

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

**Preparações Contendo Lectinas de Sementes
de *Cratylia mollis*: Atividade sobre
Biomphalaria glabrata e *Artemia salina***

FLÁVIA FABIANNY BARBOSA DE ARAÚJO

**Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Co-orientadora: Prof^a Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva**

Recife, 2003

FLÁVIA FABIANNY BARBOSA DE ARAÚJO

**Preparações Contendo Lectinas de Sementes
de *Cratylia mollis*: Atividade sobre
Biomphalaria glabrata e *Artemia salina***

**Dissertação apresentada para o cumprimento parcial
das exigências para a obtenção do título de Mestre em
Bioquímica pela Universidade Federal de Pernambuco.**

Aprovada por: _____

FEVEREIRO/2003

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
I INTRODUÇÃO	1
I.1 Lectinas	1
I.1.2 Purificação	3
I.1.3 Lectinas-Leguminosas	5
I.1.4 Isolectinas e Isoformas	5
I.1.5 <i>Cratylia mollis</i>	6
I.2 Atividade Moluscicida	7
I.2.1 Esquistossomose Mansônica	7
I.2.1.1 Ciclo Biológico	8
I.2.1.2 Sintomatologia da Esquistossomose	9
I.2.1.3 Tratamento e Profilaxia	9
I.2.2 Moluscos Transmissores	10
I.2.3 Compostos Moluscicidas	10
I.3 <i>Artemia salina</i>	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
4. ARTIGO: Activity of <i>Cratylia mollis</i> Seed Lectin Preparations on <i>Biomphalaria glabrata</i> and <i>Artemia salina</i>	28
5. CONCLUSÕES	40
6. ANEXO	41

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de aprender com derrotas e vitórias.

À Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia pela acolhida, amizade, pelo suporte e orientação.

À Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva pelo apoio, amizade, oportunidades e co-orientação.

A Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, pela atenção, incentivo e por seus ensinamentos.

À Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha, pela amizade, oportunidade e confiança.

Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio G. Sant'Ana e a Mestre Aldenir Feitosa dos Santos, pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho junto a vocês e a todos que fazem parte do laboratório de bioensaios do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Alagoas.

À Coordenação e professores do Mestrado em Bioquímica e aos funcionários do Departamento de Bioquímica.

À Maria Barbosa Reis, por tudo.

A todos que fazem o Laboratório de Glicoproteínas, pela amizade, carinho e troca de conhecimentos em especial as estudantes de iniciação científica.

A todos amigos do curso de Mestrado, por todos os momentos que passamos juntos.

Aos meus pais, Marcos e Fátima pelo amor, carinho, educação, apoio em todos os momentos e incentivo para recomeçar. Aos meus irmãos, Erick e Anderson por sempre torcerem por mim. Ao meu padrinho, Urbano pelo suporte e amor no decorrer de toda vida. A toda minha família, em especial aos tios Roberto, Semírames, Washington e Roseane pela atenção.

A Júnior pelo incentivo, compreensão e por me fazer sentir que vale a pena amar.

As minhas amigas, Adriana e Andréa pela grande amizade, pela acolhida e ajuda em todos os momentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

RESUMO

Lectinas são proteínas capazes de se ligar reversivelmente a carboidratos. Os caramujos podem transmitir doenças e *Biomphalaria glabrata* é o hospedeiro intermediário mais susceptível ao *Schistosoma mansoni* no Brasil. O uso de plantas com propriedades moluscicidas poderia ser um achado para o controle do vetor. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das preparações contendo lectinas em sementes de *Cratylia mollis* sobre *B. glabrata* e *Artemia salina*. As preparações foram obtidas através de protocolo previamente estabelecido: extrato, frações obtidas com sulfato de amônio (F0-40%, F40-60%, F60-80%) e F40-60% cromatografada em Sephadex G-75 (Cra Iso 1,4). O bioensaio para avaliar a atividade moluscicida usando caramujos *B. glabrata* (5 no preliminar e 10 no apurado) para cada preparação. Nestes bioensaios, as amostras (12,5 mg) foram solubilizadas em 1,25 l de água desclorada (A) em dimetil sulfoxido 1% (v/v), DMSO (A/DMSO) para uma concentração final de 100 ppm (24 h); amostras (8 mg) foram solubilizadas em 1 l de água desclorada em dimetil sulfoxido 1% (v/v) para uma concentração final de 80 ppm (24 h) seguido pela observação da mortalidade (máximo de 72 h). A temperatura (24 a 25°C) e o pH (6,0 a 7,0) foram acompanhados (no começo e ao final do ensaio). Foram feitos controles positivo (solução de carbonato cúprico a 50 ppm) e negativo (DMSO em água). Amostras ativas tiveram, pelo menos, 50 % de mortalidade a 100 ppm. O bioensaio com *A. salina* usou larvas eclodidas (48 h) em Cra Iso 1,4 e F60-80%. As soluções lectínicas foram preparadas a 10.000 ppm (solubilizada em água do mar em DMSO 1%). Soluções estoque (de cada amostra) foram diluídas em água do mar (1.000-1 ppm) e contendo 10 a 20 *A. salina* no ensaio preliminar e 10 no ensaio apurado. Os testes foram feitos por 24 h e as mortalidades foram observadas. Cra Iso 1,4 e F 60-80% promoveram a morte de *B. glabrata* em 80 e 100 ppm; estas preparações exibiram a mortalidade de *A. salina* de 1.000 a 1 ppm. As preparações (F60-80% e Cra Iso 1,4) mostraram atividade moluscicida e foram altamente tóxicas para *A. salina*.

ABSTRACT

Lectins are proteins with the capacity of binding reversibly to carbohydrates. Aquatic snails may transmit diseases and *Biomphalaria glabrata* is the most susceptible intermediary host to *Schistosoma mansoni* in Brazil. The use of plants with molluscicidal properties could be an approach to local control of a vector. The aim of this work was to evaluate the effect of preparations containing *Cratylia mollis* seed lectin with *B. glabrata* and *Artemia salina*. The preparations were obtained by an established protocol: crude extract, ammonium sulphate fractions (F0-40%, F40-60%, F60-80%) and F40-60% affinity chromatographed through Sephadex G-75 (Cra Iso 1,4). The bioassay to evaluate molluscicidal activity used *B. glabrata* snails (5 in the preliminary or 10 in the accurate) for each preparation. In the assays, samples (12.5 mg) were solubilized in 1.25 l of dechlorinated water (W) in 1% (v/v) of dimethyl sulfoxide, DMSO (W/DMSO) to final 100 ppm concentration (24 h); samples (8 mg) were solubilized in 1 l of dechlorinated water in 1% (v/v) of dimethyl sulfoxide to final 80 ppm concentration (24 h) followed by mortality observation (maximum of 72 h). Temperature (24 to 25°C) and pH (6.0 to 7.0) were followed (begin and end of assays). Positive (50 ppm cupric carbonate solution) and negative (DMSO in water) controls were performed. Active samples had, at least, 50 % of mortality with 100 ppm. *A. salina* bioassays used larvae emerged (48 h) in Cra Iso 1,4 and F60-80%. The lectin solutions were prepared to 10,000 ppm (solubilized in sea water in 1% DMSO). Stock solutions (of each sample) were diluted with sea water (1,000-1 ppm) and contained 10 a 20 *A. salina* in the preliminary and 10 in the accurate assay. Tests were performed by 24 h and mortality was observed. Cra Iso 1,4 and F 60-80% promoted *B. glabrata* mortality in 80 and 100 ppm; these preparations exhibited *A. salina* mortality from 1,000 to 1 ppm. The preparations (F60-80% and Cra Iso 1,4) showed molluscicidal activity and were highly toxic to *A. salina*.

I - INTRODUÇÃO

I.1 Lectinas

A pesquisa por lectinas iniciou-se em 1888 quando Stilmark observou que extratos da mamona (*Ricinus communis* – ricina) aglutinavam eritrócitos, porém o estudo sobre estas proteínas só começou a ganhar ímpeto em 1960 (Sharon e Lis, 1998); abrindo uma vasta área de aplicação para lectinas (Gabor *et al.*, 2001).

As lectinas pertencem a uma classe de proteínas ubíqua na natureza que se ligam reversivelmente a mono e oligossacarídeos de glicoconjugados eucarióticos, não apresentam atividade catalítica e ao contrário dos anticorpos, não são produtos de uma resposta imune (Sharon e Lis, 2001).

Cada molécula de lectina contém dois ou mais sítios de ligação para carboidratos; di ou polivalentes. Conseqüentemente, quando as lectinas interagem com células, por exemplo, eritrócitos, seus sítios se combinarão com açúcares da superfície das células podendo provocar uma ligação cruzada das células, bem como sua subsequente precipitação, um fenômeno chamado de aglutinação celular. A hemaglutinação causada pela ligação de lectinas a carboidratos da superfície dos eritrócitos é usada rotineiramente para detecção e caracterização destas proteínas; adicionalmente a reação de precipitação de polissacarídeos ou glicoproteínas em solução é utilizada. Os eritrócitos, de humanos ou de outros animais, utilizados no ensaio de hemaglutinação podem ser tratados enzimaticamente (tripsina, papaína, entre outras) ou quimicamente (glutaraldeído ou formaldeído) aumentando assim a sensibilidade das células a lectina (Correia e Coelho, 1995; Coelho e da Silva, 2000; Mo *et al.*, 2000; Zenteno *et al.*, 2000).

As reações de aglutinação celular e precipitação de moléculas de natureza glicídica são inibidas por açúcares específicos a estas lectinas (Sharon e Lis, 2001). A capacidade para aglutinar células distingue lectinas de outras macromoléculas ligantes de açúcar como as glicosidases e glicosiltransferases (Goldstein *et al.*, 1980; Lis e Sharon, 1986). Os carboidratos interagem com lectinas através de pontes de hidrogênio, coordenação metálica, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas (Elgavish e Shaanan, 1997). O termo lectina (originado do latim "*lectus*") foi introduzido por Boyd e Shapleigh no ano de 1954,

em virtude da capacidade de algumas proteínas se ligarem a carboidratos, aglutinando seletivamente eritrócitos de um grupo sanguíneo específico (Peumans e Van Damme, 1995). Estas proteínas, ou glicoproteínas têm sido purificadas principalmente de sementes maduras de leguminosas, como únicas ou múltiplas formas moleculares (Sharon e Lis, 1990; Paiva e Coelho, 1992; Suscelan *et al.*, 1997; Konozy *et al.*, 2003). O interesse em lectinas de sementes também pode ser atribuído à importância destas como uma fonte rica de proteínas na dieta (Machuka *et al.*, 1999). Contudo, as lectinas também têm sido obtidas de diferentes tecidos vegetais como casca, bulbo, vagem, raiz, folhas e frutos (Yamashita *et al.*, 1992; Mo *et al.*, 1993; Koike *et al.*, 1995; Kamemura *et al.*, 1996a; Kamemura *et al.*, 1996b; Witisuwannakul *et al.*, 1998).

Com base na estrutura geral das proteínas as lectinas de plantas têm sido subdivididas em: merolectina, hololectina, quimerolectina e superlectina (Peumans e Van Damme, 1998). Merolectinas são aquelas que possuem apenas um domínio para ligação a carboidratos. Elas são monovalentes e por isso não podem precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Hololectinas também possuem domínio específico para ligação a carboidratos, mas contêm pelo menos dois domínios idênticos ou mais domínios homólogos ligantes a açúcares, di ou multivalentes, aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas pertence a este grupo. Quimerolectinas são proteínas com um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio não relacionado. Este domínio diferente pode ter uma atividade enzimática bem definida ou outra atividade biológica, mas age independentemente dos outros domínios de ligação a carboidratos. Superlectinas consistem, exclusivamente, de pelo menos dois domínios de ligação a açúcares diferentes. Este pode ser considerado um grupo especial de quimerolectinas consistindo de dois domínios estruturalmente e funcionalmente diferentes de ligação a carboidratos (Van Damme *et al.*, 1996).

As lectinas mostraram ser inestimável ferramenta para investigação estrutural e funcional de carboidratos complexos, especialmente glicoproteínas, e para examinar mudanças que ocorrem na superfície celular durante os processos fisiológicos e patológicos, desde a diferenciação celular ao câncer (Sharon e Lis,

2001). O peso corporal dos camundongos machos e fêmeas tratados com diferentes concentrações da lectina de *Phaseolus acutifolus* diminui a medida que a concentração da lectina é aumentada. Os principais órgãos afetados foram intestino, baço e timo (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003). Na semente de *Talisia esculenta* (pitomba) a lectina teve um efeito inibitório no crescimento fúngico (Freire *et al.*, 2002); uma lectina de peixe (*Trichogaster trichopterus* (Pallus)) foi utilizada contra a invasão de bactérias (*Aeromonas hydrophila*) através da associação direta com macrófagos (Fock *et al.*, 2001); a partir das sementes de *Telfairiaa accidentalis* (abóboras) foi obtida uma lectina da família *cucurbitaceae* com atividade mitogênica, estimulando linfócitos de humanos e suínos (Togun *et al.*, 1993).

I.1.2 Purificação

A purificação de lectinas segue os métodos utilizados para separar as proteínas que aproveitam as propriedades exibidas pelas mesmas, como a carga elétrica, o tamanho e a solubilidade, as quais variam de uma proteína para outra. Como muitas proteínas se ligam a outras biomoléculas, também podem ser separadas em função dessas propriedades de ligação. A fonte protéica pode ser de origem animal, vegetal ou de células microbianas. As células precisam ser rompidas e as proteínas serão obtidas através do processo de extração (extrato bruto), com solução salina ou tampão (Kawagishi *et al.*, 2001; Mladenov *et al.*, 2002). Após a extração se inicia o fracionamento a partir da adição de um sal. Esta técnica baseia-se no fato de que muitas proteínas possuem água na sua superfície, camada de solvatação. Em função das proteínas possuírem muitos grupos carregados, a sua solubilidade depende da concentração dos sais dissolvidos, aumentando à proporção que os sais são adicionados (*salting in*) voltando a diminuir à medida que mais sais são adicionados (*salting out*). O sulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, é o sal mais usado para precipitar proteínas, porque a sua alta solubilidade permite a precipitação protéica em soluções com elevada força iônica (Heu *et al.*, 1995).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes.

O uso de técnicas cromatográficas convencionais é bastante utilizado para a purificação de lectinas, tais como, cromatografia de troca iônica e gel filtração (Zenteno *et al.*, 2000; Ratanapo *et al.*, 2001). A técnica mais utilizada atualmente é a cromatografia de afinidade desenvolvida por Cuatrecasas *et al.* (1968). Esta tem como princípio de separação a capacidade de proteínas se ligarem especificamente a outras moléculas (lectinas se ligam especificamente a carboidratos) através de ligações não covalentes. Desde que lectinas têm a propriedade de ligação a carboidratos, colunas contendo suportes polissacarídicos tais como Sephadex (polímero de glicose), Sepharose (polímero de galactose) e quitina (polímero de Nacetil glicosamina), têm sido usadas (Perez *et al.*, 1990; Umetsu *et al.*, 1991; Sato *et al.*, 1991; Correia e Coelho, 1995; Cavada *et al.*, 1998; Anuradha e Bhide, 1999; Jimbo *et al.*, 2000).

Na cromatografia de troca iônica a ligação da proteína ocorre com os grupos de carga de sinal contrário imobilizados na matriz. A coluna é lavada com solução tampão e as proteínas com nenhuma ou pouca interação com o trocador de íons são eluídas. As proteínas adsorvidas à matriz podem ser eluídas pelo aumento da força iônica ou alteração do valor do pH do meio (Datta *et al.*, 2001). São alguns exemplos de trocadores catiônicos e aniônicos Carboximetil celulose (CM) e Dietilaminoetil (DEAE) celulose, respectivamente.

A cromatografia por gel filtração ou peneira molecular, é um método simples e baseia-se na separação de biomoléculas de acordo com a diferença dos seus tamanhos. A mistura protéica passa através de uma coluna contendo esferas de gel cujos poros possuem intervalos de tamanhos relativamente estreitos. As

moléculas maiores que não podem penetrar nos poros do gel são eluídas primeiro, enquanto que as moléculas de tamanhos menores capazes de penetrar nos poros do gel vão passando mais lentamente, de modo que a separação ocorre na ordem decrescente da massa molecular (Heu *et al.*, 1995). Este tipo de cromatografia é utilizado tanto para obter preparações protéicas homogêneas (Bezerra *et al.*, 2001) como para definição da massa molecular da proteína (Kawagishi *et al.*, 2001).

I. 1.3 Lectinas-Leguminosas

Lectinas de legumes representam a maior e mais estudada família de proteínas desta classe, alguns dos 100 membros bem caracterizados, foram quase todos obtidos de sementes de plantas (Sharon e Lis, 1990; Loris *et al.*, 1998; Hamerlyck *et al.*, 1998; Van Damme *et al.*, 1997; Konozy *et al.*, 2003). Alguns exemplos bem conhecidos destas lectinas são concanavalina A (Con A), phytohemaglutinina (PHA), soybean agglutinin (SBA), peanut agglutinin (PNA) e a lectina de *Erythrina coralladendron* (ECoRL). As lectinas de legumes são extremamente úteis como um modelo para o entendimento da base molecular de interações proteína-carboidrato porque elas são fáceis de serem purificadas e exibem uma grande variedade de especificidade para açúcares. Uma importante razão pelo interesse nestas lectinas é sua similaridade estrutural com as lectinas de outras fontes, como as de animais e microorganismos (Sharon e Lis, 2001).

I.1.4 Isolectinas e Isoformas

Sharon e Lis (1990) definiram isolectinas como um grupo de proteínas intimamente relacionadas, resultantes da expressão de diferentes genes. A denominação pode ser dada em relação as diferentes atividades biológicas, como a atividade hemaglutinante e mitogênica (Aragon *et al.*, 1995). Também pode ser relacionada ao padrão de migração em gel de poliácridamida em condições não desnaturantes (Wongkham *et al.*, 1995), quanto à especificidade diferente para carboidratos (Shen *et al.*, 1993), pequenas alterações na estrutura da molécula protéica podem levar a modificações na orientação do açúcar ligado a ela

alterando, portanto, a especificidade da lectina (Ng *et al.*, 1996), diferença de carga (Kawagish *et al.*, 1997) ou quando são constatadas modificações pós-tradução (Mandal *et al.*, 1994). As múltiplas formas moleculares de lectinas presentes em extratos têm sido chamadas de isolectinas (Raz, 1988; Sharon e Lis, 1990) e elas podem ter sido originadas da expressão de diferentes genes. O termo isoforma é utilizado para designar múltiplas formas de lectinas presentes na mesma espécie ou variedade de origem genética não definida (Paiva e Coelho, 1992). Algumas espécies de plantas contêm duas ou mais proteínas com atividade hemaglutinante, por exemplo, *Vicia villosa* e *Sambucus nigra* (Tollesfsen *et al.*, 1983; Kaku *et al.*, 1990). Focalização isoelétrica, cromatofocalização, ou cromatografia de interação hidrofóbica são mais comumente utilizadas para suas separações. Contudo a elucidação das diferenças estruturais das isoformas por métodos de química de proteínas pode ser trabalhoso. Um método baseado em partículas não porosas e monolítico poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB) de fase estacionária e espectrometria de massa foi utilizado para separar isolectinas de três espécies de plantas, *Lens culinaris*, *Triticum vulgare* e *Canavalia ensiformis* (Hochleitner *et al.*, 2003). As três isolectinas da aglutinina de germe de trigo (WGA-1, WGA-2 e WGA-3) interagiram em diferentes graus com células leucêmicas e manifestaram citoaglutinação e atividade citotóxica diferentes (Ohba *et al.*, 2003).

1.1.4 *Cratylia mollis*

Cratylia mollis é o nome científico dado a uma planta nativa, perene do semi-árido do sertão de Pernambuco pertencente à família Fabaceae, popularmente conhecida como feijão camaratu ou camaratuba. É utilizada como forrageira na alimentação de caprinos e bovinos, principalmente nos períodos de estiagem prolongada, quando esta apresenta uma maior importância por permanecer verde. Esta planta é de porte arbustivo e produz grandes quantidades de sementes (Santos, 2001).

Sementes de *C. mollis* (Cra) foram avaliadas quanto à presença de lectinas. Três isolectinas (Iso) obtidas a partir de diferentes frações (F) de precipitados

salinos (F0-40%, F40-60% e F60-80%). Cra Iso 1 lectina mais abundante nas sementes desta planta purificada através de F40-60%; desta fração foi, também, obtida por cromatografia de afinidade uma preparação purificada (Cra Iso 1,4), mistura de Cra Iso 1 e sua isoforma, Cra Iso 4, separadas por cromatografia de troca iônica de acordo com Correia e Coelho (1995). Cra Iso 2 e Cra Iso 3 foram isoladas por Paiva e Coelho (1992). A classificação das isolectinas foi de acordo com a migração eletroforética em um gel para proteínas básicas nativas; Cra Iso 1 apresenta a maior migração (proteína mais básica), seguida de Cra Iso 2; Cra Iso 3 é a menos básica das três. Cra Iso 1,4, Cra Iso 1 e Cra Iso 2 pertencem à classe das lectinas que se ligam à glicose/manose, Cra Iso 3 é galactose específica, além de ser uma glicoproteína.

Cra Iso 1,4 e Cra Iso 1 vêm sendo estudadas quanto a suas aplicações em ensaios biológicos; foi observada uma forte ligação destas lectinas a tecidos transformados, particularmente aqueles originados de tecidos mamários (Beltrão *et al.*, 1996). Cra Iso 1,4 imobilizada em Sepharose 4B (Cra-Sepharose) foi capaz de isolar a enzima lecitina colesterol aciltransferase (Lima *et al.*, 1997); este complexo foi também utilizado para o estudo de glicoproteínas do soro humano (Santana *et al.*, 2001).

I.2 Atividade Moluscicida

I.2.1 Esquistossomose Mansônica

A esquistossomose, também conhecida como bilharzíase devido a Theodore Bilharz, que em 1852 descreveu um parasito intravascular para o qual deu o nome de *Distoma haematobia*, posteriormente conhecido como *Schistosoma*, (Neves *et al.*, 1995; Hmamouchi *et al.*, 1998), é uma doença parasitária conhecida a mais de 3500 anos sendo causada pela presença do verme *Schistosoma mansoni* no fígado da pessoa infectada. Esta doença é endêmica e atinge as regiões tropical e sub-tropical no mundo, afetando pessoas na África, América do Sul e Extremo Oriente (Agrawal e Singh, 1988). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, em inglês World Health

Organization, WHO), no início da década de 90, aproximadamente 200 milhões de pessoas foram infectadas por espécies do *Schistosoma* (WHO, 1993). A doença continua sendo uma das infecções parasitária mais freqüente (Chitsulo *et al.*, 2000). No Brasil, aproximadamente 8 milhões de pessoas foram infectadas, e a doença é distribuída desde o Belém do Pará ao norte do Paraná, com 2 focos isolados ao sul de Santa Catarina. As principais áreas endêmicas estão localizadas no Nordeste e no estado de Minas Gerais (Santos e Sant´Ana, 1999).

I.2.1.1 Ciclo Biológico

O *Schistosoma mansoni*, ao atingir a fase adulta do seu ciclo no sistema vascular do homem e de outros mamíferos, alcança as veias mesentéricas; as fêmeas fazem a postura ao nível da submucosa. Os ovos podem ficar presos à mucosa intestinal ou serem arrastados para o fígado. Os ovos que conseguem chegar à luz intestinal vão para o exterior junto com o bolo fecal; alcançando a água, os ovos liberam o miracídio. Os miracídios ao penetrarem em seus moluscos vetores (*Biomphalaria glabrata*), transformam-se em esporocisto I: esse, por poliembrionia, dá 150 a 200 esporocistos II, cada esporocisto dá origem a numerosas larvas denominadas cercárias, através de reprodução assexuada. As primeiras cercárias emergem cerca de um mês após a infecção do caramujo. A cercária sai para o exterior (água). Nadam ativamente e ao alcançarem a pele do homem se fixam, promovem a penetração do corpo cercariano e a concomitante perda da cauda. Após a penetração, as larvas resultantes, denominadas esquistossômulos, migram pelo tecido subcutâneo e, ao penetrarem num vaso, são levadas passivamente da pele até os pulmões. A partir das arteríolas pulmonares, os esquistossômulos chegam ao coração e de lá vai para diversas partes do corpo até chegar na rede capilar terminal: aqueles que conseguem chegar ao sistema porta intra-hepático permanecem vivos; os demais ou reiniciam o ciclo ou perecem. Uma vez no sistema porta intra-hepático, os esquistossômulos se alimentam e se desenvolvem se transformando em machos e fêmeas 30 dias após a penetração. Daí migram acasalados, para o território da veia mesentérica inferior onde farão ovoposição (Neves *et al.*, 1995).

I. 2.1.2 Sintomatologia da Esquistossomose

Na fase aguda da doença pode ocorrer uma disseminação dos ovos principalmente na parede do intestino e fígado, provocando a formação de granulomas simultaneamente. O paciente apresenta mal-estar, febre alta, emagrecimento, fenômenos alérgicos, tosse, diarreia, hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia. Pode haver morte do paciente nesta fase ou então evoluir para esquistossomose crônica.

A forma crônica apresenta grandes variações clínicas, dependendo de serem as alterações predominantemente intestinais, hepatointestinais ou hepatoesplênicas. A maioria dos casos crônicos é benigna, com predominância de alguns granulomas nodulares, e o paciente queixando-se, esporadicamente, de dores abdominais, com fases de diarreia mucossanguinolenta e outras de constipação, intercaladas de longos períodos normais. As alterações hepáticas típicas surgem a partir do início da ovoposição e formação de granulomas. Em consequência o quadro evolutivo depende do número de ovos que chega a esse órgão. São comuns aumento do fígado e bastante dor à palpação.

I.2.1.3 Transmissão e Profilaxia

As cercárias penetram ativamente. A penetração ocorre mais freqüentemente nos pés e pernas. O horário em que são vistas em maior quantidade na água e com maior atividade é entre 10 e 16 h, quando a luz solar e o calor são mais intensos (Neves et al., 1995). A água é o principal veículo de transmissão. Esta doença encontra-se em expansão devido à situação precária de saneamento básico e ao baixo nível sócio econômico de algumas regiões (Prata, 1987; Narvaéz, 1993). O aumento no número de pessoas infectadas pelo parasito está diretamente relacionado ao contato humano com águas naturais infestadas por cercárias. O controle da esquistossomose pode ser feito de dois modos: direcionado para a morbidade dos infectados ou atuar contra a transmissão da doença. O controle da morbidade é dado com a redução na ocorrência de casos hepatoesplênicos críticos, através do diagnóstico e tratamento cirúrgico dos

pacientes infectados. Para evitar a transmissão pode ser feita a interrupção do ciclo evolucionário do verme com a destruição de seu hospedeiro intermediário, o caramujo *Biomphalaria glabrata* (Prata, 1987; Katz, 1997; Lardans e Dissous, 1998).

I.2.2 Moluscos Transmissores

Os moluscos pertencem à subclasse *Pulmonata*, ordem *Basommatophora*, família *Planorbidae* e gênero *Biomphalaria*. No Brasil três espécies pertencentes ao gênero *Biomphalaria* foram encontradas eliminando cercárias em condições naturais: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*.

Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são hermafroditas capazes de autofecundação, entretanto, a reprodução cruzada é a preferida. A partir de 30 dias de idade, o caramujo atinge a maturidade sexual e ovipõe. Os ovos são contidos em massas gelatinosas (desovas), que podem conter até mais de 100 ovos. As posturas são realizadas quase que diariamente e as desovas são depositadas em superfícies flutuantes, tais como folhas de plantas e vasilhas de plástico, ou submersas no meio aquático. São necessários cerca de sete dias para ocorrer a eclosão dos pequenos caramujos.

B. glabrata é a espécie mais susceptível e se infecta com todas as linhagens geográficas do *S. mansoni*. Um exemplar pode eliminar até 17 mil cercárias por dia.

I.2.3 Compostos moluscicidas

A utilização de compostos moluscicidas constitui um meio para controlar a multiplicação e a propagação dos caramujos. O niclosamida é o único composto sintético que foi efetivamente usado como moluscicida no controle da esquistossomose (Perett e Whitfield, 1996).

O niclosamida pode matar *B. glabrata* adultos a uma concentração menor que 1,5 ppm após 2 h de exposição. O modo de ação deste composto tem recebido uma pequena atenção e é ainda incerta (Duncan, 1987). O principal inconveniente no uso do niclosamida é que sua formulação causa uma alta

mortalidade de organismos não alvo, como os peixes, nas concentrações utilizadas para matar os caramujos. O alto custo deste produto, junto aos seus efeitos tóxicos e o risco potencial de resistência, tem estimulado fortemente a pesquisa por novos moluscidas (Perrett e Whitfield, 1996).

Extratos de plantas têm sido avaliados para o controle da população do caramujo com a vantagem de que, além de serem menos tóxicos na natureza, eles podem ser degradados mais rapidamente que moluscidas sintéticos (Agrawal e Singh, 1988). Por estas razões ocorreu um impulso na pesquisa de moluscidas de fontes vegetais (Bilia *et al.*, 1999). Para ser efetivo como moluscida, o produto deve ter uma alta seletividade ao alvo nocivo (Lima *et al.*, 2002); o custo também deve ser avaliado.

Muitos extratos vegetais de diferentes espécies têm sido encontrados com toxicidade contra o caramujo e eles são propostos para o controle do vetor da esquistossomose. A introdução destas plantas ou suas partes no ambiente aquático requer a investigação precedente dos seus efeitos tóxicos em mamíferos e certamente em outros organismos não alvo. A preparação pode poluir a água de beber, e seus constituintes podem acumular-se em produtos de origem aquática, como os peixes; adicionalmente, outras espécies de organismos podem ser expostas diretamente ou através da alimentação (Matt, 1987).

Sementes e raízes de *Abrus precatorius* e sementes de *Argemone mexicana* mostraram atividade moluscida contra o caramujo *Lymnea acuminata* (hospedeiro intermediário) pertencente ao ciclo biológico do parasito *Fasciola hepática* responsável pela fasciolíase (processo inflamatório crônico do fígado e ductos biliares). Foi sugerido que o efeito moluscida da semente de *A. precatorius* pode ser devido à presença da lectina abrina, um heterodímero que consiste de uma cadeia-A e uma cadeia-B. A cadeia-A inibe a síntese protéica pela inativação da subunidade ribossomal, e a cadeia-B se liga a receptores de galactose na superfície celular; sua toxicidade é elucidada pela ligação da cadeia A e B por uma única ponte dissulfeto (Funatsu *et al.*, 1988; Evensen *et al.*, 1991). A ação moluscida de sementes de *A. mexicana* é devido à presença de alcalóides (Singh e Singh, 1998).

Das folhas de *Stryphnodendron adstringens*, *Stryphnodendron poluphyllum*, *Caryocar brasiliensis* e *Eugenia dysenterica* foram obtidos extratos altamente tóxicos ao *B. glabrata*, a 100 ppm (Bezerra *et al.*, 2002). Extratos, em clorofórmio e metanol, da família *Euphorbiaceae* (*Jatropha glauca*, *Euphorbia helioscopiane* e *Euphorbia schimperiana*) foram promissores contra *Biomphalaria pfeifferi* com valores de DL₅₀ variando de 10 a 100 ppm (Al-Zanbagi *et al.*, 2000). Extrato das cascas das raízes de *Caryopteris x clandonensis* apresentaram alta atividade moluscicida contra o caramujo *Bulinus truncatus*, hospedeiro intermediário do *schistosoma haematobium*, com uma DL₁₀₀ < 4 ppm (Hannedouche *et al.*, 2002).

Ensaio adicionais são necessários para ter uma visão mais detalhada da toxicidade dos compostos utilizados como moluscicidas, levando em consideração a sua aplicação no ambiente onde se encontram os caramujos, com a perspectiva de ser utilizado em larga escala. Extratos de folhas de *Licania carii*, *Licania pittieri*, e *Licania pyrifolia* foram seletivos para caramujos, com nenhuma toxicidade detectada para peixes (Bilia *et al.*, 1999). A partir de sementes de *Millettia thonningii* foi obtido extrato aquoso que mostrou ser moluscicida, cercaricida (Squire e Whitfield, 1989), sendo também efetivo contra a desova (Tang *et al.*, 1995). Como boa característica observou-se sua baixa toxicidade para peixe (Perrett e Whitfield, 1996).

O sal de lapachol, obtido pela adição de hidróxido de potássio ao lapachol (2-hidroxil-1,4-naftoquinona), apresentou um grau de toxicidade mais alto contra o *B. glabrata* e a cercária, que para peixes (*Tilapia nilotica*) e *A. salina*, organismos não-alvo (Lima *et al.*, 2002).

Uma outra avaliação de compostos ou extratos de plantas se faz utilizando *Artemia salina*, para que esta através de sua sensibilidade indique aqueles com menor toxicidade e, portanto, menos nocivos a organismos não-alvo. As substâncias, assim previamente selecionadas podem ser utilizadas em ensaios futuros utilizando vertebrados como, por exemplo, peixes.

I.3 *Artemia salina*

A *Artemia salina*, larva de camarão de água salgada possui de 8 a 10 mm de comprimento, pertence à classe *Brachiopoda*, subclasse *Sasostraca* e ordem Anostraca. Nada sempre de dorso, com o ventre para cima, para a luz ou claridade do ambiente em que se encontra (telotaxia ventral) e em direção à luz (orientação fotopositiva). Muito prolífica, reproduz-se com bastante facilidade e rapidez. Seus ovos, quando secos, podem ser conservados durante 10 anos, estando sempre aptos a eclodirem, desde que sejam colocados em água salgada (Bettaworld, 2002). O camarão de água salgada é um dos melhores alimentos para alevinos e peixes novos, logo que termina a reserva alimentícia do seu saco vitelino, pois é muito rico em proteínas, sendo freqüentemente cultivada para esse fim. Esse crustáceo pode tolerar salinidades que variam dos 10% da água marinha ao ponto de saturação para o cloreto de sódio. A pressão osmótica interna só varia ligeiramente com as condições externas. A regulação iônica é mantida pela absorção ou excreção dos sais através das brânquias (Barnes e Ruppert, 1996).

A. salina é um invertebrado de grande importância na indústria de aquicultura e tem sido usado, como teste alternativo para determinar a toxicidade de produtos químicos e naturais (McLaughlin *et al.*, 1991; Barahona e Sánchez-Fórtun, 1996; Parra *et al.*, 2001). O método é rápido, simples e barato e, sendo ideal para a seleção inicial de um grande número de amostras, detectando simultaneamente toxicidade e fototoxicidade, sendo utilizado como prognóstico para atividade antitumoral e pesticida (Sánchez *et al.*, 1993; Ojala *et al.*, 1999).

A toxicidade de vários tipos de saponinas foi testada contra a *Artemia*, e a maioria delas não foi tóxica para o crustáceo em concentrações suficientemente altas (Zhao *et al.*, 1999). Estudos comparativos dos efeitos de microcistinas e nodularina em *A. Salina* mostraram que estas toxinas elevaram os níveis de glutathione S-transferase para testes *in vivo* (Beattie *et al.*, 2003). Um levantamento utilizando vinte e um extratos de plantas da Amazônia Venezuelana foi efetuado, observando-se que dezessete apresentaram toxicidade significativa contra *A. salina* (Jiménez *et al.*, 2001).

A. salina em três estágios de idades (24, 48 e 72 h) foram utilizadas para estudar a toxicidade de inseticidas organofosfóricos (IOF). Em geral, aquelas com 24 h foram menos sensíveis para IOF que aquelas com 48 h; *Artemia* com 48 h foi significativamente mais tolerante que àquela com 72 h (Sánchez-Fortún *et al.*, 1996).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar as atividades moluscicida e sobre a *Artemia salina* utilizando lectina de semente de *Cratylia mollis* e suas preparações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter preparações contendo isolectinas de *Cratylia mollis*; seguindo protocolo previamente estabelecido;
- Determinar a atividade moluscicida através de ensaios preliminares e apurados das preparações contendo as isolectinas sobre *B. glabrata* e sua desova;
- Determinar a menor concentração capaz de provocar a morte de pelo menos 50% caramujos adultos e sua desova;
- Determinar a atividade sobre a *Artemia salina* utilizando as preparações ativas sobre o *B. glabrata*.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ZANBAGI, N. A.; BANAJA, A. A.; BARRETT, J. Molluscicidal activity of some Saudi Arabian Euphorbiales against the snail *Biomphalaria pfeifferi*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 70, p. 119-125, 2000.

BARAHONA, M. V.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Comparative sensitivity of three age classes of *Artemia salina* larvae to several phenolic compounds. Bulletin of **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p. 271-278.

ANURADHA, P.; BHIDE, S. V. An isolectin complex from *Trichosanthes anguina* seeds. **Phytochemistry**, v. 52, p. 751-758, 1999.

ARAGON, A. M.; CAVALLE, C. FRUHBECK, G.; TOSAR, A.; SANTIDRIAN, S. Identification and biological activity of lectins of different subunit composition isolated from *Phaseolus vulgaris* L VAR ATHROPURPUREA. **Journal Science Food Agricultural**, n. 68, p. 375-381, 1995.

BEATTIE, K. A.; RESSLER, J.; WIEGAND, C.; KRAUSE, E.; CODD, G. A.; STEINBERG, C. E. W.; PFLUGMACHER, S. Comparative effects and metabolism of two microcystinas and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. **Aquatic Toxicology**, v. 62, p. 219-226, 2003.

BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B. (1998) Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, V. 74, P. 125-34, (1998).

BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 73, p. 428-430, 2002.

BEZERRA, R. S.; SANTOS, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T.S.; COELHO, L. C. B. B.; VIEIRA, V. L. A.; CARVALHO JR, L. B. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, p. 199-210, 2001.

BILIA, A. R.; BRACA, A.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Molluscicidal and piscicidal activities of Venezuelan Chrysobalanaceae plants. **Life Sciences**, v. 66, p. 53-59, 1999.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUSA, A. M.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vaitarea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v. 49, p. 675-680, 1998.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple Method to purify miligram quantities of galactose-specific lectin from leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 1-6, 2000.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/ mannose specific, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Cmaratu bean). **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 55, p. 261-273, 1995.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**.v.77, p. 41-51, 2000.

CUATRECASAS, P.; WILCHEK, M.; ANFINSEN, C. B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. **Proceedings National Academy of Science**, v. 70, p. 636-643, 1968.

DATTA, K.; USHA, R.,; DUTTA, S. K.; SINGH, M. A comparative study of the winged bean protease inhibitors and their interaction with proteases. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, p.949-959, 2001.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, p. 462-467, 1997.

FASSINA, G.; RUVO, M.; PALOMBO, G.; VERDOLIVA, A.; MARINO, M. Novel ligands for affinity-chromatographic purification of antibodies. **Journal Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, p. 481-490, 2001.

FOCK, W. L.; CHEN, C. L.; LAM, T. J.; SIN, Y. M. Roles of an endogenous serum lectin in the immune protection of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus) against *Aeromonas hydrophila*. **Fish and shellfish Immunology**, v. 11, p. 101-113, 2001.

FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; DE SIMONE, S. G.; NOVELHO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

GABOR, F.; KLAUSEGGER, U.; WIRTH, M. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells DU-145. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 35-47, 2001.

GOLDESTINEIN, J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What would be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.

HAMELRYCK, T. W.; LORIS, R.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Structural features of the legume lectins. **Trends Glycosci. Glycobiol**, v.10, p.349-360, 1998.

HANNEDOUCHE, S.; SOUCHARD, J. P.; JACQUEMOND-COLLET, I.; MOULIS, C. Molluscicidal and radical scavenging activity of quinones from the root bark of *Caryopteris x clandonensis*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 520-522, 2002.

HEU, M. S.; KIM, H. R.; PYEUN, J. H. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.112 (B), n.3, p.557-567, 1995.

HMAMOUCHE, M., LAHLOU, M., ESAFI, N., AGOUMI, A. Molluscicidal properties of some proanthocyanidins, flavones and flavonols. **Fitoterapia**. LXIX, v. 2, p. 161-164, 1998.

HOCHLEIEITNER, E. O.; BAKRY, R.; HUCK, C. W.; FLORES, F.; STÖGGL, W. M.; STECHER, G.; BONN, G. K. Analysis of isolectins on non-porous particles and monolithic polystyrene-divinylbenzene based stationary phases and electrospray ionization mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 223-224, p. 519-526, 2003.

JIMBO, M.; YANOHARA, T.; KOIKE, K.; KOIKE, K.; SAKAI, R.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. The D-galactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellates. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 125 (B), p. 227-236, 2000.

JIMÉNEZ, G.; HASEGAWA, M.; RODRÍGUEZ, M.; ESTRADA, O.; MÉNDEZ, J.; CASTILLO, A.; GONZALEZ-MUJICA, F.; MOTTA, N.; VÁSQUEZ, J.; ROMERO-VECCHIONE, E. Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 77-83, 2001.

KAKU, h.; PEUMANS, W. J.; GOLDESTEN, I. Isolation and characterization of a second lectin (SNA-II) PRESENT IN ELDEBERRY (*Sambucus nigra* L.) Bark. **Archives Biochemistry and Biophysics**, V. 277, p. 255,1990.

KAMEMURA, K.; FURUICHI Y.; UMEKAWA H.; TAKAHASHI, T. Purification and characterization of a pod lectin from Great Northern bean, *phaseolus vulgaris* L. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 1289, p. 87-94, 1996a.

KAMEMURA, OZEKI, M.; FURUICHI Y.; UMEKAWA H.; TAKAHASHI, T. characterization of a lectin from the leaves of Great Northern bean, *phaseolus vulgaris* L. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, p.608-611, 1996b.

KATZ, N. Vacina polivalente anti-helmínticos. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento** 1, v.2, p.34-35, 1997.

KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 53-58, 2001.

KAWAGISHI, H.; MITSUNAGA, S. I.; YAMAWAKI, M.; IDO, M.; SHIMADA, A.; KINOSHITA, T.; MURATA, T.; USUI, T.; KIMURA, A.; CHIBAS, S. A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 44, n.1, p. 7-10, 1997.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. Lectins, versatile proteins of recognition: review. **Carbohydrate polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

KOIKE, T.; BEPPU, H.; KUSUYA, H.; MARUTA, K. SHIMPO, K.;SUZUKI, M.; TITANI, K.; FUJITA, K. A37kDa mannose-bind lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from “Kidachi Aloe” (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger). **Journal Biochemistry**, v. 109, p. 899-903, 1995.

KONOZY, E. H. E.; 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**, available online at www.sciencedirect.com, 2003;

LARDNAS, V.; DISSOUS, C. Snail control strategies for reduction of schistosomiasis transmission. **Parasitology Today**, v. 14, p. 413-417, 1998.

LIMA, V. L. M., CORREIA, M. T. S., CECHINEL, Y. M. N., SAMPAIO, C. A. M., OWEN, J. S.; COÊLHO, L. C. B. B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, p. 27-32, 1997.

LIMA. N. M. F.; SANTOS, A. F.; PORFÍRIO, Z.; GOULART. M. F.; SANT’ÁNA, A. E. G. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni cercariae*, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. **Acta Tropica**, v. 83, p. 43-47, 2002.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure, **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1383, p. 9-13, 1998.

MACHUKA, J. S.; OKEOLA, O. G.; ELS, J. M. V. D.; CHRISPEELS, M. J.; LEUVEN, F. V.; PEUMANS, W. J. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. **Phytochemistry**, v. 51, p. 721-728, 1999.

MCLAUGHLIN, J.; CHANG, C.; SMITH, D.; Bench top bioassay for the discovery of bioactive natural products : an update. In: Atta-ur-Rahman (Ed.), Studies in Natural Productus Chemistry. Elsevier, Amsterdan, v. 9, p388-409 1991.

MANDAL, D. K.; NIEVES, E.; BHATTACHARYYA, L.; ORR, G. A.; RPBOZ, J.; YU, Q. Purification and characterization of three isolectins of soybean agglutinin – evidence for c-terminal truncation by electropray ionization mass spectrometry. **European Journal of Biochemistry**, n. 221, p 547-553, 1994.

MO, H.; WINTER, H. C.; GOLDESTINE, I. J. Purification and characterization of a neu5Acalpha2-6Galbeta1-4GlnAc-apefic lectin from the fruiting body of the polypore mushroom Polyporus aquamosus. **The journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10623-106299, 2000.

MO, H.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J. GOLDSTEIN L. J. Purification and characterization of a mannose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs. **Archives Biochemistry and Biophysics**, V.306, P. 431-438, 1993.

NARVÁEZ, A. J. R. Relação entre estrutura química e atividade biológica nos fármacos esquistossomicidas. **Química Nova**, v. 6 (4), p.134-140, 1993.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana, c. 20, p.212-236, 9ª ed. Ed. Atheneu, 1995.

NG, K. K. S.; DRICKAMER, K.; WEIS, I. Structural analysis of monosaccharides recognition by rat liver mannose-binding protein. **Journal Biological Chemistry**, V. 271, p.663-647, 1996.

OHABA, H.; BAKALOVA, R.; MURAKI, M. Cytoagglutination and cytotoxicity of whea germ agglutinin isolectins against normal lymphocytes and cultured leukemic cell lines- relationship between structure and biological activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1619, p. 144-150, 2003.

OJALA, T.; VUORELA, P.; KIVIRANTA, J.; VUOPRELA, H.; HILTUNEM, R. A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. **Planta medica**, v. 65, I. 8, 715-718, 1999.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean) **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113-118, 1992.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine: International Journal of Phytoterapy and Phytopharmacology**, v. 8, issue 5, p. 395-400, 2001.

PEREZ, G.; HERNANDEZ, M; MORA, E. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea lehmanni*. **Phytochemistry**. V. 29, 1745, 1990.

PERRET, S.; WHITFIELD, P. J. Currently available molluscicides. **Parasitology today**, v. 12, p. 156-159, 1996.

PRATA, A. Esquistossomose mansoni. In: Doenças infecciosas e parasitárias. 7th edition. Ed. R. Veronesi, Rio de Janeiro: Guanabara, p.885-904, 1987.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: Specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 209-258, 1998a.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 199-228, 1998b.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. Syringae pv mori*. **Plant Science**, v.160, p.739-744, 2001.

RAZ, A.; CARMI, P.; PAZERINI, G. Expression of two different endogenous galactoside-binding lectins sharing sequence homology. **Cancer Research**, V. 48, p. 645, 1988.

SÁNCHEZ, C.; GUPTA, M.; VASQUEZ, M.; DE NORIEGA, Y. M.; MONTENEGRO, G. Bioassay with brine Artemia to predict antibacterial and pharmacologic activity. **Revista medica de Panama**, v. 18, p. 62-69, 1993.

SANTANA, E. G.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Use of mobilized *Cratylia mollis* seed lectin to purify human secretory IgA. **I Congresso da Sociedade brasileira de Biotecnologia - fronteiras da Biologia**, CD-Rom, no. BIO 217, 12 p., 2001.

SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal activity of the diterpenoids jatrophone and jatrofolones A and B isolated from *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. **phytotherapy Research**, v. 13, p.660-664, 1999.

SARKAR, M.; MAJENDER, G.; CHATTERJEE, T. Goat sperm membrane: lectin-binding sites of surface and lectin affinity chromatography of the mature sperm membrane antigens. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 1070, p. 198-204, 1991.

SATO, S., ANIMASHAUM, T.,; HUGHES, R.C. Carbohydrate-binding specificity of *tetracarpidium conophorum* lectin, **Journal of Biological Chemistry**, V.266, p. 11485-11494, 1991.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins - a large family of homologous proteins. **FASEB Journal**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2**. Taiwan: Kuwer Academic/Plenum Publishers, p.1 -19, 2001.

SINGH, D.; SINGH, A. Piscicidal effect of some common plants of India commonly used in freshwater bodies against target animals. **Chemosphere**, v. 29, p. 45-49, 2002.

SQUIRE, B. J.; WHITFIELD, P. J. *Millettia thonningii*: a rapid knockdown cercaricide for schistosome cercariae. **Phytotherapy Research.**, v. 3, p. 112-114, 1989.

STIMSON, W. H. Correlation of the blood-level of a pregnancy-associated alpha-macroglobulin with the clinical course of cancer. **Lancet**, v. 777, 1975.

STUART, M. C.; ELLIS, S.; GOWLLAND, L.; TUFF, S. Lectins used to prepare serum free of glycoprotein hormones for use as a matrix in radioimmunoassay. **Clinical Chemistry**, v. 27, p. 52-56, 1981.

SUSEELAN, K. N.; BHATIA, C. R.; MITRA, R. Characteristics of two major lectins from mungbean (*Vigna radiata*) seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 50, p. 211-222, 1997

TAVARES, G. A.; CARACELLI, I.; BURGUER; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; OLIVA, G. Crystallization and preliminary X-Ray studies of the lectin from the seeds of *Cratylia mollis* **Acta Crystallographic**, v. 32, p. 1046, 1996.

TOLLEFSEN, S. E.; Kornfeld, R. Isolation and characterization of lectins from *Vicia villosa* two distinct carbohydrate binding activities apresenin seed extracts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 5165-5171, 1983.

UMETSU, K.; YAMASHITA, K.; SUSUKI, T. Purification and carbohydrate-binding specificities of a blood type B binding lecting from hemolymph of a crab (*Chaybdis japonica*) **Journal Biochemistry**, V. 109, p.718-721, 1991.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S.; Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications. 452 pp., JONH WILEY & SONS, Chichester, England, 1997.

VAN DAMME, E. J. M., BRIKÉ, F., WINTER, H. C., VAN LEUVEN, F., GOLDSTEIN, I. J., AND PEUMANS, W. J. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European Journal of Biochemistry**, v. 236, p. 419-427, 1996

WHO. The control of schistosomiasis. **who Technical Report Series**, v. 830, WHO, Geneva, 1993.

WITISUWANNAKUL, R.; WITISUWANNAKUL, D. SAKULBORIRUG, C. A lectin from the barrk of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, p. 183-187, 1998.

YAMASHITA, K.; OHKURA, T.; UMETSU, K.; SUZUKI, T. Purification and characterization of A Fuc? 1- 2 Gal ? 1 - and GalNAc ? 1-specific lectins in root tubers of *Trichosanthes japonica*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 25414-25422, 1992.

ZHAO, W. M.; QIN, G. W.; LOU, L. G. Evaluation of toxicity of some saponins on brine shrimp. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 1, p. 307-311, 1999.

ZENTENO, R.; VAZQUEZ, L.; SIERRA, C.; PEREYRA, A.; SLOMIANNY, M. C.; BOUQUELET, S.; ZENTENO, E. Chemical characterization of the lectin from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) by MALDI-TOF. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 125 (B), p. 243-250, 2000.

ANEXO

4 Artigo a ser submetido ao periódico Life Sciences

***Activity of Cratylia mollis Seed Lectin Preparations on
Biomphalaria glabrata and Artemia salina***

ARAÚJO, F. F. B.; SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G.; COELHO, L C. B. B.;
PAIVA, P. M. G. & CORREIA, M. T. S.

Activity of *Cratylia mollis* Seed Lectin Preparations on *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*

ARAÚJO, F. F. B. ¹; SANTOS, A. F. ²; SANT'ANA, A. E. G. ²; COELHO, L C. B. B. ¹,
PAIVA, P. M. G. ¹ & CORREIA, M. T. S.^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50.670-420, Recife, Brasil.

²Departamento de Química, Universidade Federal de Alagoas, 57.092-970, Maceió, AL, Brasil.

Abstract

Crude extract, ammonium sulphate fractions (F0-40%, F40-60%, F60-80%) and Cra Iso 1,4, preparations of *Cratylia mollis* seed lectin, were assayed as molluscicidal natural products against adult forms and egg masses of *Biomphalaria glabrata*. The possible toxicity of the active preparations was also evaluated with *Artemia salina* (Brine shrimp). Preliminary molluscicidal activity was performed to select the preparations that could be used to the accurate assay. F60-80% and Cra Iso 1,4 presented molluscicidal activity against the snail in the accurate bioassay; 100 % of mortality of Cra Iso 1,4 and 70 % of F60-80% were obtained with 80 ppm, at 48 h. Cra Iso 1,4 (LC₉₀ = 23.581) showed more toxicity against *A. salina* than F60-80% (LC₉₀ = 62.988), but neither of them had activity with its egg mass.

Keywords: *Cratylia mollis* lectin; molluscicidal activity, *Biomphalaria glabrata*, *Artemia salina*; snail control.

* Corresponding autor. Tel.-fax: + 55-081-32718354; E-mail address: mtcorreia@bol.com.br

Introduction

Lectins, proteins ubiquitous in Nature, reversibly bind mono and oligosaccharides, do not show catalytic activity and are not products of an immune response (Sharon e Lis, 2001). Plant lectins are abundant in seeds, roots, fruits, flowers, barks, stems and leaves, where they can participate at the interaction between plants and microorganisms and defense against the attack of fungi, virus, pest and insects (Rudiger, 1998).

Legume lectins represent the largest and most thoroughly studied family of proteins of this class, some 100 members of which have been characterized, almost all obtained from plant seeds (Sharon and Lis, 1990; Loris et al., 1997; Van Damme et al., 1997; Hamerlyck et al., 1998). The legume lectins are extremely useful as a model system for the understanding of the molecular basis from carbohydrate-protein interactions since they are easy to obtain in purified form and exhibit an amazing variety of sugar specificities (Sharon and Lis, 2001).

Isolectins are defined as a protein group with close structural relation resulting from different gene expression (Sharon and Lis, 1990). Small changes in the structure of a protein molecule could lead to change sugar binding protein orientation altering the lectin specificity (Ng et al., 1996). Some species of plants contain two or more proteins with hemagglutinating activity, e.g., *Sambucus nigra* e *Vicia villosa* (Tollesfesen et al., 1983; kaku et al., 1990). The term isoform seems proper to designate multiple molecular forms present in the same species or variety of non-defined genetic origin (Paiva and Coelho, 1992).

Seeds of *Cratylia mollis*, a native Fabaceae of forage use *in natura* in the Semiarid Region of the Northeast of Brazil, contain three isolectins (Iso). Cra Iso 1 was initially purified from an ammonium sulphate fraction (F40-60%) by Correia and Coelho (1995). Cra Iso 2 and Cra Iso 3 were isolated from F60-80% and F0-40%, respectively (Paiva and Coelho, 1992). Cra Iso 1, the most predominant isoform, and Cra Iso 2, have glucose/mannose specificity; Cra Iso 3, is galactose specific. Another hemagglutinating protein, called isoform 4, is similar to Cra Iso 1. Structural and electrochemical studies with Cra Iso 1 and Cra Iso 1,4 have been performed (Tavares et al., 2000; Souza et al., 2001; Nascimento et al., 2002). Immobilized Cra Iso 1,4 / Sepharose was used to isolate plasma

glycoproteins, including lecithin-colesterol acyltransferase (Lima et al., 1997); Cra Iso 1 was applied to evaluate the binding patterns in human breast tissues (Beltrão et al., 1998).

Schistosomiasis or bilharziasis is an endemic parasitic disease caused by the worm *Schistosoma mansoni*, which affects tropical and subtropical regions of the world (Hmammouchi et al., 1998; WHO, 1993). Schistosomiasis remains one of the most prevalent parasitic infections in Brazil (Chitsulo et al., 2000); around 8 million people are infected. This disease is in a growing stage due to poverty and lack of basic sanitation. The reduction of its transmission is crucial. The use of molluscicides in the prophylactic treatment promotes the rupture of the evolutionary cycle of the worm with the destruction of the snail *B. glabrata*. The use of plants with molluscicidal properties could be an approach to local control of a vector with the advantage that, besides being less toxic in nature, they can be degraded faster than the synthetic molluscicides that have also high cost, possibly building up snail resistance and toxicity in non target organism (Agrawal and Singh, 1988). For this reasons an impulse in the search of molluscicides from vegetable sources is now achieved (Bilia et al., 1999).

The brine shrimp *Artemia salina* is an invertebrate branchiopod crustacean with 8 to 10 mm of length, with habitat in salty lakes or lagoons. They always swim back with belly up, to light direction. This crustacean has an easy and fast reproduction. When its eggs are dry, could be conserved during 10 years; to emerge they only need to be placed in sea water (Bettaworld, 2002). For biological studies it is used as an alternative test to determine toxicity of chemical and natural products (Parra et al., 2001; Varó et al., 2002).

The aim of this work was to evaluate the effect of *C. mollis* seed lectin preparations with *B. glabrata*. Additionally, *A. salina* was tested as an indicator of toxicity.

Methods

Preparations of *C. mollis* seed lectin were obtained by an established protocol (Correia e Coelho, 1995). Briefly, seeds (100 g) of camaratu bean collected in the State of Pernambuco were washed with distilled water, dried at room temperature and blended in 0.15 M NaCl (1000 ml). After 16 h of gently stirring at 4 °C, the obtained extract was submitted to ammonium sulphate fractionation resulting in fractions (F) 0-40%, F40-60%

and F60-80%. Fractions were dialysed against 0.15 M NaCl (F40-60% and F60-80%) or citrate-phosphate buffer, pH 5.5 (F0-40). F40-60% was affinity chromatographed on Sephadex G-75 column; the preparation was eluted with 0.3 M glucose in 0.15 M NaCl dialysed against 0.15 M NaCl. Cra Iso 1,4 contains Cra Iso 1 and Cra Iso 4. F 0-40% and F60-80% are enriched of Cra Iso 3 and Cra Iso 2, respectively.

The preliminary bioassay (Santos e Sant'Ana, 1999a) involved the immersion of *B. glabrata* adult snails or its eggs in extract, F0-40%, F40-60%, 60-80% and Cra Iso 1,4 diluted in dechlorinated water containing 1% (v/v) dimethyl sulfoxide to obtain 1000, 100, 10 or 1 ppm. Preparations which resulted in more than 60 % of snail mortality (F60-80% and Cra Iso 1,4) were used in the accurate bioassay. Ten healthy snails (14-18 mm) were immersed in a glass jar containing 100 or 80 ppm of lectin preparations in dechlorinated tap water. Each test was performed in duplicate, the time of exposure of the target organisms was 24 h. The molluscs were washed, placed in dechlorinated water, fed with lettuce and left under observation over 96 h. The criteria used for death of snails were inactivity, discoloration and, in case of doubt, foul odour upon crushing.

For the tests using egg mass (aged 0-1 day, containing 30 embryos) incubation with lectin preparations was performed by 24 h; observation of biological material was made until 96 h with a binocular microscope. An embryo was considered dead if the cells became opaque or desagregated. In order to verify the snails and embryos susceptibility, two control sets were used – one with cupric carbonate at 50 ppm and the other containing 0,1 % DMSO in dechlorinated water.

Brine Shrimp eggs of *Artemia salina* Leach were hatched in sea water and used after 48 h (Van-haecke et al., 1981); homogeneous second instar larvae obtained by two successive incubations for 24 h were used. The eggs were placed in tank with two compartments; the compartments with the eggs were covered in order to keep the eggs in a dark ambient. The next compartment of the tank was illuminated in order to attract shrimps through perforations at the boundary plate. After 24 h, the phototropic shrimp, which went to illuminated compartment, were collected by pipette and incubated under illumination for 24 h at room temperature.

In the preliminary bioassay shrimps were added to two vials for each dosis of 1000, 100, 10 and 1 ppm of Cra Iso 1,4 and F60-80%, with a final volume of 150 µl. In the

accurate bioassay, ten shrimps were added to each vial (from 1000 to 1 ppm) with final volume of 5 ml. In order to verify the shrimp susceptibility, at the same time of each experiment, controls were used-only with sea water. At both bioassay stages, the time of exposition of target organisms was 24 h. After this time, survivors were counted and the percentage of deaths at each dosis was recorded.

The LC₁₀, LC₅₀ and LC₉₀ values were processed from the percentage of death and logarithm concentration by probit analysis.

Results and discussion

The preliminary bioassay selected F60-80% and Cra, as the more active preparations, for accurate bioassay (Table 1). These results demonstrated a different effect of isolectin preparations on *B. glabrata* mortality. Preparations (F40-60% and F60-80%) containing glucose/mannose lectins (Cra Iso 1, Cra Iso 2 and Cra Iso 4) promoted mortality above than 60 %, however, preparation (F0-40%) enriched of galactose specific isolectin (Cra Iso 3) practically did not interfere on snail. Maybe the carbohydrate binding sites of *C. mollis* lectins were involved in the snail interaction, similarly to binding of abrin with the gastropod *Lymnaea acuminata* (Singh and Singh, 1999). In the accurate assay they showed more activity at 80 ppm than 100 ppm (Table 2). Cra Iso 1,4 presented activity similar to etanolic extract of *Xylopiya frustenceus* stem bark that promoted 90% of mortality with 90 ppm. As suggested from literature the data were judged positively if a plant extract killed snails at concentration of 100 ppm or less (Mott, 1987; Santos and Sant'Ana, 1999b).

F60-80% and Cra Iso 1,4 (100 ppm) were not active on egg mass of *B. glabrata*, similar to diterpenoids (Jantrophlones A and B) isolated from *Jatropha elliptica* that were inactives in the same concentration (Santos and Sant'Ana, 1999a).

The samples showed a high toxicity to *A. salina* with LC₉₀ <100 ppm (Table 3). Cra Iso 1,4 presented higher toxicity to brine shrimp in comparison to 21 extracts derived from different species of plant colleted in Venezuelan Amazons and alcoholic extracts of some Solanaceae of South American (Jiménez et al., 2001; Moreno-Murilo et al., 2001).

The accurate bioassays (adult snail and *A. salina*) showed that Cra Iso 1,4 toxicity is higher than F60-80%. Cra Iso 1,4 contains a high concentration of Cra Iso 1, which presented citotoxic activity against kB cells and tumour (Personal communication). Brine shrimp, is used to detect substances with antitumoral action and KB cells and tumour

(Personal communication). Brine shrimp is used to detect substances with antitumoral action and KB cell toxicity (McLaughlin *et al.*, 1995).

F0-40% was practically inactive on *B. glabrata* maybe due to structural differences among of *C. mollis* isolectins (Paiva and Coelho, 1992). The extract showed lower activity than F60-80% probable by the presence of the inactive isolectin.

The high toxicity of F60-80% and Cra Iso 1,4 to *A. salina* is not an indicative that samples will be toxic to fishes. Assays with pesticides showed different results to two species of *Artemia* (Varó *et al.*, 2002). Different compounds can be toxic to *A. salina* and did not have piscicidal activity or vice versa. Lapachol, a molluscicidal compound, was considered non toxic to *A. salina*, however was toxic to *Tilapia nilotica* (Lima *et al.*, 2002).

Conclusion

Cra Iso 1,4 and F60-80% showed molluscicidal activity and could be used in an approach to local control of the vector *B. glabrata*. The toxicity to *A. salina* is an indicative of potential use of Cra Iso1,4 and F60-80% as an inhibitor of tumour cell growth.

Acknowledgments

This work was financially supported by the National Council for Technological and Scientific Development (CNPq). We thank Maria Barbosa da Silva Reis for her technical assistance.

References

- Baszkin, A., Boissonnade, M.; Santos-Magalhães, N. S., Carvalho Júnior, L. B., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., 2000. *Cratylia mollis* lectin at air-aqueous solution interface: adsorption and lectin interactions. *Colloids and Surfaces A* 17, 191-201.
- Beltrão, E. I. C., Correia, M. T. S.; Figueredo-Silva, J. and Coelho, L. C. B. B., 1998. Binding Evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* Lectin to Human Mammary Tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 74, 125-134.
- Bilia, A. R., Braca, A., Mendez, J., Morelli, I., 2000. Molluscicidal and piscicidal activities of Venezuelan Chrysobalanaceae plants. *Life Sciences* 66, 53-59.
- Chitsulo, L.; Engels, D.; Montresor, A.; Savioli, L., 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica* 77, 41-51.
- Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., 1995. Purification of a glucose/ mannose specific, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry Biotechnology* 55, 261-273.
- Hamelryck, T. W., Loris, R., Bouckaert, J., Wins, L., 1998. Structural Features of the legumes lectins. *Trends Glycosci. Glycobiol.* 10, 349-360.
- Hmamouchi, M., Lahlou, M., Esafi, N., Agoumi, A., 1998. Molluscicidal properties of some proanthocyanidins, flavones and flavonols. *fitoteapia*. LXIX, 2, 161-164.
- Jiménez, G., Hasegawa, M., Rodríguez, M., Estrada, O., Méndez, J., Castillo, A., Gonzalez-Mujica, F., Motta, N., Vásquez, J., Romero-Vecchione, E., 2001. Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons. *Journal of Ethnopharmacology* 77, 77-83.
- Kaku, H., Peumans, W. J., Goldestein, I., 1990. Isolation and characterization of a second lectin (SNA-II) present in elderberry (*Sambucus nigra* L.) Bark. *Archives Biochemistry and Biophysics* 277, 255.

- Lima, V. L. M., Correia, M. T. S., Cechinel, Y. M. N., Sampaio, C. A. M., Owen, J. S.; Coêlho, L. C. B. B., 1997. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers* 33, 27-32.
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., Wyns, L., 1998. Legume lectin structure. *Biochemica and Biophysica Acta* 1383, 9-13.
- Maclaughlin, J., Colman-Saizarbitoria, T., Anderson, J., 1995. Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química* 18, 13-18.
- Moreno-Murillo, B., Fajardo, M. V. M., Soárez, M. M., 2001. Citotoxicity screening of some South American Solonaceae. *Fitoterapia*. 72, 680-685.
- Mott, K. E., 1987. Plant molluscicides. John Wiley and Sons LTD. Chichester, Great Britain.
- Nascimento, C. O.; Coelho, L. C. B. B.; Correia, M.T. S.; Cunha, M. G. C., 2002. Liquid-liquid extraction of lectin from *Cratylia mollis* seeds with reversed micelles. *Biotechnology Letters* 24, 905-907.
- Ng, K. K. S., Drickamer, K., Weis, I., 1996. Structural analysis of monosaccharides recognition by rat liver mannose-binding protein. *Journal Biological Chemistry* 271, 663-647.
- Paiva, P. M. G., Coelho, L. C. B. B., 1992. Purification and partial characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 36, p. 113-118,
- Parra, A L.; Yhebra, R. S.; Sardiñas, I. G.; Buella, L. I. , 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine: International Journal of Phytoterapy and Phytopharmacology* 8(5), 395-400.
- Rudiger, H., 1998. Plant lectins-more than just tools for glyco-scientistis; occurrence, structure, and possible functions, of plants lectins. *Acta Anat* 161, 130-152.
- Santos, A. F., Sant'ana, A. E. G., 1999a., Molluscicidal activity of the diterpenoids jatrophone and jatropholones A and B isolated from *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. *Arg. Phytotherapy Research* 13, 660-664.

- Santos, A. F. And Sant'ana, A. E. G., 1999b. The molluscicidal activity of plants used in Brazilian folk medicine. *Phytomedicine* 6 (6), 431-438.
- Sharon, N., Lis, H., 2001 The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2*. Taiwan: Kuwer Academic/Plenum Publishers, 1-19.
- Sharon, N., Lis., 1990. H. Legume lectins - a large family of homologous proteins. *FASEB Journal* 4, 3198-3208,
- Singh, D., Singh, A., 2002. Piscicidal effect of some common plants of India commonly used in freshwater bodies against target animals. *Chemosphere*, 29, 45-49.
- Souza, S., Correia, M. T. S., Pessoa, M. M. A., Kennedy, J., Lima Filho, J. L., Coelho, L. C. B. B., 2001. A novel model to characterize the double electric layer of lectin from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* in metallic surface. *Carbohydrate Polymers* 46 , 191-193.
- Tavares, G. A., Caracelli, I., Burguer; Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., Oliva, G., 1996. Crystallization and preliminary X-Ray studies of the lectin from the seeds of *Cratylia mollis*. *Acta Crystallographic* 32, 1046.
- Tollefsen, S. E., Kornfeld, R., 1983. Isolation and characterization of lectins from *Vicia villosa* two distinct carbohydrate binding activities presenting seed extracts. *Journal of Biological Chemistry* 258, 5165-5171.
- Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Pusztai, A., Bardocz, S., 1997. *Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications*. pp 452., Jonh Wiley & Sons, Chichester, England,
- Vanhaeck, P., Persoone, G., Claus, C., Sorgeloos, P., 1981. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf* 5, 382-387.
- Varó, I., Navarro, J. C., Amat, F., Guilhermino, L., 2002. Characterisation of Cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere* 48, 563-569.
- WHO., 1993. The control of schistosomiasis. WHO Technical Report Series, 830, WHO, Geneva.

Table 1. Preliminary assay of molluscicidal activity from *C. mollis* preparations

Number of Dead Snails					
Sample	Time (h)				Mortality
(100 ppm)	24	48	72	96	(%)
Extract	0	3	3	3	60
F0-40%	0	1	1	1	20
F40-60%	0	4	4	4	60
F60-80%	0	3	5	5	100
Cra Iso 1,4	0	5	5	5	100

Table 2. Accurate assay of molluscicidal activity from *C. mollis* preparations

Number of Dead Snails					
Sample	Time (h)				Mortality
(ppm)	24	48	72	96	(%)
F60-80%					
100	0	1	13	13	65
80	0	2	13	14	70
Cra Iso 1,4					
100	0	0	17	18	90
80	0	20	20	20	100

Table 3. Accurate assay of F 60-80 and Cra with *A. salina*

Sample (ppm)	Mortality (%)	Lethal Concentration (ppm)		
		LC ₁₀ [IC ₉₅]	LC ₅₀ [IC ₉₅]	LC ₉₀ [IC ₉₅]
F60-80%		0.415 [0.214; 0.673]	5.107 [3.840; 6.653]	62.988 [42.054; 107.838]
100	100			
80	100			
60	83			
40	89			
20	60			
10	57.5			
5	37.5			
3	45			
2	42.5			
1	27.5			
0.8	12.5			
Cra Iso 1,4		0.605 [0.423; 0.86]	3.777 [3.091; 4.635]	23.581 [17.361; 34.700]
100	100			
80	100			
60	90			
40	99			
20	90			
10	85			
5	75			
3	40			
2	37.5			
1	35			
0.8	12.5			

CONCLUSÕES

- O ensaio preliminar selecionou F60-80% e Cra Iso 1,4, preparações mais ativas, para o ensaio apurado;
- As preparações (F40-60% e F60-80%) contendo lectinas com especificidade para glicose/manose (Cra Iso 1, Cra Iso 2 e Cra Iso 4) promoveram mortalidade maior que 60 %;
- No ensaio apurado com caramujos adultos F60-80% e Cra Iso 1,4 apresentou atividade moluscicida a 80 e 100 ppm. Não foram observadas atividades com F60-80% e Cra Iso 1,4 (100 ppm) sobre a desova da *B. glabrata*;
- F60-80% com CL₉₀ de 62,988 ppm e Cra Iso 1,4 com CL₉₀ de 23,581 mostraram ser altamente tóxicos para *A. salina*;