 2006) e através de regressão linear simples utilizando o programa *Origin* 8.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ES₈ apresentou AH e concentração proteica satisfatória (217 e 222 mg/ml, respectivamente). A partir de ES₈, a purificação parcial das proteínas com sulfato de amônio foi realizada, gerando 4 frações proteicas. A fração F₄, por apresentar a melhor AHE (270034,0), foi escolhida para continuação do processo de purificação da lectina de *S. adstringens*. ES₈ e F₄, submetidas a ensaios de AH com eritrócitos glutarizados do grupo ABO e de coelho, foram capazes de aglutinar eritrócitos glutarizados de coelho. O ensaio de termoestabilidade indicou que ES₈ e F₄ sofreram leves perdas de AH dentro da faixa testada. Foi observado que os cátions divalentes testados a 10mM e 20mM estimularam o aumento da AH de ES₈ e F₄. Observou-se também que F₄ inibiu alguns dos carboidratos testados e todas as glicoproteínas testadas. PII foi avaliado em função da AH, sendo denominado lectina de *S. adstringens*. A eletroforese não resultou em uma banda eletroforética nos diferentes géis testados (10%, 12%, 15% e 17,5%, gel de concentração de 5% em todos) e nas concentrações de PII testadas (100-200 µg, com variações de 50 µg). Na determinação de atividade inseticida, todas preparações proteicas de *S. adstringens* apresentaram alguma toxicidade contra *A. aegypti*. Os resultados preliminares seguem na tabela 1:

Tabela 1. Testes iniciais das amostras proteicas de *S. adstringens* contra larvas de *Aedes aegypti*.

Amostra	Concentração (ppm)	V _{solução} (mL)	V _{água} (mL)	Mortalidade 24h (V/M)	%	Mortalidade 48h (V/M)	%
Contr. NaCl 0,15 M	100	20	0	20/0	0	20/0	0
ES ₈	10	2	18	0/20	100	0/20	100
	25	5	15	0/20	100	0/20	100



	50	10	10	0/20	100	0/20	100
F ₄	25	5	15	0/20	100	0/20	100
	50	10	10	0/20	100	0/20	100
	75	15	5	0/20	100	0/20	100
PII	4	0,8	19,2	-	-	19/1	5
	7	1,4	18,6	-	-	18/2	10
	10	2	18	-	-	17/3	15

Partindo destes resultados, foram montadas faixas de concentração para cada amostra. Os resultados obtidos estão esquematizados a seguir nas tabelas 2 e 3 para ES₈ e F₄, respectivamente, cujos pontos deram origem às curvas de comportamento da resposta em função da dose testada de cada amostra proteica montadas através do programa de análise de dados utilizado. Os gráficos 1 e 2 construídos correspondem aos resultados para ES₈ e F₄ (respect.) frente às larvas de *A. aegypti*:

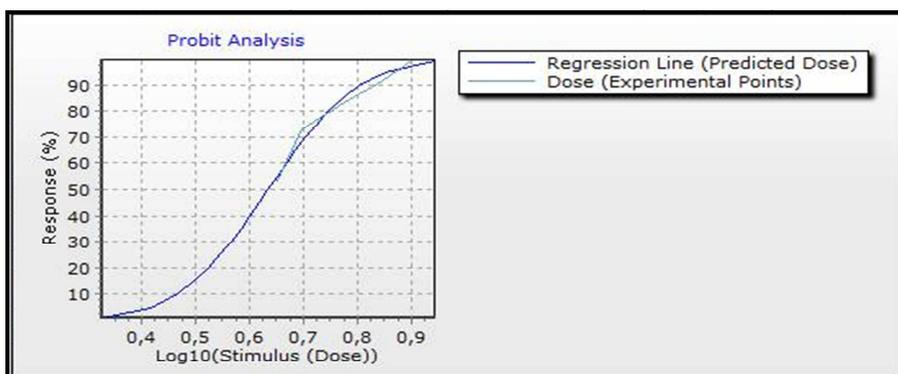


Gráfico 1. Mortalidade de *A. aegypti* em função das concentrações testadas de ES₈.

Probit Analysis - Least squares [Normal Distribution]					
Dose (Stimulus)	Actual Percent (%)	N	Probit (Y)	Weight (Z)	
4,5	0,5333	60	5,0834	4,9166	
5	0,7333	60	5,6226	4,2548	
6	0,8333	60	5,9074	3,5653	
7	0,9167	60	6,3832	2,3503	
8	0,9958	60	7,6387	1	
Regression Statistics					
LD50	4,2453	LD50 Standard Error	0,1542		
LD50 LCL	3,9414	LD50 UCL	4,5492		
Beta	0,5918	Intercept	2,4875		
Beta Standard Error	0,2333				
LD10	2,0798	LD16	2,5558		
LD84	5,935	LD90	6,411		
LD100	6,7798				

Tabela 2. Dados de Lethal Dose/ Concentração letal de ES₈ na faixa de concentração testada (ppm).

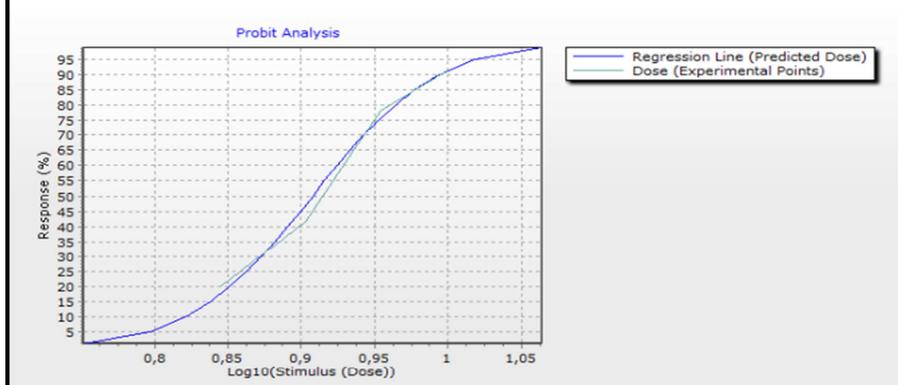


Gráfico 2. Mortalidade de *A. aegypti* em função das concentrações testadas de F₄.

Probit Analysis - Least squares [Normal Distribution]					
Dose (Stimulus)	Actual Percent (%)	N	Probit (Y)	Weight (Z)	
7	0,2	60	4,1585	3,8171	
8	0,4167	60	4,79	4,79	
9	0,7833	60	5,7833	3,9334	
10	0,9167	60	6,3832	2,3503	
Regression Statistics					
LD50	8,1407	LD50 Standard Error	0,1175		
LD50 LCL	7,9092	LD50 UCL	8,3722		
Beta	0,7767	Intercept	-1,3227		
Beta Standard Error	0,2532				
LD10	6,4904	LD16	6,8532		
LD84	9,4282	LD90	9,791		
LD100	10,072				

Tabela 3. Dados de Lethal Dose/ Concentração letal de F₄ na faixa de concentração testada (ppm).

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que lectinas foram detectadas em *S. adstringens* através de ES₈. ES₈ e F₄ mostraram-se termorresistentes, aglutinaram todos os tipos sanguíneos do sistema ABO e também eritrócitos de coelho, e tiveram sua AH estimulada pelos cátions divalentes. F₄ mostrou afinidade com a N-acetilglicosamina, justificando posteriormente a ação inseticida e termiticida desta e das demais preparações lectínicas. Quanto à atividade contra larvas de *A. aegypti*, ES₈ e F₄ apresentaram resultados excelentes, visto que induziram a morte destes insetos com concentrações mínimas. O efeito da lectina isolada ainda está sendo estimado através de novos ensaios, o qual foi dificultado pelo tempo de obtenção da amostra e a quantidade exigida para cada bioensaio, visto que o mesmo é realizado em triplicata. Pretende-se então finalizar esta etapa o mais breve possível.

AGRADECIMENTOS

À PROPESQ-CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. *et al.* Response of *Microtermes obesi* (Isoptera: Termitidae) and its gut bacteria towards some plant extracts. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 4, 317-320, 2006.
- ALMEIDA, S.P. de. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA – CPAC. 2010.
- AMSTERDAM D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: Loman V, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore: Williams and Wilkins. p. 52–111.1996.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal Clinical Pathology* 45: 493-496, 1966.
- CORREIA, M.T.S et al. Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic? In: Y.H. Siddique (ed.) *Recent Trends in Toxicology*, vol. 37, Transworld Research Network, Kerala, 2008, pp. 47-59.
- DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 73: 69-91, 2002.
- FITCHES, E. et al. An evaluation of garlic lectin as an alternative carrier domain for insecticidal fusion proteins. *Insect Science* 15, 483-495, 2008.
- GALLO, D.; NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, C.G. DE; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D. *Entomologia Agrícola*, Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.
- GREEN, A. A.; HUGHES, W. L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. In: COLOWICK, S.; KAPLAN, N. *Methods in Enzymology*, New York: Academic Press, v.1, pp. 67-90, 1995.
- LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275, 1951.
- PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109: 347-352, 1995.
- PLETSCH, M. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 4: 12-15, 1998.
- PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. *Biologia da conservação*. Londrina: Editora Planta, 2001.
- REBECCA, M. A. *et al.* Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 83, 2002, p. 101-104.
- SÁ, R. A. ; [GOMES, F. S.](#) ; [NAPOLEÃO, T. H.](#) ; [SANTOS, N. D. L.](#) ; [MELO, C.M.L.](#) ; [GUSMÃO, N.B.](#) ; [COELHO, L.C.B.B.](#) ; PAIVA, P. M. G. ; [BIEBER, L.W.](#) . Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *Wood Science and Technology JCR*, v. 43, p. 85-95, 2009.
- SIMÕES, CM.O.; SCHEMKEL, E. P.; GOSMANM, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L.; SOUSA, C. R. *Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Ceará*, Fortaleza. 1999.
- TRINDADE, M. B.; LOPES, J. L. S.; SOARES-COSTA, A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; OLIVA, M. L. V.; BELTRAMINI, L. M. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764: 146-152, 2006.
- NAVARRO, D. M. A. F.; OLIVEIRA, P. E. S. DE; POTTING, R. P. J.; BRITO, A. C.; FITAL, S. J. F.; SANT'ANA, A. E. G. The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Dipt., Culicidae). *J Appl Entomol* 127: 46-50, 2003.