ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL –
PNQM32

ANÁLISE DA TOXICIDADE DO EXTRATO DE CLADÓDIOS DE *Opuntia-ficus* (CACTACEAE) CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti* (CULICIDAE).

I.C.Vila-Nova¹, J.S Nascimento³, D.M.F.A Navarro³, W.A Almeida², T.H. Napoleão², P.M.P Silva², E.V. Pontual¹.

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal.

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Bioquímica.

³ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química Fundamental.

E-mail: bella_coimbra@hotmail.com

RESUMO- *Cladódios de Opuntia ficus-indica expressam uma lectina cuja toxicidade para cupins Nasutitermes corniger foi relatada. O objetivo do trabalho foi reportar o efeito do extrato de cladódios na sobrevivência e permeabilidade da matriz peritrófica de larvas de Aedes aegypti no quarto instar (L₄). Cladódios foram secos ao ar (25° C) e triturados, sendo a farinha homogeneizada com NaCl 0,15 M. Após filtração e centrifugação (3.000 g, 15 min), o sobrenadante correspondeu ao extrato de cladódios. O ensaio larvídica consistiu em tratar 20 L₄ com o extrato de cladódios ou com NaCl 0,15 M (controle). Após a incubação (25°C, 48h), a mortalidade foi registrada. O extrato foi obtido com concentração de 7,2% (m/v) e aglutinou eritrócitos de coelho com atividade específica de 178. O extrato de cladódios foi tóxico para L₄, promovendo 40±14% de mortalidade na concentração de 4,3%. As larvas foram então alimentadas com carvão ativado e expostas ao extrato. Os resultados revelaram um aumento na permeabilidade da matriz peritrófica, uma vez que o carvão extravazou para além dos seus limites. O extrato de cladódios de O. ficus-indica foi tóxico para larvas de A. aegypti por interferir na permeabilidade da sua matriz peritrófica.*

Palavras chave: Extrato; Lectina; Matriz peritrófica.

ABSTRACT - *Cladodes of Opuntia ficus-indica express a lectin whose toxicity to termites Nasutitermes corniger has been reported. The objective of this work was to report the effect of the cladode extract on the survival and permeability of the peritrophic matrix of Aedes aegypti larvae in the fourth instar (L₄). Cladodes were air-dried (25 ° C) and ground, the flour was homogenized with 0.15 M NaCl. After filtration and centrifugation (3,000 g, 15 min), the supernatant corresponded to the cladodes extract. The larvicidal assay consisted of treating 20 L₄ with the cladodes*

extract or with 0.15 M NaCl (control). After incubation (25 ° C, 48h), mortality was recorded. The cladodes extract was toxic to L₄, promoting 40 ± 14% mortality in the concentration of 4.3%. The larvae were then fed with activated charcoal and exposed to the extract. The results showed an increase in the permeability of the peritrophic matrix, once the coal has gone beyond its limits. O. ficus-indica cladodes extract was toxic to A. aegypti larvae by interfering with the permeability of their peritrophic matrix.

Keywords: Extract; Lectin; Peritrophic matrix.

1. INTRODUÇÃO

O Ministério da Saúde do Brasil declarou estado de emergência de saúde pública em decorrência dos altos índices de casos de microcefalia, os quais têm sido associados ao vírus zika (BRASIL, 2016). Nesse contexto, o controle de populações do mosquito *Aedes aegypti* tem se tornado a principal medida de prevenção da doença. Além de vetor do vírus zika, o *A. aegypti* é vetor da dengue, da chicungunya e da reemergente febre amarela.

Com o propósito de eliminar criadouros do *A. aegypti*, inseticidas sintéticos têm sido utilizados. Essa prática se iniciou em 1986, quando houve um dos primeiros surtos de dengue nas Américas (WHO, 2009). Contudo, nem sempre este método é eficaz, uma vez que tem resultado na seleção de populações de mosquitos resistentes. Nesse sentido, plantas têm sido estudadas como fonte de compostos bioativos com efeitos tóxicos sobre os insetos, incluindo as lectinas (GRZYBOWSKI et al., 2012, NAPOLEÃO et al., 2012).

Lectinas são proteínas capazes de ligar carboidratos e aglutinar células de maneira reversível e específica. São encontradas em vários organismos, como plantas, vírus, bactérias, fungos, invertebrados (AGRA-NETO et al., 2014) e vertebrados (MAKKER et al., 2002). As lectinas possuem várias aplicações biotecnológicas, incluindo o efeito inseticida que pode estar relacionado à capacidade de interagir com resíduos de N-acetilglicosamina ou com proteínas glicosiladas da matriz peritrófica ao nível do intestino dos insetos, alterando suas propriedades e agredindo a sua integridade (PAIVA et al., 2011a).

Cladódios de *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae), conhecida popularmente como palma forrageira, são utilizados na medicina popular por apresentar efeito antiulcerogênico, cicatrizante e diurético (GALATI et al., 2001, GALATI et al., 2002, TROMBETTA et al., 2006). Essa planta também representa uma importante fonte alternativa de alimento para animais (TEGEGNE et al., 2007).

Relatos prévios indicaram que os cladódios de *O. ficus-indica* expressam uma lectina que apresenta atividade inseticida contra cupins da espécie *Nasutitermes corniger* (PAIVA et al., 2011a). Aqui nós relatamos os resultados da investigação do extrato de cladódios de *O. ficus-indica* quanto à atividade larvicida contra *A. aegypti* e efeito na permeabilidade da matriz peritrófica de larvas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do extrato de *O. ficus-indica*

Cladódios de *O. ficus-indica* foram coletados em Pau Amarelo (Paulista/PE), secos ao ar (25° C) e triturados. A farinha obtida (10 g) foi homogeneizada (16 h, 4° C) em NaCl 0,15 M (50 ml). Após filtração e centrifugação (4.000 g, 15 min), o sobrenadante correspondeu ao extrato de cladódios. O extrato foi avaliado quanto à atividade hemaglutinante em placas de microtitulação, de acordo com Napoleão et al. (2012), utilizando-se solução de eritrócitos de coelho glutarizados seguindo a metodologia proposta por Bing et al. (1967). A atividade hemaglutinante foi definida como o inverso da maior diluição do extrato de cladódios capaz de promover hemaglutinação. A atividade hemaglutinante específica correspondeu à razão entre o título e a concentração da proteína (mg/mL). O Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE aprovou o método de coleta dos eritrócitos (processo 23076.033782/2015-70).

Ensaio larvicida

A atividade larvicida do extrato de cladódios foi investigada utilizando-se uma adaptação do método recomendado pela Organização Mundial de Saúde (1981) descrita por Navarro et al. (2003). Vinte larvas de *A. aegypti* no quarto instar foram imersas em 20 mL do extrato de cladódios (0,72-4,3%, m/v) ou de NaCl 0,15 M (solução controle). Os ensaios foram conduzidos no escuro, à temperatura entre 25–27°C durante 24 h. As larvas foram consideradas mortas quando não foram capazes de responder a estímulos ou quando não realizaram movimentos em direção à superfície da solução. Três ensaios independentes foram realizados em triplicata.

Efeito na permeabilidade da matriz peritrófica

O efeito do extrato de cladódios na matriz peritrófica das larvas foi avaliado de acordo com Edwards e Jacobs-lorena (2000) para indicar um possível mecanismo de ação da atividade inseticida. Para isso, larvas previamente tratadas com o extrato de cladódios na concentração de 4,32% e alimentadas com carvão ativado (0,01%) durante 24 h foram dissecadas e os intestinos médios removidos cuidadosamente com o auxílio de uma agulha. Em seguida os intestinos foram colocados em tampão fosfato de sódio (0,1 M pH 7,0 contendo NaCl 0,15) e imediatamente fotografados utilizando um estereomicroscópio com aumento de 6,8 x. O grupo controle correspondeu a larvas não tratadas e alimentadas com carvão ativado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho foi estimulado pela atual importância do mosquito *A. aegypti* como vetor de doenças endêmicas no Brasil e no mundo. A escolha dos cladódios de *O. ficus-indica* como material de partida foi baseada nos prévios relatos de atividade inseticida para esta planta. O extrato de cladódios de *O. ficus-indica* foi obtido com a concentração de 7,2% (m/v) e o ensaio de hemaglutinação revelou uma atividade específica de 178, sugerindo a presença de lectinas no extrato e confirmando os resultados publicados por

SANTANA et al (2008)¹³. O extrato de cladódios causou mortalidade das larvas de *A. aegypti* após 48 h (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do extrato de cladódios de *O. ficus-indica* na sobrevivência de larvas de *A. aegypti* no quarto instar. L4: larvas de *A. aegypti* no quarto instar. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores, os quais foram obtidos utilizando o Teste T de Student e considerando como significativos valores de $p < 0,05$.

Extrato de cladódio (% m/v)	Taxa de mortalidade de L4 (%)
0	0 ± 0^a
0,72	25 ± 0^b
2,8	$37,5 \pm 3,5^c$
4,3	40 ± 14^c

A matriz peritrófica é uma estrutura anatômica em forma de filme, composta de proteínas, proteoglicanos e quitina, que reveste todo o intestino médio dos insetos, impedindo o contato do conteúdo do lúmen intestinal com as células do epitélio digestivo. A matriz peritrófica é também capaz de limitar a entrada de possíveis patógenos, uma vez que o tubo digestivo é a rota mais comum de infecção⁹. Nesse sentido, para sugerir um possível mecanismo para a atividade larvívora do extrato de cladódios, seu efeito sobre a matriz peritrófica das larvas foi investigado. Os resultados revelaram que o extrato de cladódios aumentou a permeabilidade da matriz peritrófica, uma vez que houve extravasamento do carvão ativado para fora dos limites do intestino (Figura 1).

A alteração da permeabilidade da matriz peritrófica pelo tratamento com o extrato de cladódios pode estar relacionada com a presença de lectina nessa preparação, devido à sua capacidade de interagir com resíduos de N-acetil-glicosamina presentes na quitina que compõe essa membrana⁹.

Figura 1. Efeito do extrato de cladódios de *O. ficus-indica* sobre a membrana peritrófica de larvas de *A. aegypti* no quarto instar. (A) Larva alimentada com solução controle (NaCl 0,15 M) e carvão ativado (0,01%) (B) Intestino dissecado da Larva alimentada com solução controle e carvão ativado. (C) Larva alimentada com o extrato de cladódios (4,32 %) e carvão ativado. (B) Intestino dissecado da larva alimentada com o extrato de cladódios e carvão ativado. As imagens foram visualizadas em microscópio estereoscópico com aumento de 6,8 x.

4. CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados indicam que o extrato de cladódios de *O. ficus-indica* é tóxico para larvas de *A. aegypti* por interferir na permeabilidade da matriz peritrofica. Esses efeitos podem estar relacionados à presença de lectinas no extrato.

5. REFERÊNCIAS

AGRA-NETO, A.C. et al., 2014 Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitol Research**, 113, 175-184.

BING, D. H.; Weyand, J. G. M.; Stavinsky, A. B. Hemagglutination with aldehyde fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. **Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 124, p. 1166-1170, 1967.

BRASIL. Ministério da Saúde Sistema de Informação sobre Doenças de Declaração Obrigatória. . **Incidência de casos de dengue e número de óbitos no Brasil de 1990 a 2015**, 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>>. Acesso em 10 Dez. 2016.

EDWARDS, M.J., JACOBS-LORENA, M., 2000. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. **Journal of Insect Physiology**, 46, 1313-1320.

GALATI, E.M., Monforte, M.T., Tripodo, M.N., d'Aquino, A. and Mondello, M.R. 2001. Antiulcer activity of *Opuntia ficus indica* (L) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study. **Journal of Ethnopharmacology**, 76, 1-9.

GRZYBOWSKI, A. et al. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**: The combined action of phytolavicides for the control of dengue fever vector, *Aedes aegypti*, 22(3): 549-557, May/Jun. 2012.

MAKKER, N.P.; Conlin, J.; Hogan, V.; RAZ, A. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. **Trends in Molecular medicine**. 8(4): 187-192, 2002.

NAPOLEÃO, T.H., Pontual, E.V., Lima, T.A., Santos, N.D.L., Sá, R.A., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., 2012 Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, 110, 609-616.

NAVARRO, M.A.F., Oliveira, P.E.S., Potting, R.J.P., Brito, A.C., Fital, S.J.F., Sant'Ana, A.E.G., 2003. The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Dipt., Culicidae). **Journal of Applied Entomology**, 127, 46-50.

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 Biodegradation and Biodeterioration**. v. 65, p. 982-989, 2011b.

SANTANA, G.M.S. Purificação, caracterização e avaliação da atividade fúngica da Lectina de Cladônias de *Opuntia ficus indica*. 2008. 43 f. Dissertação (mestrado) – **Universidade Federal de Pernambuco**. CCB. Departamento de Bioquímica, Pernambuco, 2009.

TEGEGNE, F., Kijora, C. and Peters, K.J. Study on the optimal level of cactus pear (*Opuntia ficus indica*) supplementation to sheep and its contribution as source of water. **Small Ruminant Research**. 72, 157-164. 2007.

WHO: World Health Organization 2009. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. WHO/HTM/NTD/DEN/2009.

6. AGRADECIMENTOS

FACEPE, UFRPE, UFPE, CAPES, CNPQ.