

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

**ATIVIDADE COAGULANTE E TOXICIDADE SOBRE CÉLULAS HUMANAS E
Culex quinquefasciatus DE PREPARAÇÕES ENRIQUECIDAS DA LECTINA WSM₀L
E WSM₀L ISOLADA**

KÉZIA SANTANA DE MOURA

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA
COORIENTADOR: PROF. DR. ANÍBAL EUGÊNIO VERCESI**

**RECIFE
2017**

KÉZIA SANTANA DE MOURA

ATIVIDADE COAGULANTE E TOXICIDADE SOBRE CÉLULAS HUMANAS E *Culex quinquefasciatus* DE PREPARAÇÕES ENRIQUECIDAS DA LECTINA WSMoL E WSMoL
ISOLADA

Tese apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção de
título de Doutor em Bioquímica e
Fisiologia pela Universidade Federal de
Pernambuco.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador: Aníbal Eugênio Vercesi

RECIFE
2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Moura, Kézia Santana de

Atividade coagulante e toxicidade sobre células humanas e *Culex quinquefasciatus* de preparações enriquecidas da lectina WSMoL e WSMoL isolada / Kézia Santana de Moura- Recife: O Autor, 2017.

136 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador: Aníbal Eugênio Vercesi

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2017.

Inclui referências

1. Lectinas 2. Teste de toxicidade 3. *Culex* I. Paiva, Patrícia Maria Guedes (orientadora) II. Vercesi, Aníbal Eugênio (coorientador) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-146

KÉZIA SANTANA DE MOURA

ATIVIDADE COAGULANTE E TOXICIDADE SOBRE CÉLULAS HUMANAS E *Culex quinquefasciatus* DE PREPARAÇÕES ENRIQUECIDAS DA LECTINA WSMoL E WSMoL ISOLADA

Tese apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção de título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado em: 22/ 02/ 2017

Prof. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Orientadora)

Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Thiago Henrique Napoleão (Membro interno)

Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Membro interno)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dra. Mariana Pinheiro Fernandes (Membro externo)

Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão - Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Thâmarah de Albuquerque Lima (Titular Externo)

Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco

**Aos meus pais, Auri e Bel, e à minha irmã, Michele
por todo amor, honestidade, esforço e dedicação
que ao longo de todos os anos me ensinaram
o valor do homem de bem**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir essa existência de aprendizado e pela infinita bondade com que me abençoa todos os dias colocando no meu caminho pessoas e situações essenciais para o meu crescimento espiritual.

A minha família, pelo amor e suporte ao longo de todos esses anos. As escolhas e convicções dos meus pais me fizeram chegar onde estou agora e sem eles eu nada seria. Meus grandes amigos, professores e heróis da minha vida.

A Patrícia Paiva, por todos esses anos de amizade, cuidado e orientação. Obrigada por me aceitar em seu convívio e me deixar fazer parte do seu time e da sua vida. Minha professora-mãe-amiga-parceira, mesmo sabendo das minhas limitações e dos meus potenciais, nunca deixou de confiar em mim, sempre me colocando em busca do meu melhor. Há exatos 10 anos você entrou na minha vida e eu não seria a Keké que sou se não tivesse cruzado o seu caminho. Muito obrigada!

A Thiago e Nataly, por toda a dedicação e auxílio imenso ao longo de todos esses anos sempre me socorrendo com caridade e alegria.

A Leonardo Dobner, por todo amor com que transformou minha vida, me trouxe paz e me tornou uma pessoa melhor. Agradeço todos os dias pelo verdadeiro presente que é ter você ao meu lado. Obrigada, meu amor. Amo você!

A Léo, AnaPaty, Thâmarah e Bela, pelas risadas, conversas, companheirismo, confissões e histórias memoráveis que fazem dessa amizade algo único, maravilhoso e sarcástico do jeito que só a gente sabe. Como eu sou feliz por ter vocês! Obrigada por existirem!

Aos grandes amigos de graduação: Jamerson Alves, Michael Matos, Antônio Campos, Anselmo Jiro, Edvaldo Vieira, Vitor Xavier, Marx Lima e Rafael Carvalho por todas as gargalhadas, conversas científicas, debates filosóficos, companheirismo absurdo e carinho que me dão a certeza de que a melhor parte das escolhas que fiz na vida foi ganhar pessoas como vocês na minha história.

A minha amiga-irmã Dani Souza, pela amizade verdadeira e pelo grande coração. Como é bom poder contar com você, sorrir, desabafar e guardar minha vida na sua. Te amo, amiga!

Aos amigos do Laboratório de Bioenergética: Thiago, Carol, Genoefa, Edilene, Estela, Annelise, Ju Ruas, Roberto, Edilene, Márcia, Noelia e Miguel, obrigada por tantos dias de trabalho, apoio, desenvolvimento científico e carinho.

A Evelyne, Claudia, Raffaella, Gustavo e Érika pelo encontro de almas e alicerce de trabalho nesses dois anos em que estive na Unicamp. Foram muitas risadas e muitas lágrimas mas graças a vocês eu nunca estive e nunca estarei sozinha. Não encontro palavras pra agradecer a presença de vocês na minha vida em tantos momentos delicados e especiais.

Aos professores Aníbal Vercesi e Roger Castilho, pelo convite e oportunidade de trabalhar no Laboratório de Bioenergética da Universidade Estadual de Campinas. Um experiência única que mudou minha vida, meus conceitos e convicções.

Aos amigos da Academia Cinética, por me proporcionarem um ambiente tão maravilhoso em que pude descansar a mente, criar laços, viver experiências, fazer grandes amigos e gerar tantas memórias maravilhosas. Vocês me fizeram suportar com alegria dias árduos de trabalho e me ensinaram o real sentido da expressão "qualidade de vida". Eternamente grata à todos os encontros que esse lugar me deu!

Ao amigo e irmão mais novo, Caio Dias de Moraes. Não consigo descrever o tamanho dessa amizade, o carinho e a admiração que sinto por você.

A Maria Brisiguelo e toda sua família por todo amor e amizade. Obrigada por me darem família e aconchego em tantos momentos que fizeram da cidade de Mococa um dos sinônimos de casa para mim.

A Pedro, Pee, Paulo, Peter e Dani por fazerem parte da minha história com tantas boas lembranças, carinho e aprendizado.

A Luis Carlos Cassola e Solange Cassola por todo imenso suporte e cuidado nos dois anos em que morei na casa de vocês em Campinas. Grandes amigos que também se fizeram minha família. Muito obrigada!

Aos integrantes do laboratório de Bioquímica de Proteínas, que são tantos, obrigada por colaborarem para que nosso laboratório seja cada dia mais próspero.

Ao apoio técnico do Laboratório de Bioquímica de Proteínas.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Bioquímica.

Ao incentivo dado pela FACEPE, através da concessão da bolsa de doutorado e pelo auxílio à mobilidade discente.

Ao apoio financeiro dado pela UFPE, CNPq, CAPES, FACEPE e MCTI.

*“Não importa onde você parou,
em que momento da vida você cansou,
o que importa é que sempre possível e necessário
recomeçar.”*

Paulo Roberto Gaefke

RESUMO

A ampla utilização das sementes de *Moringa oleifera* no tratamento de água torna necessários estudos para determinação da segurança do uso para a população. As sementes de *M. oleifera* contêm lectinas (proteínas hemaglutinantes que ligam carboidratos). Dentre elas, há a lectina WSMoL (do inglês *water-soluble M. oleifera lectin*), que é um dos agentes responsáveis pelas propriedades coagulantes e que possui atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. Os objetivos deste trabalho foram: (1) determinar a toxicidade do extrato de sementes sobre células humanas normais GN1 (linhagem celular não-tumorigênica derivada de fibroblastos) e HaCaT (linhagem não-tumorigênica derivada de queratinócitos humanos); (2) avaliar a cinética de coagulação promovida por WSMoL em modelo de água turva utilizando caolin, através de medidas de densidade óptica e variação de resistência elétrica, na ausência e presença de carboidratos e íons; (3) investigar o efeito de WSMoL na sobrevivência e atividade de enzimas digestivas de larvas de *Culex quinquefasciatus*, mosquito vetor da filariose e chikungunya. O extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* reduziu o número de células viáveis com CE_{50} (48 h) de 1,32 e 1,23 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas para HaCaT e GN1, respectivamente. A análise por citometria de fluxo revelou que o extrato induziu a morte de GN1 por necrose enquanto que as células HaCaT não apresentaram marcação para necrose ou apoptose. A avaliação da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) revelou uma redução de $45,4 \pm 1,3\%$ em células HaCaT tratadas, confirmando um efeito antiproliferativo. O tratamento de GN1 e HaCaT com o extrato aumentou os níveis mitocondrial e citosólico de espécies reativas de oxigênio, bem como causou uma diminuição do consumo de O_2 . A detecção de toxicidade do extrato de sementes sobre células humanas normais indica cautela em relação à dosagem utilizada para o tratamento da água. WSMoL apresenta massa molecular nativa de 60 kDa e ponto isoelétrico 5,5. Em SDS-PAGE, foram observados três bandas polipeptídicas com aproximadamente 30, 20 e 10 kDa. Foi detectada redução tanto da densidade óptica quanto da resistência elétrica na suspensão de caolin tratada com WSMoL, o que indica que a atividade coagulante se deve à desestabilização das partículas em suspensão, seguida por interações químicas entre as partículas e a lectina. A incubação da lectina com os monossacarídeos N-acetilglicosamina, glicose e frutose (em concentrações que inibiram a atividade hemaglutinante) ou com íons cálcio e magnésio promoveram a redução da atividade coagulante de WSMoL. Esses resultados sugerem que grupos presentes no domínio de ligação a carboidratos podem estar envolvidos na atividade coagulante de WSMoL, bem como que a conformação da lectina necessária para essa propriedade é afetada pela ligação de carboidratos e íons. WSMoL revelou-se larvicida sobre *C. quinquefasciatus* com CL_{50} de 1,05 mg/mL. A incubação de extratos do intestino das larvas com a lectina não afetou a atividade de α -amilase e tripsina, porém reduziu significativamente a ação catalítica de protease, sugerindo que a atividade larvicida pode-se estar ligada à interferência no processo de digestão e absorção de nutrientes.

Palavras-chave: atividade coagulante. larvicida. lectina. extrato aquoso. morte celular. *Moringa oleifera*.

ABSTRACT

The wide use of *Moringa oleifera* seeds in the treatment of water makes studies necessary to determine the safety for the population. The seeds of *M. oleifera* contain lectins (hemagglutinating proteins that bind carbohydrates). Among them, there is the WSMoL (water-soluble *M. oleifera* lectin), which is one of the agents responsible for the coagulant properties and that has larvicidal activity against *Aedes aegypti*. The aims of this work were: (1) to determine the toxicity of the seed extract on normal human cells GN1 (non-tumorigenic cell line derived from fibroblasts) and HaCaT (non-tumorigenic line derived from human keratinocytes); (2) to evaluate the kinetics of coagulation promoted by WSMoL in turbid water model using kaolin, through measurements of optical density and of electrical resistance variation, in the absence and presence of carbohydrates and ions; (3) to investigate the effect of WSMoL on the survival and activity of digestive enzymes of *Culex quinquefasciatus* larvae, vector mosquito of filariasis and chikungunya. The aqueous extract of *M. oleifera* seeds reduced the number of viable cells with EC₅₀ (48 h) of 1.32 and 1.23 µg/mL of proteins for HaCaT and GN1, respectively. Flow cytometry analysis revealed that the extract induced the death of GN1 by necrosis while HaCaT cells showed no labeling for necrosis or apoptosis. Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression revealed a 45.4±1.3% reduction in treated HaCaT cells, confirming an antiproliferative effect. The treatment of GN1 and HaCaT with extract increased the mitochondrial and cytosolic levels of reactive oxygen species, as well as a decrease in O₂ consumption. The detection of toxicity of the seed extract on normal human cells indicates caution regarding the dosage used for the treatment of water. WSMoL has a native molecular mass of 60 kDa and isoelectric point 5.5. In SDS-PAGE, three polypeptide bands with approximately 30, 20 and 10 kDa were observed. Reduction of both the optical density and the electrical resistance were detected in the kaolin suspension treated with WSMoL, indicating that the coagulant activity is due to the destabilization of the suspended particles, followed by chemical interactions between the particles and the lectin. Incubation of the lectin with the monosaccharides N-acetylglucosamine, glucose and fructose (at concentrations that inhibited hemagglutinating activity) or with calcium and magnesium ions promoted the reduction of the coagulant activity of WSMoL. These results suggest that groups present in the carbohydrate binding domain may be involved in the coagulant activity of WSMoL, as well as that the conformation of the lectin required for this property is affected by the binding of carbohydrates and ions. WSMoL showed to be larvicidal on *C. quinquefasciatus* with LC₅₀ of 1.05 mg/mL. Incubation of larval intestinal extracts with lectin did not affect α-amylase and trypsin activity, but significantly reduced the catalytic action of protease, suggesting that larvicidal activity may be linked to interference in the digestion and absorption of nutrients.

Palavras-chave: coagulant activity. larvicide. lectin. aqueous extract. cell death. *Moringa oleifera*.

LISTA DE FIGURAS

Página

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1: Figura 1. A espécie *M. oleifera*. Aspecto geral (A), Flores (B), Folhas (C), Sementes(D)..... **20**

Figura 2: Representação da atividade hemaglutinante de lectinas (A) e inibição da aglutinação por carboidratos livre em solução (B)..... **22**

Figura 3: Ciclo biológico do mosquito *Culex quinquefasciatus*. Adultos (1). As fêmeas depositam na água ovos agrupados sob a forma de jangada (2), após a eclosão há quatro estágios larvais (3), em seguida é atingido o estágio de pupa (4), que dará origem aos adultos..... **43**

ARTIGO 1

Figure 1: Effect of aqueous extract from *M. oleifera* seeds on viability of GN1 and HaCaT cells. (A) HaCaT and GN1 viability curves after treatment with the aqueous extract at different concentrations. (B) Percentage of viable HaCaT and GN1 cells after treatment with the extract for 48 h. (C) Time-response curves of HaCaT and GN1 viability in treatment with the extract at 1.6 µg/mL of protein. All the values represent the mean ± SEM of four independent experiments..... **100**

Figure 2: Evaluation of cell death in treatments of GN1 and HaCaT with the aqueous extract from *M. oleifera* seeds for 48 h at 1.6 µg/mL of protein. (A) Necrosis (7-AAD+) and apoptosis (AV+) were evaluated by flow cytometry. $p < 0.001$ by Student's t test (control cells vs. treated cells). (B) Percentage of GN1 cells dead by necrosis among all unviable cells. Staurosporin was used as positive control for apoptosis and digitonin for necrosis. $*p < 0.001$ by Student's t test. The values represent the mean ± SEM of seven independent experiments..... **101**

Figure 3: Analysis of PCNA expression in HaCaT and GN1 cells after 48-h treatment with the aqueous extract of *M. oleifera* seeds at 1.6 µg/mL of protein. (A) and (B)

represent the PCNA expression level in comparison with control. * $p < 0.05$ by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparisons. (C) The gel from a representative experiment showing the immunoreactive bands of PCNA (~36 kDa). (D) Membrane stained with Ponceau S showing the staining of all proteins present in the cell extract. The densitometry of all bands stained with Ponceau S from each experimental group was used as internal control for the respective

group..... 102

Figure 4: Production of ROS, reactive oxygen species, (mainly $O_2^{\bullet-}$) in GN1 cells from control or treated for 48 h with the aqueous extract of *M. oleifera* seeds at 1.6 $\mu\text{g/mL}$ of protein. (A) Mitochondrial ROS level determined using the probe MitoSox. (B) Cytosolic ROS level determined using the dihydroethidium (DHE). The values represent the mean $\pm$ SEM of seven independent experiments. * $p < 0.001$ (in comparison with control) by Student's t test..... 103

Figure 5: Production of ROS, reactive oxygen species, (mainly $O_2^{\bullet-}$) in HaCaT cells from control or treated for 48 h with the aqueous extract of *M. oleifera* seeds at 1.6 $\mu\text{g/mL}$ of protein. (A) Mitochondrial ROS level determined using the probe MitoSox. (B) Cytosolic ROS level determined using the dihydroethidium (DHE). The values represent the mean $\pm$ SEM of seven independent experiments. * $p < 0.001$ (in comparison with control) by Student's t test..... 104

Figure 6: Evaluation of the involvement of opening of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) in cytotoxic effects of aqueous extract of *M. oleifera* seeds. HaCaT and GN1 cells were treated with the extract at 1.6 $\mu\text{g/mL}$ of protein for 48 h in the presence or absence of 1 mM Debio 025 (A) or 1 mM boncrecate, BA (B). Values are expressed as mean $\pm$ SEM of four independent experiments for each condition. * $p < 0.001$ (control cells vs. treated cells). There were no statistical differences between cells treated with aqueous extract alone and cells treated with aqueous extract and Debio 025 or BA..... 105

Figure 7: . Evaluation of mitochondrial oxygen consumption. HaCaT and GN1 cells were treated with the extract at 1.6 $\mu\text{g/mL}$ of protein for 48 h. Representative tracings of

oxygen consumption measurements and absolute values of oxygen consumption in GN1 and HaCaT cells (2×10^6 cells/mL) incubated in reaction medium (pH 7.2) containing 125 mM sucrose, 1 mM MgCl_2 , 65 mM KCl, 2 mM K_2HPO_4 , 10 mM HEPES- K^+ , 300 mM EGTA and 5 mM of each of the respiratory substrates malate, glutamate, α -ketoglutarate and pyruvate. It was added 20 μM digitonin, 150 μM ADP, 1 μM CAT, 750 nM FCCP, 5 μM rotenone, 20 mM succinate, 200 μM TMPD/2 mM ascorbate. The absolute values of the oxygen consumption observed in the different experimental conditions correspond to the mean $\pm$ S.E.M of five independent experiments. $p < 0.01$ (control cells vs. treated cells) for both GN1 and HaCaT results..... 106

Figure 8: Photomicrographs of HaCaT and GN1 cells maintained in culture after treatment with the aqueous extract from *M. oleifera* seeds at 1.6 $\mu\text{g/mL}$ of protein for 48 h. HaCaT and GN1 cells (15,000 cells/ cm^2) were plated in 6-well plates (9.6 cm^2/well) in 4 mL of DMEM medium containing phenol red, 6 g/L glucose, 10% fetal bovine serum, and antibiotic. Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 . After 24 h, the medium was changed and the cells were treated with the extract. The photomicrographs were obtained after 48 h of treatment. The original images were also adjusted by increasing the contrast. Scale bars: 75 μm 107

ARTIGO 2

Figure 1: Characterization of WSMoL. Gel filtration chromatography of WSMoL (0.4 mg) was performed on a Hiprep 16/60 Sephacryl S-100HR column coupled to the ÄKTA prime plus system. The chromatography was performed using 0.15 M NaCl. The inset shows an SDS-PAGE of WSMoL stained with Coomassie Brilliant Blue.) 113

Figure 2: Coagulant activities of seed extract (SE), WSMoL, and alum (positive control) in the kaolin suspension model. The optical density at 500 nm (A) and electric resistance (B) were monitored. Distilled water was used instead of sample in the negative control. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation. 115

Figure 3: Coagulant activity of WSMoL in the presence of *N*-acetylglucosamine

(GlcNAc; A), glucose (Glu; B) or fructose (Fru; C) at different concentrations, using the kaolin suspension model. The optical density at 500 nm and electrical resistance were evaluated. The control corresponds to the kaolin suspension without addition of any compound. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation..... 116

Figure 4: Coagulant activity of WSMoL (0.2 mg/mL) and of the monosaccharides GlcNAc (A), Glc (B), and Fru (C) at 200 mM in both the presence and absence of lectin. The optical density at 500 nm was evaluated. Distilled water was used instead of sample in the negative control. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation)..... 116

Figure 5: Coagulant activity of WSMoL in the presence of Mg^{2+} at 20 mM using a kaolin suspension model. The optical density at 500 nm (A) and electric resistance (B) were evaluated. Distilled water was used instead of sample in the negative control. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation..... 116

ARTIGO 3

Figure 1: Effect of the lectin WSMoL on survival of *Culex quinquefasciatus* fourth-stage larvae..... 136

Figure 2: *In vitro* effects of WSMoL on the activities of α -amylase (A), protease (B) and trypsin-like (C) enzymes from gut extracts of *C. quinquefasciatus* larvae..... 136

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1 A espécie <i>Moringa oleifera</i>	19
2.2 Lectinas de plantas	21
2.2.1 Lectinas ligadoras de quitina isoladas de <i>Moringa oleifera</i>	24
2.3. Tratamento de água	26
2.3.1 Coagulantes naturais	29
2.4 Vias de morte celular	32
2.5 Estresse oxidativo	36
2.6 Toxicidade de compostos naturais sobre células humanas	40
2.7 O mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823 (Diptera: Culicidae)	41
2.7.1 Distribuição, biologia e ecologia	41
2.7.2 Importância vetorial	43
2.8 Controle populacional de vetores	46
3. OBJETIVOS	53
3.1. Geral	53
3.2. Específicos	53
4. REFERÊNCIAS	54
5. CAPÍTULO 1	82
Artigo: “Efeito do extrato aquoso de sementes de <i>Moringa oleifera</i> (WSMoL) sobre linhagens de células normais GN1 (Fibroblastos) e HaCaT (Queratinócitos)”	
6. CAPÍTULO 2	108
Artigo: “Coagulant activity of water-soluble <i>Moringa oleifera</i> lectin is linked to lowering of electrical resistance and inhibited by monosaccharides and magnesium ions ”	
7. CAPÍTULO 3	120
Artigo: “Avaliação de atividade larvicida da lectina de sementes de <i>Moringa oleifera</i> (WSMoL) e efeito sobre as enzimas digestivas das larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> ”	

1. INTRODUÇÃO

A coagulação, em geral, é um processo em que o potencial repulsivo da dupla camada elétrica de colóides é reduzido com consequente formação de micro-partículas que colidem entre si formando estruturas maiores (EL-ASHTOUKHY *et al.*, 2015; MANGRICH *et al.*, 2014; BUDD *et al.*, 2004). A coagulação é utilizada no tratamento de água para diminuir a turbidez, cor e eliminar agentes patogênicos (EL-ASHTOUKHY *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2007). Coagulação química é conseguida por adição de coagulantes inorgânicos, tais como sais de alumínio e de ferro para proporcionar a remoção de contaminantes a partir da fonte de água contendo matéria orgânica natural (KEHINDE; AZIZ, 2015; DUAN *et al.*, 2006;). No entanto, existe atualmente a necessidade de aumentar a eficiência do tratamento de água uma vez que os padrões de qualidade tornaram-se cada vez mais difíceis de serem obtidos (AQUINO *et al.*, 2014; JARVIS *et al.*, 2006).

Coagulantes alternativos conhecidos por polieletrólitos oferecem uma solução simples e de baixo custo (RIZZO *et al.*, 2008). Um polímero é denominado de polieletrólito catiônico, aniônico ou anfótero quando a sua unidade monomérica contém grupos ionizáveis (por exemplo, carboxila, amino ou sulfônicos), enquanto que os polímeros sem grupos ionizáveis são denominados não-iônicos (GAO *et al.*, 2008; BOLTO *et al.* , 2007). No Brasil são utilizados os aniônicos e não-iônicos em função das características das águas e sólidos suspensos (CARVALHO, 2008). Embora existam na água partículas negativamente carregadas, a utilização de polieletrólitos catiônicos orgânicos é limitada desde que os mesmos são considerados muito tóxicos para organismos aquáticos (AQUINO *et al.*, 2014; ZAMPERO, 2011; RIZZO *et al.*, 2008).

A espécie *Moringa oleifera* (família Moringaceae), de origem indiana, é uma planta

cultivada em território brasileiro por ser bastante viável, perene, resistente à seca, pouco exigente quanto ao solo, adubação e tolerante a pragas e doenças (MAKKAR; BECKER, 1997). O cultivo da *M. oleifera* vem sendo difundido no Semi-Árido nordestino, devido à utilização das sementes no tratamento de água para uso doméstico. As sementes de *M. oleifera* contêm lectinas (proteínas hemaglutinantes que ligam carboidratos) e Ferreira *et al.* (2011) demonstraram que a lectina WSMoL (do inglês *water-soluble M. oleifera lectin*) é um dos coagulantes presentes nas sementes. Este trabalho ampliou o estudo da atividade coagulante de WSMoL pela investigação do efeito da lectina na resistência elétrica do meio aquoso durante o processo de coagulação e pela determinação do efeito de carboidratos inibidores da atividade hemaglutinante de WSMoL e íons bivalentes na atividade coagulante.

Rolim *et al.* (2011) determinaram que concentrações elevadas do extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* são genotóxicos enquanto a lectina isolada não apresentou esta propriedade biológica. Tem sido reportado que lectinas induzem morte celular (ARANDA-SOUZA *et al.*, 2014) e a utilização do extrato de sementes de *M. oleifera* no tratamento de água para consumo humano justifica a investigação do efeito do extrato e de WSMoL em células humanas visando a definição do risco para a saúde humana. Nesse sentido, este trabalho determinou a toxicidade do extrato sobre as linhagens de células normais GN1 (linhagem celular não tumorigênica derivada de fibroblastos) e HaCaT (linhagem não tumorigênica derivada de queratinócitos humanos). A investigação de preparações purificadas da lectina WSMoL foi realizada para definir se preparações ricas em proteínas coagulantes podem ser mais seguras que o extrato.

Insetos, especialmente os mosquitos, são responsáveis pela disseminação de sérias doenças humanas em regiões tropicais. Com o surgimento de formas resistentes de mosquitos aos inseticidas convencionais utilizados para o seu controle, têm crescido a procura por

substâncias naturais que sejam efetivas no combate ao mosquito adulto, ovos e larvas e isentas de toxicidade para o meio ambiente. As plantas sintetizam enzimas, lectinas e inibidores de enzimas digestivas que podem afetar a biologia, o desenvolvimento e a reprodução dos insetos (PONTUAL *et al.*, 2014; NAPOLEÃO *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2011) e portanto o estudo de novas moléculas derivadas de fontes vegetais, com diferentes atividades biocidas, pode auxiliar no combate aos mosquitos vetores. WSMoL é um agente larvicida e ovicida sobre *Aedes aegypti* (SANTOS *et al.*, 2012; COELHO *et al.*, 2009), mosquito vetor da dengue, Chikungunya e febre amarela. Este trabalho investigou o efeito de WSMoL na sobrevivência de larvas de *Culex quinquefasciatus*, vetor da filariose e Chikungunya (CALJON *et al.*, 2013; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A espécie *Moringa oleifera*

A *Moringa oleifera*, popularmente conhecida como moringa, lírio branco ou quiabo da quina, é originária do nordeste indiano sendo amplamente distribuída na Burma, Ceilão, Egito, Filipinas, Índia, Jamaica, Malásia, Nigéria, Paquistão, Singapura e Tailândia (MAKKAR; BECKER, 1997; DUKE, 1987; PIO CÔRREA, 1984). Está inserida na família Moringaceae, pertencente à Ordem Brassicales, que possui um único gênero denominado *Moringa*, constituído por 14 espécies descritas.

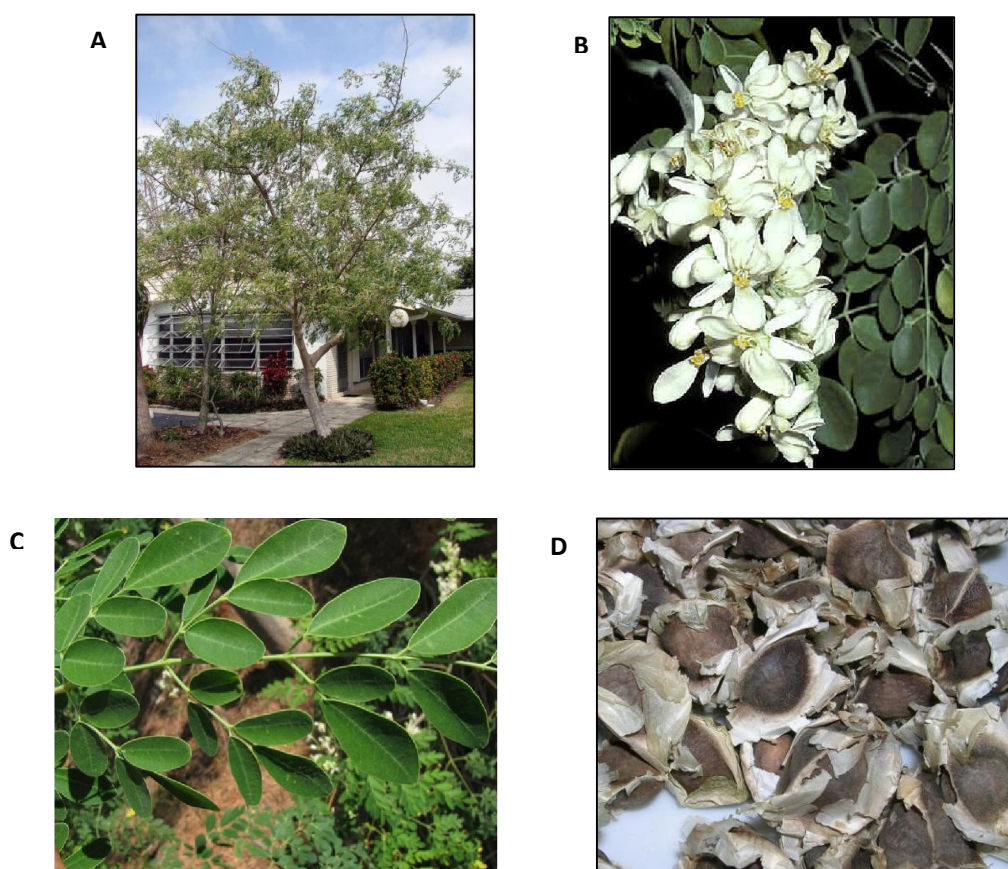
É uma planta de porte arbóreo, entre 7 e 12 m de altura, uma hortaliça perene, com baixo custo de produção e é bastante cultivada devido à adaptação a regiões de secas prolongadas, sobrevivendo a grandes períodos em solos pobres e com baixo teor de umidade (MACCONNACHIE *et al.*, 1999). É muito cultivada devido à adaptação a regiões de secas prolongadas, sobrevivendo a grandes períodos em solos pobres e com baixo teor de umidade (MACCONNACHIE *et al.*, 1999). A planta tem sido utilizada como cerca viva e quebra-vento em algumas regiões do Brasil (SILVA; KERR, 1999).

Propriedades biológicas importantes para a saúde humana têm sido identificadas em diferentes partes de *M. oleifera* (Figura 1): as flores (B) folhas (C), frutos verdes e sementes (D) possuem valor alimentar devido à presença de quantidades representativas de cálcio, ferro, proteínas e também podem ser utilizadas como suplemento alimentar por apresentarem potássio, vitaminas do complexo B e cobre. O extrato das folhas é uma fonte de antioxidantes e agentes hipocolesterolêmicos (CHUMARK *et al.*, 2008; ARABSHAHI *et al.*, 2007). As sementes apresentam atividades hipotensiva, antioxidante e quelante de arsênio (GUPTA *et*

al., 2005; FAIZI *et al.*, 1995;). As folhas, frutos, raízes e sementes são tradicionalmente utilizadas para o tratamento de tumores abdominais, escorbuto, ataques paralíticos, problemas de bexiga e próstata, úlceras e infecções cutâneas (FUGLIE, 2001)

Figura 1. A espécie *M. oleifera*. Aspecto geral (A), Flores (B), Folhas (C), Sementes (D).

Fonte:<http://www.sempresustentavel.com.br/terrena/moringa-oleifera/moringa-oleifera.html>



A utilização de sementes de *M. oleifera* em vários países no tratamento de água para consumo humano tem estimulado estudos que avaliam a genotoxicidade e toxicidade de preparações obtidas das mesmas. Rolim *et al.* (2011) revelaram que o extrato na concentração

de 0,2 µg/µL (usada pela população para tratar a água) não apresentou atividade genotóxica e mutagênica contudo atividade mutagênica; foi detectada quando a concentração de 0,8 µg/µL foi avaliada. Araújo *et al.* (2013) demonstraram que o extrato na concentração de 0,2 µg/µL foi tóxico (IC₅₀ de 144,8 µg/mL) para células mononucleares de sangue periférico de humanos e Al-Anizi *et al.* (2014) revelaram que compostos hidrofóbicos de farinha de sementes são citotóxicos enquanto outros solúveis em água são genotóxicos.

2.2 Lectinas de plantas

As lectinas são uma classe de proteínas ou glicoproteínas estruturalmente diversas e que contêm pelo menos um domínio de ligação a carboidratos, tais como monossacarídeos e oligossacarídeos, aos quais se ligam com alta especificidade e de forma reversível (CORREIA *et al.*, 2008). Estas proteínas têm ampla distribuição na natureza e em plantas, têm sido isoladas de cerne, folhas, flores, frutos, entrecascas, raízes, rizomas e sementes (SILVA *et al.*, 2016; ALBUQUERQUE *et al.*, 2012; NAPOLEÃO *et al.*, 2012; SÁ *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2008; WANG & NG, 2006; ITO, 1986).

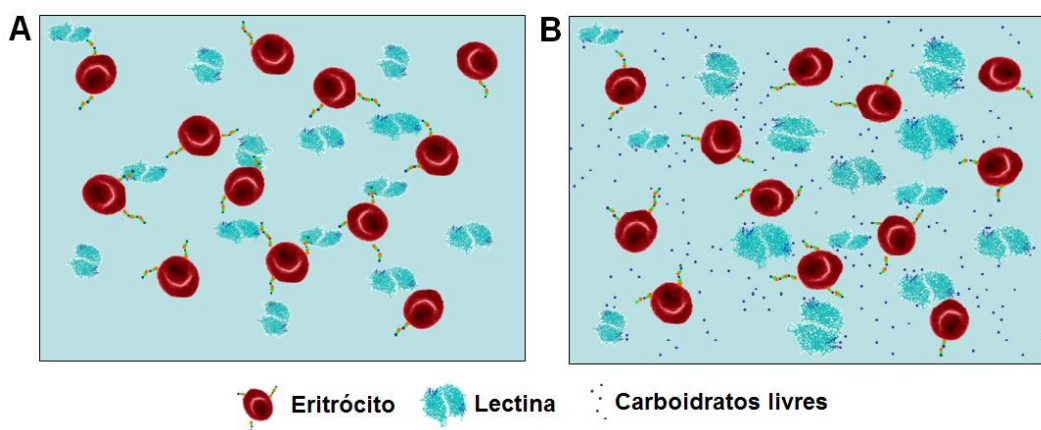
A detecção de lectinas em material biológico inicia-se a partir de ensaios de hemaglutinação (Figura 2A), no qual estas proteínas interagem com os carboidratos da superfície celular do eritrócito por meio dos seus sítios de ligação, formando ligações cruzadas entre as células (SANTOS *et al.*, 2005). O ensaio da atividade hemaglutinante (AH) é comumente realizado pela técnica de diluições seriadas da amostra contendo lectina e posterior incubação com eritrócitos (SANTOS *et al.*, 2005). A presença de uma lectina na amostra, como agente aglutinante é confirmada através dos ensaios de inibição da AH (Figura 2B) com uma solução de carboidrato ou glicoproteína livre em solução (TRINDADE *et al.*,

2006). A detecção, identificação e quantificação de lectinas também podem ser realizadas através de análise proteômica e de sequenciamento por espectrometria de massas para futuras aplicações em processos bioquímicos, imunológicos e toxicológicos (NASI *et al.*, 2009).

Na purificação de lectinas estão envolvidas técnicas comuns a protocolos de isolamento de proteínas. A etapa inicial do isolamento consiste de preparações de extratos em água destilada (SANTOS *et al.*, 2005), salina (KONOZY *et al.*, 2003) ou em tampões (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Figura 2. Representação da atividade hemaglutinante de lectinas (A) e inibição da aglutinação por carboidratos livre em solução (B).

Fonte: Paiva *et al.* (2010).



A purificação parcial de lectinas através de fracionamento salino utilizando o sulfato de amônio tornou-se um dos procedimentos mais utilizados, pois as proteínas possuem muitos grupos carregados e por isso, a sua solubilidade depende da concentração dos sais dissolvidos (PAIVA *et al.*, 2011); a solubilidade aumenta com o acréscimo de sais (*salting in*) e volta a decrescer à medida que mais sal é adicionado além do limiar de saturação (*salting out*).

Após o fracionamento salino, as lectinas são normalmente submetidas a processos de

diálise em membranas semipermeáveis, seguida de processos cromatográficos, tais como troca iônica (LAM & NG, 2008), gel filtração ou exclusão molecular (POHLEVEN *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 2007; REGO *et al.*, 2002) e de afinidade (SANTANA *et al.*, 2008 ; TATENO *et al.*, 2003).

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

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 de adultos e ainda foram resistentes às enzimas digestivas destes insetos (FREITAS *et al.*, 2011). As lectinas isoladas da entrecasca (MuBL), cerne (MuHL) e folha (MuLL) de *M. urundeuva*, do líquen *Cladonia verticillaris* (ClaveLL), das raízes secundárias de *Bauhinia monandra* (BmoRoL), de cladódios de *Opuntia ficus-indica* (OfiL) e da entrecasca de *Crataeva tapia* (CrataBL) apresentaram atividade inseticida contra operários e soldados de *Nasutitermes corniger* (ARAÚJO *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2011; NAPOLEÃO *et al.*, 2011; PAIVA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2009 SÁ *et al.*, 2008).

Extratos salinos, frações protéicas e lectinas purificadas do cerne (MuHL), da casca

(MuBL) e da folha (MuLL) de *M. urundeuva* promoveram a mortalidade do quarto estágio larval de *Aedes aegypti* (NAPOLEÃO *et al.*, 2012 ; SÁ *et al.*, 2009). MuLL foi resistente à degradação por proteases intestinais e apresentou efeitos inibitórios sobre a atividade de tripsina e estimulatório sobre α -amilase larvais (NAPOLEÃO *et al.*, 2012).

2.2.1 Lectinas ligadoras de quitina isoladas de sementes de *Moringa oleifera*

Lectinas ligadoras de quitina foram isoladas de sementes de *M. oleifera* sendo denominadas cMoL (do inglês *coagulant M. oleifera lectin*) e WSMoL (do inglês *water-soluble M. oleifera lectin*). Adicionalmente, foi isolada a lectina denominada WSMoL_C a partir da torta de sementes de *M. oleifera*, co-produto obtido após a remoção do óleo das sementes (OLIVEIRA *et al.*, 2016). As lectinas WSMoL e WSMoL_C apresentam similaridades entre si quanto à massa molecular, propriedades físico-químicas e especificidade de ligação a carboidratos (OLIVEIRA *et al.*, 2016; COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2005). As lectinas cMoL e WSMoL apresentam características diferentes, como especificidade a carboidrato, massa molecular e carga elétrica (PAIVA *et al.*, 2011; ROLIM *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2009).

cMoL tem natureza catiônica (PI teórico: 11,97) e é composta por 101 resíduos de aminoácidos e estrutura α/β (OLIVEIRA *et al.*, 2011). cMoL é uma lectina que reduz a turbidez da água com eficiência similar ao sulfato de alumínio, produto rotineiramente utilizado nas estações de tratamento de água (SANTOS *et al.*, 2009). cMoL apresentou atividade inseticida contra a mariposa da farinha (*Anagasta kuehniella*) promovendo redução no peso e distúrbios nutricionais nas larvas (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Em 2014, Agra-Neto *et al.* investigando a atividade larvicida desta lectina sobre diferentes colônias de *Aedes aegypti*,

detectaram que, embora não promova a mortalidade das larvas, cMoL inibiu a atividade das enzimas tripsina e superóxido dismutase nas colônias Rockefeller (sensível a temefós) e Rec-R (resistente a temefós) podendo ser utilizada como um agente sinérgico para o controle de populações do inseto.

WSMoL apresentou atividades antibacteriana e coagulante, sendo capaz de reduzir turbidez e contaminação bacteriana de água de ambiente (FERREIRA *et al.*, 2011). Estudo avaliando a genotoxicidade dessa lectina (ROLIM *et al.*, 2011) revelou que a mesma não apresentou efeito mutagênico nem promoveu quebras na molécula de DNA nas concentrações de 0,0125 a 0,8 µg/mL, indicando a segurança de uso da lectina nessas concentração para tratar água para consumo humano.

Também já foi reportado a eficácia de WSMoL como agente removedor de metais em água e os efeitos desses metais nas atividades hemaglutinante e antibacteriana da lectina (FREITAS *et al.*, 2016). A AH de WSMoL foi reduzida após a incubação com os metais e os valores de eficiência de remoção para WSMoL determinados foram de 49,00%, 53,21%, 71,45%, 55,42%, 69,88%, 62,14% e de 49,36% para Cd^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} e Al^{+3} , respectivamente. WSMoL apresentou atividades bacteriostática e bactericida contra *Escherichia coli* (CMI e CMB de 50 e 200 µg/mL, respectivamente) e *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis (CMI e CMB de 200 e 400 µg/mL, respectivamente) mas a presença de metais aboliu a atividade antibacteriana da lectina. Portanto, WSMoL removeu eficientemente metais presentes na água, mas a interação com metais prejudica a sua capacidade de ligação a carboidratos e sua atividade antibacteriana.

WSMoL atrasou o desenvolvimento larval de *A. aegypti* e possui efeito larvicida (CL_{50} de 0,197mg/mL) sobre o quarto estágio (L4). Também, na concentração de 0,1 mg/mL, é um agente ovicida promovendo a mortalidade do embrião pré formado em ovos estocados e

reduzindo a viabilidade de ovos frescos e agente estimulante de oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti*. Sendo assim, uma lectina de amplo espectro funcional sobre o ciclo biológico do mosquito vetor de importantes doenças, tais como dengue, Zika e Chikungunya (SANTOS *et al.*, 2012; COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009). O efeito de WSMoL na sobrevivência de larvas de *A. kuehniella* foi avaliado por Oliveira *et al.* (2017) e foi demonstrado que a lectina não apresentou atividade larvicida embora tenha reduzido a digestão de proteínas em 90%. Os autores sugeriram que WSMoL promoveu apoptose em células do intestino da larva.

A torta de sementes de *M. oleifera*, co-produto obtido após a remoção do óleo foi fonte da lectina WSMoL_C (do inglês *water soluble Moringa oleifera lectin from cake*) que possui efeito sobre a oviposição de fêmeas do mosquito *A. aegypti* na concentração de 0,1 mg/mL bem como sobre os ovos (CE₅₀ de 0,13 mg/mL) e larvas (CL₅₀ de 0,89 mg/mL) desse inseto (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Os autores também demonstraram que WSMoLc foi resistente à degradação por proteases digestivas das larvas, estimulou as atividades da amilase e protease e inibiu a atividade de tripsina do intestino de larvas.

2.3 Tratamento de água

A qualidade da água é definida por sua composição química, física e bacteriológica e para o consumo humano há necessidade que a água seja livre de matéria suspensa visível, cor, gosto e odor e de organismos e substâncias orgânicas ou inorgânicas capazes de provocar enfermidades no ser humano.

Os métodos de tratamento de água vão desde a fervura até sistemas completos incluindo a adsorção (KEHINDE ; AZIZ, 2015), nanofiltração (ZAHIRIM *et al.*, 2011),

processos oxidativos (HAYAT *et al.*, 2015; MANENTI *et al.*, 2015), coagulação/eletrocoagulação (EL-ASHTOUKHY *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2015) e métodos eletroquímicos (AQUINO *et al.*, 2014; DIAMADOPOULOS *et al.*, 2009). Os polímeros sintéticos aniônicos e não iônicos são usados como auxiliares de floculação, filtração e no condicionamento do lodo (TROVÓ *et al.*, 2013).

Os métodos mais utilizados são a coagulação, floculação, sedimentação, filtração e cloração (RAMOS, 2005). O processo de coagulação/floculação é uma técnica que permite a remoção de materiais em suspensão coloidal ou que permaneçam dispersos na solução e não são removidos por processos físicos convencionais (LEE *et al.*, 2014). A coagulação, em geral, é um processo em que o potencial repulsivo da dupla camada elétrica de colóides é reduzido de tal forma que micropartículas podem ser produzidas. Estas partículas colidem entre si e formam estruturas maiores (TROVÓ *et al.*, 2013; BUDD *et al.*, 2004).

A dupla camada elétrica é formada por duas superfícies de cargas elétricas opostas mantidas por forças eletrostáticas (TROVÓ *et al.*, 2013). A concentração das cargas contrárias diminui exponencialmente entre as fronteiras da camada compacta e da camada difusa até igualar a concentração de cargas da solução, intervalo esse em que o potencial elétrico formado é conhecido como Potencial Zeta (AMIRTHARAJAH; O'MELIA, 1990).

A literatura apresenta quatro principais formas de desestabilização de partículas coloidais: adsorção e neutralização, compressão da camada difusa, adsorção e formação de pontes e varredura (KEHINDE; AZIZ, 2015; DI BERNARDO; DANTAS, 2005, HASSEMER, 2000). Na adsorção e neutralização de cargas, a desestabilização da dispersão coloidal consiste nas interações entre coagulante-colóide, coagulante-solvente e colóide-solvente (KEHINDE; AZIZ, 2015; DI BERNARDO; DANTAS, 2005). As interações coagulante-solvente são responsáveis pela adsorção do coagulante na interface colóide-água.

No caso de espécies hidrolisadas de alumínio e ferro ou de polieletrólitos catiônicos é comum ocorrer a adsorção causada pela interação entre coagulante e colóide (PANG; ABDULLAH, 2013; FERREIRA, 1997).

Na compressão da camada difusa, a introdução de íons no sistema coloidal causará um aumento na densidade de cargas na camada difusa que para manter-se eletricamente neutra, tem seu volume reduzido, de tal modo que em dado momento as forças de Van der Waals sejam dominantes, eliminando a estabilização eletrostática (AQUINO *et al.*, 2014; CUBAS, 1999).

Na adsorção e formação de pontes, compostos orgânicos sintéticos e naturais caracterizados por grandes cadeias moleculares, que apresentam sítios ionizáveis ao longo da cadeia, adsorvem mais que uma partícula, mantendo-as unidas umas as outras (FREITAS *et al.*, 2015; DI BERNARDO; DANTAS, 2005).

No processo conhecido por varredura as partículas coloidais são envolvidas pelos coagulantes e, como este mecanismo não depende da neutralização da carga dos colóides, a condição ótima da coagulação pode não corresponder àquela em que é mínimo o potencial zeta (HAYAT *et al.*, 2015; HASSEMER, 2000).

O papel do coagulante é desestabilizar a suspensão coloidal reduzindo a barreira de energia e permitindo que as partículas se agreguem. Os colóides são apresentados por partículas que tem uma faixa de tamanho de 1 nm a 0,1 nm, e conferem cor, turbidez e alteram a qualidade da água (MANGRICH *et al.*, 2014). Os coagulantes podem ser classificados como coagulantes metálicos ou polieletrólitos também conhecidos como auxiliares de coagulação (LEME, 1990). Devido à boa eficiência e ao baixo custo, o sulfato de alumínio destaca-se como o coagulante químico mais utilizado no Brasil, contudo, o alumínio não é biodegradável e gera um elevado volume de lodo além de formar

subprodutos (monômeros) tóxicos (LIBÂNIO, 2010; OKUDA *et al.*, 2001). Um polímero é denominado como um polieletrólito, quando a sua unidade monomérica contém grupos ionizáveis (GAO *et al.*, 2008).

2.3.1 Coagulantes naturais

Os polímeros naturais mais usados no Brasil são os amidos de batata e depois os amidos de mandioca e de milho (DI BERNARDO; DANTAS, 2005). O tanino extraído da acácia negra, de acordo com Mangrich *et al.*, (2014) tem sido usado em muitas estações de tratamento de água e esgoto, com nomes comerciais como Tanac e Tanfloc. Os extratos de cactos e da babosa também já foram utilizados, porém com aplicação restrita (ZAMPERO, 2011). A quitosana, que é extraída da carapaça de frutos do mar (camarão e lagostas) é outro polímero orgânico natural, usado como auxiliar de floculação (ZENG *et al.*, 2004).

Dentre os diversos polímeros naturais usados como auxiliares de floculação, verifica-se o emprego do quiabo (*Abelmoschus esculentus*) na forma da mucilagem extraída da vagem ou do pó seco da vagem, da mutamba ou “chico magro” (*Guazuma ulmifolia*) na forma de solução da casca, do caule e do fruto e do cacau (*Theobroma cacao*), usado na forma de solução do pó da casca (ABREU-LIMA, 2007).

Ang *et al.* (2016) desenvolveram um sistema híbrido de coagulação-nanofiltração para tratamento de água testando a combinação de membrana de quitosana e ácido húmico com três soluções sintéticas que diferiram em força iônica e composição. O modelo de água turva utilizando caolin foi utilizado e o sistema de quitosana/ácido húmico foi testado na ausência de NaCl (conjunto 1), apenas com NaCl (conjunto 2) e com NaCl, CaCl₂ e NaHCO₃ (conjunto 3). Os autores observaram declínio gradual no processo de coagulação-nanofiltração devido

propensão de incrustação da membrana nos 3 conjuntos avaliados. A incrustação foi menor no conjunto 2 devido à presença de forte repulsão eletrostática entre as impurezas e a membrana. Durante o processo de filtração inicial o fluxo do conjunto 3 permaneceu constante devido à forte repulsão entre as impurezas carregadas negativamente e a membrana que apresentava pH 7, mas em seguida detectou-se forte declínio na eficiência do processo provavelmente devido ao efeito da polarização da concentração. A repulsão eletrostática desempenha um papel vital na contenção da propensão de incrustação e o principal mecanismo de coagulação da quitosana foi à neutralização de cargas sugerindo que sistemas híbridos de coagulação-nanofiltração com quitosana são ineficazes devido à alta propensão de incrustações na membrana.

A aplicabilidade de sementes de *Vicia faba* L. como coagulante natural foi detectada através da avaliação dos extratos aquoso e salino (0,5 M e 1 M de NaCl) utilizando sistema sintético de caolin. O aumento da força iônica do extrato pelo aumento da concentração do NaCl resultou em maior quantidade de compostos extraídos mas não afetou a eficiência do processo de coagulação quando comparado ao extrato aquoso. A aplicação de doses diferentes dos coagulantes em água mostrou que a melhor atividade de coagulação foi conseguida pela adição de uma dose de 0,125 mL/L do extrato aquoso (KUKIC *et al.*, 2015).

Outro estudo avaliou a mucilagem de sementes de *Ocimum basilicum* L. como coagulante natural para ser utilizado em combinação com alumínio no pré-tratamento de água proveniente de lixiviação contendo quantidade elevada de matéria orgânica, componentes inorgânicos, metais pesados e compostos xenobióticos orgânicos (RASOOL *et al.*, 2016). Os dados revelaram que o tratamento por 15 min, pH 7 e na proporção de 1:1 de alumínio/*O. basilicum* destacou-se como a condição ótima reduzindo 64,4% de matéria orgânica suscetível de oxidação e 77,8% de cor.

Choy *et al.* (2016) determinaram a eficiência dos amidos de arroz, trigo, milho e batata na remoção da turbidez comparados ao alúmen utilizando suspensões de caolin. Os autores avaliaram os efeitos da dosagem e pH e detectaram que os amidos do trigo e da batata não foram eficientes na remoção da turbidez. Já o amido de milho na concentração de 120 mg/L em pH 7 foi capaz de reduzir em 20% a turbidez do caolin. O amido de arroz, por possuir o maior comprimento da cadeia polimérica, superou os demais promovendo remoção de 50% da turvação com uma dosagem otimizada de 120 mg/L, pH inicial de 4 e tempo de sedimentação de 30 min.

Muiybi & Evison (1995) descreveram a propriedade coagulante da suspensão obtida com as sementes de *M. oleifera* como sendo similar a um polieletrólito catiônico, composto basicamente por polipeptídeos. Camacho *et al.* (2017) avaliaram a eficiência de sementes integrais e sementes com uma quantidade reduzida de óleo de *Moringa oleifera* como coagulante no tratamento convencional de água para remoção de cianobactérias proveniente de diferentes águas superficiais naturais. O pó integral de sementes, pó extraído com etanol, o pó obtido após técnica de pressurização e o pó extraído com NaCl foram testados em águas com baixa (5-10 NTU) e alta (30-60 NTU) turbidez inicial com e sem células de *Microcystis aeruginosa*. Os resultados mostraram que a extração de pó não é necessária quando se utilizam sementes de *M. oleifera* como coagulante na coagulação/floculação/sedimentação na situação testada. A remoção de clorofila e turbidez foi de até 85% para águas de alta turvação, com 50 mg/L para o pó integral e resultados similares foram obtidos para as demais preparações testadas. Para águas com baixa turvação, o pó extraído com NaCl 1 M promoveu a remoção de clorofila e turbidez em aproximadamente 60%. Adicionalmente, demonstrou-se que o pó de sementes extraído com NaCl removeu entre 40 e 50% da matéria orgânica presente na água. No entanto, foi detectado aumento de matéria orgânica dissolvida

independente do tipo de coagulante usado.

2.4 Vias de morte celular

A homeostase nos tecidos depende de uma série de eventos acoplados. A proliferação, sobrevivência e morte celular são moduladas por múltiplos sinais, e o equilíbrio entre as taxas de proliferação e morte das células promove o constante processo de renovação celular (FULDA *et al.*, 2010; GRIVICICH *et al.*, 2007). Condições estressantes prejudicam a homeostase e a célula pode responder ao estresse de formas variadas, dependendo do seu tipo e gravidade. Essa resposta pode ser de proteção adequada à célula, possibilitando e permitindo sua sobrevivência, ou, caso o estresse seja tão severo que incapacite essa proteção, a resposta celular poderá ser a ativação de morte celular (FULDA *et al.*, 2010).

Devido a mecanismos de restauração do DNA, as células podem ativar um ponto de checagem (*checkpoint*) de dano, interrompendo o ciclo celular e permitindo a reparação e prevenção da transmissão dos danos, podem produzir uma resposta na transcrição que irá beneficiar o funcionamento celular, ou podem entrar em apoptose, processo que irá eliminar as células altamente danificadas e desreguladas. Porém, falhas em qualquer uma dessas vias causa instabilidade genômica, podendo levar à carcinogênese (SANCAR *et al.*, 2004).

A interrupção do ciclo celular e/ou indução à morte por apoptose pode decorrer da diminuição ou bloqueio do sistema de proliferação (BIRT *et al.*, 2001). O ciclo celular consiste em um ciclo de duplicação e divisão do conteúdo celular por meio do qual novas células são originadas. Em células eucariontes, esse ciclo é dividido em quatro etapas: G1,

S, G2, e M. As três primeiras fases compõem a intérfase, período em que a célula realiza a transcrição de genes, sintetiza proteínas e cresce em massa. A fase G1 (do inglês *gap*, que significa lacuna), é o intervalo entre o término da fase M e início da fase S. Na fase S (de síntese), ocorre a replicação do DNA nuclear, e G2 é a fase de intervalo entre a fase S e a M. A fase M, por sua vez, é compreendida pela mitose, em que ocorre a divisão nuclear, e a citocinese, em que ocorre a divisão celular (ALBERTS *et al.*, 2009). Vias bioquímicas que retardam ou interrompem a progressão do ciclo celular em resposta a danos nos pontos de checagem de danos no DNA são definidos com base na transição em que está sendo interrompida, como G1/S, intra- S, e G2/M *checkpoints* (ALBERTS *et al.*, 2009).

A apoptose é um dos mecanismos de morte celular que participa de várias situações fisiológicas incluindo a reposição fisiológica de certos tecidos. Porém, este mecanismo pode ser desencadeado por fatores externos, como a baixa quantidade de nutrientes e exposição a xenobióticos que provocam danos no DNA e aumento de espécies reativas do oxigênio, por exemplo. Assim, é um mecanismo rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interação da célula com o meio externo (GRIVICICH *et al.*, 2007; NARULA *et al.*, 1999).

Um padrão de alterações morfológicas marcantes e coordenadas. Inicialmente ocorre retração celular levando à perda de aderência célula- célula e célula-matriz. Não há alteração morfológica da maioria das organelas, apenas as mitocôndrias podem apresentar ruptura na membrana externa. Ocorre a condensação da cromatina ao redor da periferia nuclear e a desintegração do núcleo em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. A membrana celular forma prolongamentos, que vão aumentando em número e tamanho (ANAZETTI; MELO, 2007 ; GRIVICICH *et al.*, 2007).

Na apoptose, o citocromo *c* liberado pelas mitocôndrias durante a permeabilização

da membrana mitocondrial externa e oxidam a fosfatidilserina da face interna da membrana, modulando a externalização desse fosfolípido (TYURINA *et al.*, 2004). A fosfatidilserina quando presente na membrana externa atua como sinal para fagocitose da célula apoptótica por macrófagos (WU *et al.*, 2006). Para a visualização de células que possuem fosfatidilserina na face externa, o marcador anexina V tem sido utilizado por possuir alta afinidade com este fosfolípido e, portanto, representa um valioso marcador na detecção de apoptose (VAN GENDEREN *et al.*, 2008).

Quando sinais de morte atingem a mitocôndria, ocorre um colapso no potencial da membrana mitocondrial interna e uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). Esses fatores geram a liberação de moléculas que podem provocar apoptose, interromper a síntese de ATP e aumentar a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs). A liberação de EROs provoca a oxidação de biomoléculas, aumentando ainda mais o colapso no potencial de membrana mitocondrial (GRIVICICH *et al.*, 2007; KROEMER; REED, 2000; LOEFFLER; KREMER, 2000).

A regulação da apoptose apresenta duas vias principais: a via intrínseca, mediada pela mitocôndria e a via extrínseca, que é mediada por receptores de morte presentes na membrana plasmática. Em ambas as vias há a participação de caspases que executam eventos intracelulares que resultarão na morte celular programada (GRIVICICH *et al.*, 2007; NICHOLSON; THORNBERRY, 1997).

A via mitocondrial pode ser ativada por vários estímulos, incluindo compostos citotóxicos, resultando na ativação de proteínas pró-apoptóticas. Estas proteínas induzem a permeabilização da membrana mitocondrial externa através da formação de canais que causa a liberação, além de outras substâncias, de pequenos íons, solutos e citocromo *c* para o citosol. O citocromo *c* liberado se associa a uma proteína adaptadora, formando um

complexo chamado apoptossomo, que promove, na presença de ATP, a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9, ativa, que irá ativar as caspases efetoras (caspase 3), ocasionando a apoptose (GREEN; KROMER, 1998). O complexo catalítico gerado pelos sinais mitocondriais e a ação das caspases ativadas de via extrínseca são sinais convergentes responsáveis pela ativação das caspases efetoras 3 e 7 (HAIL *et al.*, 2006). Na via extrínseca de regulação da apoptose, quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas capazes de recrutarem caspases iniciadoras (caspase-8), que irão ativar caspases efetoras (caspase-3), executando a morte por apoptose (GRIVICICH *et al.*, 2007). Na via intrínseca, diversos sinais atuam modulando a permeabilização da membrana mitocondrial externa.

Outro tipo de morte celular é a necrose, que é caracterizada por rápida desregulação da homeostasia. A necrose ocorre, geralmente, em resposta à injúria severa às células (BRAS *et al.*, 2005). No entanto, estudos têm sugerido que a necrose também pode ser regulada geneticamente, com a função de manter a integridade do organismo (ZONG; THOMPSON, 2006).

As características morfológicas e bioquímicas da necrose compreendem desorganização do citoplasma e intumescimento celular, intumescimento e/ou rompimento das organelas e da membrana plasmática e liberação do conteúdo celular. Consequentemente a essa liberação, ocorre uma resposta inflamatória e dano às células vizinhas (GRIVICICH *et al.*, 2007).

Evidências recentes têm apontado para uma interdependência entre os diferentes mecanismos de morte celular. Um processo conhecido como necrose apoptótica é caracterizado por células em fase avançada de apoptose quando não são fagocitadas, que podem apresentar características necróticas devido à perda de energia celular e integridade

da membrana plasmática (MAJNO; JORIS, 1995; BRAS 2005). Além disso, é importante ter ciência de outros tipos de morte celular além da apoptose e da necrose, como a autofagia, a mitose catastrófica e a senescência (GRIVICICH *et al.*, 2007).

2.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção de EROs excede a taxa de sua decomposição por sistemas. As EROs são potentes oxidantes e podem reagir com moléculas celulares críticas, levando a danos em membranas biológicas, causando peroxidação lipídica, danos na mitocôndria e ao DNA e consequentemente podem acarretar em morte celular (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

As EROs são produzidas e degradadas durante a função celular normal de organismos aeróbios, uma vez que eles necessitam de oxigênio para a geração de energia através da fosforilação oxidativa, processo que gera subprodutos reativos (LUSHCHAK, 2006). Outro processo que pode gerar espécies reativas é a biotransformação de xenobióticos, em que ocorrem reações para transformar um produto lipofílico em hidrofílico, para ser mais facilmente eliminado. Essas reações podem formar subprodutos reativos (VAN DER OOST *et al.*, 2003). A exposição a alguns xenobióticos, especialmente poluentes químicos tóxicos, podem levar a um aumento exacerbado da produção de EROs, e consequentemente ao estresse oxidativo (ALMEIDA *et al.*, 2008; NORDBERG; ARNER, 2001).

Como mecanismos de defesa antioxidante, organismos aeróbios apresentam sistemas enzimáticos e não enzimáticos, que podem evitar a formação das EROs, reagir com essas espécies, ou reparar os danos provocados por elas. Antioxidantes não enzimáticos incluem a glutathiona reduzida (GSH), o ácido ascórbico (vitamina C), o β -

caroteno (vitamina B), e o α -tocoferol (vitamina E) (KLING; OLSSON, 2000). Essas moléculas participam diretamente em reações de óxido-redução, fazendo uma varredura nos produtos de oxidação. Elas são consumidas ou modificadas durante esses processos, e devem ser repostas ou regeneradas a fim de recuperarem suas funções (DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 2010).

As células podem responder a um dano, como aqueles produzidos por estresse oxidativo, de diversas formas. Podem ativar o sistema de reparo, ativar um ponto de checagem no ciclo celular, programar a morte celular, ou produzir uma resposta na transcrição de genes de enzimas antioxidantes (SANCAR *et al.*, 2004). Tal regulação ocorre em resposta a flutuações das condições ambientais intra e extra-celulares quanto à presença de estressores oxidativos (NORDGREN; WALLACE, 2014; YIN *et al.*, 2013; DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 2010).

Thannickal & Fanburg (2000) observaram que citocinas, fatores de crescimento e hormonais, interleucina 6 (IL-6), interleucina 3 (IL-3), fator de necrose tumoral α (TNF- α), angiotensina II (ANGII), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), (TGF- β 1), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2) provocavam um aumento na resposta oxidativa gerando baixas concentrações de EROs em células. Storz (2005) sugeriu que EROs podem desempenhar um papel fisiológico muito importante como mensageiros secundários e que a iniciação e/ou o funcionamento apropriado de várias vias de transdução de sinal dependem da ação dessas como moléculas de sinalização que podem atuar em diferentes níveis na cascata de transdução de sinal. Um grande número de funções fisiológicas são controladas por vias de sinalização redox-responsivas como: regulação do tônus vascular e outras funções reguladas por óxido nítrico, a produção de EROs como um sensor para

mudanças na concentração de oxigênio, a regulação redox da adesão celular, a regulação redox das respostas imunes e indução da morte celular (DROGE, 2002; JONES; DANGL, 1996; THANNICKAL & FANBURG, 1995).

A adesão celular desempenha um papel importante na embriogênese, no crescimento celular, na diferenciação, na reparação de feridas e em outros processos consequentemente, alterações nas propriedades adesivas das células e dos tecidos são rigorosamente reguladas por redox (VALKO *et al.*, 2007; FRENETTE; WAGNER, 1996; ALBELDA *et al.*, 1994).

O estresse oxidativo está relacionado a diversas condições patológicas que podem ser divididas em doenças pró-oxidantes envolvidas com o estresse oxidativo mitocondrial, como câncer e diabetes mellitus, e doenças promovidas por condições oxidativas inflamatórias que conduzem a aterosclerose, inflamação crônica, isquemia e lesão por reperfusão (DALLE-DONNE *et al.*, 2006; JENNER, 2003; SAYRE *et al.*, 2001; DHALLA *et al.*, 2000). O processo de envelhecimento é em grande parte devido à consequência prejudicial da ação de radicais livres na peroxidação lipídica, danos ao DNA e oxidação de proteínas (SCHIEPER; CHANDEL, 2014; HARMAN, 1956).

A modificação permanente do material genético resultante de incidentes induzidos pelo desequilíbrio redox celular está envolvida com o início da mutagênese, carcinogênese e envelhecimento. Lesões no DNA podem resultar em parada ou indução de transcrição, indução de vias de transdução de sinal, erros de replicação e instabilidade genômica associadas à carcinogênese (VALKO *et al.*, 2006; MARNETT, 2000). Níveis elevados de lesões oxidativas no DNA foram observados em vários tumores (TIAN *et al.*, 2016; DORFF *et al.*, 2011; TONKS, 2006; WISHART; DIXON, 2002).

O estresse oxidativo induzido por EROs também desempenha um papel em várias doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose, cardiopatia isquêmica, hipertensão,

cardiomiopatias, hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca congestiva (VALKO *et al.*, 2007; BERRY; HARE, 2004; HARE; STAMLER, 2005; PETROSILLO *et al.*, 2003; DHALLA *et al.*, 2000; KUKREJA; HESS, 1992). Diabetes mellitus tipo 2 é a forma mais comum de diabetes e a resistência à insulina é um dos principais contribuintes para a progressão e complicações da diabetes (WEYER *et al.*, 2001). Defeitos relacionados com o estresse oxidativo na maquinaria de fosforilação oxidativa e a β -oxidação mitocondrial levam ao excesso de acúmulo intracelular de triacilglicerol no músculo e no fígado e subsequente resistência à insulina (ROSCA *et al.*, 2005).

O estresse oxidativo aumenta com a idade e, portanto, pode ser considerado como um importante fator causador de várias doenças neurodegenerativas, especialmente para indivíduos mais velhos. O cérebro é particularmente vulnerável a danos oxidativos devido à elevada utilização de oxigênio, ao elevado teor em ácidos graxos poliinsaturados oxidáveis e à presença de metais redox (BUTTERFIELD *et al.*, 2006; TRETTER; ADAM-VIZI, 2004; SAYRE *et al.*, 2001). Os cérebros de pacientes com doença de Alzheimer mostram uma extensão significativa de dano oxidativo associado a acúmulo de peptídeo amilóide β ($A\beta$), bem como deposição de emaranhados neurofibrilares e fios neurofílicos (BUTTERFIELD *et al.*, 2002). A produção elevada de $A\beta$, é postulada como sendo um acontecimento importante no desenvolvimento da doença de Alzheimer (VALKO *et al.*, 2007; BUTTERFIELD *et al.*, 2002). O estresse oxidativo induz a degeneração das células nigrais e há evidências de que o nível de estresse oxidativo basal na substância negra no cérebro normal aumenta nos pacientes com doença de Parkinson (WAKATSUKI; ARAKI 2016; ROSA *et al.*, 2015). No entanto, fatores tais como inflamação, mecanismos excitotóxicos, ação tóxica do óxido nítrico e disfunção mitocondrial também estão envolvidos desempenham papéis na etiologia da doença (WAKATSUKI; ARAKI 2016;

ANDERSEN, 2004).

2.6 Toxicidade de compostos naturais sobre células humanas

De 1960 a 1982, o National Cancer Institute (NCI) nos EUA realizou um programa de coleta de plantas, visando impulsionar o progresso na descoberta de agentes anti-cancerígenos derivados de plantas (CRAGG; NEWMAN, 2005). Durante este tempo, uma vasta gama de agentes citotóxicos foram descobertos a partir de extratos de plantas, mas poucos destes conseguiram chegar ao mercado para uso clínico (MOLASSIOTIS *et al.*, 2005).

Extratos de *Tilia amurensis* e *Camellia sinensis* foram testados em linhagens celulares de câncer de pele e verificou-se que eles têm efeitos citotóxicos *in vitro* (VINHA *et al.*, 2013). O rizoma de *Zingiber officinale* promoveu inibição de crescimento, indução anti-proliferativa e apoptose regulada por EROs em células de carcinoma epidermóide (NIGAN *et al.*, 2009). Chandu *et al.* (2012) demonstraram que células de melanoma murino tratadas com extrato salinos de *Aloe vera* tinham sua viabilidade celular reduzida. Os extratos das flores de *Calendula officinalis* inibiram a proliferação de células tumorais e administrado por via oral mostrou, além disso, efeitos anti-metastáticos que levaram a um aumento da vida dos ratos com tumores metastáticos (PREETHI *et al.*, 2010; JIMENEZ-MEDINA *et al.*, 2006). O chá de cravo-da-índia apresentou maior ação anti-melanoma, comparado ao chá de camomila (*Matricaria chamomilla*) segundo (MATIC *et al.*, 2013). O extrato de folhas de *Viscum album* L. tem sido investigado para possível utilização no tratamento de câncer de pâncreas avançado, pulmão, colorretal e de mama (VINHA *et al.*, 2013; CHAN *et al.*, 2012).

A literatura também destaca os efeitos deletérios do uso de extratos e componentes naturais sobre células normais humanas. Shikonina, o componente principal da erva chinesa

tradicional *Lithospermum erythrorhizon*, possui várias funções biológicas, incluindo atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antitumorais (CHEN *et al.*, 2002). Também foi relatado que o tratamento com shikonina ativa a via da caspase induzindo a apoptose celular em células de leucemia HL-60 e de câncer colorretal humano, inibe a proliferação celular em células de carcinoma epidermóide humano, desencadeia apoptose em células de carcinoma hepático e promove perturbação no potencial de membrana, formação de EROs e morte por apoptose em células de hepatoma HE-1 (CHEN *et al.*, 2012; GONG *et al.*, 2011; HSU *et al.*, 2004; SINGH *et al.*, 2003; YOON *et al.*, 1999). Todavia, Jing *et al.* (2016) detectou que o tratamento com shikonina inibiu significativamente a viabilidade das queratinócitos normais da linhagem HaCaT de uma forma dependente da dose e do tempo e promoveu a detenção do ciclo celular na fase G0/G1 e apoptose. Além disso, o tratamento com shikonina reduziu o potencial da membrana mitocondrial e induziu a geração de espécies reativas de oxigênio.

Li *et al.* (2016) avaliando o efeito de sementes de damasco (*Semen armeniaca amarum*) em linhagem de queratinócitos cultivados HaCaT observou que o óleo essencial das semente produziu efeito antiproliferativo, parada do ciclo celular G0/G1, aumento no número de células apoptóticas precoces e tardias e ativação de caspases 3 e 9.

2.7 *Culex quinquefasciatus* SAY, 1823 (Diptera: Culicidae)

2.7.1 Distribuição, biologia e ecologia

Culex quinquefasciatus ocorre nas porções meridionais da Ásia, África, Américas (do sul dos EUA ao norte da Argentina) e na Oceania, sendo por isso considerado um mosquito trópico-cosmopolita. No Brasil, sua distribuição é abrangente e sua abundância é influenciada pela presença humana e urbanização (FORATTINI *et al.*, 1993).

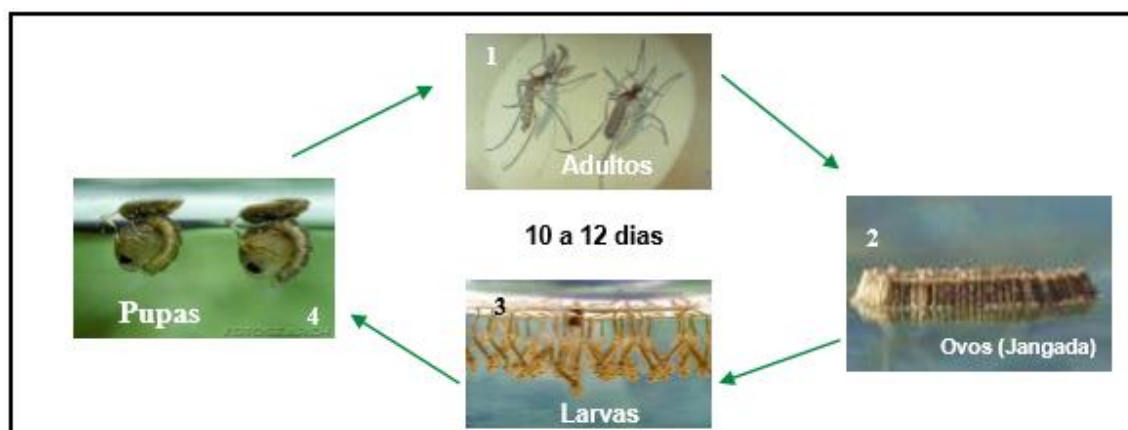
É um inseto holometábolo, sendo o adulto alado e as formas pré-imaginais aquáticas. O ciclo biológico tem duração média de 10 a 12 dias, desde a eclosão das larvas até a emergência do adulto, porém a duração do ciclo depende de fatores como disponibilidade de alimento, temperatura, luz e umidade (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Após a cópula, a fêmea, que é hematófaga, realiza o repasto sanguíneo geralmente à noite ou durante o período vespertino. Quando atingida a reprodução, a fêmea procura um local de repouso até a oviposição, que ocorre entre 48 e 72 horas após o repasto. Os ovos são depositados diretamente sob a lâmina d'água dos criadouros, agrupados em número de 150 a 250, sob a forma de jangada (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

A seleção do local de oviposição é o principal fator de distribuição da espécie, que é influenciado pelo feromônio de oviposição, presente na superfície apical dos ovos que tem a capacidade de atrair as fêmeas para os criadouros já colonizados (BARBOSA *et al.*, 2007; LAURENCE; PICKETT, 1985). O desenvolvimento larval ocorre no ambiente aquático e é composto por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) e um de pupa (Figura 3). As larvas são filtradoras e alimentam-se preferencialmente na superfície dos criadouros. As pupas não se alimentam, mas permanecem ativas, movimentando-se quando o ambiente é perturbado e os adultos alimentam-se de seiva vegetal. As fêmeas são também hematófagas e a alimentação sanguínea está relacionada à maturação de seus ovos. Embora possam realizar o repasto sanguíneo em aves ou em outros animais, as fêmeas são predominantemente antropofílicas (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Os criadouros preferenciais do mosquito *C. quinquefasciatus* são coleções de água estagnada a nível do solo, rica em matéria orgânica em decomposição e detritos, tais como valetas, fossas, córregos, caixas de inspeção de esgoto, entre outros. Após a emergência, os adultos permanecem, preferencialmente, próximos ao local onde ocorreu a oviposição, no

ambiente peridomiciliar ou dentro das casas, para que as fêmeas possam buscar o repasto sanguíneo (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Figura 3. Ciclo biológico do mosquito *Culex quinquefasciatus*. Adultos (1). As fêmeas depositam na água ovos agrupados sob a forma de jangada (2), após a eclosão há quatro estágios larvais (3), em seguida é atingido o estágio de pupa (4), que dará origem aos adultos. Fonte: (1) Action Nature (2008); (2) Gulf Coast Mosquito Control (2006); (3) Wildlife Trust (2006); (4) Fotosearch (2008).



2.7.2 Importância vetorial

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2011), a espécie *C. quinquefasciatus* é vetor exclusivo da filariose bancroftiana nas Américas. Esta parasitose é endêmica em várias regiões tropicais, com estimativa de 120 milhões de indivíduos infectados em 81 países e mais de um bilhão de pessoas vivendo em áreas de risco de contrair a infecção (OMS, 2011). A transmissão ativa da filariose nas Américas foi evidenciada em quatro países: Brasil, República Dominicana, Guiana e Haiti. No Brasil, a

Região Metropolitana do Recife (RMR), localizada no Estado de Pernambuco, apresenta focos endêmicos da filariose linfática desde 1990. A doença é causada pelo verme nematoda *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae) e sua transmissão se dá através da picada da fêmea do mosquito *C. quinquefasciatus* infectado.

O ciclo biológico de *W. bancrofti* é do tipo heteroxênico, possuindo hospedeiro intermediário (mosquito) e definitivo (homem) (REY, 2001). A infecção vetorial ocorre quando a fêmea do mosquito realiza o repasto sanguíneo e ingere microfilárias, forma jovem de *W. bancrofti*, presentes no sangue periférico do indivíduo infectado. No mosquito, as microfilárias perdem a bainha e transformam-se em larva de primeiro estágio (L1), estas larvas atravessam a parede do intestino e migram para os músculos torácicos, havendo mais duas mudas e, cerca de duas semanas após o repasto sanguíneo, atingem o estágio de larva infectante (L3) e migram para as glândulas salivares do mosquito por movimento ativo (REY, 2001). Quando a fêmea de *C. quinquefasciatus* realiza novamente o repasto sanguíneo, as L3 se desprendem do aparelho bucal e penetram ativamente na pele do hospedeiro humano, através da lesão causada pela picada do mosquito. Alcançam a corrente sanguínea e se alojam nos vasos linfáticos aferentes, onde se desenvolvem até a fase adulta. Quando macho e fêmea se encontram no mesmo vaso linfático ocorre a fase reprodutiva. A longevidade dos adultos nos vasos linfáticos pode atingir de 8 a 10 anos (FONTES, 2005).

Um programa global para eliminação da filariose proposto pela OMS foi iniciado em 2000 e, para tal, a associação de medidas como o tratamento em massa da população humana com uma droga microfilaricida foi recomendada para interromper o ciclo de transmissão da doença (WHO, 2011; OTTESEN *et al.*, 2008). Entretanto, um número de entraves biológicos e operacionais tem ameaçado o sucesso do tratamento de massa, por exemplo, o elevado número de pessoas que rejeitam o tratamento, o que levou a questionar se somente este

método seria suficiente para eliminar a doença.

Há uma estimativa de ampliação mundial da transmissão de arboviroses, e mosquitos do gênero *Culex* podem ter um papel estratégico, devido a sua abundância em áreas urbanas. *C. quinquefasciatus* também é vetor de arbovírus de importância clínica na saúde pública. Foi encontrado naturalmente infectado com vírus causadores de encefalites no Panamá e no Brasil (Pará) e tem sido evidenciado como vetor de arbovírus em áreas rurais e urbanas. Outro exemplo é a transmissão do Vírus do Nilo Ocidental (VNO), um arbovírus do gênero Flavivirus, que tem como hospedeiro principal as aves migratórias, sendo transmitido ao homem por mosquitos infectados, sobretudo do gênero *Culex*. Epidemias nos Estados Unidos ocorrem desde 1999 e o vírus já foi isolado no Caribe, Colômbia, Argentina e, recentemente, foram encontrados cavalos com sorologia positiva para o vírus no Brasil (BERROCAL *et al.*, 2006; MORALES *et al.*, 2006; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003). Cerca de 80% das pessoas que se infectam com o VNO não apresentam sintomas clínicos ou desenvolvem a doença, com período de incubação da infecção pelo VNO de 2 a 14 dias (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003). As características clínicas são febre, dor de cabeça, fadiga e, em alguns casos, rachadura na pele e dor nos olhos, porém, quando o sistema nervoso é afetado pode causar meningite e encefalite e levar a morte (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003). Como a disseminação do VNO pode ocorrer através de aves migratórias, deve haver vigilância ambiental de animais tidos como reservatórios e vetores para impedir a entrada e dispersão do VNO no país (LUNA *et al.*, 2003).

Dados recentes de uma pesquisa realizada pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) reportaram a presença do vírus Zika em mosquitos do gênero *Culex* (conhecido como pernilongo doméstico) coletados na cidade do Recife, onde a população desse mosquito

ultrapassa em quantidade a população de *A. aegypti*. Diante disso, essa pesquisa confirma a espécie como potencial vetor do vírus causador da febre do vírus Zika (ALIOTA *et al.*, 2016).

2.8 Controle populacional de vetores

O controle de insetos vetores exige estratégias que levem em consideração a biologia e ecologia, pois fatores como período do ciclo biológico e número elevado número de criadouros encontrados em áreas urbanas dificultam o controle da densidade populacional dos mesmos (REGIS *et al.*, 1995). O controle pode ser realizado por saneamento, uso de microesferas de poliestireno na superfície das fossas e vedação das mesmas e emprego de inseticidas químicos ou biológicos (REGIS *et al.*, 1995)

O controle biológico baseia-se na utilização de predadores, parasitas, competidores, patógenos ou toxinas resultantes do metabolismo de agentes biológicos. Podem ser utilizados peixes, insetos, nematódeos, protozoários, fungos, vírus e bactérias entomopatógenas (WINGFIELD *et al.*, 2016; BECKER *et al.*, 2003). Pesquisas têm sido desenvolvidas para avaliar o papel de espécies de fungos no controle biológico de mosquitos. A espécie *Lagenidium giganteum* é considerada um agente de controle biológico em potencial desde o início da década de 70 e estudos demonstraram a eficácia desse fungo para espécies de *Culex pipiens*, *Culex tarsalis*, *Aedes aegypti* e *Aedes gambiae* (WOODRING; KAYA; KERWIN, 1995; GOLKAR *et al.*, 1993). Os problemas mais frequentemente encontrados na utilização de fungos como entomopatógenos têm sido a baixa especificidade, a alta dosagem necessária e as dificuldades de cultivo *in vitro* (FAROOQ; FREED, 2016; BECKER *et al.*, 2003).

As bactérias entomopatógenas, por sua vez, são utilizadas desde os anos 60 para o

controle de insetos praga na agricultura. O seu uso para o controle de dípteros tomou impulso com a descoberta da propriedade inseticida de *Bacillus sphaericus* (Bs) (KELLEN *et al.*, 1965) e do isolamento de *B. thuringiensis* sorovar *israelenses* (Bti) (GOLDBERG; MARGALIT, 1977). A propriedade inseticida destas bactérias é devida, primariamente, a proteínas inseticidas produzidas durante a fase de esporulação. Estudos têm demonstrado que populações de *Culex* podem desenvolver resistência aos biolarvicidas à base de Bs, como por exemplo, a colônia resistente R2362 quando submetidas à forte pressão de seleção, sob condições de laboratório ou de campo, porém, continuaram susceptíveis a Bti (CHALEGRE *et al.*, 2013; AMORIM *et al.*, 2010).

Com o avanço das pesquisas no campo da biologia molecular, a técnica de silenciamento gênico via RNA de interferência (RNAi) tem sido bastante estudada como potencial alternativa para o controle de insetos (WHYARD *et al.*, 2009). O RNAi é um mecanismo de regulação que ocorre naturalmente na maioria das células eucarióticas e, em plantas e animais, é uma defesa importante contra ataque de vírus (SUN; TSAO, 2008; MOLNAR *et al.*, 2005). Este mecanismo é capaz de promover a inativação gênica após a transcrição do RNA mensageiro, o que permite silenciar a atividade de genes específicos, controlar o fluxo de informação genética na célula, além de identificar a função destes genes (FIRE *et al.*, 1998). Esta técnica pode ser usada para reduzir a competência vetorial ou diminuir a população dos insetos, pois é possível bloquear a transmissão de patógenos, gerar machos inférteis ou silenciar genes responsáveis pela síntese de quitina (PARADKAR *et al.*, 2012; THAILAYIL *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2010). A utilização de mosquitos transgênicos para o controle de doenças pode ser possível devido a mecanismos que levam ao bloqueio da transmissão do patógeno, redução do número de picadas, aumento da mortalidade da prole e aumento da mortalidade dos mosquitos induzida pela infecção

(MEDLOCK *et al.*, 2012).

Os compostos inorgânicos utilizados para o controle de insetos são classificados em fluorados (fluoreto de sódio, criolita), arsenicais (arsênico branco, cálcio e chumbo) e miscelânea incluindo sulfatos e carbomatos (MARICONI, 1988). Os compostos inorgânicos não são viáveis para a utilização em campo, pois são bastante tóxicos, sensíveis à luz e sua obtenção tem elevado custo. Estes inseticidas foram amplamente substituídos no controle de pragas após a descoberta dos primeiros produtos orgânicos sintéticos em meados da década de 30 até os anos 70 (CASIDA; QUISTAD, 1998).

Atualmente o controle químico pode ser realizado utilizando inseticidas orgânicos sintéticos como organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (KAWADA *et al.*, 2009; BRAGA; VALLE, 2007; SUCEN, 2001; HEMINGWAY; RANSON, 2000). Porém o meio ambiente tem sofrido com a utilização descontrolada destes compostos químicos, pois, além de causarem enorme impacto ambiental, depois de certo tempo perdem o largo espectro de atividade.

O maior problema na Entomologia Aplicada e que ainda não foi totalmente resolvido é a evolução da resistência a inseticidas em populações de artrópodes (N'GUESSAN *et al.*, 2016). Por conta da utilização em larga escala de inseticidas sintéticos por décadas, as populações de insetos vêm sendo expostas e selecionadas a diferentes produtos, reduzindo a probabilidade da existência de uma população que ainda não teve contato com algum tipo de inseticida (BECKER *et al.*, 2003). Desde 1998 a OMS define a resistência como a tolerância de uma linhagem a doses de um produto que é letal para a maioria dos indivíduos em uma população normal da mesma espécie. Whalon & McGhaghey (1998) redefiniram resistência como um processo microevolucionário, no qual a alteração genética selecionada pelo uso do inseticida produz populações com diferenciado modo de manejo.

A redução da sensibilidade dos insetos aos inseticidas pode ocorrer devido a diferentes mecanismos como modificações comportamentais, redução da penetração do inseticida pela cutícula do inseto, aumento da capacidade de metabolização dos inseticidas (resistência metabólica) ou ainda pode ocorrer alterações nos sítios alvo dos inseticidas (N'GUESSAN *et al.*, 2016; HEMINGWAY; RANSON, 2000). A resistência a inseticidas é caracterizada por uma variedade de modificações moleculares, tais como alterações na transcrição, amplificação de genes e/ou mutações pontuais em regiões codificantes, que resultam no aumento da expressão de enzimas de detoxificação ou na sensibilidade reduzida da proteína alvo do inseticida, afetando o metabolismo do inseto (WANG *et al.*, 2016; VONTAS *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2007).

Os dois principais mecanismos de resistência aos organofosfatos em populações de *Culex* são o aumento da atividade de enzimas de detoxificação ou a perda da sensibilidade da acetilcolinesterase (SANE, 2016; TOMA *et al.*, 2011; WEILL *et al.*, 2003; BROGDON; McALLISTER, 1998). A identificação dos alelos que conferem resistência é fundamental, pois um dos fatores que influenciam a evolução da seleção de resistência é a frequência inicial desses alelos de resistência nas populações (SANE *et al.*, 2016).

Em 1951 foi registrado o primeiro caso de populações de *Anopheles* resistentes ao organoclorado diclorodifeniltricloroetano (DDT) e estudos têm demonstrado que diversas ordens de artrópodes apresentavam resistência a uma ou mais classes de inseticidas químicos (GEORGHIU; LAGUNES-TEJEDA, 1991; GEORGHIU, 1990). Li *et al.* (2004) observaram que populações de *C. quinquefasciatus* do Alabama e da Flórida estavam resistentes a organofosfatos como o malation (inibidor de acetilcolinesterase), além de apresentar resistência cruzada a outras classes de inseticidas. Na Argentina o temefós (inibidor de acetilcolinesterase) é usado em programas de controle de *A. aegypti* desde 1998,

com aplicações sistemáticas desde 2002 e estudo realizado em 2008 mostrou que as populações dos insetos apresentaram uma razão de resistência na ordem de 3,9 vezes ao temefos (LLINÁS *et al.*, 2010).

A partir dos estudos básicos de fisiologia dos insetos, a pesquisa por inseticidas alternativos, com sítio-alvo diferente dos inseticidas orgânicos sintéticos, levou à utilização de substâncias capazes de interferir nos processos da metamorfose e reprodução dos insetos (BECKER *et al.*, 2003). Neste caso, surgiram os inseticidas que são reguladores de crescimento de insetos (IGR do inglês *insect growth regulator*) que podem ser divididos em duas categorias: os hormonais e os não-hormonais (GRAF, 1993). Os IGRs hormonais, como metopreno, hidropreno, piriproxifeno e fenoxicarb, interferem no sistema endócrino provocando retardo no desenvolvimento do inseto e a morte. Os IGRs não hormonais, como diflubenzuron e triflumuron, atuam sobre a formação do exoesqueleto dos insetos interferindo na síntese de quitina, molécula que constitui a cutícula dos ovos e inseto adulto e da matriz peritrófica do intestino dos mesmos (MANSOUR *et al.*, 2010; MERZENDORFFER; ZIMMICH, 2003; GRAF, 1993).

Visando possibilitar aplicações em campo em concentrações menores e mais espaçadas, foram desenvolvidas moléculas com atividade tóxica sobre o sistema nervoso de artrópodes com eficácia elevada, alta seletividade e baixa toxicidade para espécies não-alvo. O espinosade, primeiro inseticida comercial entre as espinosinas, moléculas isoladas do actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* atua estimulando o receptor colinérgico (HUANG *et al.*, 2009). A molécula induz ativação alostérica persistente dos receptores nicotínicos de acetilcolina, levando à morte dos insetos devido à prolongada contração muscular (PERRY *et al.* 2011). Um trabalho realizado no México demonstrou a eficácia do espinosade no controle de *A. aegypti*, *A. albopictus*, *C. quinquefasciatus* e *C. coronator*, mesmo após a

recolonização do ambiente (MARINA *et al.*, 2011).

Dentre os inseticidas orgânicos cujas substâncias ativas são provenientes de plantas, destacam-se o alcaloide nicotina isolado de espécies de *Nicotiana*, o qual é agonista do receptor nicotínico da acetilcolina e a rotenona, isolada de espécies do gênero *Derris* e *Lonchocarpus*, que inibe o complexo da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (CASIDA; QUISTAD, 1998; SOLOWAY, 1976). Os neonicotinoides são derivados da molécula de nicotina que ao atuarem como agonistas dos receptores nicotínicos da acetilcolina, promovem a abertura dos canais de sódio e geram um colapso do sistema nervoso e morte (TOMIZAWA; CASIDA, 2005).

Os óleos essenciais de *Pimpinella anisum* e *Illicium verum* foram mais eficientes sobre o quarto ínstar de *C. pipiens* (LC₅₀ de 18 mg/L) do que aqueles obtidos de *Dianthus caryophyllus* e *Lepidium sativum* cujos valores de CL₅₀ foram maiores que 50 mg/L (KIMBARIS *et al.*, 2012). Rahuman *et al.* (2008) testaram a atividade larvicida de extratos em etanol e éter de petróleo de cinco espécies de plantas da família Euphorbiaceae: *Jatropha curcas*, *Pedilanthus tithymaloides*, *Phyllanthus amarus*, *Euphorbia hirta* e *Euphorbia tirucalli* contra as larvas do quarto ínstar de *C. pipiens*. Os extratos etanólicos apresentaram baixa mortalidade enquanto os extratos em éter de petróleo apresentaram bom desempenho sendo aqueles obtidos de *J. curcas* e *E. tirucalli* os mais eficientes com LC₅₀ de 11,34 e 5,52 ppm, respectivamente. O extrato aquoso de flores de *Nerium oleander* também foi larvicida contra *C. pipiens* com valores de CL₅₀ de 2758,87 e 168, 84 ppm após 24 e 48 horas de incubação (RAVEEN *et al.*, 2014) e Molan *et al.* (2016) demonstraram que o extrato aquoso do bagaço de *Solanum lycopersicum* foi larvicida e pupicida causando a morte de 40% das larvas e 30% das pupas, que extrato parcialmente purificado de *Croton hirtus* inibiu a

emergência dos adultos em 50% das larvas tratadas e que o extrato de *Pogostemon quadrifolius* diminuiu a fecundidade do mosquito em 72,4% em *C. quinquefasciatus*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Investigar preparações de sementes de *M. oleifera* contendo WSMoL e a lectina isolada quanto a atividade coagulante e toxicidade sobre células humanas e *Culex quinquefasciatus*.

3.2 Específicos

- ✓ Determinar o efeito de extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* em linhagens não tumorigênicas GN1 (fibroblastos) e HaCaT (queratinócitos) analisando a viabilidade e proliferação celular, morfologia, produção de EROs citosólico e mitocondrial, abertura do poro de transição de permeabilidade, consumo mitocondrial de oxigênio e níveis do antígeno nuclear de proliferação celular.
- ✓ Isolar WSMoL de sementes de *M. oleifera* de acordo com procedimento previamente estabelecido e determinar o ponto isoelétrico e o efeito de íons na atividade hemaglutinante da lectina.
- ✓ Definir a cinética de coagulação de WSMoL em modelo de água turva com caolin, em presença ou não de carboidratos e íons, através das medidas de absorbância (densidade óptica) e variação da resistência elétrica em resposta à aplicação de corrente elétrica.
- ✓ Determinar o efeito de WSMoL em larvas do quarto instar (L4) de populações de *Culex quinquefasciatus* susceptível.
- ✓ Avaliar *in vitro* o efeito de WSMoL na atividade de tripsina, amilase e protease extraída do intestino de L4 de *C. quinquefasciatus*.

4. REFERÊNCIAS

ABREU-LIMA, G. J. Uso de polímero natural do quiabo como auxiliar de floculação e filtração em tratamento de água e esgoto. Tese de Doutorado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2007.

AL-ANIZI, A. A.; HELLYER, M. T.; ZHANG, D. Toxicity assessment and modelling of *Moringa oleifera* seeds in water purification by whole cell bioreporter. **Water research**, v. 56, p. 77-87, 2014.

ALBELDA, S. M.; SMITH, C. W.; WARD, P. A. Adhesion molecules and inflammatory injury. **The FASEB Journal**, v. 8, n. 8, p. 504-512, 1994.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2009). **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora.

ALBUQUERQUE, L. P.; SANTANA, G. M. S.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. . Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 75, p. 158-166, 2012.

ALIOTA, M. T.; PEINADO, S. A.; OSORIO, J. E.; BARTHOLOMAY, L. C. *Culex pipiens* and *Aedes triseriatus* mosquito susceptibility to Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 10, p. 1857, 2016.

ALMEIDA, G. D.; ZUCOLOTO, M.; ZETUN, M. C.; COELHO, I.; SOBREIR, F. M. Estresse oxidativo em Células vegetais mediante aleloquímicos. **Revista Facultad Nacional de Agronomia Medellin**, v.61, n.1, p.4237, 2008.

AMIRTHARAJAH, A.; O'MELIA, C. R. Coagulation processes: Destabilization, mixing and AMORIM, L. B.; BARROS, R. A.; CHALEGRE, K. D. M.; OLIVEIRA, C. M. F.; REGIS, L.

N.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Stability of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* evaluated by molecular tools. **Insect biochemistry and molecular biology**, v.40, n4, p.311-316, 2010.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. **Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular**. Metrocamp pesquisa, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ANDERSEN, J. K. **Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?** 2004.

ANG, W.L.; MOHAMMAD, A.W.; BANEMOR, A.; HILAL, N. Chitosan as natural coagulant in hybrid coagulation-nanofiltration membrane process for water treatment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, p. 4857- 4862.

AQUINO, J. M.; ROCHA-FILHO, R. C.; RUOTOLO, L. A. M.; BOCCHI, N.; BIAGGIO, S. R. "Electrochemical degradation of a real textile wastewater using β -PbO₂ and DSA anodes". **Chemical Engineering Journal**, v. 251, p.138-145, 2014.

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

ARAÚJO, L. C. C.; AGUIAR, J. S.; NAPOLEÃO, T. H.; MOTA, F. V. B.; BARROS, A. L. S.; MOURA, M. C.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P. M. G. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PloS one**, v.8, n.12, p. e81973, 2013.

ARAÚJO, R. M.S.; SILVA, F. R.; NAPOLEÃO, T. H.; CUNHA, M. G. C.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M.T. S.; PAIVA, P. M. G. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant science**, v. 183, p. 20-26, 2012.

BARBOSA, R. M.; SOUTO, A.; EIRAS, A. E.; REGIS, L. Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto**

Oswaldo Cruz, v. 102, n. 4, p. 523-529, 2007.

BECKER, N.; PETRIC, D.; BOASE, C.; LANE, J.; ZGOMBA, M.; DAHL, C.; KAISER, A. **Mosquitoes and their control**. New York: Springer, 2003.

BERROCAL, L.; PEÑA, J.; GONZÁLEZ, M.; MATTAR, S. West Nile virus; ecology and epidemiology of an emerging pathogen in Colombia. **Revista de Salud Pública**, v. 8, n. 2, p. 218-228, 2006.

BERRY, C. E.; HARE, J. M. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. **The Journal of physiology**, v. 555, n. 3, p. 589-606, 2004.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 90, n. 2, p. 157-177, 2001.

BOLTO, B.; GREGORY, J. Organic polyelectrolytes in water treatment. **Water Research**, v. 41, p. 2301-2324, 2007.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 2, p. 231-239, 2005.

BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 4, p. 605, 1998.

BUDD, G.C.; HESS, A.F.; SHORNEY-DARBY, H.; NEEMANN, J.J.; SPENCER, C. M.; BELLAMY, J.D.; HARGETTE, P.H. Coagulation applications for new treatment Goals. **American Water Works Association** v. 92, p. 102-113, 2004.

BUTERRFIELD, D. A.; POON, H. F.; CLAIR, D. S.; KELLER, J. N.; PIERCE, W. M.; KLEIN, J. B.; MARKESBERY, W. R. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. **Neurobiology of disease**, v.22, n.2, p. 223-232, 2006.

CALJON, G.; VOOGHT, L.; VAN DEN ABELLE, J. "Options for the delivery of anti-pathogen molecules in arthropod vectors. **Journal of invertebrate pathology**, v. 112, p. S75-S82, 2013.

CAMACHO, F. P.; SOUSA, V. S.; BERGAMASCO, R.; TEIXEIRA, M. R. The use of *Moringa oleifera* as a natural coagulant in surface water. **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p 226- 237, 2017.

CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539, 2002.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F.; SOBRAL, P. J. A. Effect of chemical treatment on the mechanical properties, water vapour permeability and sorption isotherms of gelatin-based films. **Packaging Technology and Science**, v. 21, n. 3, p. 165-169, 2008.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: past, present, or future?. **Annual review of entomology**, v. 43, n. 1, p. 1-16, 1998.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. BUREAU OF EPIDEMIOLOGY et al. **Health information for international travel**. US Dept. of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control, Bureau of Epidemiology, 2003.

CHALEGRE, K. D. M. Caracterização e detecção molecular de alelos de resistência ao biolarvicida *Bacillus sphaericus* em *Culex quinquefasciatus*. 2013. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

CHAN, Y. S.; WONG, J. H.; FANG, E. F.; PAN, W.; NG, T. B. Isolation of a glucosamine

binding leguminous lectin with mitogenic activity towards splenocytes and anti-proliferative activity towards tumor cells. **PloS one**, v.7, n.6, p. e38961, 2012.

CHANDU, A. N.; KUMAR, S. C.; BHATTACHARJEE, C.; DEDNATH, S. Cytotoxicity study of plant *Aloe vera* (Linn). **Chronicles of Young Scientists**, v.3, n.3, p. 233, 2012.

CHEN, X.; YANG, L.; OPPENHEIM, J. J.; HOWARD, O. M. Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives. **Phytotherapy Research**, v.16, n.3, p.199-209, 2002.

CHOY, S. Y.; PRASAD, K. N.; WU, T. Y.; RAGHUNANDAN, M. E.; RAMANAN, R. N. Performance of conventional starches as natural coagulants for turbidity removal. **Ecological Engineering**, v. 94, n. 2016, p. 352- 364.

CHUMARK, P.; KHUNAWAT, P.; SANVARINDA, Y.; PHORNCHIRASILP, S.; MORALES, N. P.; PHIVTHONG- NGAM, L.; KLAI-UPSORN, S. P. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v.116, n.3, p.439-446, 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 aegyti* larvae. **Chemosphere**, v.77, p. 934-938, 2009.

CONSOLI, R.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic?, Recent Trends in **Toxicology**, Transworld Research Network, Kerala, v. 37, p. 47-59, 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, David J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 72-79, 2005.

CUBAS, A. L. Y. Floculação em meio granular expandido. Dissertação de Mestrado. Engenharia Ambiental –Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical chemistry**, v.52, n.4, p.601-623, 2006.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of hypertension**, v. 18, n. 6, p. 655-673, 2000.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of hypertension**, v. 18, n. 6, p. 655-673, 2000.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A.D.B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. Editora Rima, São Carlos, SP, vol.2, 2005.

DIAMADOPOULOS, E.; BARNDÖK, H.; XEKOUKOULOTAKIS, N. P.; MANTZAVINOS, D. Treatment of ink effluents from flexographic printing by lime precipitation and boron-doped diamond (BDD) electrochemical oxidation. **Water Science and Technology**, v. 60, n. 10, p. 2477-2483, 2009.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; TALALAY, P. NAD(P)H: quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n. 1, p. 116-123, 2010.

DORFF, T. B.; FLAIG, T. W.; TANGEN, C. M.; HUSSAIN, M. H.; SWANSON, G. P.; WOOD, D. P.; VOGELZANG, N. J. Adjuvant androgen deprivation for high-risk prostate cancer after radical prostatectomy: SWOG S9921 study. **Journal of Clinical Oncology**, v.29, n.15, p.2040-2045, 2011

DROGE, Wulf. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUAN, J.; GREGORY J. Coagulation by hydrolysing metal salts. **Advances in Colloid and Interface Science**. v.100, p.102-475, 2006.

DUKE, J.A. Moringaceae: horseradish-tree, drumstick-tree, sohnja, moringa, murunga-kai, mulungay. In: BENGE, M. D. (Ed.) *Moringa a multipurpose tree that purifies water*. Boston, **Science and Technology for Environment and Natural Resources**, p. 19-28, 1987.

EL-ASHTOUKHY, E-S. Z.; AMIM, N. K.; FOUAD, Y. O. 2015. "Treatment of real wastewater produced from Mobil car wash station using electrocoagulation technique". **Environmental Monitoring and Assessment**. v.187, n. 10, p. 628, 2015.

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

FAROOQ, M.; FREED, S. Lethal and sublethal effects of mixtures of entomopathogenic fungi and synthetic insecticides on biological aspects of *Musca domestica* L. **Turkish Journal of Entomology**, v. 40, n. 3, 2016.

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.C.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.

FERREIRA, S. S. F. Comportamento químico do alumínio e do ferro em meio aquoso e implicações no tratamento de água. **Sanare**, p. 50-58, 1997.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v.391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FONTES, G.; BRAUN, R. F.; FRAIHA, N. H.; VIEIRA, J. B. F.; PADILHA, S. S., ROCHA, R. C., ROCHA, E. M. M. Filariose linfática em Belém, Estado do Pará, Norte do Brasil e a perspectiva de eliminação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 131-136, 2005.

FORATTINI, O. P.; KAKITANI, I., MASSAD, E.; GOMES, A. D. C. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment: 1-Parity of blood seeking Anopheles (Kerteszia) in South-Eastern Brazil. **Revista de saúde pública**, v. 27, n. 1, p. 1-8, 1993.

FREITAS J.H.E.S.; SANTANA V, K.; SILVA, P. M.; MOURA, M.C.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, A.E.; NAPOLEÃO, T.H. Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Lectin as a Metal Remover in Aqueous Solutions. **Protein and peptide letters**, v. 23, n. 7, p. 645-649, 2016.

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, n.1, p 34-41, 2011.

FRENETTE, P. S.; WAGNER, D. D. Adhesion molecules—blood vessels and blood cells. **New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 1, p. 43-45, 1996.

FUGLIE, L.J., The Miracle Tree: *Moringa oleifera*: Natural Nutrition for the Tropics, **Church World Service**, Dakar, v. 5, p. 68, 2001.

FULDA, S.; GORMAN, A. M.; HORI, O.; SAMALI, A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. **International journal of cell biology**, v. 201, 2010.

GAO, B.Y.; WANG Y.; YUE Q.Y.; WEI, J.C.; LI, Q The size and coagulation behavior of a novel composite inorganic-organic coagulant. **Separation and Purification Technology**. v. 62, p. 544-550, 2008.

GAO, B.Y.; WANG Y.; YUE Q.Y.; WEI, J.C.; LI, Q The size and coagulation behavior of a novel composite inorganic-organic coagulant .**Separation and Purification Technology**. v. 62, p. 544-550, 2008.

GEOGHIOU, G. P. Overview of insecticide resistance. In: **ACS Symposium series- American Chemical Society (USA)** 1990.

GEOGHIOU, G. P.; LAGUNES-TEJEDA, A. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. 1991.

GOLDBER, L. J.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquitoes News**, v. 37, n. 3, p. 355-358, 1977.

GOLKAR, L.; LEBRUN, R. A.; OHAYON, H.; GOUNON, P.; PAPIEROK, B.; BREY, P. T. Variation of larval susceptibility to *Lagenidium giganteum* in three mosquito species. **Journal of invertebrate pathology**, v. 62, n. 1, p. 1-8, 1993.

GRAF, J.-F. The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitology Today**, v. 9, n. 12, p. 471-474, 1993.

GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. **Trends in cell biology**, v. 8, n. 7, p. 267-271, 1998.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose, **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

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

HAIL JR, N.; CARTER, B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11, n. 6, p. 889- 904, 2006.

HARE, J. M.; STAMLER, J. S. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 3, p. 509-517, 2005.

HARMAN, E. Protein oxidation in aging and age-related diseases. **Journal Gerontology**, v. 11, p. 298-300, 1956.

HASSEMER, M. E. N. Tratamento de efluente têxtil –processo físico-químico com ozônio e floculação em meio granular. Dissertação de Mestrado. Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2000.

HAYAT, H.; MAHMOOD, Q.; PERVEZ, A.; BHATTI, Z. A.; BAIG, S. A. Comparative decolorization of dyes in textile wastewater using biological and chemical treatment. **Separation and Purification Technology**, v. 154, p. 149-153, 2015.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H.. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual review of entomology**, v. 45, n. 1, p. 371-391, 2000.

HUANG, K. X.; XIA, L.; ZHANG, Y.; DING, X.; ZAHN, J. A. Recent advances in the biochemistry of spinosyns. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 1, p. 13-23, 2009.

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

JARVIS, P.; MARTIN, J.; WINSPEA, T.; JEFFERSON, B. Ballasted flotation with glass microspheres for removal of natural organic matter. **Separation Science and Technology**, v. 46, p. 2489-2495, 2006.

JENNER, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. **Annals of neurology**, v. 53, n. S3, p. S26-S38, 2003.

JIMENEZ-MEDINA, E.; GARCIA-LORA, A.; PACO, L.; ALGARRAI, I.; COLLADO, A.; GARRIDA, F. (2006). A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. **BMC câncer**, v. 6, n.1, p.11, 2006.

JING, H.; SUN, W.; FAN, J.; ZHANG, Y.; YANG, J.; JIA, J.; ZHENG, Y. Shikonin induces apoptosis of HaCaT cells via the mitochondrial, Erk and Akt pathways. **Molecular medicine reports**, v.13, n.4, p. 3009-3016, 2016.

JONES, A. M.; DANGL, J. L. Logjam at the Styx: programmed cell death in plants. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 4, p. 114-119, 1996.

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

KAWADA, H.; HIGA, Y.; KOMAGATA, O.; KASAI, S.; TOMITA, T.; YEN, N. T.; TAKAGI, M. Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. **PLoS Negligency Tropical Disease**, v. 3, n. 10, p. e527, 2009.

KEHINDE, F.O.; AZIZ, H.A. “Classical optimization of process variables in the treatment of real textile wastewater using clinoptilolite.” **Journal of Enviromental Chemical Engineering**, v. 4, n. 1, p. 1242-1247, 2015.

KELLEN, W. R.; CLARK, T. B.; LINDEGREN, J. E.; HO, B. C.; ROGOFF, M. H., SINGER, S. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. **Journal of invertebrate pathology**, v. 7, n. 4, p. 442-448, 1965.

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

KIMBARIS, A. C.; KOLIOPOULOS, G.; MICHAELAKIS, A.; KONSTANTOPOULOU, M. A. . Bioactivity of *Dianthus caryophyllus*, *Lepidium sativum*, *Pimpinella anisum*, and *Illicium verum* essential oils and their major components against the West Nile vector *Culex pipiens*. **Parasitology research**, v.111, n.6, p.2403-2410, 2012.

KLING, P. G.; OLSSON, P. Involvement of differential metallothionein expression in free radical sensitivity of RTG-2 and CHSE-214 cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 11, p. 1628-1637, 2000.

KONOZY, E. H.; BERNARDES, E. S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 222-229, 2003.

KROEMER, G.; REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. **Nature Medicine**, v. 6, n. 5, 2000.

KUKIC, D. V.; SCIBAN, M .B; PRODANOVIC, J. K; ALEKSANDRA, N. T., Extract of fava bean (*Vicia faba* L.) seeds as natural coagulants. **Ecological Engineering**. v. 85, n. 2015, p 229-232, 2015.

KUKREJA, R. C.; HESS, M. L. The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. **Cardiovascular research**, v. 26, n. 7, p. 641-655, 1992.

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

2009.

LAURENCE, B. R.; PICKETT, J. A. An oviposition attractant pheromone in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 75, n. 02, p. 283-290, 1985.

LEE, C. S.; ROBINSON, J.; CHONG, M. F. "A review on chemical coagulation/flocculation technologies for removal of colour from textile wastewaters." **Journal of environmental management**, v. 93, n. 1, p. 154-168, 2012.

LEME, F. P. **Teorias e técnicas de tratamento de água**. ABES, Rio de Janeiro, 1990.

LI, K.; YANG, W.; LI, Z.; JIA, W.; LI, J.; ZHANG, P.; XIAO, T. Bitter apricot essential oil induces apoptosis of human HaCaT keratinocytes. **International immunopharmacology**, v.34, p. 189-198, 2016.

LI, T.; LIU, L.; ZHANG, L.; LIU, N. Role of G-protein-coupled receptor-related genes in insecticide resistance of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. **Scientific reports**, v. 4, p. 6474, 2014.

LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review Entomology**, v. 52, p. 231-253, 2007.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos da qualidade e tratamento de água**. 3^a. ed. Campinas – SP: Editora Átomo, 2010.

LLINÁS, G. A.; SECCACINI, E.; GARDENAL, C. N.; LICASTRO, S. Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 113-116, 2010.

LOEFFLER, M.; KREMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and

incognita. **Experimental Cellular Research**, v. 256, n. 1, p. 19-26, 2000.

LORIS, R. ; HAMELRYCK, T. ; BOUCKAERT, J. ; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, p. 9-36, 1998.

LUNA, E.J.A.; PEREIRA, L. E.; SOUZA, R. P. Encefalite do Nilo Ocidental, nossa próxima epidemia?. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 12, n. 1, p. 7-19, 2003.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 144, n. 3, p. 283-289, 2006.

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

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American journal of pathology**, v. 146, n. 1, p. 3, 1995.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. **Journal of Agricultural Science**, v. 2, p. 331-322, 1997.

MANENTI, D. R.; SOARES, P. A.; MÓDENES, A. N.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; BOAVENTURA, R. A. R.; BERGAMASCO, R.; VILAR, V. J. P. Insights into solar photo-Fenton process using iron(III)–organic ligand complexes applied to real textile wastewater treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 266, p. 203-212, 2015.

MANGRICH, A. S; DOUMER, , M. E.; MALLMANN,; A. S.; WOLF, C. R. Química verde no tratamento de águas: uso de coagulante derivado de tanino de *Acacia mearnsii*. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 2-15, 2014.

MANSOUR, M. Effects of gamma radiation on the Mediterranean flour moth, *Ephestia*

kuehniella, eggs and acceptability of irradiated eggs by *Trichogramma cacoeciae* females. **Journal of pest science**, v. 83, n. 3, p. 243-249, 2010.

MARICONI, F.A.M. **Inseticidas e seu emprego no controle às pragas**. Editora Nobel, 7ª edição, São Paulo, v. 95, 1988.

MARINA, C. F.; BOND, J. G.; CASAS, M.; MUÑOZ, J.; OROZCO, A.; VALLE, J.; WILLIAMS, T. Spinosad as an effective larvicide for control of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, vectors of dengue in southern Mexico. **Pest management science**, v. 67, n. 1, p. 114-121, 2011.

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 361-370, 2000.

MATIC, I. Z.; JURANIC, Z.; ŠAVIKIN, K.; ZDUNIC, G.; NADVINSKI, N.; GODEVAC, D. Chamomile and marigold tea: chemical characterization and evaluation of anticancer activity. **Phytotherapy research**, v.27, n.6, p.852-858, 2013.

MEDLOCK, J. M.; HANSFORD, K. M.; SCHAFNERR, F.; VERSEIRT, V.; HENDRICKX, G.; ZELLER, H.; BORTEL, W. V. A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 12, n. 6, p. 435-447, 2012.

MERZENDORFER, H.; ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 24, p. 4393-4412, 2003.

MOLAN, A.L.; MUNTHER, H.R.; DOA, A. A. Larvicidal and pupicidal activity of water extracts from tomato pomaces and their components against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditios " **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 5, p. 163-171, 2016.

MOLASSIOTIS, A.; FERNANDEZ-ORTEGA, P.; PUD, D.; OZDEN, G.; SCOTT, J. A.;

PANTELI, V.; MADSEN, E. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. **Annals of oncology**, p. 16, n. 4, p. 655-663, 2005.

MOLNAR, A.; CSORBA, T.; LAKATOS, L.; VÁRALLYAY, É.; LACOMME, C.; BURGYAN, J. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. **Journal of virology**, v.79, n.12, p.7812-7818, 2005.

MORALES, M. A.; BARRANDEGUY, M.; FABBICI, C.; GARCIA, J. B.; VISSANI, A.; TRONO, K.; TAYLOR, N. West Nile Virus Isolation from Equines, Argentina, 2006. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 10, p. 1559, 2006.

MUYIBI, S.A.; EVISON, L.M. Optimizing physical parameters a effecting coagulation of turbid water with *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v. 29, p. 2689-2695, 1995.

N'GUESSAN, R.; ODJO, A.; NGUFOR, C.; MALONE, D.; ROWLAND, M. A Chlorfenapyr Mixture Net Interceptor® G2 Shows High Efficacy and Wash Durability against Resistant Mosquitoes in West Africa. **PLoS One**, v.11, n.11, p. e0165925, 2016.

NAPOLEÃO, T. H.; PONTUAL, E. V.; Lima, T. A.; SANTOS, N. D.L., SÁ, R. A., COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M.G. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology research**, v. 110, n. 2, p. 609-616, 2012.

NAPOLEÃO, T. H.; PONTUAL, E. V.; Lima, T. A.; SANTOS, N. D.L., SÁ, R. A., COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M.G. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology research**, v. 110, n. 2, p. 609-616, 2012.

NAPOLEÃO, T. H.; REGO, B. B.; PONTUAL, E. V.; ALBUQUERQUE, L. P.; SÁ, R. A.; PAIVA, L. M.; COELHO, L.C.B.B; PAIVA, P. M. G. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of stored products research**, v. 54, p. 26-33, 2013.

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 and Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.

NARULA, J.; PANDEY, P.; ARBUSTINI, E.; HAIDER, N.; NARULA, N.; KOLODZIE, F. D.; ISRAELS, S. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 8144-8149, 1999.

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

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

NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. **Trends in biochemical sciences**, v. 22, n. 8, p. 299-306, 1997.

NIGAM, N.; BHUI, K.; PRASAD, S.; GEORGE, J.; SHUKLA, Y. . [6]-Gingerol induces reactive oxygen species regulated mitochondrial cell death pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. **Chemico-biological interactions**, v.181, n.1, p.77-84, 2009.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.

OKUDA, T.; BAES, A. U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Improvement of extraction method of coagulation active components from *Moringa oleifera* seed, **Water Research**, v.

33, p. 3373-3378, 2001.

OLIVEIRA, A. M.; NASCIMENTO, M. F.; FERREIRA, M. R. A.; MOURA, D. F.; SOUZA, T. G. S.; SILVA, G. C.; RAMOS, E. H. S.; PAIVA, P. M. G.; MEDEIROS, P. L.; SILVA, T. G.; SOARES, L. A. L.; CHAGAS, C. A.; SOUZA, I. A.; NAPOLEÃO, T. H. Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L. (Moraceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, p. 1-8, 2016.

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.

OLIVEIRA, J.T.A.; MELO, V. M.; CÂMARA, M. F.; VASCONCELOS, I. M.; BELTRAMINI, L. M.; MACHADO, O. L.; CAPISTRANO, G. G. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 301- 310, 2002.

OTTESEN, E. A.; HOOPER, P. J.; BRADLEY, M.; BISWAS, G. The global programme to eliminate lymphatic filariasis: health impact after 8 years. **PLoS Negligency Tropical Disease**, v. 2, n. 10, p. e317, 2008.

PAIVA, P. M. G.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v. 1, p. 396-406, 2010.

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

PANG, Y. L.; ABDULLAH, A. Z. 2013. "Fe³⁺ doped TiO₂ nanotubes for combined adsorption–sonocatalytic degradation of real textile wastewater." **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 129, p. 473-481, 2013.

PARADKAR, P. N.; TRINIDAD, L.; VOYSEY, R.; DUCHEMIN, J. B.; WALKER, P. J. Secreted Vago restricts West Nile virus infection in Culex mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n.46, p.1891, 2012.

PERRY, T.; BATTERHAM, P.; DABORN, P. J. The biology of insecticidal activity and resistance. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 7, p. 411-422, 2011.

PETROSILLO, G.; RUGGIERO, F. M.; PARADIES, G. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. **The FASEB Journal**, v.17. n.15, p. 2202-2208, 2003.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro.IBDF, v. 5, p. 276-283, 1984.

POHLEVEN, J.; OBERMAJER, N.; SABOTIČ, J.; ANŽLOVAR, S.; SEPČIĆ, K.; KOS, J.; KRALJ, B.; ŠTRUKELJ, B.; BRZIN, J. Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 23, p. 158- 162, 2009.

PONTUAL, E. V.; SANTOS, N. D. L.; MOURA, M. C.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. D. A. F.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. **Parasitology research**, v.113, n.2, p. 727-733, 2014.

PREETHI, K. C.; SIVEEN, K. S.; KUTTAN, R.; KUTTAN, G. Inhibition of metastasis of B16F-10 melanoma cells in C57BL/6 mice by an extract of *Calendula officinalis* L flowers. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.11, n.6, p.1773-1779, 2010.

RAHUMAN, A. A.; VENKATESAN, P.; GOPALAKRISHNAN, G. Mosquito larvicidal activity of oleic and linoleic acids isolated from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. **Parasitology research**, v. 103, n. 6, p. 1383-1390, 2008.

RAMOS, R. O. Clarificação de água com turbidez baixa e cor moderada utilizando sementes de *Moringa oleifera* Lam, Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2005.

RASOOL, M. A.; TAVAKOLI, B.; CHAIBAKHSH, N.; PENDASHTEH, A. L. Use of plant-based coagulant in coagulation-ozonation combined treatment of leachate from a waste dumping site. **Ecological Engineering**, v. 90, n 2016, p. 431- 437, 2016.

RAVEEN, R.; KAMAKSHI, K. T.; DEEPA, M.; ARIVOLI, S.; TENNYSON, S. Larvicidal activity of *Nerium oleander* L.(Apocynaceae) flower extracts against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **International Journal of Mosquito Research**, v.1, n.1, p.36-40, 2014.

REGIS, L.; SILVA-FILHA, M. H. N.; OLIVEIRA, C. M.; RIOS, E. M.; SILVA, S. B. D.; FURTADO, A. F. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, n. 1, p. 115-119, 1995.

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

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. In: **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. Guanabara Koogan, 2001.

RIZZO, L.; Di GENNARO, A.; GALLO, M.; BELGIORNO, V. Coagulation/chlorination of surface water : A comparison between chitosan and metal salts. **Separation and Purification Technology** , v. 62, p. 79-85, 2008.

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. “Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin”, **Journal Food Science**, v. 76, pp.T53-T58, 2011.

ROSA, P.; MARINI, E. S.; GELMETTI, V.; Valente, E. M. Candidate genes for Parkinson disease: lessons from pathogenesis. **Clinica Chimica Acta**, v. 449, p. 68-76, 2015.

ROSCAM, G.; MUSTATA, T. G.; KINTER, M. T.; OZDEMIR, A. M.; KERN, T. S.; SZWEDA, L. I.; WEISS, M. F. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v.289, n.2, p. F420-F430, 2005.

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.

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.; BIEBER, L.W.; PAIVA, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, p.460-464, 2008.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; ÜNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annual review of biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 39-85, 2004.

SANE, S. P. Neurobiology and biomechanics of flight in miniature insects. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 41, p. 158-166, 2016.

SANTANA, M.A.; SANTOS, A.M.C.; OLIVEIRA, M.E.; OLIVEIRA, J.S.; BABA, E.H.; SANTORO, M.M.; ANDRADE, M.H.G. A novel and efficient and low-cost methodology for purification of *Macrotyloma axillare* (Leguminosae) seed lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 352–358, 2008.

SANTOS, A.F.S.; ARGOLO, A.C.C.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research** 39, 975–980, 2005.

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

SANTOS, N. D. L.; MOURA, K. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, G. K. N.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. D. A. F.; PAIVA, P. M. G. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v.7, n.9, p. e44840, 2012.

SAYRE, L. M.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. **Current medicinal chemistry**, v. 8, n. 7, p. 721-738, 2001.

SAYRE, L. M.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. **Current medicinal chemistry**, v. 8, n. 7, p. 721-738, 2001.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014.

SILVA, A.R.; KERR, E.W. **Moringa uma nova alternativa para o Brasil**. Fortaleza: UFC

SILVA, M. D.; SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; SANTOS, N. D.; ALBUQUERQUE, A. C.; COELHO, L. C. B. B. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **International**

Biodeterioration and Biodegradation, v. 63, n. 3, p. 334-340, 2009.

SILVA, P. M.; NAPOLEÃO, T. H. ; SILVA, L.C.P.B.B.; FORTES, D.T.O. ; LIMA, T. A.; ZINGALI, R. B.; PONTUAL, E. V.; ARAÚJO, J. M.; MEDEIROS, P. L.; RODRIGUES, C. G.; GOMES, F. S.; PAIVA, P.M.G. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 695-702, 2016.

SOLOWAY, S. B. Naturally occurring insecticides. **Environmental health perspectives**, v. 14, p. 109, 1976.

SOUZA, J. D.; SILVA, M. B.; ARGOLO, A. C.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T.; 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, n. 5, p. 696-702, 2011.

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

STORZ, P. Reactive oxygen species in tumor progression. **Frontiers in Bioscience** , v. 10, n. 1-3, p. 1881-1896, 2005.

SUN, B. K.; TSAO, H. Small RNAs in development and disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 59, n. 5, p. 725-737, 2008.

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

THAILAYIL, J.; MAGNUSSON, K.; GODFRAY, H. C. J.; CRISANTI, A.;

CATTERUCCIA, F. Spermless males elicit large-scale female responses to mating in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, n.33, p.1367, 2011.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, n. 6, p. L1005-L1028, 2000.

TIAN, M.; ZHAO, B.; ZHANG, J.; MARTIN, F. L.; HUANG, Q.; LIU, L.; SHEN, H. Association of environmental benzo [a] pyrene exposure and DNA methylation alterations in hepatocellular carcinoma: A Chinese case-control study. **Science of the Total Environment**, v. 541, p 1243-1252, 2014.

TOMA, T.; MIYAGI, I.; TAMASHIRO, M.; HIGA, Y. New records of mosquito species for different islands of the Ryukyu Archipelago, Japan. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.27, n.2, p.149-152, 2011.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 247-268, 2005.

TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 7, n. 11, p. 833-846, 2006.

TRETTER, L.; ADAM-VIZI, V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by α -ketoglutarate dehydrogenase. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 36, p. 7771-7778, 2004.

TRINDADE, M.B.; LOPES, J. L.; 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**, v. 1764, p. 146-152, 2006.

TROVÓ, A. G.; GOMES, O. J.; MACHADO, A. E. H. Treatment of Effluent from a Factory of Paints Using Solar Photo-Fenton Process. **International Journal of Photoenergy**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

TYURINA, Y. Y.; TYURIN, V. A.; ZHAO, Q.; DJUKIC, M.; QUINN, P. J.; Pitt, B. R.; KAGAN, V. E. Oxidation of phosphatidylserine: a mechanism for plasma membrane phospholipid scrambling during apoptosis?. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 324, n. 3, p.1059-1064, 2004.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n.1, p. 44-84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOIC, M. M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v.160, n.1, p. 1-40, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VAN GENDEREN, H.O.; KENIS, H.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.;REUTELINGSPERGER, C.P. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 6, p. 953-963, 2008.

VINHA, A. F.; BARREIRA, S. V.; CASTRO, A.; MACHADO, M. Comparison between the phytochemical and antioxidant properties of plants used in plant infusions for medicinal purposes. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 11, p. 11, 2013.

VONTAS, J.; RANSON, H.; ALPHEY, L. Transcriptomics and disease vector control. **BMC biology**, v. 8, n. 1, p. 1, 2010.

WAKATSUKI, S.; ARAKI, T. NADPH oxidases promote apoptosis by activating ZNRF1 ubiquitin ligase in neurons treated with an exogenously applied oxidant. **Communicative & integrative biology**, v. 9, n. 2, p. E1143575, 2016.

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

WANG, L.; VALDERRAMOS, S. G.; WU, A.; OUYANG, S.; LI, C.; BRASIL, P.; ALIYARI, R. From mosquitos to humans: genetic evolution of Zika virus. **Cell host & microbe**, v.19, n. 5, p.561-565, 2016.

WEILL, M.; LUFTALLA, G.; MOGENSEN, K.; CHANDRE, F.; BERTHOMIEU, A.; BERTICAT, C.; RAYMOND, M. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. **Nature**, v. 423, n. 6936, p. 136-137, 2003.

WEYER, C.; FUNAHASHI, T.; TANALA, S.; HOTTA, K.; MATSUZAWA, Y.; PRATLEY, R. E.; TATARANNI, P. A. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, n.5, p. 1930-1935, 2001.

WHALON, M. E.; MCGAUGHEY, W. H. *Bacillus thuringiensis*: use and resistance management. In: **Insecticides with Novel Modes of Action**. p. 106-137, 1998.

WHO, Geneva. Guidelines for drinking-water quality. **World Health Organization**, v. 216, p. 303-4, 2011.

WHYARD, S.; SINGH, A. D.; WONG, S.. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 39, n. 11, p. 824-832, 2009.

WINGFIELD, M. J.; GARNAS, J. R.; HAJEK, A.; HURLEY, B. P.; BEER, Z. W.; TAERUM, S. J. . Novel and co-evolved associations between insects and microorganisms as drivers of forest pestilence. **Biological Invasions**, v.18, n.4, p. 1045-1056, 2016.

WISHART, M. J.; DIXON, J. E. PTEN and myotubularin phosphatases: from 3-phosphoinositide dephosphorylation to disease. **Trends in cell biology**, v. 12, n. 12, p. 579-585, 2002.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K.; KERWIN, J.L. *Lagenidium giganteum* in *Culex tarsalis* larvae: production of infective propagules. **Journal of invertebrate pathology**, v. 66, n. 1, p. 25-32, 1995.

WU, Y.; TIBREWAL, N.; BIRGE, R. B. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. **Trends in cell biology**, v. 16, n. 4, p. 189-197, 2006.

YIN, J.; REN, W.; WU, X.; YANG, G.; WANG, J.; LI, T.; DING, J.; CAI, L.; SU, D. Oxidative stress-mediated signaling pathways: A review. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 11, n. 2, p. 132-9, 2013.

YU, J.F.; WANG, D.S.; YAN, M.Q.; YE, C.; YANG, M.; GE, X. Optimized Coagulation of High Alkalinity, Low Temperature and Particle Water: pH Adjustment and Polyelectrolytes as Coagulant Aids. **Environmental Monitoring and Assessment**. v.131, p.377–386, 2007.

ZAHRIM, A. Y.; TIZAOUI, C.; HILAL, N. Coagulation with polymers for nanofiltration pre-treatment of highly concentrated dyes: a review. **Desalination**, v. 266, n. 1, p. 1-16, 2011.

ZAMPERO, Rosangela. "Tratamento de efluente líquido da indústria de vidros com semente de moringa oleífera." , 2011.

ZENG, D.; WU, J.; KENNEDY, J. F. Application of a chitosan flocculant to water treatment. **Carbohydrate polymers**, v. 71, n. 1, p. 135-139, 2008.

ZHANG, X.; ZHANG, J.; ZHU, K. Y. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). **Insect molecular biology**, v. 19, n. 5, p. 683-693, 2010.

ZONG, W.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes & development**, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2006.

5. CAPÍTULO 1

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO



Food and Chemical Toxicology

(Fator de impacto: 3.584 - Qualis A2)

Effects of aqueous extract from *Moringa oleifera* seeds on human fibroblasts and keratinocytes

Kézia Santana de Moura^a, Gustavo Faccini^b, Raffaella Ignarro^b, Claudia Danielle Navarro^b, Érika Rodrigues da Silva^b, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Roger Frigério Castilho^b, Anibal Eugênio Vercesi^b, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

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

^b*Núcleo de Cirurgia e Medicina Experimental, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 13083-887, Campinas, São Paulo, Brazil.*

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

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

Abstract

Moringa oleifera seeds have been used for treatment of water for human consumption. However, previous reports suggested the toxicity of seed components. In this sense, the present work investigated the toxicity of aqueous extract from *M. oleifera* seeds against human gingival fibroblasts (GN1) and skin keratinocytes (HaCaT). The extract reduced the number of viable cells with EC₅₀ (48 h) of 1.32 and 1.23 µg/mL of protein for HaCaT and GN1, respectively. Flow cytometry analysis revealed that the extract induced GN1 death by necrosis while HaCaT cells did not show staining for necrosis or apoptosis. Evaluation of the expression of PCNA revealed a reduction of 45.4±1.3% in treated HaCaT cells confirming an anti-proliferative effect. The treatment with the extract increased both mitochondrial and cytosolic levels of ROS as well as a decrease in O₂ consumption and phosphorylative capacity in GN1 and HaCaT cells. The effects of the extract were not due to opening of mitochondrial permeability transition pore. This study shows that it is needed caution regarding the dosage used for water treatment. On the other hand, the results stimulate the evaluation of the extract to treat skin diseases that involve uncontrolled keratinocytes proliferation like psoriasis.

Keywords: necrosis, anti-proliferative effect, moringa, natural product, toxicity.

1. Introduction

Moringa oleifera Lam. (Moringaceae), popularly known as drumstick tree, horseradish tree or moringa, is a plant native to India and well suited to Brazil's climate and soil conditions (Kigundu et al., 2016; Gualberto et al., 2015). The seeds of this plant contain coagulant proteins that reduce the turbidity of muddy water and decrease the concentration of metals soluble in water (Freitas et al., 2016; Ferreira et al., 2011). Due to this coagulant property, aqueous extract from *M. oleifera* seeds have been used in the treatment of water for consumption by humans and animals (Nordmark et al., 2016).

Although people usually believes that the natural origin is sufficient to ensure the safety of plant extracts and isolated compounds, there are several reports on plant substances that are toxic to humans since ancient times (Sponchiado et al., 2016). Thus, the toxicity of natural substances has been evaluated in different ways, including the determination of genotoxicity and cytotoxicity (Saadat et al., 2016; Leite et al., 2015; Al-Anizi et al., 2014).

Suspensions of powdered *M. oleifera* seeds (1–50 mg/L) were evaluated for cytotoxicity and genotoxicity using a whole cell *Acinetobacter* bioreporter. The authors reported that hydrophobic components of seeds promote cytotoxic effects while the water-soluble compounds showed genotoxicity (Al-Anizi et al., 2014). Rolim et al. (2011) also investigated the genotoxicity of aqueous extract from *M. oleifera* seeds and found that the extract was non-toxic by Kado and Ames assays at the concentration (0.2 µg/µL) recommended to be used for water treatment; however, a two-fold increase in the dose was enough to induce mutagenic effects. In other study, it was demonstrated that the seed extract prepared as used by the population was toxic to human peripheral blood mononuclear cells, with an IC₅₀ of 144.8 µg/mL (Araújo et al., 2013). These reports demonstrated the need for

more studies assessing the risk of *M. oleifera* seed extract for human health.

The present work investigated the toxicity of aqueous extract from *M. oleifera* seeds against human gingival fibroblasts (GN1) and skin keratinocytes (HaCaT). For this, we are reporting the effects of the extract on cell survival and proliferation, alterations in cytosolic and mitochondrial levels of reactive oxygen species (ROS), effects on the oxygen consumption, as well as morphological changes in the cells.

2. Materials and methods

2.1. Extract preparation

Seeds of *M. oleifera* were collected at the campus of the *Universidade Federal de Pernambuco*, with authorization (38690) of the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio). A voucher specimen (number 73,345) is archived at the herbarium *Dárdano de Andrade Lima* from the *Instituto Agrônomo de Pernambuco* (Recife, Brazil). The seeds were dried during 3 days and powdered using a blender. The *M. oleifera* seed meal (10 g) was submitted to extraction in distilled water (100 mL) for 16 h at 4°C under constant stirring. After this period, the suspension was filtered with gauze and centrifuged (15 min, 9,000 rpm, 4°C). The collected supernatant corresponded to the seed extract.

2.2. Culture of GN1 and HaCaT cells

The GN1 cell line is derived from fibroblasts obtained through normal gingival biopsy and was kindly provided by Dr. Ricardo Della Coletta from the *Universidade Estadual de*

Campinas. The HaCaT cell line (human keratinocytes) was purchased from Cell Line Service (CLS, Heidelberg, Germany). The cells were maintained in liquid nitrogen in 10% (v/v) dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich, USA) and 90% (v/v) FBS. For culture, the cells were transferred to Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing high glucose (6 g/L) and supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 µg/mL gentamicin, 100 IU/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin. Both cell lines were maintained at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. The confluence of the cells was maintained less than 80%.

The cells used in the experiments were subcultured whenever they reached a confluence of about 70-80%. The culture medium was removed and the cells were washed with 10 mL of phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 and subsequently incubated with 0.25% (w/v) trypsin and 0.02% (w/v) ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). After complete cell detachment, the trypsin action was stopped by adding DMEM containing high glucose and supplemented with 10% (v/v) FBS. After centrifugation at 1600 rpm for 5 min, the cells were resuspended in DMEM containing 10% (v/v) FBS and supplemented with 0.1% (w/v) Trypan Blue, visualized by light microscopy and counted in a Neubauer chamber. Cells that were labeled with Trypan blue or that had apoptotic morphology (apoptotic bodies and shrinkage) were considered unviable. Only vials with cell viability above 90% were used in the experiments. Each culture was subcultured by a maximum of ten passages at each thaw.

2.3. Evaluation of extract effect on cell viability

The percentage of viable cells after treatment with aqueous extract was determined using the reagent 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, USA). HaCaT and GN1 cells were plated separately in 24-well plates (3 x 10⁴

cells/mL) containing DMEM with high glucose. After 24 h, the culture medium was renewed and both cell lines were treated with the aqueous extract (0.16, 0.32, 0.64, 1.28, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8 and 16.0 $\mu\text{g/mL}$ of protein). After 48 h of treatment, the culture medium was aspirated and replaced by fresh medium containing 0.5 mg/mL MTT, in the absence of FBS. Cells were incubated for 4 h at 37°C in 5% CO₂ and then the medium was removed and 250 μL of 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate in 0.01 M HCl was added to each well to promote the complete solubilization of the formazan crystals produced. The absorbance at 570 nm (A_{570}) and 650 nm (A_{650}) were obtained using a plate reader (PowerWave XS 2, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Corrected absorbance values ($A_{570} - A_{650}$) were calculated and used as indicative of cell viability. The percentage of viable cells was expressed regarding the correct absorbance in controls (without extract) and a dose $\times$ response curve was constructed for the determination of the concentration that reduces cell viability by 50% (EC₅₀).

2.4. Western blot analysis for the proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

HaCaT and GN1 (10,000 cells/cm²) were treated with the extract (1.6 $\mu\text{g/mL}$ of protein) for 48 h. After this incubation period, the GN1 cells were detached from the plates (60 cm²) using a cell scraper and transferred to 50-mL tubes. After centrifugation (4,000 rpm, 5 min, 4°C), the cell pellet was resuspended in an extraction buffer constituted by 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% (v/v) Tween 20, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF and 1% (v/v) of a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, USA, cat # P8340). Cells were then lysed by three sonication cycles of 15 s (Misonix Sonicator 3000, Farmingdale, USA). After centrifugation (14,000 rpm, 10 min, 4°C), the pellet was discarded and the protein concentration in the supernatant was determined according to Bradford (1976).

The samples were submitted to SDS-PAGE according to Laemmli (1970). After the run, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (0.45 μ m, Bio-Rad Laboratories, USA) at 120 V for 90 min (Towbin et al., 1979). The membrane was then stained with Ponceau S solution (Sigma-Aldrich, USA) to verify the transfer quality and to confirm the concentration of proteins indicated by the colorimetric method. The dye was removed by washing the membrane with 0.1 M NaOH for 1 min. Next, the membrane was rapidly washed with PBS Tween (50 mM phosphate buffer pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.01%, v/v, Tween 20) and unspecific binding sites were blocked with a 5% solution of skim milk powder in PBS Tween for 1 h. After washing with PBS Tween for removal of the blocking solution, the membrane was incubated with anti-PCNA primary antibody (1:1,000; BD Biosciences, USA) diluted in 10 mL of PBS-Tween buffer containing 3% (w/v) bovine serum albumin, for 12 h at 4°C. The nitrocellulose membrane was washed for 15 min with PBS-Tween and incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000, BD Biosciences, USA) in 10 mL PBS-Tween plus 3% (w/v) skim milk powder, for 1 h at room temperature. Thereafter, three washing steps (5 min each) were performed with PBS-Tween and the immunoreactive bands were detected using a photodocumentator (UVITEC Cambridge) using a SuperSignal West Pico Chemiluminescence kit (Thermo Fisher Scientific, USA). The densitometry of the bands was quantified using Image J software (version 1.49V). For each sample, the optical density of the band corresponding to the PCNA protein was divided by the value of the optical density obtained by Ponceau S staining. Subsequently to this normalization by internal control, the value of the group of cells that received only culture medium was considered as 100%.

2.5. Evaluation of opening of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP)

To analyze whether the incubated of cells with extract lead to opening of the MPTP, the cells were pre-incubated for 90 min (prior to treatment with the extract EC₅₀) with the following inhibitors of the transition pore opening: 1 μ M Debio 025, an analog of cyclosporin A (which is an inhibitor of cyclophilin A), or 1 μ M boncrecate, which inhibits the adenine nucleotide translocator. After 48 h of treatment with extract, the viability was determined by the MTT assay.

2.6. Determination of cell death and reactive oxygen species levels by flow cytometry

The percentages of apoptotic and necrotic cell death were determined using the annexin V-FITC (AV) and 7-aminoactinomycin D (7-AAD) markers. The cells were detached using 0.25% (w/v) trypsin and 0.03% (w/v) EDTA and plated (3×10^4 viable cells) in 6-well plates. The cells were treated with the aqueous extract (1.6 μ g/mL of protein) during 24 h and then washed with PBS, detached from the plates with the trypsin/EDTA solution and resuspended in a binding buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 1.8 mM CaCl₂) containing 1:500 AV. After 20 min of incubation at room temperature, 7-AAD (1:50) was added and cell populations were analyzed separately for the intensity of the probe fluorescent signal using a FACSCalibur System equipped with an argon laser and CellQuest software (Becton Dickinson, USA). Ten thousand events were purchased for each sample. Apoptosis, late apoptosis and necrosis were quantified as percentage of AV+/7-AAD-, AV+/7-AAD+, and AV-/7-AAD+ cells, respectively.

It was also determined the production of reactive oxygen species (ROS) by HaCaT and GN1 (10,000 cells/cm²) treated for 48 h with the extract (1.6 μ g/mL of protein) previously

incubated or not for 1 h with the N-acetylcysteine (NAC). The assays used the fluorescent probes MitoSox and dihydroethidium (DHE) to determine mitochondrial and cytosolic levels, respectively. After the incubation period, the cells were washed, trypsinized, labeled with 1.25 μ M MitoSox and 0.625 μ M DHE at 37°C for 5 min. The readings were performed on the FACSCalibur System in FL-2 channel for quantification of mitochondrial and cytosolic ROS, mainly superoxide anion.

2.7. Mitochondrial oxygen consumption

The determination of mitochondrial oxygen consumption was performed using the high-resolution OROBOROS Oxygraph-2k (Oroboros Instruments Corp, Innsbruck, Austria) with a volumetric capacity of 2 mL containing a magnetic stirrer. The initial concentration of O₂ at the reaction medium was considered 200 nmol/mL at 37°C (Robinson and Cooper, 1970). The cells were incubated in a respiration medium composed by 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES-K⁺ pH 7.2, 2 mM K₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA and a cocktail of respiratory substrates (cetoglutarate, malate, glutamate and pyruvate, 5 mM each). To achieve permeabilization of the plasma membrane, experiments were conducted in the presence of 30 μ M digitonin. The respirometer was calibrated before each measurement series using the incubation medium. Data were recorded in intervals of 2 s and the slope of the oxygen consumption rate (OCR) plot was calculated through a polynomial fit (Pesta and Gnaiger, 2012) with the DataLab 4 software (Oroboros Instruments Corp).

2.8. Analysis of cell morphology

HaCaT and GN1 cells were disposed in 6-well plates at a confluence of 15,000 cells/cm² in 4 mL of DMEM medium containing phenol red and 6 g/L glucose, supplemented as described in the section 2.2. Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. After 24 h, the medium was changed and the cells were treated with the extract (1.6 µg/mL of protein). Microphotographs were performed after 48 h of treatment and captured using a Leica DMLB microscope coupled to the Leica DC 300F digital image system and the Image Manager 50 1.2 acquisition software (Leica Microsystems, Bannockburn, IL). The inverted optical phase contrast mode was used using objective lens with 20x magnification.

3. Results and discussion

The use of *M. oleifera* seeds in the treatment of water for human consumption in several parts of the world and previous reports suggesting the toxicity of seed components stimulated the present study. We evaluated the effects of aqueous extract from *M. oleifera* seeds on human gingival fibroblasts since these are some of the first cell types that may come in contact with the water treated with *M. oleifera* seeds when used by people. Also, we evaluated the effect of extract on skin keratinocytes for comparison purpose.

The aqueous extract from *M. oleifera* seeds reduced the number of viable HaCaT and GN1 cells in a dose-dependent manner (Figure 1A). The GN1 cells were most sensitive to the extract, which was confirmed by the EC₅₀ values (48 h): 1.32 µg/mL of protein for HaCaT and 1.23 µg/mL of protein for GN1 (Figure 1B). Based on these results, a concentration of 1

mg/mL of seeds was established for the following experiments. The effect of the extract increased with the incubation time (Figure 1C).

Flow cytometry analysis revealed that the extract induced GN1 death by necrosis while HaCaT cells did not show staining for necrosis or apoptosis (Figure 2A). The use of the positive control digitonin confirmed that the staining was due to necrosis (Figure 2B). These data suggest that the extract impaired the viability of fibroblast cells and affected the proliferative capacity of keratinocytes. To confirm this, we evaluated the expression of PCNA and detected a significant ($p < 0.002$) reduction of $45.4 \pm 1.3\%$ in treated HaCaT cells (Figure 3A and 3C) confirming an ant-proliferative effect. It was not observed significant differences in PCNA expression by GN1 cells treated or not with the extract (Figure 3B and 3C). Figure 3D shows the staining with Ponceau S used in normalization of protein concentrations.

The HaCaT is an immortalized cell line of human epidermal keratinocytes and it is also used to determine the effects on keratinocytes of drugs with therapeutic potential against of inflammatory skin diseases like psoriasis (Feng et al., 2017; Howes et al., 2016; Joyce et al., 2011; Belső et al., 2008). The psoriasis is characterized by increased dermal vascularization, infiltration of inflammatory cells, and proliferation of keratinocytes (Bhalerao and Bowcock 1998; Li et al., 2016). Our results obtained for HaCaT cells suggest a potential of extract use in psoriasis therapy and stimulate future studies focused on the effects of aqueous extract from *M. oleifera* seeds on psoriasis models.

Necrotic cell death may involve a wide variety of molecular pathways that may lead to increased cytosolic and mitochondrial ROS production (Basu et al. 2016; Yang et al. 2016; Xipell et al., 2016; Yi et al., 2014). It has also been reported that the increase in ROS concentration can be associated with antiproliferative effects in cells (Basha et al., 2016; Jiménez et al. 2016; Liao et al. 2016). The treatment with the aqueous extract from *M.*

oleifera seeds increased both mitochondrial (Figure 4A) and cytosolic (Figure 4B) levels of ROS in GN1 and HaCaT (Figure 5A and 5B, respectively). It was observed that mitochondrial ROS levels were increased about three times while cytosolic level increased about twice for both fibroblasts and keratinocytes. The increase in ROS level was not observed when the assays were performed in the presence of the antioxidant *N*-acetylcysteine. These results suggest that imbalance in ROS production would be involved in GN1 cell death and HaCaT proliferative decrease caused by the seed extract. Tiloke et al. (2016) investigated the effect of *M. oleifera* leaf extract on human esophageal cancer cells and observed that a ROS overproduction resulted in chronic oxidative stress, lipid peroxidation, DNA damage and decrease in proliferative capacity.

Debio 025 and bongreocate are used to evaluate the involvement of opening of the MPTP in cell death. Debio 025 is an analogue of cyclosporin A (CsA), which is a molecule able to inhibit MPTP opening due to binding to cyclophilins at the internal mitochondrial membrane (Nicolli 1996; Connern; Halestrap 1994). Bongreocate inhibits pore opening by binding to the adenine nucleotide transport channel (Halestrap et al., 2002). In the present work, the viability of GN1 and HaCaT cells treated with the extract did not increase when the MPTP opening inhibitors Debio 025 (Figure 6A) and bongreocate (Figure 6B) were used, revealing that there is no participation of the pore in the effects observed.

The mitochondrial oxygen consumption was evaluated and the results showed that the treatment with the extract caused a decrease in O₂ consumption and phosphorylative capacity even in the presence of substrates for the complexes I, II and IV (Figure 7). The microphotographs revealed reduced number of HaCaT and GN1 cells in the treated groups as well as morphological alterations (Figure 8).

4. Conclusion

This work revealed that the aqueous extract from *M. oleifera* was cytotoxic to GN1 and HaCaT cells by promoting necrotic cell death and anti-proliferative effect, respectively. This study, together with other previous reports on the toxicity of *M. oleifera* seed components, shows that it is needed caution regarding the dosage used for water treatment since harmful effects have been detected in aqueous seed preparations. On the other hand, the results stimulate the evaluation of seed extract to treat skin diseases that involve uncontrolled keratinocytes proliferation like psoriasis.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; 446902/2014-4) for research grants and fellowship (LCBBC, THN, AEV, PMGP), the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES; AUXPE 1454/2013) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15) for financial support. KSM would like to thank FACEPE for graduate scholarship (IBPG-0904-2.08/12) and supporting mobility for realization of experiments at UNICAMP (AMD-0168-2.00/13).

References

- AL-ANIZI, A. A.; HELLYER, M. T.; ZHANG, D. Toxicity assessment and modelling of *Moringa oleifera* seeds in water purification by whole cell bioreporter. **Water research**, v.56, p.77-87, 2014.
- ARAÚJO, L. C. C.; AGUIAR, J. S.; NAPOLEÃO, T. H.; MOTA, F. V. B.; BARROS, A. L. S.; MOURA, M. C.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P. M. G. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PloS one**, v.8,

n.12, p. e81973, 2013.

BASHA, R. M.; CONNELLY, S. F.; PUMACHANDRA, G.; SANKPAL, U. T.; PATEL, H.; VISHWANATHA, J. K.; EL-RAYES, B. Tolfenamic acid and curcumin treatment induces pancreatic cancer cell growth inhibition via suppressing Sp1 expression, NF-kB translocation to nucleus, 2016.

BASU, A.; CAJIGAS-DU ROSS, C. K.; RIOS-COLON, L.; MEDIAVILLA-VARELA, M.; DANIELS-WELLS, T. R.; LEOH, L. S., CASIANO, C. A. LEDGF/p75 overexpression attenuates oxidative stress-induced necrosis and upregulates the oxidoreductase ERP57/PDIA3/GRP58 in prostate cancer. **PloS one**, v.11, n.1, p. e0146549, 2016.

BELSŐ, N.; SZELL, M., PIVARCSI, A.; KIS, K.; KORMOS, B.; KENDERESSY, A. S.; BATA-CSORGO, Z. Differential expression of D-type cyclins in HaCaT keratinocytes and in psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v.128, n.3, p. 634-642, 2008.

BHALERAO, J.; BOWCOCK, A. M. The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system. **Human molecular genetics**, v. 7, n. 10, p. 1537-1545, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CONNERN, C. P.; HALESTRAP, A. P. Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. **Biochemical Journal**, v. 302, n. 2, p. 321-324, 1994.

FENG, S. J.; CHU, R. Q.; MA, J.; WANG, Z. X.; ZHANG, G. J.; YANG, X. F.; MA, Y. Y. MicroRNA138 regulates keratin 17 protein expression to affect HaCaT cell proliferation and apoptosis by targeting hTERT in psoriasis vulgaris. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.85, p.169-176, 2017.

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.C.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.

FREITAS J.H.E.S.; SANTANA V, K.; SILVA, P. M.; MOURA, M.C.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, A.E.; NAPOLEÃO, T.H. Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Lectin as a Metal Remover in Aqueous Solutions. **Protein and peptide letters**, v. 23, n. 7, p. 645-649, 2016.

GUALBERTO, A. F.; FERRARI, G. M.; ABREU, K. M. P.; PRETO, B. L.; FERRARI, J. L. Características, propriedades e potencialidades da moringa (*Moringa oleifera* Lam.): Aspectos agroecológicos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, p.19-25, 2015.

HALESTRAP, A. P.; MCSTAY, G. P.; CLARKE, S. J. The permeability transition pore complex: another view. **Biochimie**, v. 84, n. 2, p. 153-166, 2002.

HOWES, A.; O'SULLIVAN, P. A.; BREYER, F.; GHOSE, A.; CAO, L.; KRAPPMANN, D.; LEY, S. C. Psoriasis mutations disrupt CARD14 autoinhibition promoting BCL10-MALT1-dependent NF- κ B activation. **Biochemical Journal**, v.473, n.12, p.1759-1768, 2016.

JIMENÉZ, S.; GASCÓN, S.; LUQUIN, A.; LAGUNA, M.; AANCIN-AZPILICUETA, C.; RODRÍGUEZ-YOLDI, M. J. Rosa canina extracts have antiproliferative and antioxidant effects on caco-2 human colon cancer. **PLoS One**, v.11, n.7, p. e0159136, 2016.

JOYCE, C. E.; ZHOU, X.; XIA, J.; RYAN, C.; THRASH, B.; MENTER, A.; BOWCOCK, A. M. Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome. **Human molecular genetics**, v.20, n.20, p. 4025-4040, 2011.

KIGONDU, E. V.; KAMITA, M. K.; NJENGA, E. W.; WANGA, J.; AMALEMBA, G.;

MATU, E. N. In vivo Antifertility and Safety Profiles of Kenyan *Moringa oleifera* Lam.(Moringaceae) extracts. **African Journal of Pharmacology and Therapeutics**, v.5, n.4.

LAEMMLI, V. K. Determination of protein molecular weight in polyacrylamide gels. **Nature**, v. 227, p. 680-5, 1970.

LEITE, A. D. S.; DANTAS, A. F.; OLIVEIRA, G. L. D. S.; GOMES JÚNIOR, A. L.; LIMA, S. G.; CITÓ, A. M. D. G. L.; DANTAS LOPES, J. A. Evaluation of toxic, cytotoxic, mutagenic, and antimutagenic activities of natural and technical cashew nut shell liquids using the *Allium cepa* and *Artemia salina* bioassays. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

LI, K., Y.; LI, W. Z.; JIA, W.; LI, J.; ZHANG, P.; XIAO, T. Bitter apricot essential oil induces apoptosis of human HaCaT keratinocytes. **International immunopharmacology**, v.34, p.189-198, 2016.

LIAO, W.; CHEN, L.; MA, X.; JIAO, R.; LI, X.; WANG, Y. Protective effects of kaempferol against reactive oxygen species-induced hemolysis and its antiproliferative activity on human cancer cells. **European journal of medicinal chemistry**, v.114, p. 24-32, 2016.

NOCOLLI, A.; BASSO, E.; PETRONILLI, V.; WENGER, R. M.; BERNARDI, P. (1996). Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, a cyclosporin A-sensitive channel. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.4, p. 2185-2192, 1996.

NORDMARK, B. A.; PRZYBYCIEN, T. M.; TILTON, R. D. Comparative coagulation performance study of *Moringa oleifera* cationic protein fractions with varying water hardness. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 4, p. 4690-4698, 2016.

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. “Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin”, **Journal Food**

Science, v. 76, pp.T53-T58, 2011.

SAADAT, R.Y.; BARZEGARI, A.; ZUNUNI V. S.; SAEEDI, N.; ESKANDANI, M.; OMIDI, Y.; BARAR, J. Cyto/Genotoxic Effects of *Pistacia atlantica* Resin, a Traditional Gum. DNA and cell biology, v.35, n.6, p.261-266, 2016.

SPONCHIADO, G.; ADAM, M. L.; SILVA, C. D.; SOLEY, B. S.; MELLO-SAMPAYO, C.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **Journal of ethnopharmacology**, v.178, p.289-296, 2016.

TILOKE, C.; PHULUKDAREE, A.; CHUTURGOON, A. A. The Antiproliferative Effect of *Moringa oleifera* Crude Aqueous Leaf Extract on Human Esophageal Cancer Cells. **Journal of medicinal food**, v. 19, n. 4, p. 398-403, 2016.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

XIPELL, E.; GONZALEZ-HUARRIZ, M.; IRUJO, J. J. M.; GARCÍA-GARZÓN, A.; LANG, F. F.; JIANG, H., ALONSO, M. M. Salinomycin induced ROS results in abortive autophagy and leads to regulated necrosis in glioblastoma. **Oncotarget**, v.7, n.21, p.30626, 2016.

YANG, Y. J.; BAEK, J. Y.; GOO, J.; SHIN, Y.; PARK, J. K.; JANG, J. Y.; LEE, S. K. Effective killing of cancer cells through ros-mediated mechanisms by AMRI-59 targeting peroxiredoxin I. **Antioxidants & redox signaling**, v.24, n.8, p.453-469, 2016.

YI, L.; ZONGYAN, Y.; CHENG, G.; LINGYUN, Z.; GUILIAN, Y.; WEI, G. Quercetin enhances apoptotic effect of tumor necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in ovarian cancer cells through reactive oxygen species (ROS) mediated CCAAT enhancer-binding protein homologous protein (CHOP)-death receptor 5 pathway. **Cancer science**, v. 105, n.5, p.520-527, 2014.

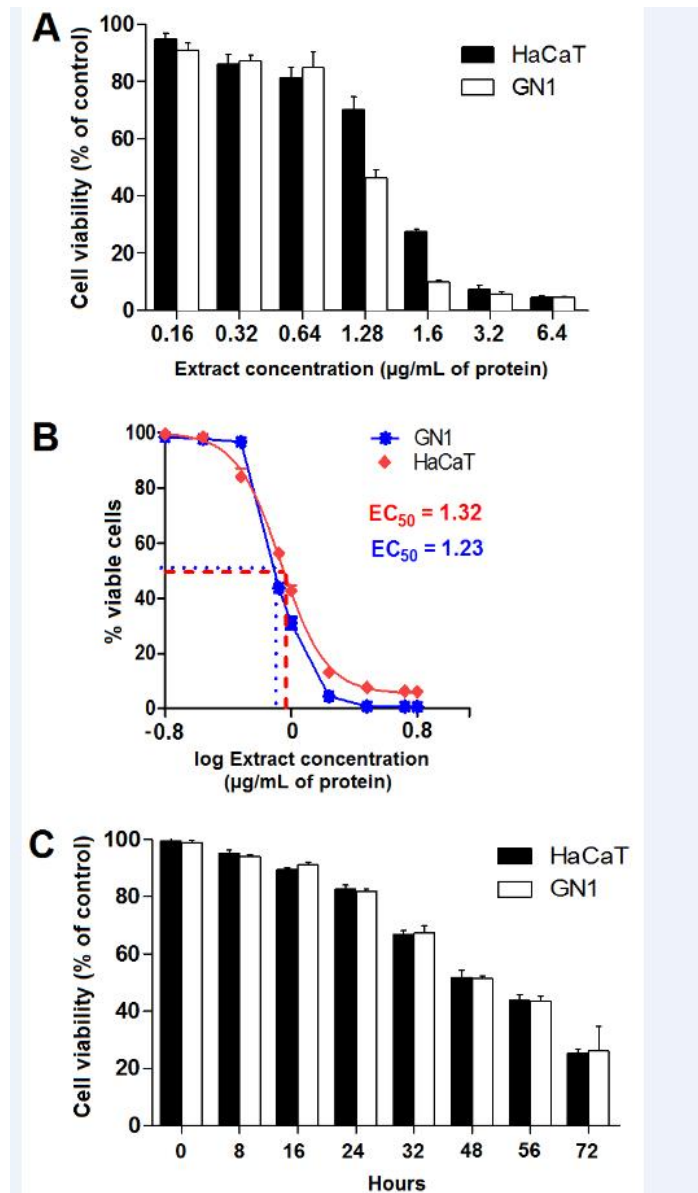


Figure 1. Effect of aqueous extract from *M. oleifera* seeds on viability of GN1 and HaCaT cells. (A) HaCaT and GN1 viability curves after treatment with the aqueous extract at different concentrations. (B) Percentage of viable HaCaT and GN1 cells after treatment with the extract for 48 h. (C) Time-response curves of HaCaT and GN1 viability in treatment with the extract at 1.6 μg/mL of protein. All the values represent the mean ± SEM of four independent experiments.

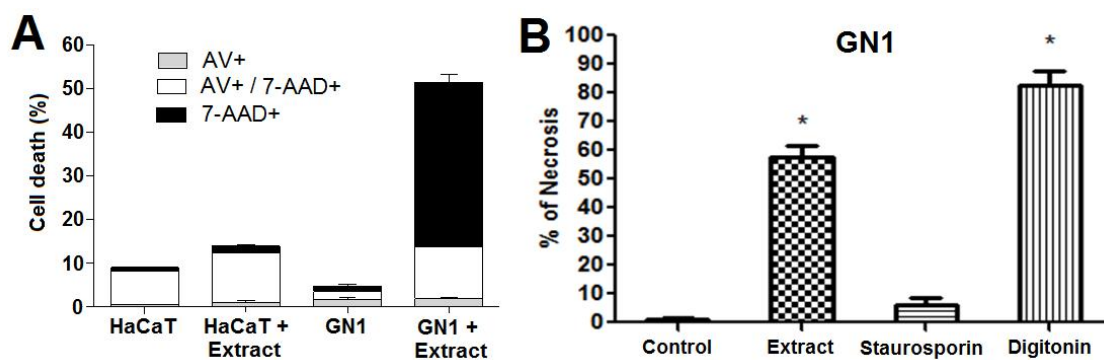


Figure 2. Evaluation of cell death in treatments of GN1 and HaCaT with the aqueous extract from *M. oleifera* seeds for 48 h at 1.6 $\mu\text{g/mL}$ of protein. (A) Necrosis (7-AAD+) and apoptosis (AV+) were evaluated by flow cytometry. $p < 0.001$ by Student's t test (control cells vs. treated cells). (B) Percentage of GN1 cells dead by necrosis among all unviable cells. Staurosporin was used as positive control for apoptosis and digitonin for necrosis. * $p < 0.001$ by Student's t test. The values represent the mean $\pm$ SEM of seven independent experiments.

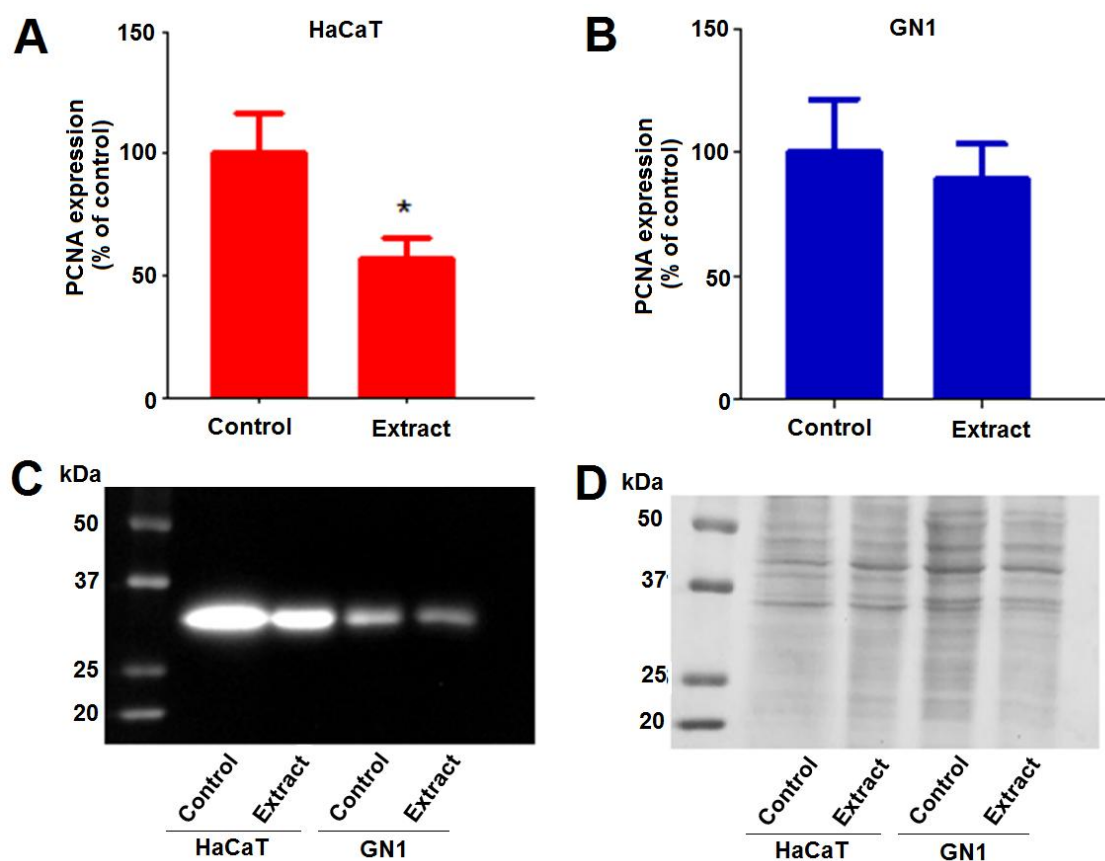


Figure 3. Analysis of PCNA expression in HaCaT and GN1 cells after 48-h treatment with the aqueous extract of *M. oleifera* seeds at 1.6 $\mu\text{g/mL}$ of protein. (A) and (B) represent the PCNA expression level in comparison with control. * $p < 0.05$ by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparisons. (C) The gel from a representative experiment showing the immunoreactive bands of PCNA (~36 kDa). (D) Membrane stained with Ponceau S showing the staining of all proteins present in the cell extract. The densitometry of all bands stained with Ponceau S from each experimental group was used as internal control for the respective group.

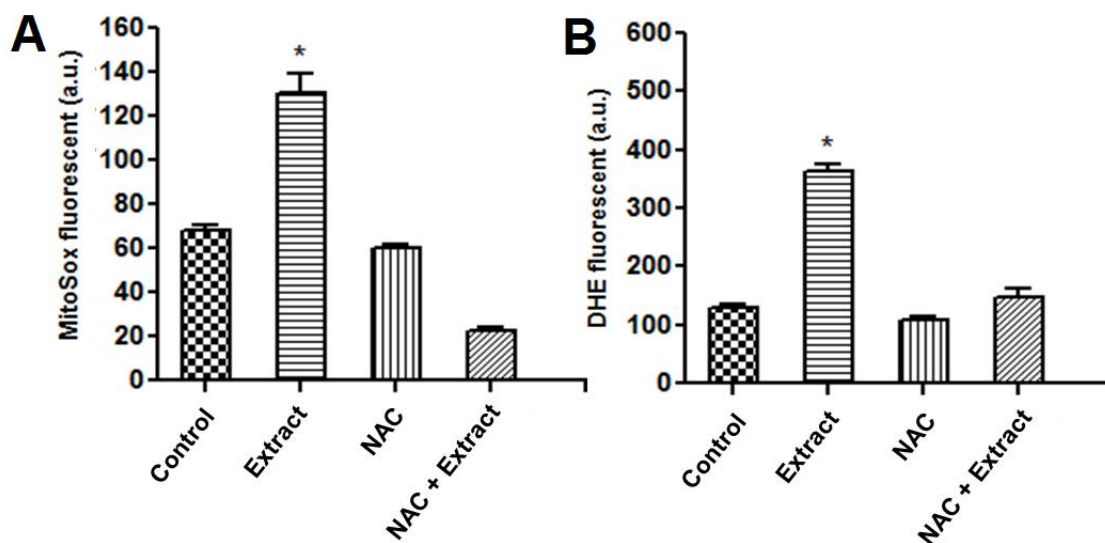


Figure 4. Production of ROS, reactive oxygen species, (mainly $O_2^{\bullet-}$) in GN1 cells from control or treated for 48 h with the aqueous extract of *M. oleifera* seeds at 1.6 $\mu\text{g/mL}$ of protein. (A) Mitochondrial ROS level determined using the probe MitoSox. (B) Cytosolic ROS level determined using the dihydroethyidium (DHE). The values represent the mean $\pm$ SEM of seven independent experiments. * $p < 0.001$ (in comparison with control) by Student's t test.

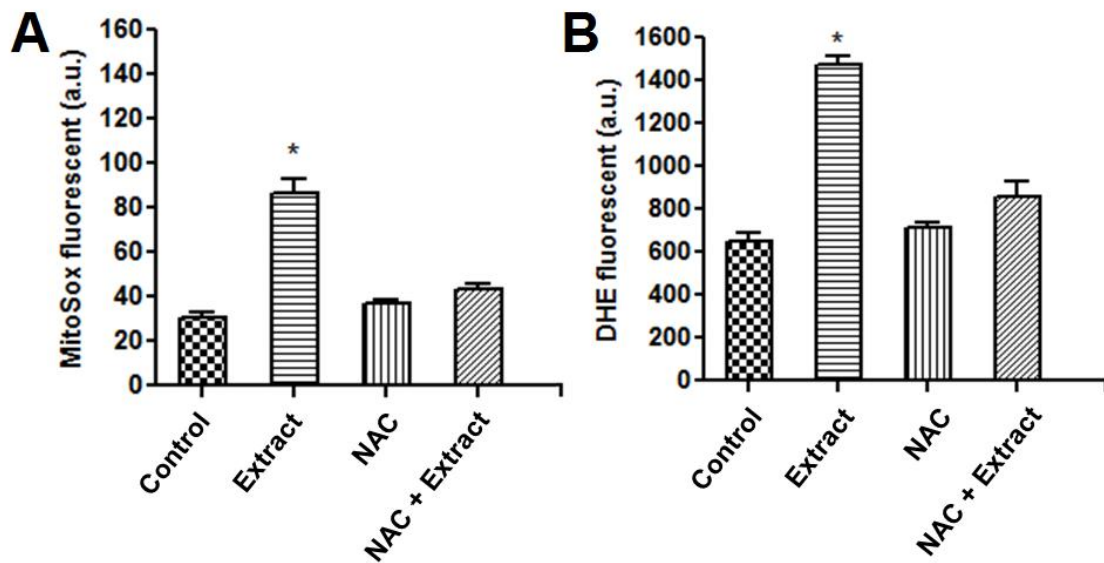


Figure 5. Production of ROS, reactive oxygen species, (mainly $O_2^{\bullet-}$) in HaCaT cells from control or treated for 48 h with the aqueous extract of *M. oleifera* seeds at 1.6 $\mu\text{g/mL}$ of protein. (A) Mitochondrial ROS level determined using the probe MitoSox. (B) Cytosolic ROS level determined using the dihydroethyidium (DHE). The values represent the mean $\pm$ SEM of seven independent experiments. * $p<0.001$ (in comparison with control) by Student's t test.

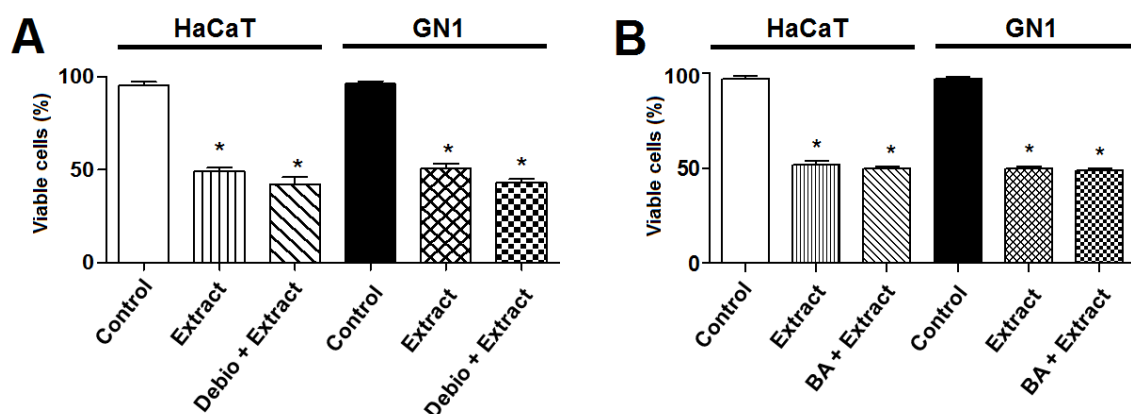


Figure 6. Evaluation of the involvement of opening of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) in cytotoxic effects of aqueous extract of *M. oleifera* seeds. HaCaT and GN1 cells were treated with the extract at 1.6 $\mu\text{g/mL}$ of protein for 48 h in the presence or absence of 1 mM Debio 025 (A) or 1 mM boncrecate, BA (B). Values are expressed as mean $\pm$ SEM of four independent experiments for each condition. * $p < 0.001$ (control cells vs. treated cells). There were no statistical differences between cells treated with aqueous extract alone and cells treated with aqueous extract and Debio 025 or BA.

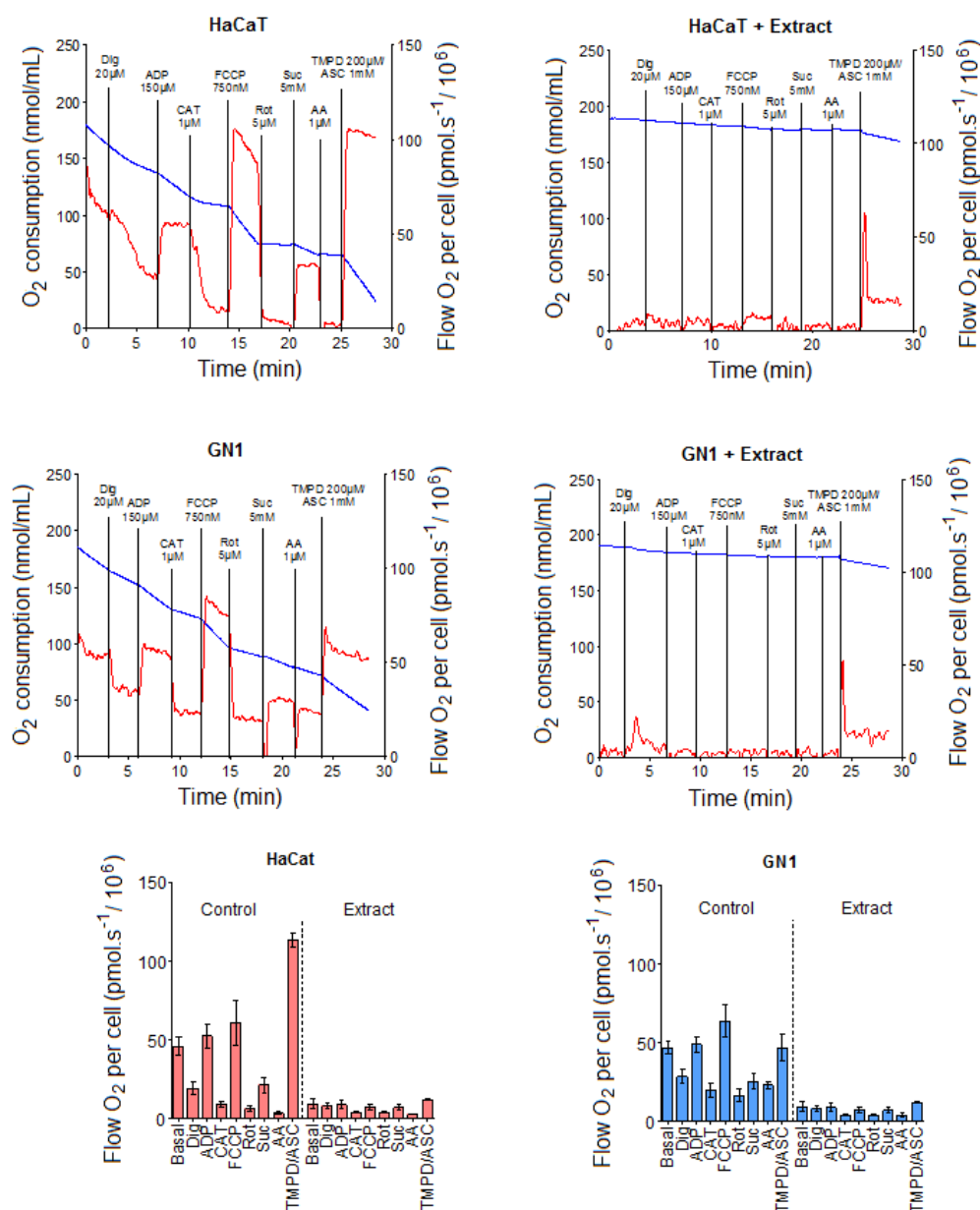


Figure 7. Evaluation of mitochondrial oxygen consumption. HaCaT and GN1 cells were treated with the extract at 1.6 $\mu\text{g/mL}$ of protein for 48 h. Representative tracings of oxygen consumption measurements and absolute values of oxygen consumption in GN1 and HaCaT cells (2×10^6 cells/mL) incubated in reaction medium (pH 7.2) containing 125 mM sucrose, 1 mM MgCl_2 , 65 mM KCl, 2 mM K_2HPO_4 , 10 mM HEPES- K^+ , 300 mM EGTA and 5 mM of each of the respiratory substrates malate, glutamate, α -ketoglutarate and pyruvate. It was added 20 μM digitonin, 150 μM ADP, 1 μM CAT, 750 nM FCCP, 5 μM rotenone, 20 mM

succinate, 200 μ M TMPD/2 mM ascorbate. The absolute values of the oxygen consumption observed in the different experimental conditions correspond to the mean $\pm$ S.E.M of five independent experiments. $p < 0.01$ (control cells vs. treated cells) for both GN1 and HaCaT results.

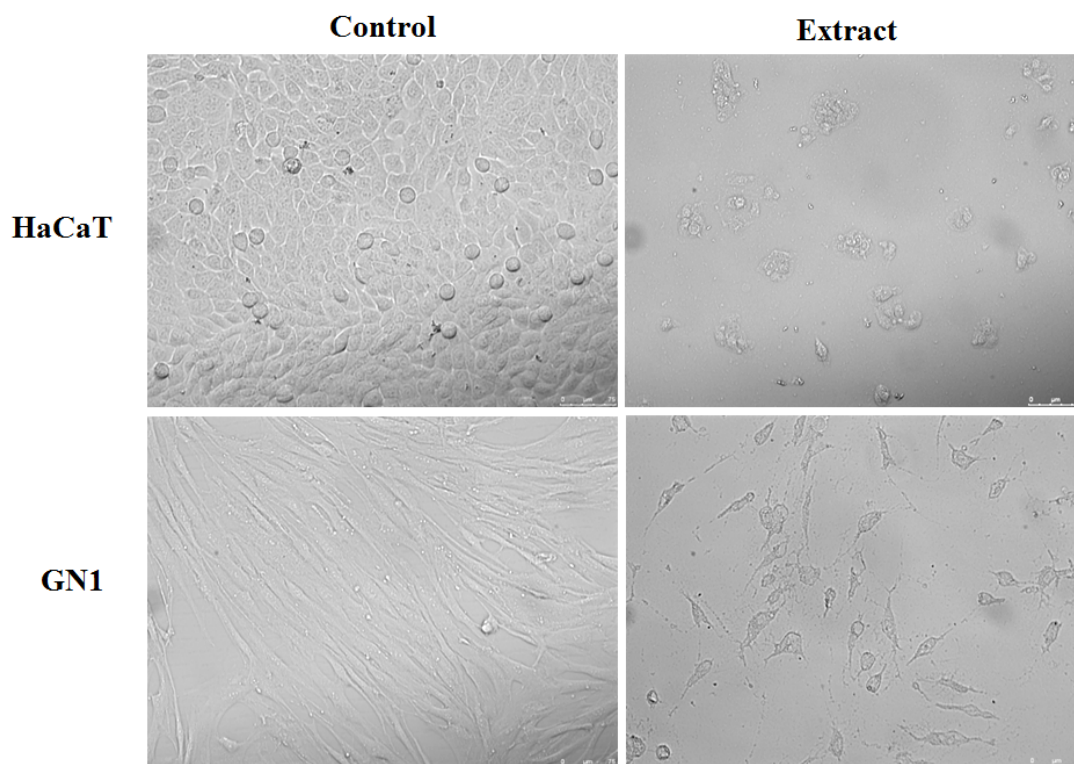
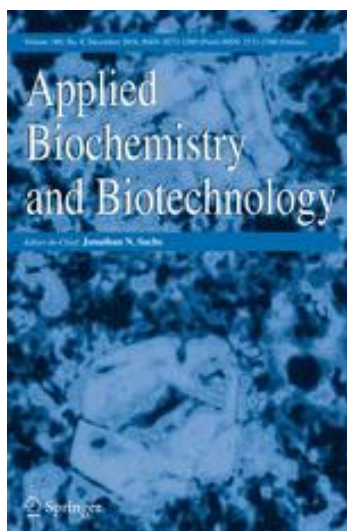


Figure 8. Photomicrographs of HaCaT and GN1 cells maintained in culture after treatment with the aqueous extract from *M. oleifera* seeds at 1.6 μ g/mL of protein for 48 h. HaCaT and GN1 cells (15,000 cells/cm²) were plated in 6-well plates (9.6 cm²/well) in 4 mL of DMEM medium containing phenol red, 6 g/L glucose, 10% fetal bovine serum, and antibiotic. Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. After 24 h, the medium was changed and the cells were treated with the extract. The photomicrographs were obtained after 48 h of treatment. The original images were also adjusted by increasing the contrast. Scale bars: 75 μ m.

6. CAPÍTULO 2

ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO



(Fator de impacto: 1.606)

Coagulant Activity of Water-Soluble *Moringa oleifera* Lectin Is Linked to Lowering of Electrical Resistance and Inhibited by Monosaccharides and Magnesium Ions

Kézia Santana de Moura¹ ·
Hugo Rafael Chaves da Silva¹ ·
Leonardo Prezzi Dornelles¹ ·
Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho¹ ·
Thiago Henrique Napoleão¹ ·
Maria Danielly Lima de Oliveira¹ ·
Patrícia Maria Guedes Paiva¹

Received: 15 April 2015 / Accepted: 20 June 2016 /
Published online: 28 June 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract *Moringa oleifera* seeds contain a water-soluble lectin [water-soluble *M. oleifera* lectin (WSMoL)] that has shown coagulant activity. Magnesium ions are able to interfere with the ability of this lectin to bind carbohydrates. In this study, we performed structural characterization of WSMoL and analyzed its effect on the electrical resistance of a kaolin clay suspension in both presence and absence of monosaccharides (*N*-acetylglucosamine, glucose, or fructose) and magnesium ions. The coagulant activity of WSMoL was monitored by measuring optical density and electrical resistance over a period of 60 min. Native WSMoL had a molecular mass of 60 kDa and exhibited anionic nature (pI 5.5). In sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE), it appeared as three polypeptide bands of 30, 20, and 10 kDa. WSMoL reduced the optical density and electrical resistance of the kaolin suspension, which suggests that suspended particles are destabilized and that this is followed by formation of complexes. The coagulant activity of lectin decreased in the presence of Mg^{2+} ions and carbohydrates at concentrations that also inhibited hemagglutinating activity. This was most likely due to conformational changes in lectin structure. Our findings suggest that the coagulant activity of WSMoL is enhanced by lowering of electrical resistance of the medium and is impaired by lectin–carbohydrate and lectin– Mg^{2+} interactions.

✉ Patrícia Maria Guedes Paiva
ppaivaufpe@yahoo.com.br

¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco 50670-420, Brazil

Keywords Coagulant activity · Electric resistance · Kaolin · Lectin · Monosaccharides · Magnesium

Introduction

Moringa oleifera Lam. (Moringaceae family) is a plant that originated in India and is now broadly cultivated along the tropics [1]. The seeds of *M. oleifera* are used by people to make water potable and fit for human consumption. This property has been attributed to the presence of proteins and a polyelectrolyte that are able to reduce water turbidity and promote sedimentation of microorganisms [2–5]. Among these proteins, two lectins (carbohydrate-binding proteins) called coagulant *M. oleifera* lectin (cMoL) and water-soluble *M. oleifera* lectin (WSMoL) showed coagulant activity in a model of turbid water using kaolin [6, 7].

Coagulation is employed in water treatment with the aim of decreasing turbidity and color and eliminating pathogenic agents [8]. The coagulation agents usually destabilize colloidal particles by adsorption and neutralization, compression of the diffuse layer, and adsorption and bridge formation [9–13]. Chemical coagulation is achieved by addition of inorganic coagulants, such as aluminum and iron salts [14]. Other cheap alternatives to coagulants are cationic, anionic, and amphoteric molecules containing ionizable groups such as amino, carboxyl, and sulfonic groups [15]. Natural coagulants and flocculants have demonstrable advantages in comparison with synthetic coagulants, specifically with regard to biodegradability, lower toxicity, and production of residual sludge [13, 16, 17].

Although *M. oleifera* lectins have been reported to be promising natural coagulating agents, the mechanisms of their coagulant activity have not been fully elucidated. Santos et al. [13] proposed that cMoL, which is a basic protein, interacts electrostatically with colloidal particles with negative zeta potential, decreasing repulsive forces and leading to formation of aggregates. However, no mechanism was proposed for the activity of WSMoL.

Interactions between carbohydrates and lectins are involved in several biological functions of these proteins and also have biotechnological applications [18–23]. Carbohydrates are also able to induce conformational changes in the lectin molecule [24, 25]. Divalent cations may be required inside the carbohydrate-binding sites of lectins and may alter protein conformation and, consequently, its activity [26, 27]. It has been shown that monosaccharides, glycoproteins, and ions are able to affect the hemagglutinating activity of WSMoL [7, 28, 29].

In this study, we investigated the coagulant property of WSMoL by measurement of optical density and electrical resistance, using a kaolin coagulation assay [5–7]. We also evaluated whether carbohydrate and ions that are able to modulate the hemagglutinating activity of the lectin would interfere with its coagulant activity.

Materials and Methods

Plant Material

Seeds of the *M. oleifera* were collected at the campus of the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE), Recife, Brazil. A voucher specimen (number 73,345) was archived at the herbarium, Dárdano de Andrade Lima, at the *Instituto Agrônomo de Pernambuco* (IPA) in Recife, Brazil. Plant collection was performed with authorization (38690-2) of the

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade at the Brazilian Ministry of Environment.

Purification of Water-Soluble *M. oleifera* Lectin

M. oleifera seed powder (10 g) was subjected to protein extraction in distilled water (100 mL) for 16 h at 4 °C with constant agitation. After filtration through gauze and centrifugation (15 min, 9000g, 4 °C), the supernatant collected corresponded to the seed extract (SE). Proteins in SE were precipitated with ammonium sulfate at 60 % saturation [30] for 4 h at 28 °C. After centrifugation (15 min, 9000g, 4 °C), the precipitate (F0–60) was collected, resuspended in 0.15 M NaCl, and dialyzed against distilled water (4 h) and then 0.15 M NaCl (2 h). WSMoL was isolated according to the protocol described by Coelho et al. [28]. Dialyzed F0–60 was loaded (40 mg protein) onto a chitin column (7.5 × 1.5 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl (0.3 mL/min). After washing with the equilibration solution, WSMoL was eluted with 1.0 M acetic acid and subsequently dialyzed against distilled water (4 h) to eliminate the eluent. Protein concentration was estimated according to Lowry et al. [31], using the standard curve of bovine serum albumin (31.25–500 µg/mL).

Gel Filtration Chromatography

WSMoL (2.0 mL, 0.4 mg) was chromatographed on a HiPrep 16/60 Sephacryl S-100HR column (16 mm × 60 cm) coupled to a ÄKTA prime plus system (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) pre-equilibrated at 24 °C with 0.15 M NaCl. The chromatography was performed using 0.15 M NaCl at a flow rate of 0.5 mL/min. The molecular mass markers phosphorylase b (97,000 Da), albumin (66,000 Da), ovalbumin (45,000 Da), carbonic anhydrase (30,000 Da), soybean trypsin inhibitor (20,100 Da), and α -lactalbumin (14,400 Da) were chromatographed similarly.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing

Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed on a 12 % (w/v) gel according to Laemmli [32]. The molecular mass markers described above were also used in electrophoresis. The gel was stained with a solution of 0.02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue in 10 % (v/v) acetic acid.

For isoelectric focusing, WSMoL (150 µg) was solubilized in a rehydration solution (8 M urea, 2 % CHAPS, 1 % IPG buffer at pH 3–10, 0.002 % bromophenol blue) for 30 min at 28 °C. The sample was taken up into the strip (linear pH gradient 3–10; 7 cm) passively during rehydration for 16 h at 25 °C. The isoelectric focusing was performed using the IPGphor III system (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions. Next, the strip was stained with a solution of 0.02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue in 10 % (v/v) acetic acid.

Hemagglutinating Activity

The hemagglutinating activity (HA) of WSMoL was evaluated in microtiter plates using rabbit erythrocytes [33]. A sample of WSMoL (50 µL) was submitted to twofold serial dilution in 0.15 M NaCl in the microtiter plate. Next, 50 µL of a suspension (2.5 % v/v) of

glutaraldehyde-treated [34] rabbit erythrocytes in 0.15 M NaCl was added to each well and the plate was incubated at 27 °C for 45 min. One hemagglutination unit was defined as the reciprocal value of the highest dilution of sample that promoted complete agglutination of erythrocytes. The specific HA was defined as the ratio of the number of hemagglutination units and protein concentration (in mg/mL). The inhibition of HA was assayed by incubating (30 min) the WSMoL sample with a solution of monosaccharides (*N*-acetylglucosamine, glucose, or fructose at concentrations of 25, 50, 100, and 200 mM) before addition of the erythrocyte suspension.

Coagulant Activity Assays

Coagulant activity was determined using kaolin suspension as a model of turbid water [5]. Kaolin was added to tap water in a proportion of 1 % (w/v) and was constantly agitated for 30 min. Next, the mixture was allowed to stand for 24 h to provide complete hydration. In an assay tube, 30 µL of the sample [SE with 0.015 or 1.6 mg/mL of protein, WSMoL at 0.2 mg/mL, or alum ($KAl(SO_4)_2$) at 0.015 mg/mL] was added to 3 mL of the kaolin suspension, whose pH is 6.0. After stirring using a vortex, the optical density at 500 nm of the mixture was measured in a quartz cuvette at time zero and then after every 10 min for a period of 60 min. The electrical resistance of the suspension was also evaluated at these time intervals. This was determined using a Keithley Model 2400 multimeter associated with a platinum electrode parallel plate immersed in deionized water and subjected to a potential range of 0–10 V. To perform the electrical measurements, the residual particles on the parallel plate electrodes were removed using chloroform. In the negative control, 30 µL of distilled water was added instead of the sample.

To determine the effect of carbohydrates and ions on the coagulant activity of WSMoL, the lectin (0.2 mg/mL) was pre-incubated with solutions of monosaccharides (*N*-acetylglucosamine or glucose at concentrations of 25, 50, 100, and 200 mM and fructose at concentrations of 50, 100, and 200 mM) or magnesium chloride (20 mM) for 15 min prior to incubation with the kaolin suspension. Control experiments were also performed by incubating kaolin suspension with 200-mM monosaccharide or 20-mM ion solution.

Statistical Analysis

Standard deviations (SD) were calculated using the GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), and data have been expressed as mean of replicates $\pm$ SD. Significant differences between treatment groups were analyzed by the Tukey test (significant at $p < 0.05$) using the Origin 6.0 program.

Results and Discussion

WSMoL was isolated from *M. oleifera* SE by ammonium sulfate precipitation followed by chitin chromatography, according to the procedure described by Coelho et al. [28]. These authors reported a single polypeptide band of 5 kDa for WSMoL on SDS-PAGE under reducing conditions and found a peptide sequence with 70 % homology to other coagulant proteins from *M. oleifera* seeds. In the present study, we further characterized WSMoL, aiming to obtain new information about the molecular conformation of this protein.

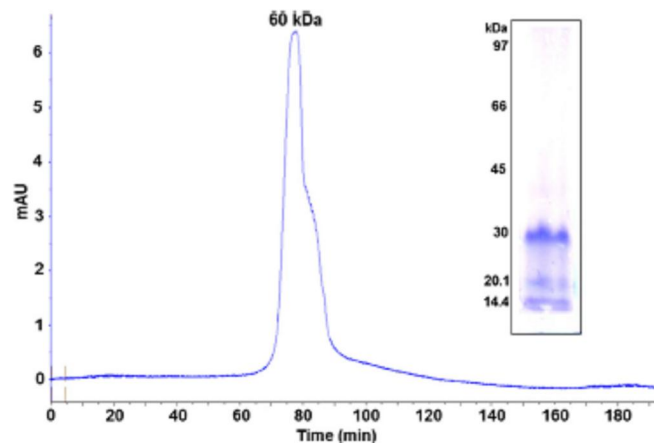


Fig. 1 Characterization of WSMoL. Gel filtration chromatography of WSMoL (0.4 mg) was performed on a HiPrep 16/60 Sephacryl S-100HR column coupled to the ÄKTA prime plus system. The chromatography was performed using 0.15 M NaCl. The inset shows an SDS-PAGE of WSMoL stained with Coomassie Brilliant Blue

A molecular mass of 60 kDa for native WSMoL was determined by gel filtration chromatography. Moreover, SDS-PAGE under non-reducing conditions revealed the presence of three polypeptide bands with molecular masses of approximately 30, 20, and 15 kDa (Fig. 1). Based on these results and previously reported findings [28], WSMoL is a protein that corresponds to an oligomeric arrangement of 5 kDa subunits and the three peptides detected on SDS-PAGE correspond to partial aggregates of a 60 kDa oligomer, whose structure is maintained by non-covalent interactions that are disrupted by SDS. Isoelectric focusing revealed WSMoL as a single polypeptide band with pI 5.5. This datum is in agreement with the anionic nature of WSMoL previously reported by Paiva et al. [35] using native PAGE.

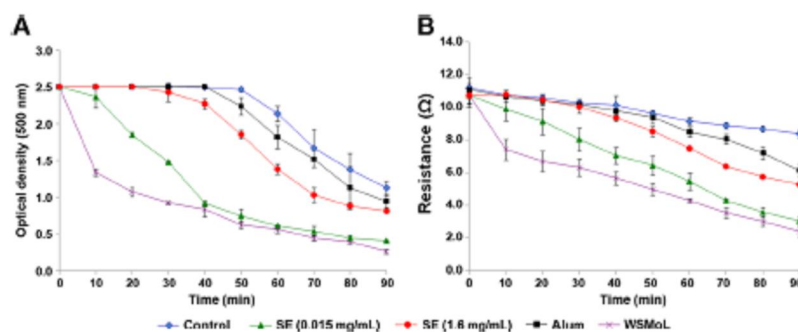


Fig. 2 Coagulant activities of seed extract (SE), WSMoL, and alum (positive control) in the kaolin suspension model. The optical densities at 500 nm (a) and electric resistance (b) were monitored. Distilled water was used instead of sample in the negative control. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation

Table 1 Specific hemagglutinating activity (SHA) of WSMoL in the presence of *N*-acetylglucosamine, glucose, and fructose at different concentrations

Monosaccharide	SHA
<i>N</i> -acetylglucosamine (mM)	
25	20,480
50	20,480
100	10,240
200	10,240
Glucose (mM)	
25	20,480
50	20,480
100	10,240
200	5,120
Fructose (mM)	
25	40,960
50	20,480
100	10,240
200	10,240

SHA of WSMoL in 0.15 M NaCl: 40,960

The quality of water is determined by its chemical, physical, and microbiological properties. Water that is suitable for human consumption should be colorless, tasteless, and free of visible suspended material, organisms that may cause illnesses, and organic or inorganic substances that may produce damaging physiological effects [14]. WSMoL was shown to be an effective coagulant, as it could reduce turbidity and promote sedimentation of solid particles and human pathogenic bacteria in ambient water [7]. These findings support further evaluation of WSMoL as a coagulant to treat water required for human consumption. The possible biotechnological applications of WSMoL prompted us to extensively investigate its coagulant activity.

The coagulant activities of seed extract (SE, protein concentration of 0.015 and 1.6 mg/mL), WSMoL (0.2 mg/mL), and alum (0.015 mg/mL, positive control) were evaluated by determining the kinetics of changes in optical density (Fig. 2a) and electric resistance (Fig. 2b) of kaolin suspension over a period of 60 min. Rolim et al. [29] reported that the SE showed mutagenic effect at concentrations from 0.6 mg/mL, while no mutagenicity was detected at 0.0125 mg/mL. For this reason, the SE was evaluated as obtained, without any dilution (1.6 mg/mL), and at a non-mutagenic concentration (0.015 mg/mL). The alum was used in the same concentration of SE (0.015 mg/mL). The WSMoL was used at 0.2 mg/mL because this concentration was also non-mutagenic [29]. The data show that only SE at a concentration of 1.6 mg/mL did not promote significant reduction ($p > 0.05$) of both parameters compared to the negative control. This was probably due to the high intrinsic turbidity of the SE at this concentration. Also, the SE was more efficient than the alum when they are used at the same concentration.

After an incubation of 60 min, WSMoL reduced the optical density of kaolin suspension from 2.5 ± 0.0 to 0.558 ± 0.05 (Fig. 2a) and the electric resistance decreased from 10.45 ± 0.0 to $4.28 \pm 0.11 \Omega$ (Fig. 2b). The comparison between the kinetic curves of coagulant activity of the SE at a concentration of 0.015 mg/mL of protein and those of

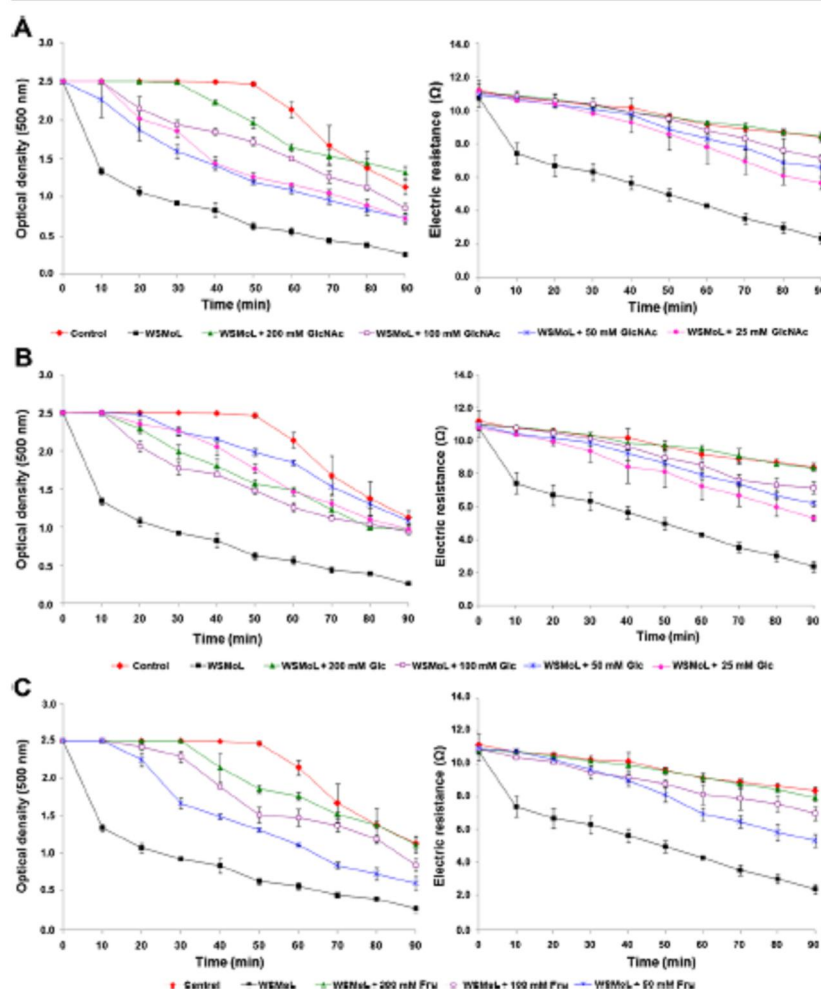


Fig. 3 Coagulant activity of WSMoL in the presence of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc; a), glucose (Glu; b), or fructose (Fru; c) at different concentrations, using the kaolin suspension model. The optical density at 500 nm and electrical resistance were evaluated. The control corresponds to the kaolin suspension without addition of any compound. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation

the isolated lectin showed no significant difference ($p < 0.05$). This evidence suggests that SE has a similar efficiency of coagulation even at a concentration approximately 13 times lower than that of WSMoL. This is probably due to the presence other coagulant agents from *M. oleifera* seeds in the SE. The lower coagulant activity of the alum in comparison with WSMoL is probably due to the low value of its concentration.

The results found here are in accordance with those reported by Ferreira et al. [7] who detected the ability of WSMoL to reduce optical density of a kaolin suspension. In our study,

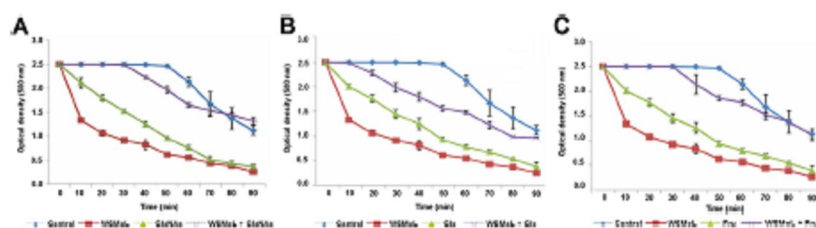


Fig. 4 Coagulant activity of WSMoL (0.2 mg/mL) and of the monosaccharides *N*-acetylglucosamine, GlcNAc (a), glucose, Glc (b), and fructose, Fru (c) at 200 mM in both the presence and absence of lectin. The optical density at 500 nm was evaluated. Distilled water was used instead of sample in the negative control. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation

we also detected a decrease in the electrical resistance of the suspension. The fact that both optical density and electric resistance decreased due to the coagulant action of WSMoL suggests that this process occurs due to chemical interactions between the coagulant protein and the charged particles in suspension. This leads to reduction of electric resistance and destabilization of the particles in suspension, which is followed by the sedimentation of WSMoL–particle complexes.

Subsequent investigations aimed at improving our understanding of the mechanisms inherent to coagulant activity of WSMoL. The effects of sugars on the coagulant efficiency of WSMoL were determined using *N*-acetylglucosamine, glucose, and fructose. Earlier studies have reported that these monosaccharides inhibit the HA of WSMoL by interacting with its carbohydrate-binding sites [29, 35]. Different concentrations of monosaccharides (25, 50, 100, and 200 mM) were used to determine the effect of carbohydrate concentrations on carbohydrate-binding ability and HA of WSMoL. These results are summarized in Table 1 and show that only 25 mM fructose did not inhibit agglutination of erythrocytes by WSMoL. Therefore, this fructose concentration was not evaluated in the coagulant activity assay.

The presence of carbohydrates in the assay medium resulted in significant ($p < 0.05$) reduction of WSMoL coagulant activity (Fig. 3). The optical density and electric resistance of kaolin suspension treated with WSMoL and monosaccharides (200 mM) were not significantly different ($p > 0.05$) from those of the negative control, suggesting that the coagulant activity was neutralized. The greatest inhibitory effect of coagulant

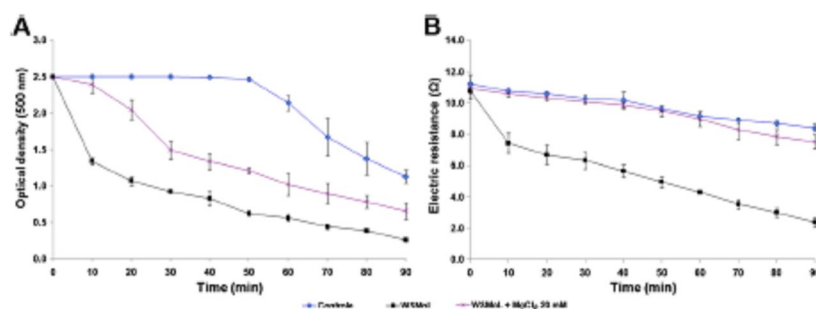


Fig. 5 Coagulant activity of WSMoL in the presence of Mg^{2+} at 20 mM using a kaolin suspension model. The optical density at 500 nm (a) and electric resistance (b) were evaluated. Distilled water was used instead of sample in the negative control. The values are represented as the mean of three experiments $\pm$ standard deviation

activity was found in the presence of *N*-acetylglucosamine. These results suggest that the coagulant activity of WSMoL may be affected because the groups present in the carbohydrate-binding domain are involved in inducing the coagulant effect and/or the binding of sugars alters the lectin conformation required for its activity.

Control experiments were performed by adding only the monosaccharides to the kaolin suspension, and the optical density was monitored. This was done to assess whether the decrease in optical density of the kaolin suspension was due to interference of monosaccharides with WSMoL coagulant activity or due to an increase in turbidity after addition of carbohydrates to the assay media. The monosaccharides reduced the optical density at 500 nm (Fig. 4), indicating that they also exerted a coagulant effect on the kaolin model. This result is particularly interesting because it implies that when WSMoL was incubated with monosaccharides, the reduction in coagulant activity was actually linked to lectin-carbohydrate interactions that impaired the coagulant effects of both lectin and monosaccharide.

Ferreira et al. [7] reported that there was an increase in WSMoL HA after incubation with Mg^{2+} at concentrations of 20 and 30 mM. To verify this result, we investigated the effect of Mg^{2+} ions on the coagulant activity of WSMoL. In the coagulant assay, the reduction of optical density by WSMoL in presence of Mg^{2+} at 20 mM was significantly ($p < 0.05$) lower than that promoted by the lectin in the absence of ions (Fig. 5a). In addition, it was observed that there was no significant effect ($p > 0.05$) on electric resistance when the lectin was incubated in the presence of ions (Fig. 5b). These results show that the presence of magnesium ions impaired the coagulant activity of WSMoL.

Since the HA of WSMoL was stimulated by Mg^{2+} while the coagulant activity was reduced, it is possible that these ions induced conformational changes in WSMoL that favored its binding to carbohydrates on the erythrocyte surface but impaired its interaction with kaolin particles. This reinforces the hypothesis that the coagulant activity of WSMoL is dependent on its conformation. In addition, the inhibition of the coagulant property would result of a complexation of WSMoL molecules with Mg^{2+} ions, which reduces the number of sites for interaction and therefore causes a decrease in the reactivity on colloid particles.

Conclusions

Native WSMoL is an anionic protein whose structure corresponds to a molecular arrangement of 5 kDa subunits. The reduction in electrical resistance of kaolin suspension treated with WSMoL is probably due to destabilization of suspended particles, which is followed by chemical interactions between the particles and WSMoL. This study reports that WSMoL conformation is important for its coagulant activity. Also, it is demonstrated that measurement of electrical resistance is a useful way of monitoring coagulant activity in the kaolin model of turbid water.

Acknowledgments The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), for research grants and fellowship (L.C.B.B. Coelho, M.D.L. Oliveira, and P.M.G. Paiva), to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), and to the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE) for research grants. K.S. Moura would like to thank CNPq for graduate scholarship.

References

- Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1997). Nutrients and anti-quality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. *Journal of Agricultural Science*, 128, 311–322.
- Gassenschmidt, U., Jany, K. D., Tauscher, B., & Niebergall, H. (1995). Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1243, 477–481.
- Ndabigengsere, A., Narasiah, K. S., & Talbot, B. G. (1995). Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. *Water Research*, 29, 703–710.
- Okuda, T., Baes, A. U., Nishijima, W., & Okada, M. (2001). Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. *Water Research*, 35, 405–410.
- Ghebremichael, K. A., Gunaratna, K. R., Henriksson, H., Bruner, H., & Dalhammar, G. (2005). A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water Research*, 39, 2338–2344.
- 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.
- Ferreira, R. S., Napoleão, T. H., Santos, A. F. S., Sá, R. A., Cameiro-da-Cunha, M. G., Moraes, M. M. C., Silva-Lucca, R. A., Oliva, M. L. V., Coelho, L. C. B. B., & Paiva, P. M. G. (2011). Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 186–192.
- Yu, J. F., Wang, D. S., Yan, M. Q., Ye, C., Yang, M., & Ge, X. (2007). Optimized coagulation of high alkalinity, low temperature and particle water: pH adjustment and polyelectrolytes as coagulant aids. *Environmental Monitoring and Assessment*, 131, 377–386.
- Cubas, A. L. Y. (1989). *Floculação em meio granular expandido*. Master's thesis: Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.
- Di Bernardo, L., & Dantas, A. D. B. (2005). *Métodos e técnicas de tratamento de água*. São Paulo, Brazil: Rima.
- Ferreira Filho, S. S., & Lage Filho, F. A. (1996). Comportamento químico do alumínio e do ferro em meio aquoso e implicações no tratamento de água. *Sanare – Revista Técnica da Sanepar*, 6, 50–58.
- Hassemer, M. E. N. (2000). *Tratamento de efluente têxtil—processo físico-químico com ozônio e floculação em meio granular*. Master's thesis: Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.
- Santos, A. F. S., Luz, L. A., Napoleão, T. H., Paiva, P. M. G., & Coelho, L. C. B. B. (2013). Coagulation, flocculation, agglutination and hemagglutination: similar properties? In J. C. Taylor (Ed.), *Advances in Chemistry Research* vol. 20 (pp. 51–70). New York: Nova Science Publishers Inc.
- Duan, J., & Gregory, J. (2006). Coagulation by hydrolysing metal salts. *Advances in Colloid and Interface Science*, 100, 102–475.
- Bolto, B., & Gregory, J. (2007). Organic polyelectrolytes in water treatment. *Water Research*, 41, 2301–2324.
- Carvalho, M. J. H. (2008). *Uso de coagulantes naturais no processo de obtenção de água potável*. Master's thesis: Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil.
- Fabris, R., Chow, C. W., & Drikas, M. (2010). Evaluation of chitosan as a natural coagulant for drinking water treatment. *Water Science and Technology*, 61, 2119–2128.
- Hébert, E. (2000). Endogenous lectins as cell surface transducers. *Bioscience Reports*, 20, 213–237.
- Ramnarath, N. D. S., & Dwek, M. V. (2011). Cell surface glycan-lectin interactions in tumor metastasis. *Acta Histochemica*, 113, 591–600.
- Dias, R. O., Machado, L. S., Migliolo, L., & Franco, O. L. (2015). Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. *Molecules*, 20, 519–541.
- Napoléão, T. H., Santos-Filho, T. G., Pontual, E. V., Ferreira, R. S., Coelho, L. C. B. B., & Paiva, P. M. G. (2013). Affinity matrices of *Cratylia mollis* seed lectins for isolation of glycoproteins from complex protein mixtures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 744–755.
- Oliveira, M. D. L., Nogueira, M. L., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., & Andrade, C. A. S. (2012). Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on *Cratylia mollis* lectin affinity. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 155, 789–795.
- Lino, J. S. L., Oliveira, M. D. L., Melo, C. P., & Andrade, C. A. S. (2014). Impedimetric sensor of bacterial toxins based on mixed (Concanavalin A)/polyaniline films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, 549–554.
- Hemmi, H., Kuno, A., & Hirabayashi, J. (2013). NMR structure and dynamics of the C-terminal domain of R-type lectin from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *FEBS Journal*, 280, 70–82.
- Dong, M., Xu, S., Oliveira, C. L. P., Pedersen, J. S., Thiel, S., Besenbacher, F., & Vorup-Jensen, T. (2007). Conformational changes in mannan-binding lectin bound to ligand surfaces. *Journal of Immunology*, 178, 3016–3022.

26. Santana, G. M. S., Albuquerque, L. P., Napoleão, T. H., Souza, S. R., Coelho, L. C. B. B., & Paiva, P. M. G. (2012). Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. *Bioelectrochemistry*, 85, 56–60.
27. Ambrosi, M., Cameron, N. R., & Davis, B. G. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glyco-code. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3, 1593–1608.
28. 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.
29. Rolim, L. A. D. M. M., Macedo, M. F. S., Sisenando, H. A., Napoleão, T. H., Felzenszwalb, I., Añub, 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.
30. Green, A. A., & Hughes, W. L. (1955). Protein solubility on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. In S. Colowick & N. Kaplan (Eds.), *Methods in enzymology* (pp. 67–90). New York: Academic Press.
31. 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.
32. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
33. Paiva, P. M. G., & Coelho, L. C. B. B. (1992). Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (amarante bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 36, 113–118.
34. Bing, D. H., Weyand, J. G., & Stavinsky, A. B. (1967). Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 124, 1166–1170.
35. 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 Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 982–989.

7. CAPÍTULO 3

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO



Parasitology Research

(Fator de impacto: 2.027 - Qualis B2)

Larvicidal activity of water-soluble *Moringa oleifera* lectin (WSMoL) against *Culex quinquefasciatus*

Kézia Santana de Moura^a, Nataly Diniz de Lima Santos^a, Ana Patrícia Silva de Oliveira^a, Ana Paula de Araújo^b, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha^b, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

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

^b*Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife-PE, 50670-465, Brazil.*

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

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

Abstract

Bancroftian filariasis is a parasitosis considered one of the main neglected tropical diseases. It is transmitted by the mosquito *Culex quinquefasciatus* and caused by the nematode *Wuchereria bancrofti*. The control of mosquito population remains the main measures adopted to prevent this disease. However, the development of resistance to the conventional pesticides becomes necessary the search for new insecticides. In this work, it was evaluated the effects of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin (WSMoL) on survival and digestive enzymes of *C. quinquefasciatus*. WSMoL was able to promote the death of the larvae with a LC₅₀ of 1.05 mg/mL. Incubation of larval gut extracts with the lectin did not affect α -amylase activity but the protease activity has significantly reduced. Trypsin-like activity did not change in presence of WSMoL, suggesting that other types of protease present in the extract are sensitive to this lectin. In conclusion, WSMoL showed larvicidal activity against *C. quinquefasciatus* larvae and this action may be linked to an inhibitory effect on proteolytic digestive enzymes at larval gut. To our knowledge, this is the first report on the larvicidal effects of lectins against this mosquito species.

Keywords: southern house mosquito, protease inhibition, moringa, filariasis.

1. Introduction

Bancroftian filariasis is a parasitosis endemic in several tropical regions of the world (e.g. Brazil, Dominican Republic, Guyana and Haiti), being considered one of the main neglected tropical diseases. It is estimated that more than one billion people live in areas at risk of contracting this infection (Turner et al., 2016). According to the World Health Organization (WHO), the mosquito *Culex quinquefasciatus* Say is the principal vector of the filarial nematode *Wuchereria bancrofti*, which causes this disease. This mosquito is a cosmopolitan species with adaptability to different hosts. The metropolitan region of Recife (Pernambuco, Brazil) has endemic foci of Bancroftian filariasis since 1990, which demonstrates the relevance of searching new control methods (Boccolini et al., 2016).

The Bancroftian filariasis transmission occurs through the bite of infected *C. quinquefasciatus* females, which can be also vector of other arboviruses such as yellow fever and chikungunya (Mayer et al., 2017). Since there are no vaccines for these three diseases, measures for controlling populations of this mosquito remain the main measures adopted to prevent them (Daudens-Vaysse et al., 2016). However, conventional pesticides have failed to control mosquito population due to the development of resistance. Hence, high dosages of pesticides, along with their toxic solubilizers, have been employed raising pesticide pollution load, environmental toxicity, human health concerns, and selection of resistant individuals (Balaji et al., 2017; Pluempunapat et al., 2013).

Many studies look for alternative pesticides demonstrating the potential of natural products such as larvicide, ovicide and oviposition modulators for the control of *C. quinquefasciatus* (Benelli et al., 2017; Shah et al., 2016; Muthukumaran et al., 2015; Govindarajan; Sivakumar., 2014). Plant-derived insecticides have been studied as alternative

and sustainable insecticides for use in mosquito control programs. Some of the characteristics of these insecticides are: specific effects directed to different stages of the life cycle of the mosquito (eggs, larvae, pupae or adults), biodegradability and lower toxicity than synthetic chemicals (Bianco et al., 2013; Pluempanupat et al., 2013).

Lectins are proteins that bind to carbohydrates and possess biological properties including insecticidal activity. Plant lectins have shown deleterious effects against the mosquito *Aedes aegypti*. The lectins from *Myracrodruon urundeuva* heartwood, bark and leaf promoted the death of fourth stage larvae with LC₅₀ of 0.04, 0.125 and 0.202 mg/mL, respectively (Napoleão et al., 2012; Sá et al., 2009). The water soluble lectin from *Moringa oleifera* (WSMoL) seeds was also insecticidal agent against *A. aegypti* showing larvicidal activity (LC₅₀ of 0.197 mg/mL) and also ovicidal effect on fresh and stored eggs. In addition, WSMoL presented oviposition-stimulant activity on pregnant *A. aegypti* females both under laboratory and simulated field conditions (Santos et al., 2014; Santos et al., 2012; Coelho et al., 2009). Agra-Neto et al. (2014) suggested that larvicidal mechanism of WSMoL on *A. aegypti* larvae involve modulation of enzyme activities.

The present work evaluated the effects of WSMoL on survival and digestive enzymes of *C. quinquefasciatus* aiming to increase the biotechnological potential of this lectin. To our knowledge, there are no reports on the larvicidal effects of lectins against this mosquito species.

2. Materials and methods

2.1 Plant material

Seeds of *M. oleifera* were collected at the campus of the *Universidade Federal de*

Pernambuco and a voucher specimen is archived at the herbarium *Dárdano de Andrade Lima* from the *Instituto Agrônomo de Pernambuco* (Recife, Brazil) under number 73,345. The seed collection was authorized (38690) by the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio). The seeds were dried during 3 days and powdered using a blender.

2.2 Isolation of WSMoL

WSMoL was isolated according to the procedure reported by Coelho *et al.* (2009). Proteins from *M. oleifera* seed powder (10 g) were extracted in distilled water (100 mL) for 16 h at 4°C under constant stirring. After this period, the suspension was filtered with gauze, centrifuged (15 min, 9,000 rpm, 4°C) and the supernatant corresponded to the water extract. Soluble proteins were then precipitated with ammonium sulfate at 60% saturation (Green; Hughes, 1955) during 4 h at 28°C. The precipitated protein (lectin-rich fraction) was collected by centrifugation (3000 g, 15 min, 4°C), resuspended and dialyzed against distilled water (4 h) and 0.15 M NaCl (4 h). The dialyzed fraction (50 mg of proteins) was then loaded onto a chitin column (7.5 × 1.5 cm) equilibrated (20 mL/h) with 0.15 M NaCl. WSMoL was eluted with 1.0 M acetic acid and then dialysed against distilled water (6 h, 4°C) for eluent elimination. Lectin concentration was determined according to Lowry *et al.* (1951) using a standard curve of bovine serum albumin (31.25–500 µg/mL).

2.3 *Culex quinquefasciatus* colony

The *C. quinquefasciatus* fourth-stage larvae were obtained from the reference colony S kept in the insetary of the *Departamento de Entomologia* of the *Centro de Pesquisa Aggeu*

Magalhães from *Fundação Oswaldo Cruz*. This colony was established starting from eggs collected in the metropolitan region of Recife and has been maintained for more than ten years in the insetary.

2.4 Larvicidal assay

The larvicidal activity was evaluated by adapting the World Health Organization (2015). Stock solutions of water extract (4.3 mg/mL of protein), lectin-rich fraction (28.0 mg/mL of protein) and WSMoL (2.5 mg/mL of protein) were diluted in distilled water to provide test solutions in the protein concentration range of 0.2–2.5 mg/mL. The final volume of each larvicidal assay was 50 mL of test solution or negative control (distilled water) and contained 20 larvae in the early fourth stage. Mortality rate (%) was determined after 48 h of incubation at 25–27°C and 12:12 (light–dark) photoperiod. Larvae that were unable to reach the surface solution or did not respond to mechanical stimulus were considered dead. Five independent experiments were performed in triplicate.

2.5 Preparation of larval gut extracts

Groups of 150 larvae were immobilized at 4°C for 10 min and their guts were removed under a stereomicroscope. The dissected guts were homogenized with 1 mL of 0.1 M sodium acetate pH 5.5 containing 0.02 M CaCl₂ (acetate buffer) or 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 (Tris buffer) using a 2 mL tissue grinder. After centrifugation (6000 g, 10 min), the gut extracts were collected and evaluated for protein concentration according to Bradford (1976) using a standard curve of lysozyme (0.1–1.0 mg/mL).

2.6 Effects of WSMoL on activity of larval digestive enzymes

The effects on the enzymatic activities were evaluated by incubation (30 min at 28°C) of the gut extract with WSMoL before the determination of the enzymatic activity. The results were compared with those of the assays performed in absence of lectin (100% activity control). Control trials were also performed only with WSMoL.

The α -amylase activity assay as performed according to Bernfeld (1955). The gut extract in acetate buffer (50 μ L; 60 μ g of protein) was incubated (50°C, 10 min) with 50 μ L of WSMoL (10–400 μ g) or distilled water (100% activity control) and 400 μ L of a 1% (w/v) soluble starch suspension in acetate buffer. The reaction was stopped by adding 500 μ L of dinitrosalicylic acid. Then, the reactions were heated at 100°C in boiling water for 6 min, immediately cooled on ice for 15 min, and evaluated for absorbance at 540 nm. The amount of reducing sugars was determined using a standard curve glucose reaction with DNS ($Y = 0.4153X - 0.0026$, 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.

Protease activity was determined according to Azeez et al. (2007). Gut extract in Tris buffer (100 μ L; 130 μ g of protein) and 100 μ L of WSMoL (10–400 μ g) or distilled water (100% activity control) was added to 300 μ L of 0.1 M sodium phosphate (pH 7.5) containing 50 μ L of 0.6% (w/v) azocasein. Next, 100 μ L of Triton X-100 (0.1%, v/v) was added and the mixture was incubated at 37°C for 3 h. The reaction was stopped by adding 200 μ L of 10% (v/v) trichloroacetic acid, and the assay was incubated at 4°C for 30 min. The reaction mixture was then centrifuged (9000 g for 10 min) and the absorbance of the supernatant at 366 nm was

read. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme required to increase absorbance by 0.01.

The trypsin activity was determined according to Oliveira et al. (2016). The gut extract in Tris buffer (15 μ L; 19.5 μ g of protein) was incubated (30 min, 37°C) with 15 μ L of WSMoL (10–200 μ g) or distilled water (100% activity control) and 8 mM *N*-benzoyl-DL-arginyl- ρ -nitroanilide (BAPNA; 5 μ L) in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0, 165 μ L). Trypsin activity was followed by the measurement of absorbance at 405 nm. One unit of trypsin activity is defined as the amount of enzyme that hydrolyses 1 μ mol of BAPNA per minute.

Statistical analysis

Standard deviations (SDs) were calculated using GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and data were expressed as mean of replicates $\pm$ SD. The concentrations required to kill 50% of larvae (LC_{50}) in 48 h was calculated by probit analysis with a reliability interval of 95% using the software StatPlus® 2006 (AnalystSoft, Canada). Significant differences between treatment groups were analysed by Student's *t*-test (statistical significance at $p < 0.05$) and Tukey test using Origin 6.0 program.

3. Results and discussion

Lectins have been reported to exert insecticidal activity against species from several orders such as Coleoptera, Lepidoptera, Isoptera, and Diptera (Paiva et al., 2013). The larvicidal activity of plant lectins on *A. aegypti* has been reported but only this disease vector mosquito was evaluated until now. In this work, we evaluated the larvicidal action of a plant lectin on the filariasis vector *C. quinquefasciatus*.

The aqueous extract and the lectin-rich fraction from *M. oleifera* seeds did not show larvicidal activity against *C. quinquefasciatus* at any of the tested concentrations. On the other hand, WSMoL was able to promote the death of the larvae (Figure 1) with a LC₅₀ of 1.05 mg/mL. This result shows that WSMoL was about five times less effective against *C. quinquefasciatus* than *A. aegypti* larvae since the LC₅₀ for these last was 0.197 mg/mL (Coelho et al., 2009).

Lectins may interact with the peritrophic matrix and glycoconjugates along the digestive tract, affecting nutrient absorption, and bind to digestive enzymes modulating their catalytic properties (Macedo et al., 2015;). In this sense, we investigated whether the larvicidal action of WSMoL on *C. quinquefasciatus* would involve alterations in the activity of digestive enzymes. The results revealed that α -amylase activity was not affected ($p > 0.05$) after incubation with the lectin (Figure 2A) but the protease activity was significantly ($p < 0.05$) reduced (Figure 2B). The trypsin-like activity did not change in presence of WSMoL (Figure 2C), which indicates that other types of protease present in the extract are sensitive to this lectin.

Inhibition of protease activity was also detected when the lectin from *M. urundeuva* leaf was incubated with gut extract from *A. aegypti* larvae (Napoleão et al., 2012). Oliveira *et al.* (2015) reported that a lectin from *Dioclea violacea* seeds decreased the activities of trypsin and chymotrypsin from *A. kuehniella* larvae. Similarly to WSMoL, the *Crataeva tapia* bark lectin caused distinct effects on the activity of different class of proteases in the gut of *Callosobruchus maculatus* larvae: the cysteine proteases activity decreased in treatments with the lectin while serine protease activity increased (Nunes et al., 2015).

The action mechanisms of insecticidal lectins may differ according to the species affected (Vandenborre et al., 2011). Agra-Neto et al. (2014) evaluated the effects of WSMoL on *A. aegypti* digestive enzymes and observed a stimulatory effect on protease, trypsin, α -amylase

activities, conversely to the results described here with *C. quinquefasciatus* larvae. These distinct effects may explain the different susceptibility of larvae of these mosquito species to WSMoL. It was suggested that the excessive proteolysis at the gut lumen of *A. aegypti* larvae induced by WSMoL may lead to degradation of important proteins and morphological damages at gut level (Agra-Neto et al., 2014). In the case of *C. quinquefasciatus*, the WSMoL action seems to involve damage to digestive processes reducing the bioavailability of amino acids. This mechanism is more similar to that involved in the insecticidal action of WSMoL on *A. kuehniella* larvae (Oliveira et al., 2017). The authors reported that ingestion of WSMoL reduced the proteolytic activity in midgut of *A. kuehniella* larvae; in addition, chymotrypsin enzymes were not affected, revealing specificity in the action of WSMoL.

4. Conclusion

The lectin WSMoL showed larvicidal activity against *C. quinquefasciatus* larvae and this action may be linked to an inhibitory effect on proteolytic digestive enzymes at larval gut.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; 446902/2014-4) for research grants and fellowship (LCBBC, THN, MHNLS, PMGP), the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES; AUXPE 1454/2013) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado*

de Pernambuco (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15) for financial support. KSM would like to thank FACEPE for graduate scholarship (IBPG-0904-2.08/12).

References

AGRA-NETO, A. C.; NAPOLEÃO, T. H.; PONTUAL, E. V.; SANTOS, N. D.L., LUZ,, L.A., de OILIVEIRA, C. M. F., COELHO, L.C.B.B; PAIVA, P. M. G. (2014). Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitology research**, v. 113, n. 1, p. 175-184, 2014.

AZEEZ, A.; SANE, A. P.; BHATNAGAR, D.; NATH, P. Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. **Phytochemistry**, v.68, n.10, p. 1352-1357, 2007.

BALAJI, A. P. B.; SASTRY, T. P.; MANIGANDAN, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Environmental benignity of a pesticide in soft colloidal hydrodispersive nanometric form with improved toxic precision towards the target organisms than non-target organisms. **Science of The Total Environment**, v.579, p. 90-201, 2017.

BENELLI G.; PAVELA, R.; CANALE, A.; CIANFAGLIONE, K.; CIASCHETTI, G.; Conti, F.; MAGGI, F. Acute larvicidal toxicity of five essential oils (*Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* and *Pelargonium graveolens*) against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: Synergistic and antagonistic effects. **Parasitology International**, v.66, n. 2, p. 166-171, 2017.

BERNFELD, Peter. Amylases, alpha and beta. **Methods in enzymology**, v.1, p. 149-158, 1955.

BIANCO, K.; YUSSEPONE, M. S.; OTERO, S.; LUQUET, C.; MOLINA, M. D. C. R.; KRISTOFF, G. Cholinesterases and neurotoxicity as highly sensitive biomarkers for an organophosphate insecticide in a freshwater gastropod (*Chilina gibbosa*) with low sensitivity carboxylesterases. **Aquatic toxicology**, v.144, p.26-35, 2013.

BOCCOLINI, C. S.; BOCCOLINI, P. D. M. M.; DAMACENA, G. N.; Ferreira, A. P. S.; Szwarcwald, C. L. **Fatores associados à discriminação percebida nos serviços de saúde do Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde**, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

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.

DAUDENS-VAYSSE, E.; LEDRANS, M.; GAY, N.; ARDILLON, V.; CASSADOU, S.; NAJIOULLAH, F.; MAQUART, M. Zika emergence in the French Territories of America and description of first confirmed cases of Zika virus infection on Martinique, November 2015 to February 2016. **Eurosurveillance**, v.21, n.28, 2016.

GOVINDARAJAN, M.; SIVAKUMAR, R.. Ovicidal, larvicidal and adulticidal properties of *Asparagus racemosus* (Willd.)(Family: Asparagaceae) root extracts against filariasis (*Culex quinquefasciatus*), dengue (*Aedes aegypti*) and malaria (*Anopheles stephensi*) vector mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Parasitology research**, v. 113, n. 4, p. 1435-1449, 2014.

GREEN, A. A.; HUGHES, W. L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous

solutions of salts and organic solvents. **Methods in enzymology**, v. 1, p. 67-90, 1955.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, n.1, p. 265-275, 1955.

MACEDO, M. L. R.; OLIVEIRA, C. F. R.; OLIVEIRA, C. T. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2014-2033, 2015.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N.. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Tropica**, v. 166, p. 155-163, 2017.

MUTHUKUMARAN, U.; GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; HOTI, S. L. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Gmelina asiatica* leaf extract against filariasis, dengue, and malaria vector mosquitoes. **Parasitology research**, v.114, n. 5, p.18, 2015.

NAPOLEÃO, T. H.; PONTUAL, E. V.; Lima, T. A.; SANTOS, N. D.L., SÁ, R. A., COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M.G. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology research**, v. 110, n. 2, p. 609-616, 2012.

NUNES, N. N.; FERREIRA, R. S.; SILVA-LUCCA, R. A.; SÁ, L. F.; OLIVEIRA, A. E. A.; CORREIA, M. T. D. S.; OLIVA, M. L. V. Potential of the Lectin/Inhibitor Isolated from *Crataeva tapia* Bark (CrataBL) for Controlling *Callosobruchus maculatus* Larva Development. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.63, n.48, p.10431-10436, 2015.

OLIVEIRA, A. P. S., SILVA, L.L.S.; , LIMA, T.A.; PONTUALI, E. V.; SANTOS N. D. L., COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Biotechnological value of *Moringa oleifera* seed cake as source of insecticidal lectin against *Aedes aegypti*. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p.

1683-1690, 2016.

OLIVEIRA, C. F. R.; MOURA, M. C.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; MACEDO, M. L. R. A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2017.

OLIVEIRA, C. T.; KUNZ, D.; SILVA, C. P.; MACEDO, M. L. R.. Entomotoxic properties of *Dioclea violacea* lectin and its effects on digestive enzymes of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). **Journal of insect physiology**, v. 81, p.81-89, 2015.

PAIVA, P. M. G.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B. Lectins and trypsin inhibitors from plants: biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae. Nova Science, New York, v.52, 2013.

PLUEMPANUPAT, S.; KUMRUNGSEE, N.; PLUEMPANUPAT, W.; NGAMKITPINYO, K.; CHAVASIRI, W.; BULLANGPOTI, V.; KOUL, O. Laboratory evaluation of *Dalbergia oliveri* (Fabaceae: Fabales) extracts and isolated isoflavonoids on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 653-658, 2013.

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, N. D. L.; MOURA, K. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, G. K. N.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. D. A. F.; PAIVA, P. M. G. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v.7, n.9, p. e44840, 2012.

SANTOS, N.D.L.; PAIXÃO, K.S.; NAPOLEÃO, T.H.; TRINDADE, P.B.; PINTO, M.R.; COELHO, L.C.B.B.; EIRAS, A.E.; NAVARRO, D.M.A.F.; PAIVA, P.M.G. Evaluation of the *Moringa oleifera* seed lectin in traps for capture of *Aedes aegypti* eggs and mosquitoes under semi-field conditions. **Parasitology Research**, v.113, p.1837, 2014.

SHAH, R. M.; ALI, Q.; ALAM, M.; SHAD, S. A.; MAJEED, S.; RIAZ, M.; BINYAMEEN, M. Larval Habitat Substrates Could Affect the Biology and Vectorial Capacity of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, p. Tjw211, 2016.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J.M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1538-1550, 2011.

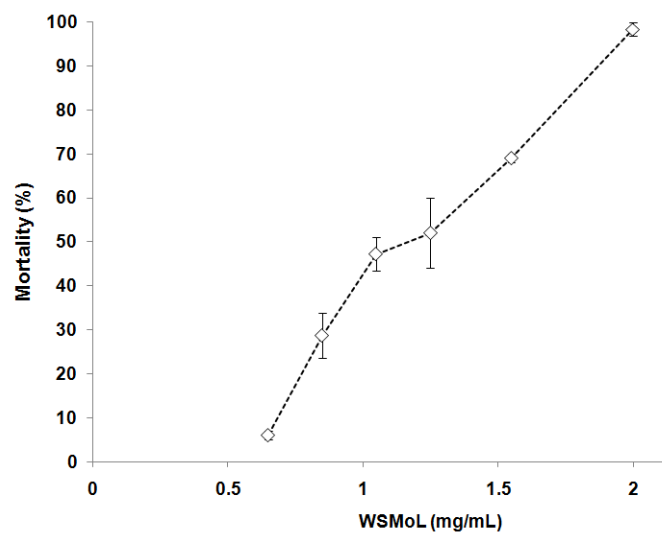


Figure 1. Effect of the lectin WSMoL on survival of *Culex quinquefasciatus* fourth-stage larvae.

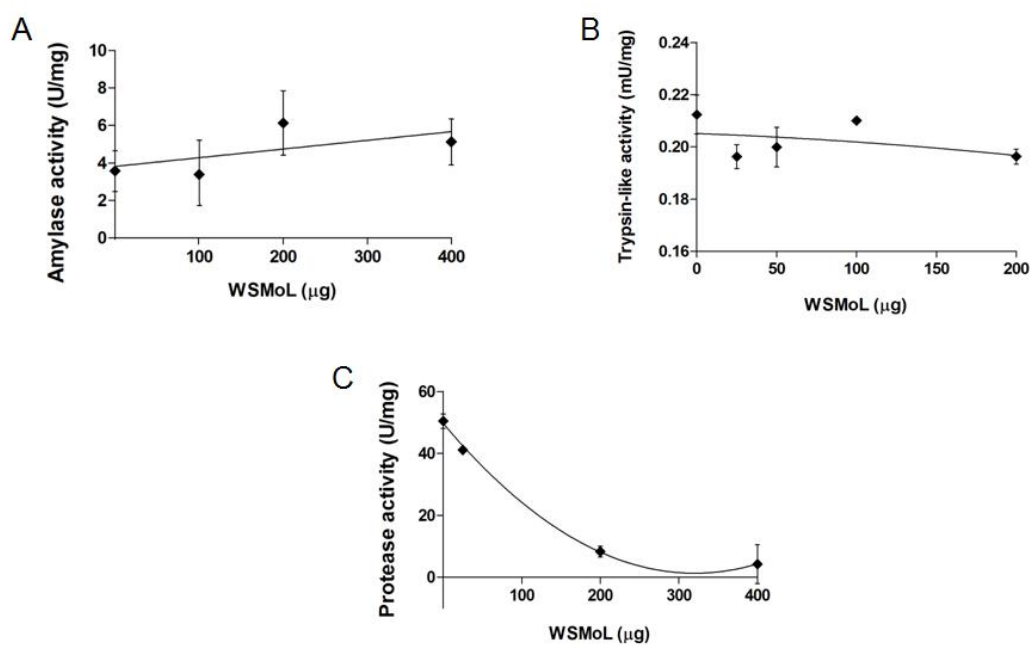


Figure 2. *In vitro* effects of WSMoL on the activities of α -amylase (A), protease (B) and trypsin-like (C) enzymes from gut extracts of *C. quinquefasciatus* larvae.

CONCLUSÃO

- O extrato aquoso de *M. oleifera* é citotóxico para células GN1 e HaCaT promovendo a morte celular por necrose e efeito anti-proliferativo, respectivamente. Este estudo mostra que é necessária cautela em relação à dosagem utilizada para o tratamento da água, uma vez que efeitos nocivos foram detectados em preparações aquosas de sementes de *M. oleifera*. Por outro lado, os resultados estimulam a avaliação do extrato de sementes para tratar doenças de pele que apresentam proliferação descontrolada de queratinócitos, como a psoríase.

- A lectina WSMoL é uma proteína aniônica de 59,4 kDa cuja estrutura corresponde a um arranjo molecular de subunidades de 5 kDa. A redução na resistência elétrica da suspensão de caolin tratada com WSMoL sugere que a atividade coagulante é provavelmente devido à desestabilização de partículas em suspensão, seguida por interações químicas entre as partículas e lectina. A conformação de WSMoL é importante para a sua atividade coagulante, desde que a ligação de carboidratos e íons promove diminuição dessa atividade.

- A lectina WSMoL mostrou atividade larvicida contra *Culex quinquefasciatus* e esta ação pode estar ligada a um efeito inibitório sobre as enzimas digestivas proteolíticas no intestino das larvas.