

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DA AÇÃO DE EXTRATO DE FOLHAS DE *Schinus
terebinthifolius* NA SOBREVIVÊNCIA E NO
DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE *Aedes aegypti***

THAMARA FIGUEIREDO PROCÓPIO VASCONCELOS

ORIENTADOR: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

**COORIENTADORES: Prof. Dr. Gustavo Ferreira Martins
Prof^a. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva**

**Recife
2014**

THAMARA FIGUEIREDO PROCÓPIO VASCONCELOS

ESTUDO DA AÇÃO DE EXTRATO DE FOLHAS DE *Schinus terebinthifolius*
NA SOBREVIVÊNCIA E NO DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE
Aedes aegypti

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das
exigências para obtenção do
título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de
Pernambuco

ORIENTADOR: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

COORIENTADORES: Prof. Dr. Gustavo Ferreira Martins
Prof^a. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Data: 08 / 09 / 2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Vasconcelos, Thamara Figueiredo Procópio

Estudo da ação de extrato de folhas de *Schinus terebinthifolius* na sobrevivência e no desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti*/ Thamara Figueiredo Procópio Vasconcelos– Recife: O Autor, 2014

86 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão

Coorientadores: Patrícia Maria Guedes Paiva e Gustavo Ferreira Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2014

Inclui bibliografia

- 1. *Aedes aegypti* 2. Aroeira 3. Larva I. Napoleão, Thiago Henrique (orientador) II. Paiva, Patrícia Maria Guedes (coorientadora) III. Martins, Gustavo Ferreira (coorientador) IV. Título**

595.772

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-124

Thamara Figueiredo Procópio Vasconcelos

“Estudo da ação de extrato de folhas de *Schinus terebinthifolius* na sobrevivência e no desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti*”

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão – Presidente

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual

Data: 08 / 09 /2014

Dedico este trabalho
a **Deus**,
aos meus **pais Nilma e Nelson**,
ao meu **marido Radeval**,
aos meus **irmãos Thiago e Thaiane**,
a Thiago Henrique (orientador).
a todos a quem tenho a honra de chamar de **amigo(a)s** e
àqueles que torceram por mim
e que de alguma forma
contribuíram para a conclusão desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que iluminou o meu caminho durante esta caminhada, pela graça da vida, saúde e a oportunidade de conviver e aprender com todas as pessoas que fazem parte da minha vida, sobretudo a minha família e amigos.

Aos meus pais, **Nilma e Nelson**, pelo amor eterno, dedicação e apoio incondicional, sobrepondo toda e qualquer distância física, por sempre acreditarem em minha capacidade e me darem força quando fraquejei, de forma que nunca poderei retribuir tudo o que fizeram por mim. Amo vocês!

A **Radeval**, o marido, o amigo, o homem com o qual tenho o prazer de conviver, amar e dividir a minha vida. A essa pessoa maravilhosa que Deus colocou em meu caminho para alegrar os meus dias. Por sempre acreditar em meu potencial e me encorajar a seguir em frente. Aquele que esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida a minha sincera gratidão!

A minha **família** pelo carinho, amor, amizade, respeito, confiança, dedicação, paciência, força, por todos os momentos de aprendizado e alegria, pelos cuidados dispensados a mim, pelas palavras amigas, pelo exemplo de pessoas maravilhosas que são, por tudo que vocês fizeram por mim, para que eu me tornasse o que sou hoje. Em especial aos meus irmãos maravilhosos, **Thiago e Thaiane**, por todos os momentos vividos. Aos meus avôs, **Vó Zilica, Vô Bené, Vó Iraci e Vô Murilo**. A todos os meus **tios e tias** em especial àqueles que torceram por mim e de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui. À **Tia Nilma, Tia Neusa e Tia Norma** que, desde as primeiras leituras até os longos dias de estudo para as provas do colégio, estiveram me apoiando e me incentivando e muitas vezes cuidando de mim com muito amor e carinho.

Ao professor **Thiago Henrique Napoleão**, meu amigo e orientador, pela honra de sua amizade sincera e respeito, pelo exemplo de pessoa e profissional, por todos os ensinamentos, pelos bons momentos de convivência diária, pela confiança, apoio incondicional, paciência e incentivo. Por aceitar me orientar. Por tornar nosso trabalho menos árido, através da sua orientação diária, do seu otimismo e da sua competência. Rogo a Deus para que retribua todo apoio prestado a mim.

À professora **Patrícia Paiva**, pelo apoio, confiança, exemplo, incentivo, orientação e ensinamentos essenciais para o meu desenvolvimento durante toda a Graduação e Mestrado.

Ao professor **Gustavo Ferreira Martins** e a **Kenner Moraes Fernandes**, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, pela receptividade, disponibilidade, orientação, dedicação, apoio e pelas inúmeras ideias e metodologias que acrescentaram ao meu trabalho.

Ao professor **Emmanuel Viana Pontual** pela amizade sincera, gentileza, generosidade, paciência, exemplo de pessoa e de profissional, confiança, orientação, ensinamentos.

À professora **Daniela Navarro**, do Departamento de Química Fundamental da UFPE pela colaboração e pela disponibilidade.

Ao professor **Rafael Matos Ximenes**, do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela colaboração fundamental e pela disponibilidade imprescindível na determinação da composição fitoquímica.

Ao professor **Francis Soares Gomes**, pela honrosa amizade, confiança, respeito, paciência, e pelo apoio prestado me ensinando os primeiros passos na pesquisa acadêmica.

A todos os meus queridos amigos que de alguma forma estiveram ao meu lado, tornando os dias de trabalho mais leves. Em especial a Ana Patrícia, Carol, Lidiane, Maiara, Nataly, Leyde, Polly e Thâmarah. Deixo a todos meu agradecimento, pelo carinho, respeito, alegrias, tristezas e dores compartilhadas durante todos esses anos. Que nossa amizade seja eternizada.

A todos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Bioquímica de Proteínas da UFPE, em especial aos queridos Aline Cardoso, Belany, Bernardo, Caio, Claudio, Cynarha, Dalila, Felipe, Giselly, Ídila, Kézia, Laysa, Leandro, Lívia, Marília, Raylla, Tati e Wivi.

A todos os integrantes do Departamento de Bioquímica da UFPE, professores, funcionários e colegas.

A todos os integrantes do Laboratório de Ecologia Química pelo apoio durante os bioensaios com *A. aegypti*.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pela concessão de suporte financeiro.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram na minha formação pessoal e acadêmica. Obrigada por tudo!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o vetor da dengue, doença que acometeu cerca de 2,3 milhões de pessoas em 2013 somente nas Américas. O controle da população do vetor é a principal medida profilática no combate a essa doença, contudo os inseticidas sintéticos atualmente utilizados apresentam toxicidade não seletiva e são persistentes no ambiente. Ainda, tem crescido o número de populações do inseto resistentes a esses compostos. Todos esses fatores têm estimulado a procura por inseticidas de origem vegetal para uso no controle do *A. aegypti*. *Schinus terebinthifolius* (aroeira da praia) é uma árvore da família Anacardiaceae, nativa das Américas Central e do Sul e amplamente encontrada no Brasil. No presente estudo, o extrato de folhas de *S. terebinthifolius* foi avaliado quanto ao efeito na sobrevivência e desenvolvimento de larvas de *A. aegypti* no quarto estágio larval (L4), bem como quanto à toxicidade sobre *Artemia salina*. Adicionalmente, foram realizados: 1) avaliação do efeito do extrato no intestino médio das larvas, através de análises histológicas, microscopia eletrônica e técnicas de marcação celular; 2) separação dos metabólitos secundários presentes no extrato por extração em fase sólida; e 3) avaliação do efeito das frações contendo os metabólitos separados sobre a sobrevivência e desenvolvimento das larvas L4. O extrato de folhas foi obtido usando NaCl 0,15 M e avaliado quanto à composição fitoquímica (por cromatografia de camada delgada, CCD) e presença de lectina (atividade hemaglutinante). Larvas L4 foram incubadas com o extrato (0,3–1,35%, p/v) por 8 dias, na presença ou ausência de alimento. Proantocianidinas poliméricas, taninos hidrolisáveis, flavonoides heterosídeos e agliconas, derivados de ácido cinâmico, traços de esteroides e atividade lectínica foram detectados no extrato, o qual matou as larvas com CL₅₀ de 0,62% (larvas não alimentadas) e 1,03% (larvas alimentadas). As larvas incubadas com o extrato reagiram eliminando o conteúdo alimentar do intestino. Quanto ao efeito no desenvolvimento, as larvas (alimentadas) não alcançaram o estágio de pupa nos tratamentos com concentrações entre 0,5% e 1,35%, enquanto que no controle 61,7% dos indivíduos emergiram como adultos. O extrato (1,0%) promoveu intensa desorganização no epitélio do intestino médio das larvas, incluindo deformação e hipertrofia de células, rompimento de microvilosidades e vacuolização do citoplasma, afetando células digestivas, enteroendócrinas, regenerativas e proliferativas; além disso, células com fragmentação de DNA foram observadas. Separação dos componentes do extrato por extração em fase sólida resultou em duas frações com atividade larvicida contendo derivados de ácido cinâmico (F1) e flavonoides (F2). Os derivados cinâmicos constituem agentes larvicidas mais eficientes, uma vez que F1 causou mortalidade em um período mais curto que F2. A lectina presente no extrato foi isolada, mas não mostrou nenhum efeito deletério sobre as larvas. O extrato e a fração contendo os derivados de ácido cinâmico (F1) foram tóxicos para náuplios de *A. salina*, enquanto que a fração contendo flavonoides (F2) mostrou baixa toxicidade. Em conclusão, extrato de folhas de *S. terebinthifolius* causou danos ao intestino médio de larva de *A. aegypti*, interferindo na sobrevivência e desenvolvimento desse inseto. O efeito larvicida do extrato pode ser atribuído a derivados de ácido cinâmico e flavonoides. Os dados obtidos utilizando *A. salina* indicam que é necessário cuidado no emprego desse extrato como agente larvicida, sendo o efeito artemicida ligado à presença dos derivados cinâmicos.

Keywords: Aroeira da praia; atividade larvicida; mosquito da dengue; intestino médio; *Artemia salina*; derivados cinâmicos; flavonoides.

ABSTRACT

The mosquito *Aedes aegypti* is the vector of dengue fever, disease that affected about 2.3 million of people in 2013 only in America. The control of vector population is the main prophylactic measure in the combat to this disease but the synthetic insecticides currently used show unselective toxicity and are persistent in the environment. Also, the number of insect population resistant to these compounds has increased. All these factors have stimulated the search for insecticides from plant origin for use in control of *A. aegypti*. *Schinus terebinthifolius* (Brazilian pepper tree) is a tree from Anacardiaceae family, native from Central and South America and broadly distributed in Brazil. In the present study, a leaf extract from *Schinus terebinthifolius* was evaluated for effects on survival and development of *A. aegypti* fourth instar larvae (L4), as well as for toxicity to *Artemia salina*. In addition, it was performed: 1) evaluation of extract effects on midgut of larvae through histological analysis, electron microscopy and cell labeling techniques; 2) separation of secondary metabolites present in the extract by solid phase extraction; and 3) evaluation of the effect of fractions containing the separate metabolites on survival and development of L4 larvae. Leaf extract was obtained using 0.15 M NaCl and evaluated for phytochemical composition and lectin activity (hemagglutinating activity). Early L4 larvae were incubated with the extract (0.3–1.35%, w/v) for 8 days, in presence or absence of food. Polymeric proanthocyanidins, hydrolysable tannins, heterosid and aglycone flavonoids, cinnamic acid derivatives, traces of steroids, and lectin activity were detected in the extract, which killed the larvae at an LC₅₀ of 0.62% (unfed larvae) and 1.03% (fed larvae). The larvae incubated with the extract reacted by eliminating the gut content. In regard to effect on development, no larvae reached the pupal stage in treatments at concentrations between 0.5% and 1.35%, while in the control (fed larvae), 61.7% of individuals emerged as adults. The extract (1.0%) promoted intense disorganization of larval midgut epithelium, including deformation and hypertrophy of cells, disruption of microvilli, and vacuolization of cytoplasm, affecting digestive, enteroendocrine, regenerative, and proliferating cells; also, cells with fragmented DNA were observed. Separation of extract components by solid phase extraction resulted in two fractions with larvicidal activity, containing cinnamic acid derivatives (F1) and flavonoids (F2). The cinnamic acid derivatives constitute more effective larvicides since F1 caused mortality in a short time than F2. The lectin present in the extract was isolated, but did not show deleterious effects on larvae. The extract and the fraction with cinnamic acid derivatives (F1) were toxic to *A. salina* nauplii, while the flavonoids fraction (F2) showed low toxicity. In conclusion, *S. terebinthifolius* leaf extract caused damage to the midgut of *A. aegypti* larvae, interfering with survival and development. The larvicidal effect of the extract can be attributed to cinnamic acid derivatives and flavonoids. The data obtained using *A. salina* indicates that caution should be used when employing this extract as a larvicidal agent, being the artemicidal effect linked to the presence of cinnamic derivatives.

Keywords: Brazilian pepper tree; larvicidal activity; dengue mosquito; midgut; *Artemia salina*; cinnamic derivatives; flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

<u>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</u>	Pág.
Figura 1 – Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> , compreendendo as fases de adulto (A), ovo (B), larva (C) e pupa (D).	16
Figura 2 – Ações que um arbovírus deve exercer no corpo de um mosquito para que esse se torne um vetor de transmissão durante o repasto sanguíneo.	19
Figura 3 – Distribuição mundial da dengue em 2013.	21
Figura 4 – Representação do trato digestivo de mosquito <i>A. aegypti</i> adulto.	23
Figura 5 – Fotomicrografias do intestino médio de larvas de <i>A. aegypti</i> .	24
Figura 6 – Exemplos de metabólitos secundários produzidos por plantas pertencentes às classes dos alcaloides (A), terpenóides (B), flavonoides (C), ligninas (D), taninos (E) e compostos cinâmicos (F).	29
Figura 7 - <i>Schinus terebinthifolius</i> . Aspecto geral da planta (A). Inflorescência (B). Infrutescência não madura (C).	33
<u>ARTIGO</u>	
Figure 1. <i>Aedes aegypti</i> L ₄ larvae incubated for 12 h with <i>Schinus terebinthifolius</i> leaf extract (1.0%, w/v). (A) Larva eliminating the food bolus covered by the peritrophic matrix. (B) Shrunken and pigmented gut dissected from a larva incubated with the leaf extract. (C) Gut dissected from a control larvae, after removal of food bolus and peritrophic matrix, without apparent alterations.	62
Figure 2. Toluidine Blue stained histological sections of the midgut of <i>Aedes aegypti</i> L ₄ larvae from control (A) and incubated for 12 h with the <i>Schinus terebinthifolius</i> leaf extract (B). Midgut from control larva (A) showed a single-layered epithelium (ep) constituted by digestive (dc) and regenerative cells (rc) with preserved morphology (C). L- midgut lumen; m- muscle; n- digestive cell nuclei. Midgut from treated larva (B) showed intense disorganization of epithelial layer (ep) with several spaces between cells (*) and some hypertrophied digestive cells (dc). Tissue/cell debris (arrow head) is seen into midgut lumen. m- muscle; n- digestive cell nucleus; pm- peritrophic matrix (pm). Details of columnar digestive cells of control (C) and treated (D) larvae. Structure resembling vacuoles (v) are seen in D. n- cell nucleus; N- nucleolus; B- brush border.	66
Figure 3. Midgut of <i>Aedes aegypti</i> L ₄ larvae incubated for 12 h with distilled water (control) and <i>Schinus terebinthifolius</i> leaf extract at 1.0% (w/v). (A) Total mounting of larvae midgut stained with DAPI (blue) evidencing the nuclei of digestive (arrow) and regenerative (arrow head) cells. (B) Enteroendocrine (FMRF-imunorreactive) cells at the posterior region of larvae midgut.	67

Figure 4. Number of different cell types at the midgut of *A. aegypti* L₄ larvae from control and incubated for 12 h with the *Schinus terebinthifolius* leaf extract (1.0%, w/v). (A) Digestive, regenerative, and enteroendocrine cells from midgut epithelium were counted using fluorescence microscopy techniques. (B) Number of proliferating regenerative cells or in apoptotic process in the midgut epithelium determined by fluorescence microscopy. (*) indicates significant difference ($p < 0.05$) in comparison with control. 68

Figure 5. Cells in proliferation and apoptosis processes at midgut of *Aedes aegypti* L₄ larvae incubated for 12 h with distilled water (control) and *Schinus terebinthifolius* leaf extract at 1.0% (w/v). (A) Nuclei of proliferating (phosphohistone H3-positive) regenerative cells (arrow) at the posterior region of midgut. (B) Nuclei of digestive and regenerative cells positive for apoptosis (arrow head). 69

Figure 6. Proliferating regenerative cells or cells with nuclear DNA damage in the midgut of *Aedes aegypti* L₄ incubated for 12 h with distilled water (control) and *Schinus terebinthifolius* leaf extract at 1.0% (w/v). (A) Nuclei of proliferating (phosphohistone H3-positive) regenerative cells (arrow) at the posterior region of the midgut. (B) Nuclei of digestive and regenerative cells positive for DNA damage/fragmentation (arrowhead). 70

LISTA DE TABELAS

	Pág.
<u>ARTIGO</u>	
Table 1. Development systems and revealers used for analysis by thin-layer chromatography of secondary metabolites in methanol fraction from <i>S. terebinthifolius</i> leaf extract.	55
Table 2. Acute effects of <i>Schinus terebinthifolius</i> leaf extract on <i>Aedes aegypti</i> larvae after 24 h, in bioassays performed adding or not food in the start of experiment.	63
Table 3. Mortality and life stages reached after 8 days by <i>A. aegypti</i> individuals incubated with <i>S. terebinthifolius</i> from the fourth larval stage.	64
Table 4. <i>Aedes aegypti</i> L4 mortality rates after incubation with fractions (F1, F2, and F3) obtained after the separation of secondary metabolites from <i>Schinus terebinthifolius</i> leaf extract.	72

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1. <i>Aedes aegypti</i>	16
2.1.1. Características gerais e ciclo de vida	16
2.1.2. Papel como vetor de doenças	18
2.1.3. Intestino médio	22
2.2. Controle de insetos	25
2.2.1. Controle do <i>A. aegypti</i>	26
2.3. O microcrustáceo <i>Artemia salina</i> como indicador da toxicidade	27
2.4. Componentes da defesa química das plantas e uso como potenciais agentes inseticidas	28
2.5. <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	32
3. OBJETIVOS	36
3.1. Geral	36
3.2. Específicos	36
4. REFERÊNCIAS	38
5. ARTIGO	48
<i>Schinus terebinthifolius</i> leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of <i>Aedes aegypti</i> larvae	
6. CONCLUSÃO	86

1. INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti*, vetor de doenças comuns em países tropicais e subtropicais – como a dengue, a febre chicungunha e a febre amarela – é um mosquito adaptado ao ambiente urbano e utiliza preferencialmente recipientes com água limpa e parada para o desenvolvimento de sua fase larvária (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014). A dengue está entre as mais importantes doenças virais transmitidas por artrópodes, tendo sido estimado em 2,3 milhões o número de casos nas Américas em 2013 (BHATT *et al.*, 2013; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014). Nos últimos 50 anos a incidência dessa doença aumentou trinta vezes, atingindo novos países; essa expansão está relacionada com o aumento da incidência de seus vetores e com a indisponibilidade de vacina, estando o controle focado principalmente na redução da densidade populacional do vetor (GOMES *et al.*, 2005; GUZMAN *et al.*, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014a).

As medidas de controle da população de *A. aegypti* incluem melhoramento de condições sanitárias, campanhas de conscientização da população, visando a eliminação dos focos de proliferação do mosquito, e através do uso de inseticidas (MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2014). Contudo, a utilização excessiva de inseticidas têm aumentado a pressão de seleção, favorecendo indivíduos resistentes. Ainda, os inseticidas químicos mais comumente utilizados são persistentes no ambiente e apresentam efeitos adversos contra organismos não-alvo (AIUB *et al.*, 2002; POUPARDIN *et al.*, 2008; MELO-SANTOS *et al.*, 2010).

Nesse cenário, tem crescido a busca por novos agentes inseticidas, visando ampliar o leque de possibilidades para emprego no controle de insetos, o que é fundamental para minimizar os efeitos do desenvolvimento de resistência. Os inseticidas de fontes naturais são intensivamente estudados por serem biodegradáveis e geralmente serem mais específicos,

apresentando menor toxicidade para organismos não-alvo (PONTUAL *et al.*, 2012; MURRAY *et al.*, 2013).

As plantas são as principais fontes de inseticidas naturais, produzindo diversos constituintes químicos para a própria defesa contra insetos (CICCIA *et al.*, 2000; OMENA *et al.*, 2007). Extratos de plantas, óleos essenciais e compostos isolados, sejam produtos do metabolismo primário ou secundário, têm sido descritos como agentes tóxicos, reguladores de crescimento, repelentes contra mosquitos, dentre outras atividades (AMER *et al.*, 2006a; 2006c; COSTA *et al.*, 2012; DELETRE *et al.*, 2013; KAMIABI *et al.*, 2013; KANIS *et al.*, 2013; NAVARRO *et al.*, 2013; PONTUAL *et al.*, 2014).

Larvas e adultos de *A. aegypti* possuem condições de vida distintas que refletem em suas características morfológicas e fisiológicas. Para que uma larva se transforme em adulto, é necessário que ela acumule reservas energéticas durante o estágio larval e passe por uma transformação global do corpo, incluindo um profundo rearranjo celular a nível intestinal (BRUSCA e BRUSCA, 2007). Assim, qualquer interferência no desenvolvimento do intestino médio pode afetar a metamorfose e até mesmo provocar redução da fertilidade de adultos (FERNANDES *et al.*, 2014). Os inseticidas que atuam sobre as larvas têm recebido maior atenção que os agentes adulticidas, uma vez que previnem a emergência da forma adulta – transmissora de doenças e com maior capacidade de dispersão – e as larvas permanecem limitadas geograficamente ao seu criadouro (FARNESI & VALLE, 2013).

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) é uma planta popularmente conhecida como aroeira da praia, sendo encontrada no Brasil desde o Nordeste até o Sul do país (LORENZI, 2008). Compostos identificados em *S. terebinthifolius* apresentam diversas atividades biológicas, tais como atividades antialérgica, antitumoral, mitogênica, antimicrobiana e larvicida (LLOYDE *et al.*, 1977; JAIN *et al.*, 1995; CAVALHER-

MACHADO *et al.*, 2008; MATSUO *et al.*, 2011; PAWLOWSKI *et al.*, 2011; PRATTI *et al.*, 2015;).

Geralmente, os compostos de origem vegetal são consideravelmente menos prejudiciais ao ambiente, ou até mesmo inócuos, mas não se pode excluir a possibilidade de que eles exerçam efeitos deletérios sobre organismos não-alvo. O ensaio de toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina* (Classe Brachiopoda, família Artemiidae) é um modelo eficiente para avaliar a ecotoxicidade de compostos em ambientes aquáticos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014).

O presente estudo teve como objetivos determinar os efeitos de extrato salino de folhas de *S. terebinthifolius* na sobrevivência e no desenvolvimento de larvas de *A. aegypti* no quarto estágio (L4), investigar os danos causados pelo extrato no intestino médio das larvas e determinar a toxicidade ambiental do extrato utilizando como modelo *A. salina*. Adicionalmente, foi realizada a separação dos metabólitos secundários do extrato, bem como isolamento da lectina (SteLL) presente no extrato. As frações contendo metabólitos e a lectina purificada foram avaliados quanto ao efeito deletério contra as larvas.

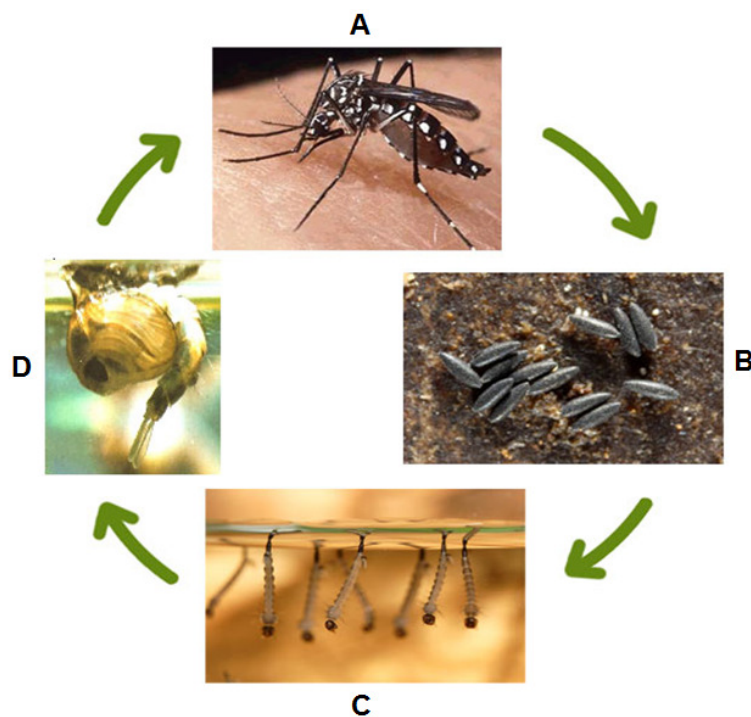
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. *Aedes aegypti*

2.1.1. Características gerais e ciclo de vida

O *A. aegypti* é um mosquito pertencente à família Culicidae e ao subgênero *Stegomyia*, sendo originário da África, mas atualmente presente em praticamente todos os países tropicais e subtropicais. Os adultos dessa espécie possuem como a principal característica a coloração preta, com escamas e manchas branco-prateadas no tórax e abdômen e com listras brancas nas pernas traseiras (Figura 1A). Provavelmente, o *A. aegypti* foi introduzido no Brasil na metade do século XIX, através de navios negreiros (SILVA *et al.*, 2008).

Figura 1 – Ciclo de vida do *Aedes aegypti*, compreendendo as fases de adulto (A), ovo (B), larva (C) e pupa (D).



O ciclo de vida (Figura 1) é holometabólico, uma vez que o inseto sofre metamorfose completa durante o seu desenvolvimento. Tal ciclo de vida compreende os estágios de ovo, larva (quatro instares), pupa e adulto, sendo as larvas bem diferentes da forma adulta. O desenvolvimento holometabólico possibilita que os estágios imaturos e os adultos se especializem na utilização de diferentes recursos, reduzindo a competição intra-específica nos diferentes estágios do desenvolvimento. No entanto, essas diferenças implicam em mudanças estruturais drásticas nos indivíduos durante o ciclo de vida, afetando tanto a estrutura externa quanto os órgãos internos (GULLAN e CRANSTON, 2007; SILVA *et al.*, 2008).

Os ovos de *A. aegypti* são muito resistentes podendo sobreviver vários meses sem contato com a água. As larvas possuem um modo de vida independente, por não necessitarem de cuidados parentais, e eficiente, mas, devido a sua dependência do meio aquático, tem capacidade de disseminação restrita. No estágio de pupa, ocorre o remodelamento das estruturas larvais em estruturas de indivíduos adultos, os quais são alados, disseminando-se rapidamente pelo ar. As fêmeas se alimentam de sangue para maturação dos ovos, sendo responsáveis pela transmissão de doenças causadas por diferentes arbovírus (GULLAN e CRANSTON, 2007; SILVA *et al.*, 2008). As fêmeas infectadas com um dos sorotipos do vírus da dengue se tornam um vetor permanente e, ainda, há possibilidade de cerca de 30 a 40% da sua prole já nascer infectada (<http://www.dengue.pr.gov.br>).

O tempo do ciclo de vida do *A. aegypti* (do ovo à forma adulta) pode variar conforme disponibilidade de alimentos, quantidade de larvas existentes no mesmo criadouro, temperatura, umidade, bem como presença de toxinas e de outros organismos. Em condições favoráveis, o desenvolvimento do mosquito a partir da eclosão do ovo até a forma adulta leva um período de 10 dias (GULLAN e CRANSTON, 2007).

A temperatura influi tanto direta como indiretamente sobre a alimentação, crescimento e desenvolvimento dos insetos, de forma que a duração do período larval normalmente diminui com a elevação térmica (SILVEIRA- NETO *et al.* 1976; GULLAN e CRANSTON, 2007). Segundo Beserra *et al.* (2006) a temperatura favorável ao desenvolvimento de *A. aegypti* em condições de laboratório encontra-se entre 22°C e 30°C. No ambiente natural, a temperatura ideal para o desenvolvimento da larva está entre 25 e 30°C. Abaixo e acima destas temperaturas o *A. aegypti* diminui sua atividade, sendo que as larvas não conseguem sobreviver em temperaturas acima de 42°C e abaixo de 5°C (<http://www.sanofi.com.br>).

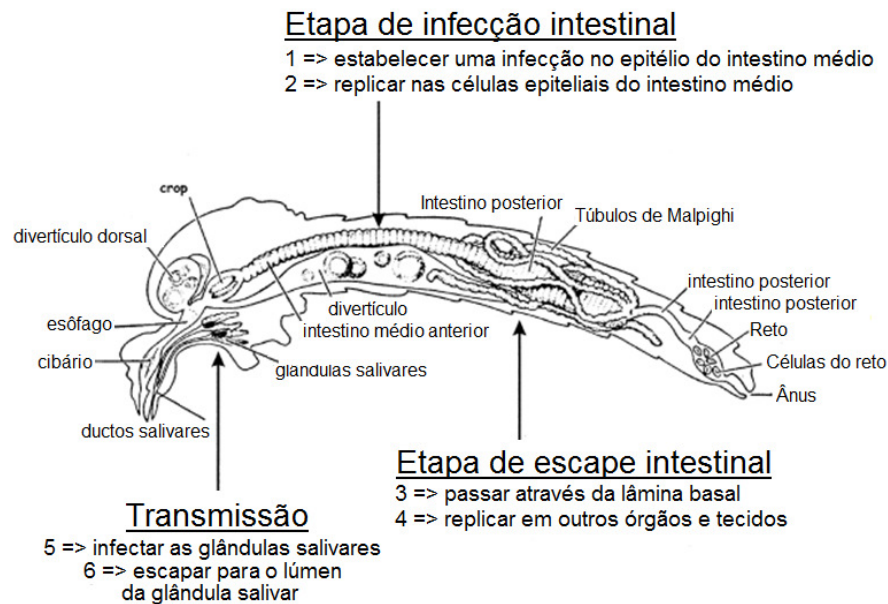
A densidade populacional influencia no desenvolvimento dos insetos de forma semelhante ou até mais pronunciada do que a escassez de alimento, já que o aumento na densidade sem correspondente aumento na disponibilidade de recursos alimentares leva ao deslocamento, exclusão, canibalismo ou mesmo à morte por inanição (TAUBER *et al.*, 1986; MERCER, 1999; HOOPER *et al.*, 2003). De acordo com Beserra *et al.* (2009), o aumento da densidade é mais prejudicial ao desenvolvimento larval de *A. aegypti* do que às demais fases do desenvolvimento.

2.1.2. Papel como vetor de doenças

O *A. aegypti* é conhecido principalmente como mosquito da dengue, pois é o principal vetor dessa doença. No entanto, ele também é responsável pela transmissão de outras doenças, como a febre amarela e a febre chicungunha. Um mosquito se torna vetor de uma doença ao adquirir o vírus durante o repasto sanguíneo. O vírus infecta as células epiteliais do intestino médio e, dentro dessas células, passa por um processo de maturação, se disseminando então do epitélio intestinal para órgãos secundários, tais como as glândulas salivares. A partir das

glândulas salivares, o vírus pode ser transmitido para o homem através da picada do inseto (BLACK *et al.*, 2002). Esse processo está esquematizado na Figura 2.

Figura 2 – Ações que um arbovírus deve exercer no corpo de um mosquito para que esse se torne um vetor de transmissão durante o repasto sanguíneo.



Adaptado de: Black *et al.* (2002)

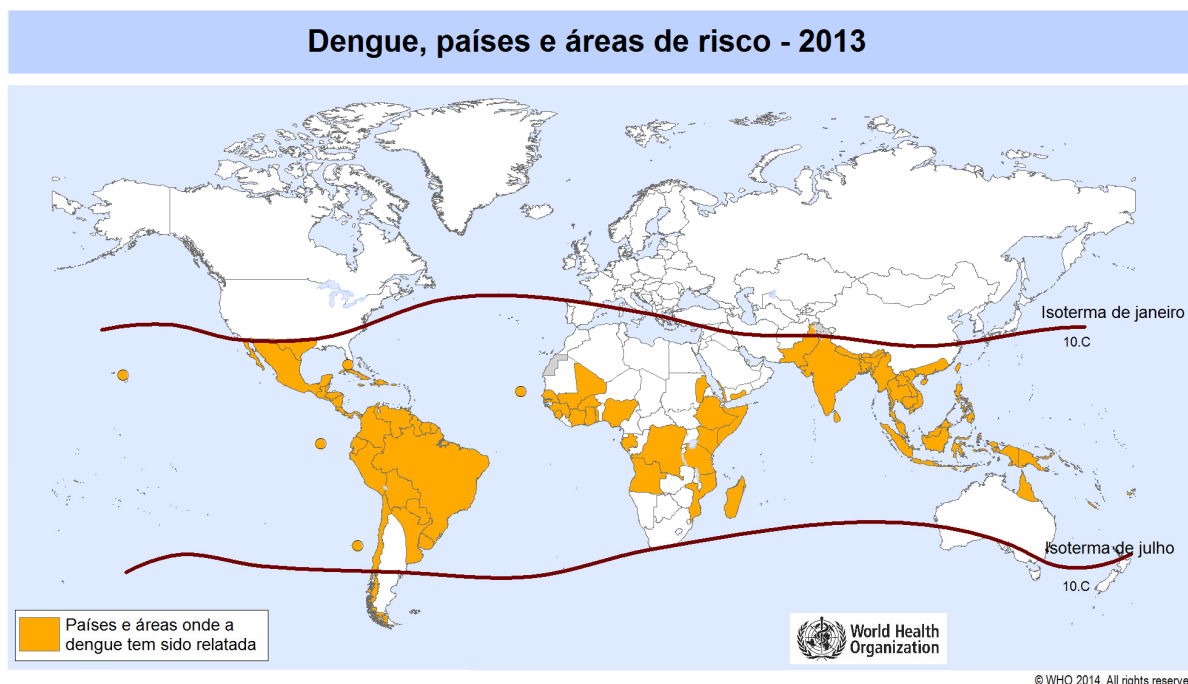
A febre amarela é uma doença infecciosa aguda causada pelo arbovírus YFV, pertencente ao gênero *Flavivirus*. Essa doença ocorre na América do Sul e na África, sendo o *Aedes aegypti* o vetor em meio urbano, enquanto mosquitos do gênero *Haemagogus* atuam como vetores no ambiente silvestre (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014b; FIOCRUZ, 2014a). Atualmente, a vacina disponível para essa doença possui validade de dez anos, devendo ser tomada por pessoas que moram em área com risco de transmissão ou para as que irão viajar para essas áreas, tais como regiões de matas e rios dos Estados da Região Norte e Centro-Oeste, bem como o Maranhão, sudoeste do Piauí, oeste e extremo-sul da Bahia, Minas Gerais, oeste de São Paulo, norte do Espírito Santo, oeste dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio

Grande do Sul. Para os viajantes internacionais, essa vacina é uma exigência sanitária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014b).

A febre chicungunha é uma doença causada pelo vírus CHIKV, do gênero *Alphavirus*. Os seus sintomas são semelhantes aos da dengue, porém mais dolorosos; no entanto, essa doença é menos letal. A sua transmissão é restrita a países da África e Ásia, porém países como EUA, Canadá, Guiana Francesa, Martinica, Guadalupe e Brasil possuem registros de casos importados. No Brasil, até o mês de agosto de 2014 foram relatados 33 casos da doença, todos adquiridos no exterior e, até o momento, não há indícios de que o vírus esteja circulando pelo país (PORTAL DA SAÚDE, 2014).

A dengue e sua forma mais severa, chamada dengue hemorrágica, estão dentre as mais importantes doenças virais transmitidas por artrópodes e são causadas por quatro diferentes sorotipos do vírus DEN, pertencente ao gênero *Flavivirus*. Estima-se que 390 milhões de infecções ocorram anualmente em mais de 100 países tropicais e subtropicais (BHATT *et al.*, 2013). A Figura 3 apresenta as áreas de risco de infecção de dengue em 2013, de acordo com a Organização Mundial de Saúde.

Figura 3 – Distribuição mundial da dengue em 2013.



Fonte: Organização Mundial da Saúde (<http://www.who.int/ith/en/>)

Os primeiros relatos de dengue ocorridos no Brasil datam do final do século XIX e início do século XX. Em 1955, o Brasil erradicou o *A. aegypti*, mas no final da década de 1960 o vetor foi encontrado novamente e atualmente está distribuído por todos os estados brasileiros. Na América Latina, as epidemias de dengue tornaram-se frequentes a partir do início dos anos 80 (GOH *et al.*, 1987).

Uma pesquisa realizada entre 2000 e 2010 revelou que os casos de dengue no Brasil estão cada vez mais graves. O número de mortes e a quantidade de hospitalizações nesse período cresceram em razão não só da alta incidência da doença, mas também em função da circulação simultânea dos quatro sorotipos do vírus no país. A maioria da população está susceptível ao sorotipo 4 do vírus da dengue, já que ele passou a circular no país mais recentemente (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Em 2013, cerca de 2,3 milhões de casos de dengue foram relatados nas Américas, caracterizando um surto. No Brasil, o número de óbitos por dengue em novembro de 2013

atingiu o dobro de 2012 e o número de casos prováveis da doença superou 1,4 milhão (ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE, 2014). Em 2014, o número de casos de dengue registrados no Brasil nos dois primeiros meses caiu 80% em relação ao mesmo período do ano anterior. Ao todo, foram notificados 87 mil casos entre janeiro e fevereiro de 2014, contra 427 mil nos dois primeiros meses de 2013 (FIOCRUZ, 2014b). No entanto, essa drástica redução não corresponde a uma real diminuição da incidência da doença no Brasil, já que o ano de 2013 foi considerado um ano atípico, com incidência extremamente elevada.

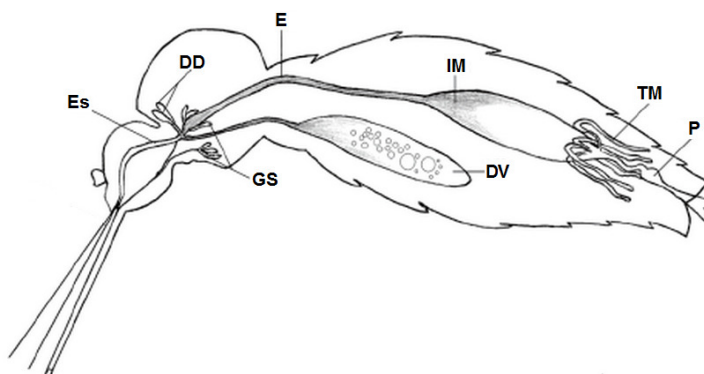
Em geral, o aumento drástico da incidência da dengue nos últimos anos é atribuído ao aumento da população mundial do *A. aegypti* e do *Aedes albopictus* e à indisponibilidade de drogas específicas ou vacinas (GUZMAN *et al.*, 2010; WHITEHEAD *et al.*, 2007; <http://www.breakdengue.org>). Dessa forma, a principal forma de combate a essa doença ainda é a interrupção do seu ciclo de transmissão, tendo como principais alvos os estágios imaturos aquáticos do vetor e os mosquitos adultos.

2.1.3. Intestino médio

O trato digestivo de insetos se divide em três regiões (Figura 4): anterior (estomodeu), mediana (intestino médio) e posterior (proctodeu). A região anterior está relacionada com a ingestão e trituração do alimento. O intestino médio produz e secreta enzimas digestivas e absorve produtos da digestão, enquanto a região posterior absorve água, sais e outras moléculas importantes, bem como recebe o material remanescente da digestão e a urina (produzida pelos túbulos de Malpighi) a serem excretados. O epitélio do trato digestivo possui uma camada de células por toda a extensão do canal e está apoiado em uma membrana basal, envolvida por fibras musculares dispostas em duas camadas formando uma camada muscular

irregularmente desenvolvida (Figura 5A). Cada região do trato digestivo apresenta diversas especializações locais (GULLAN e CRANSTON, 2007).

Figura 4 – Representação do trato digestivo de mosquito *A. aegypti* adulto.



Es: esôfago; GS: glândulas salivares; DD: divertículo dorsal; DV: divertículo ventral; E: estomodeu; IM: intestino médio; P: proctodeu; TM: túbulos de Malpighi.

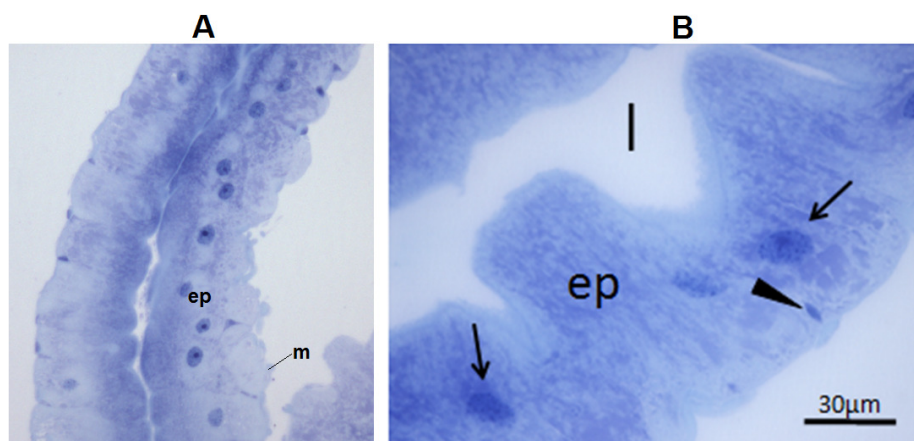
Adaptado de: Gusmão *et al.* (2007)

O intestino de larvas de insetos é considerado uma interface com o meio externo e está relacionado com a homeostasia, osmorregulação e digestão (BERNICK *et al.*, 2007). Interferências no funcionamento e estrutura desse órgão podem prejudicar a absorção e o armazenamento de nutrientes, impedindo a transformação da larva em adulto (FERNANDES *et al.*, 2014). A morfologia do intestino médio de *A. aegypti* varia como o seu estágio de desenvolvimento e também está relacionada com as alterações nos hábitos alimentares nesses diferentes estágios. No estágio larval, a região posterior é ligeiramente mais larga que a região anterior, enquanto que no adulto a região anterior é mais fina e a posterior tem forma de saco expansível para acomodar o sangue após a alimentação (GAMA e CRUZ-LANDIM, 1984; BILLINGSLEY, 1990; BERNICK *et al.*, 2007).

Os intestinos médios de larvas e adultos são compostos por uma camada epitelial simples, na qual a maioria das células é estruturalmente semelhante, sendo do tipo colunar com microvilosidades cobrindo a superfície interna. Tais células, denominadas células

digestivas (Figura 5B), possuem a função de produzir enzimas digestivas e absorver os produtos da digestão (TERRA, 1990).

Figura 5 – Fotomicrografias do intestino médio de larvas de *A. aegypti* no quarto instar coradas com azul de toluidina.



(A) ep: epitélio; m: músculo. (B) ep: epitélio; l: lúmen. Seta: núcleo das células digestivas. Cabeça de seta: núcleo de célula regenerativa. Fotos: Kenner M. Fernandes.

O epitélio é também formado por mais dois tipos celulares: células regenerativas e células endócrinas. As células regenerativas (Figura 5B) são células indiferenciadas que estão localizadas entre as células digestivas de forma isolada, em pares ou em pequenos agrupamentos. São fundamentais para a renovação do epitélio digestivo e estão localizadas adjacentes à lâmina basal e suas superfícies não alcançam o lúmen (CRUZ-LANDIM, 1999; NEVES *et al.*, 2003). As células endócrinas são mais comuns na região posterior do intestino médio e distinguem-se de outras células por possuírem grânulos secretores de peptídeos, monoaminas e outras substâncias com efeitos parácrinos sobre as células regenerativas e na produção de enzimas pelas células digestivas (BROWN *et al.*, 1985; BILLINGSLEY e LEHANE, 1996).

Normalmente, o epitélio do intestino médio é separado do alimento pela matriz peritrófica, a qual consiste em uma rede de fibrilas de quitina disposta em uma matriz glicoproteica. A matriz peritrófica permite a passagem de moléculas pequenas, porém

restringe o acesso direto de moléculas grandes às células do intestino médio, além de proteger insetos herbívoros do efeito abrasivo de partículas alimentares e de compostos antinutricionais, tais como os taninos (GULLAN e CRANSTON, 2007).

2.2. Controle de insetos

O controle de insetos vetores consiste na redução da densidade populacional da espécie de modo a reduzir a possibilidade de disseminação da doença transmitida. Basicamente, os principais tipos de controle são o físico (torna o ambiente inadequado a sobrevivência do inseto), o controle biológico (consiste no uso organismos predadores ou patogênicos ao vetor para estabelecer o equilíbrio da população) e o controle químico (uso de inseticidas) (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

Os inseticidas químicos entram no corpo do inseto por penetração através da cutícula, por meio de inalação ou por ingestão. A maioria dos inseticidas de contato também age como inseticidas sistêmicos se ingeridos pelo inseto. Os inseticidas químicos no geral possuem efeito agudo e seu modo de ação pode envolver o comprometimento do sistema nervoso, dos processos metabólicos ou do desenvolvimento dos insetos (GULLAN e CRANSTON, 2007).

A maioria dos inseticidas sintéticos possui um amplo espectro de ação (não específico). Inseticidas sintéticos incluem: carbamatos e organofosforados (ambos matam insetos em geral, por contato ou por ingestão), organoclorados (uso proibido em diversos países por se acumularem gorduras de mamíferos) e fenilpirazóis (semelhantes ao DDT). Os inseticidas químicos mais utilizados apresentam efeitos drásticos, estando associados com o rápido aparecimento de populações resistentes e o surgimento de novas pestes, bem como contribuem para a poluição ambiental e apresentam toxicidade ao homem e a organismos não-alvo (SARWAR *et al.*, 2009). Para minimizar esses problemas, tem crescido o número de

estudos acerca de produtos naturais provenientes de plantas com efeito inseticida (ZHU *et al.*, 2006).

Países tropicais e subtropicais apresentam uma enorme biodiversidade e possuem grande quantidade de espécies vegetais com utilidade para a população. No entanto, uma fração muito pequena dessas espécies tem sido alvo de estudos (MARTINS, 2000). O Brasil, um dos países megadiversos do mundo, abriga aproximadamente 14% da flora mundial (LEWINSOHN, 2005), que corresponde a um grande potencial biotecnológico a ser estudado.

2.2.1. Controle do *A. aegypti*

No caso do *A. aegypti*, o controle físico consiste na substituição, drenagem ou redução dos locais de reprodução dos insetos. A participação da população é fundamental na localização e eliminação dos criadouros, principalmente intradomiciliares e peridomiciliares, que funcionam como os principais focos para proliferação desse inseto (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; HEMME *et al.*, 2009). A exposição à luz solar, com conseqüente aumento na temperatura da água afeta negativamente o ciclo de vida do inseto e esta estratégia pode ser adotada como uma medida adicional para controlar a população de mosquitos (HEMME *et al.*, 2009).

Estratégias para o controle biológico de mosquitos utilizam organismos predadores (peixes e copépodos), patógenos e parasitas naturais. Algumas linhagens de bactérias entomopatogênicas, do gênero *Bacillus*, produzem toxinas protéicas com um alto grau de especificidade a insetos vetores que, quando ingeridas, provocam mortalidade das larvas. As duas espécies mais utilizadas como larvicidas são o *Bacillus sphaericus* (Bs) e *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti). O Bti é estável sob condições normais de

armazenamento e demonstrou excelente persistência em ensaios que mimetizaram condições de campo (ARAÚJO *et al.*, 2007).

O controle químico de mosquitos com os inseticidas organofosforados é a principal medida adotada em programas de saúde pública. No entanto, o uso contínuo desses inseticidas tem selecionado larvas resistentes e efeito genotóxico do organofosforado temefós tem sido reportado em concentrações normalmente utilizadas no controle de larvas (AIUB *et al.*, 2002; POUPARDIN *et al.*, 2008; MELO-SANTOS *et al.*, 2010). Dessa forma, a busca por inseticidas naturais, biodegradáveis e isentos de toxicidade para organismos não-alvo tem crescido.

2.3. O microcrustáceo *Artemia salina* como indicador da toxicidade

Artemia salina, pertencente à classe Brachiopoda, é um microcrustáceo de habitat marinho medindo de 8 a 10 mm de comprimento. Reproduz-se de forma bastante rápida e com facilidade. Seus ovos, quando secos, podem ser conservados durante 10 anos à temperatura ambiente, estando sempre aptos a eclodirem, contanto que sejam colocados em água salgada (RUPPERT & BARNES, 2005).

Este tipo de crustáceo é amplamente utilizado em avaliações toxicológicas para estabelecer o nível de toxicidade de produtos químicos e naturais em ambientes aquáticos (BARAHONA & SÁNCHEZ-FORTUN, 1996; PARRA *et al.*, 2001). Considera-se ainda *A. salina* como um organismo indicador de contaminação ambiental, devido à susceptibilidade desses microcrustáceos frente aos elementos químicos chumbo, mercúrio, selênio, arsênico, cobre, zinco e cádmio (PARRA *et al.*, 2001).

2.4. Componentes da defesa química das plantas e uso como potenciais agentes inseticidas

No ambiente natural, as plantas estão sujeitas a diversos tipos de estresse relativo às condições adversas, como oscilações drásticas de temperatura, umidade, radiação solar, ataque de patógenos, dentre outros. Para sobreviver a essas adversidades, as plantas, ao longo de sua evolução, desenvolveram mecanismos de resposta relacionados à sua defesa e proteção (SOARES & MACHADO, 2007).

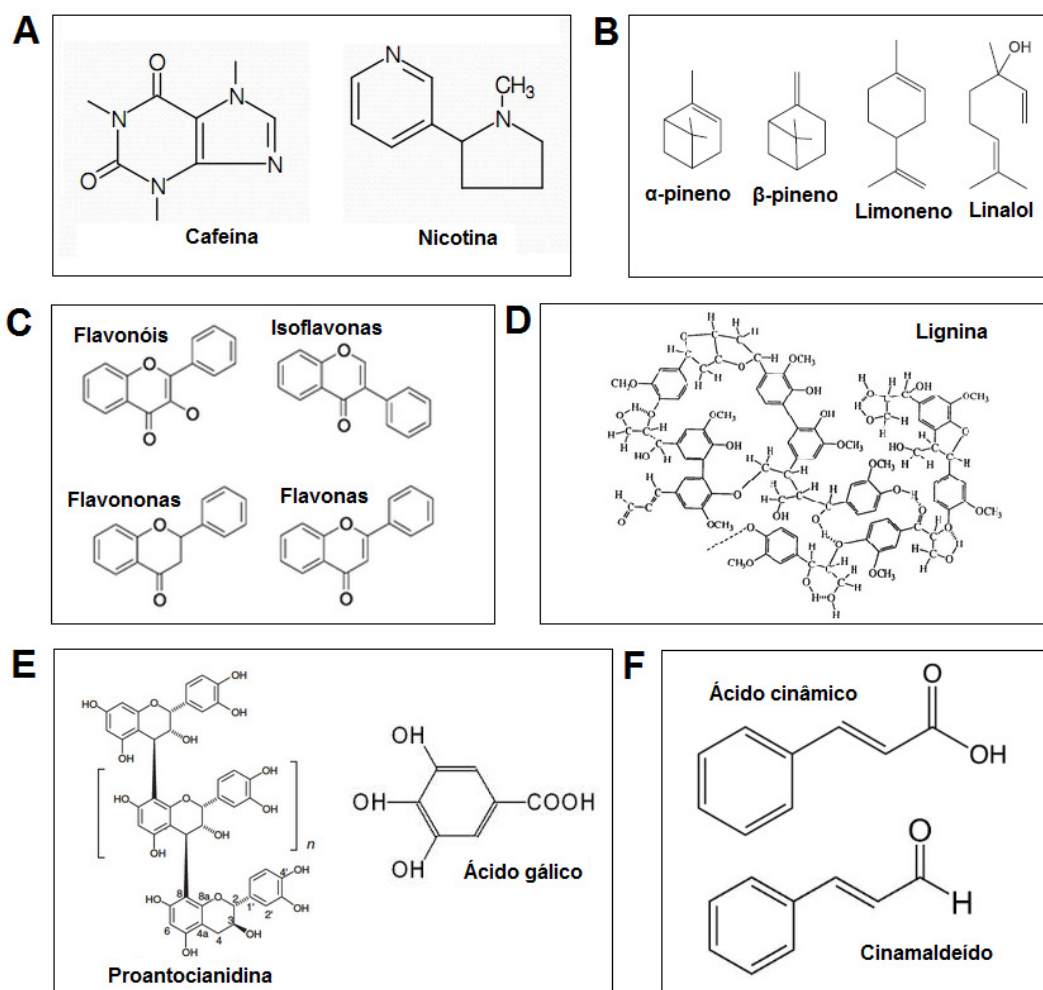
A defesa química compreende diversos compostos bioativos de massa molecular variada incluindo diversas substâncias tóxicas e repelentes (SHEWRY & LUCAS, 1997; MELO & SILVA-FILHO, 2002). Ela está associada à proteção contra agentes externos, como fitopatógenos e predadores, podendo ser mediada por metabólitos primários, tais como proteínas inibidoras de enzimas e lectinas, e por metabólitos secundários, como fenóis, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, dentre muitos outros.

A produção de metabólitos secundários pela planta não é uniforme, e ocorre tipicamente em um órgão ou tecido, ou em uma célula em determinado estágio do desenvolvimento. As três principais classes de compostos secundários são: compostos nitrogenados (alcalóides e aminoácidos não protéicos), terpenóides (piretróides, monoterpenos e óleos essenciais) e compostos fenólicos (lignina, flavonóides e taninos) (RAVEN, 2010; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os compostos nitrogenados são os metabólitos secundários que possuem nitrogênio na sua estrutura como alcalóides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos e aminoácidos não proteicos. Os alcalóides (Figura 6A) são compostos nitrogenados alcalinos e estão entre os compostos mais importantes por possuírem efeitos fisiológicos ou psicológicos em animais vertebrados e em seres humanos, tais como morfina, cocaína, nicotina, cafeína e atropina

(RAVEN, 2010). Acredita-se que a maior parte dos alcalóides atua na defesa contra predadores devido a sua toxicidade geral e a capacidade de deterrência (HARTMANN, 1992; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Figura 6 – Exemplos de metabólitos secundários produzidos por plantas pertencentes às classes dos alcalóides (A), terpenóides (B), flavonóides (C), ligninas (D), taninos (E) e compostos cinâmicos (F).



Os terpenóides (Figura 6B) constituem a maior classe de produtos secundários, sendo formados por unidades de isopreno (5 carbonos). Ocorrem em todas as plantas e desempenham múltiplas funções, atuando como pigmentos fotossintéticos, hormônios e componentes estruturais de membrana. O hidrocarboneto isopreno (5 carbonos) é o mais

simples terpeno e é a partir deste composto que os demais terpenos são classificados em: monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos) e diterpenos (20 carbonos). Muitos monoterpenos e sesquiterpenos constituem óleos essenciais, sendo altamente voláteis e contribuindo para a fragrância das plantas. Geralmente, esses óleos possuem propriedades repelentes de insetos (RAVEN, 2010; TAIZ & ZEIGER, 2009). Os piretróides (ésteres de monoterpeno) apresentam potente atividade inseticida, reduzida persistência no ambiente e baixa toxicidade aos mamíferos.

As substâncias fenólicas são caracterizadas pela presença do anel aromático substituído com uma hidroxila, sendo conhecidas por se acumularem em todas as partes vegetais. Incluem um grupo heterogêneo de compostos como flavonoides, taninos e ligninas, os quais possuem uma diversidade de funções, tais como defesa contra herbivoria e patógenos, atração de polinizadores ou dispersores de frutos e proteção contra radiação ultravioleta (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os flavonoides (Figura 6C) representam o maior grupo de compostos fenólicos vegetais. A estrutura básica dessas moléculas consiste em um núcleo constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis ($C_6-C_3-C_6$), sendo dois anéis fenólicos substituídos e um pirano (DI CARLO *et al.*, 1999). A maioria dos flavonoides ocorre naturalmente como glicosídeos. As antocianinas constituem o grupo mais comum de flavonoides pigmentados responsáveis pela maioria das cores vermelhas, rosa, roxa e azul observadas nos vegetais. Flavonas e flavonóis são encontrados em flores, sendo atrativos para insetos como abelhas, as quais podem enxergar uma faixa extrema do ultravioleta e identificar esses compostos. Também podem estar presentes em folhas de plantas verdes atuando na proteção das células contra o excesso de radiação UV-B. Os isoflavonóides constituem um grupo de flavonoides cuja posição do anel aromático está invertida, sendo encontrados

principalmente em leguminosas, e possuem diversas atividades biológicas como ação inseticida (TAIZ & ZEIGER, 2009).

As ligninas (Figura 6D) são compostos fenólicos que são depositados na parede celular conferindo resistência à compressão e a rigidez, além de impermeabilizar a parede celular e proteger a planta por ataque de fungos (RAVEN, 2010).

Os taninos (Figura 6E) constituem um grupo de polímeros fenólicos, estando presentes em altas concentrações nas folhas e frutos não maduros de plantas lenhosas, conferindo característica adstringente que repele predadores (RAVEN, 2010; TAIZ & ZEIGER, 2009). Os taninos condensados (também chamados de proantocianidinas, devido ao fato de originarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas) são formados pela polimerização de unidades de flavonoides. Os taninos hidrolisáveis são polímeros heterogêneos que contêm ácidos fenólicos e açúcares simples, sendo menores que os condensados e podem ser hidrolisados com mais facilidade. A toxicidade dos taninos está relacionada a sua capacidade de formar complexos com proteínas do trato digestório de herbívoros causando um impacto negativo na nutrição por inativar enzimas e por formar complexos de difícil digestão (TAIZ & ZEIGER, 2009).

O ácido cinâmico é um intermediário chave na síntese do ácido chiquímico (precursor de alcalóides, aminoácidos aromáticos e indol) e de fenilpropanoides. É encontrado tanto na forma livre quanto na forma de ésteres (etil, cinamil e benzil) denominados derivados cinâmicos (Figura 6F). Esses derivados são frequentemente encontrados em óleos essenciais (SHARMA, 2011).

Todos esses compostos envolvidos na defesa química das plantas têm sido detectados em preparações vegetais estudadas quanto ao potencial para o controle de vetores e pestes. Fitoquímicos extraídos de plantas podem ser usados contra mosquitos como tóxicos, reguladores de crescimento, repelentes e deterrentes de oviposição (AMER *et al.*, 2006a,

2006b). Os inseticidas botânicos geralmente são específicos, biodegradáveis, tem baixa capacidade de bioacumulação e ausência de toxicidade a maioria dos animais (WARIKOO *et al.*, 2012).

Extratos vegetais, óleos essenciais, flavonóides, limonóides, rotenóides, terpenos, fenilpropanóides, quinonas têm sido avaliados como alternativas aos inseticidas sintéticos para controle do *A. aegypti* (PAIVA *et al.*, 2011).

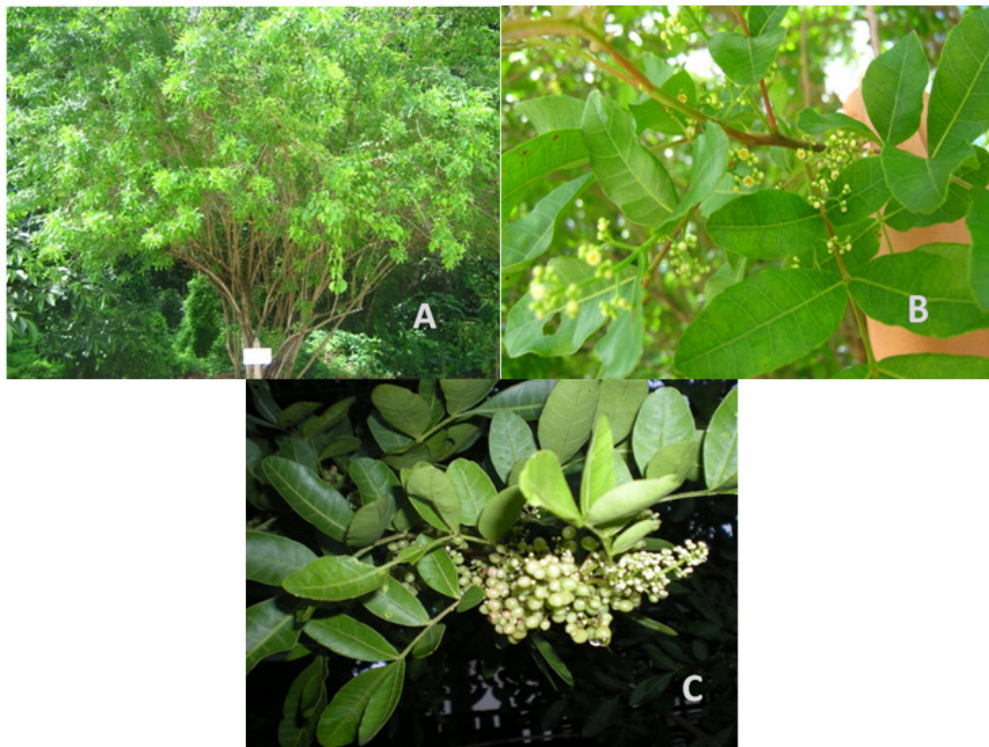
2.5. *Schinus terebinthifolius* Raddi

S. terebinthifolius (Figura 7) é uma árvore conhecida por diferentes nomes como aroeira da praia, aroeira marrom, aroeira vermelha, aroeira pimenteira e fruto da raposa, dentre outras denominações. Essa planta pertence à família Anacardiaceae e, segundo a proposta de 2003 do Grupo de Filogenia das Angiospermas II (APG II), pertence à ordem Sapindales, subclado Eurosidae II, dentro das Eudicotiledôneas (SOUZA & LORENZI, 2008).

No Brasil, a aroeira da praia é encontrada desde Pernambuco até Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul, nas mais variadas formações vegetais. É uma planta dióica, terrestre e de hábito arbóreo podendo atingir uma altura entre 5 a 10 m, com tronco de 30-60 cm de diâmetro revestido com casca grossa (LORENZI, 2008)

Suas flores são pentâmeras, actinomorfas, pequenas, com sépalas pequenas e verdes de formato triangular e pétalas pequenas, brancas e ovais, estando dispostas em inflorescência composta do tipo panícula racemosa. As flores estaminadas têm dez estames heterodínamos, dispostos em duas fileiras concêntricas, com anteras basifixas que apresentam deiscência longitudinal e pólen amarelo. As flores pistiladas possuem estigma trilobado, ovário súpero e unilocular e estames reduzidos. A placentação é apical lateral (FAGUNDES *et al.*, 2007).

Figura 7 - *Schinus terebinthifolius*. Aspecto geral da planta (A). Inflorescência (B). Infrutescência não madura (C).



Fotos: Thamara Figueiredo Procópio.

O fruto (pimenta rosa) é do tipo drupa, sendo numerosos e pequenos, inicialmente de coloração verde tornando-se vermelho brilhante quando maduros. As folhas, fortemente aromáticas, são alternas espiraladas, compostas e imparipinadas, normalmente com cinco ou sete folíolos de consistência membranácea sempre sem estípulas e com venação do tipo peninérvea (FAGUNDES *et al.*, 2007; LORENZI, 2008).

Altas concentrações de monoterpenos e de alguns hidrocarbonetos sesquiterpenos foram relatadas nas folhas e frutos de *S. terebinthifolius* (STAHL *et al.*, 1983; MALIK *et al.*, 1994). O extrato etanólico de folhas de *S. terebinthifolius* apresentou fenóis, flavonas, flavonoides, xantonas, leucoantocianidinas, flavononas e esteróides livres (LIMA *et al.*, 2006).

A espécie é amplamente usada na recuperação de áreas degradadas em programas de reflorestamento e tem grande importância ornamental, devido ao longo período em que as flores e frutos persistem nas plantas, (KAGEYAMA & GANDARA, 2000; SOUZA *et al.*, 2001). Sua casca, rica em taninos, pode ser utilizada na produção de tinta para tecidos ou para curtimento de couro e fortalecimento de redes de pesca. A madeira resistente é utilizada para cercados e como lenha e carvão devido às suas características energéticas comparáveis a eucaliptos usados para esse fim. É uma espécie muito procurada por aves, possivelmente dispersoras de seus frutos. Suas flores são melíferas tendo um alto valor apícola para a produção de mel de qualidade (SOUZA *et al.*, 2001; GUIMARÃES, 2003).

Atualmente, a aroeira da praia está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A sua casca, folhas e frutos são utilizados na medicina popular como antiinflamatório, antitérmico, analgésico e cicatrizante no tratamento de cervicites, corrimento genital, em diversas infecções no aparelho respiratório, digestivo e ginecológico e como reparador tecidual de feridas cutâneas (CORSI *et al.*, 1994; AMORIM & SANTOS, 2003; RIBAS *et al.*, 2006).

A casca é utilizada como chá para curar diarreias, hemoptises e como banhos contra ciática, gota, reumatismo e erisipela. Índios do Paraná e Santa Catarina utilizavam brotos novos e casca do caule contra odontalgia (BALBACHAS, 1959; LINDENMAIER, 2008). Melo Júnior *et al.* (2002) mostraram que o tratamento com o extrato etanólico da casca de *S. terebinthifolius* foi de eficiência semelhante ou superior a antibióticos utilizados contra *Enterococcus*, *Bacillus corineforme* e *Streptococcus viridans*. Estudo também mostrou que um extrato hidroalcoólico da casca apresentou um efeito anti-inflamatório, aliado com a ação anti-histamínica, além da ação antimicrobiana contra *S. aureus* (MATOS, 1988).

As folhas são antirreumáticas e um valioso remédio na cura de úlceras e ferida. Sua infusão é utilizada pelos índios Guarani para combater o popular “sapinho” na boca das

crianças (BALBACHAS, 1959; LINDENMAIER, 2008). Extrato etanólico de folhas de *S. terebinthifolius* inibiu o crescimento de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (MARTINEZ *et al.*, 1996; GUERRA *et al.* 2000). O óleo essencial das folhas apresentou potencial inibitório frente a alguns agentes etiológicos da infecção otológica em cães como *Staphylococcus* spp., *Malassezia*, *Streptococcus* sp. e *Corynebacterium* sp. (CAMPOS *et al.*, 2010). Coutinho *et al.* (2006) comprovaram por meio da análise histológica o efeito positivo do extrato hidroalcoólico de folhas no processo de cicatrização de anastomoses do cólon em ratos. Segundo Cavalher-Machado *et al.* (2008), a fração de acetato de folhas de *S. terebinthifolius* possui uma importante propriedade antialérgica, que é marcada pela inibição da formação de edema, degranulação dos mastócitos e influxo de eosinófilos. A lectina isolada da folha de *S. terebinthifolius* (SteLL) possui propriedades antimicrobianas contra bactérias e fungo de importância médica (GOMES *et al.*, 2013). É recomendado, no entanto, precaução no uso da planta, principalmente das folhas e cascas, devido às suas propriedades tóxicas (LORENZI, 2008; BAGGIO, 1988; LINDENMAIER, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Investigar extrato de folhas de *S. terebinthifolius* quanto ao efeito sobre sobrevivência, desenvolvimento e integridade do intestino de larvas de *A. aegypti* e quanto à ecotoxicidade através de ensaio utilizando *Artemia salina* como modelo, bem como determinar as classes de metabólitos envolvidos nos efeitos detectados.

3.2. Específicos

- ✓ Obter extrato de folhas de *S. terebinthifolius* em NaCl 0,15 M e determinar sua composição fitoquímica.
- ✓ Avaliar a presença de microrganismos no extrato.
- ✓ Determinar a concentração do extrato necessária para matar 50% (CL₅₀) de larvas de *A. aegypti* no quarto estágio após 3 e 8 dias, na ausência e na presença de comida.
- ✓ Investigar o efeito do extrato no desenvolvimento das larvas, na ausência e na presença de comida, através da determinação do número de pupas e adultos após 8 dias.
- ✓ Avaliar danos causados no intestino médio de larvas incubadas com o extrato por 12 h.
- ✓ Determinar o número de células digestivas, regenerativas, enteroendócrinas e em mitose no intestino médio de larvas incubadas com o extrato por 12 h.
- ✓ Investigar a ocorrência de fragmentação do DNA de células do epitélio intestinal de larvas incubadas com o extrato por 12 h.
- ✓ Investigar a ocorrência de melanização no intestino médio das larvas incubadas com o extrato.

- ✓ Separar as principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato.
- ✓ Isolar a lectina de *S. terebinthifolius* (SteLL) de acordo com protocolo pré estabelecido.
- ✓ Avaliar os efeitos das frações de metabólitos secundários e a lectina purificada sobre as larvas.
- ✓ Determinar a toxicidade do extrato e frações sobre o microcrustáceo *A. salina*.

4. REFERÊNCIAS

AIUB, C.A.F.; COELHO, E.C.; SODRE, E.; PINTO, L.F.; FELZENSZWALB, I. Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. **Genetic and Molecular Research**, v. 1, p. 159-166, 2002.

ALBUQUERQUE, L. P.; PONTUAL, E. V.; SANTANA, G. M. S.; SILVA, L. R. S.; AGUIAR, J. S.; COELHO, L. C. B. B.; REGO, M. J. B. M.; PITTA, M. G. R.; SILVA, T. G.; MELO, A. M. M. A.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**, v. 138, p. 23-27, 2014.

AMER. A.; MEHLHORN, H. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research**, v. 99, p. 466-472, 2006a.

AMER, A.; MEHLHORN, H. Persistency of larvicidal effects of plant oil extracts under different storage conditions. **Parasitology Research**, v. 99, p. 473-477, 2006b.

AMER. A.; MEHLHORN, H. Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* mosquitoes. **Parasitology Research**, v. 99, p. 478-490. 2006c

AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, p. 96- 102, 2003.

ARAÚJO, A. P.; MELO-SANTOS, M. A. V.; CARLOS, S. O.; RIOS, E. M. M. M.; REGIS, L. Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera:Culicidae). **Biological Control**, v. 41, p. 339–347, 2007.

BAGGIO, A. J. Aroeira como potencial para usos múltiplos na propriedade rural. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 17, p. 25-32, 1988.

BALBACHAS, A. **As plantas curam**. São Paulo: Missionária, 1959.

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, 1996.

BERNICK, E.P; MOFFET, S.B; MOFFETT, D.F. Organization, ultrastructure, and development of midgut visceral muscle in larval *Aedes aegypti*. **Tissue and Cell** v. 39, p. 277–292, 2007.

BESERRA, E. B.; CASTRO JR, F. P.; SANTOS, W.; SANTOS, T. S.; FERNANDES, C. R. M. Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 35, p. 853-860, 2006.

BESERRA, E.B.; FERNANDES, C.R.M.; RIBEIRO, P.S. Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em Laboratório. **Neotropical Entomology**. v. 38, p. 847–852, 2009.

BHATT, S.; GETHING, P.W.; BRADY, O.J.; MESSINA, J.P.; FARLOW, A.W.; MOYES, C.L.; DRAKE, J.M.; BROWNSTEIN, J.S.; HOEN, A.G.; SANKOH, O.; MYERS, M.F.; GEORGE, D.B.; JAENISCH, T.; WINT, G.R.W.; SIMMONS, C.P.; SCOTT, T.W.; FARRAR, J.F.; HAY, S.I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**. Vol. 496, 504-507, 2013.

BILLINGSLEY, P.F. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. **Annual Review in Entomology**, v. 35, p.219-248, 1990.

BILLINGSLEY, P.F.; LEHANE, M.J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In LEHANE, M.J. AND BILLINGSLEY, P.F. (Ed) **Biology of the insect midgut**. Chapman and Hall, London, 1996. Pp. 31-54.

BLACK, W. C.; BENNETT, K. E.; GORROCHÓTEGUI-ESCALANTE, N.; BARILLAS-MURY, C. V.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; MUÑOZ, M. L.; FARFÁN-ALÉ, J. A.; OLSON, K. E.; BEATY, B.J. Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*. **Archives of Medical Research**, v. 33, p. 379–388, 2002.

BROWN, M. R.; RAIKHEL, A. S.; LEA, A. O. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. **Tissue and Cell**, v. 17, p. 709–721, 1985.

BRUSCA, G. J.; BRUSCA, R. C. **Invertebrados**. GUANABARA KOOGAN, 2007.

CAMPOS, G. M.; OLIVEIRA, D. M. N. M.; CAVALCANTI, R. S.; MOTA, R. A.; LIMA, E. V. **Avaliação da atividade antimicrobiana *in vivo* do óleo essencial de aroeira (*Schinus terebinthifolius*, *Raddi*), em cães com otite externa**. Disponível em: <<http://www.sigeventos.com.br/jepex/inscricao/resumos/0001/R0378-1.PDF>>. Acesso em 30 de novembro de 2010.

CAVALHER-MACHADO, S. C., ROSAS, E. C., BRITO, F. A., HERINGE, A. P., OLIVEIRA, R. R., KAPLAN, M. A. C., FIGUEIREDO, M. R., HENRIQUES, M. G. M. O. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 1552–1560, 2008.

CICCIA, G., COUSSIO, J., MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 185–189, 2000.

CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. **Principais mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1994.

CORSI, R. C. C.; PIRANA, S.; MURACO, F. A.; JORGE, D. Cicatrização das feridas – revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 84, p. 17-24, 1994.

COSTA, M. S.; PINHEIRO, D. O.; SERRÃO, J. E.; PEREIRA, M. J. B. Morphological changes in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae following exposure to an *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonaceae) extract. **Neotropical Entomology**, v. 41, p. 311–314, 2012.

COUTINHO, I. H. I. L. S. ; TORRES, O. J. M. ; MATIAS, J. E. F. ; COELHO, J. C. U. ; STAHLKE JUNIOR, H. J. ; AGULHAM, M. A. ; BACHLE, E. ; CAMARGO, P. A. M. ; PIMENTEL, S. K. ; FREITAS, A. C. T. Efeito do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus Terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo Experimental em Ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 49, 2006.

CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructural features of the regenerative cells of the bees (Hymenoptera, Apidae) midguts. **Sociobiology**, v. 34, p. 597-603, 1999.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, v. 65, p. 337-353, 1999.

FAGUNDES, R. P.; FEILSTRECKER, S.; MARIATH, J. E. A.; OLIVEIRA, J. M. S. Aspectos da fecundação e embriogênese inicial em *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 873-875, 2007.

FARNESI, L.; VALLE, D. **Estratégias de Controle do Vetor - *Aedes aegypti*: Introdução aos aspectos científicos do vetor.** Disponível em: <http://auladengue.ioc.fiocruz.br/?p=86>. Acesso: 02 set. 2014.

FERNANDES K. M., NEVES C. A., SERRÃO, J. E., MARTINS, G. F. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. **Parasitology International**, v. 63, p. 506-512, 2014.

FIOCRUZ. **Biblioteca de Ciências Biomédicas - Febre Amarela.** Disponível em: <http://www.fiocruz.br/bibcb/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=93&sid=106>. 2014a Acesso em: 02 set. 2014.

FIOCRUZ. **Casos de dengue no país caem 80% no primeiro bimestre.** Disponível em: <http://www.fiocruz.br/rededengue/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=250&sid=9>. 2014b. Acesso em 02 set. 2014.

GAMA, V. & CRUZ-LANDIM, C. Morfologia do tubo digestivo de *Camponotus (Myrmothix) rufipes* (Fabricius, 1975) (Hymenoptera, Formicidae) durante a metamorfose. **Naturalia**, v. 9, p. 43-55, 1984.

GOH, K.T.; NG, S.K.; CHAN, Y.C.; LIM, S.J.; CHUA, E.C. Epidemiological aspects of an outbreak of dengue fever/dengue haemorrhagic fever in Singapore. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 18, p. 291–294, 1987.

GOMES, F.S.; PROCÓPIO, T.F.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Antimicrobial Lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 672-679, 2013.

GOMES, A. C.; SOUZA, J. M. P.; BERGAMASCHI, D. P.; SANTOS, J. L. F.; ANDRADE, V. R.; RANGEL, O.; LEITE, O. F.; SOUZA, S. S. L.; GUIMARÃES, N. S. N.; LIMA, V. L. C. Atividade antropofílica de *Aedes albopictus* em área sob controle e vigilância. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, p. 206-210, 2005.

GUERRA, M. J. M. *et al.* Actividad antimicrobiana de um extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Copal). **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, v. 5, p. 23–25, 2000.

GUIMARÃES, M. A. Frugivoria por aves em *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae) na zona urbana do município de Araruama, estado do Rio de Janeiro, sudeste brasileiro. **Atualidades Ornitológicas**, v. 116, p. 12-22, 2003.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P.S. **Os insetos: um resumo de entomologia.** Editora Roca, São Paulo, 2007.

GUSMÃO, D. S.; SANTOS, A. V.; MARINI, D. C.; RUSSO, E. S.; PEIXOTO, A. M. D.; BACCI JUNIOR, M.; BERBERT-MOLIMA, M. A.; LEMOS, F. J. A. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 919-924, 2007.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M. B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S. E. PEELING, R. W. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. S7-S16, 2010.

HARTMANN, T. Alkaloids. In: ROSENTHAL, G. A.; BERENBAUM, M. R. (Eds). **Herbivores: Their Interactions with secondary plant metabolites**. vol. 1: Academic Press, San Diego, 1992, pp. 79-121.

HEMME, R. R.; TANK, J. L.; CHADEE, D. D.; SEVERSON, D. W. Environmental conditions in water storage drums and influences on *Aedes aegypti* in Trinidad, West Indies. **Acta Tropica**, v. 112, p. 59-66, 2009.

HOOPER, H. L.; SIBLY, R. M.; HUTBHINSON, T. H.; MAUND, S. J. The influence of larval density, food availability and habitat longevity on the life history and population growth rate of the midge *Chironomus riparius*. **Oikos**, v. 102, p. 515-524, 2003.

JAIN, M. K.; YU, BAO-ZH; ROGERS, J. M.; SMITH, A. E.; BOGER, E. T. A.; OSTRANDER, R. L. e RHEINGOLD, A. L. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 39, p. 537-547, 1995.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Recuperação de áreas ciliares. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO FILHO, H. (Org.). **Matas Ciliares: Conservação e Recuperação**. São Paulo, EDUSP, 2000. pp. 249-269.

KAMIABI, F.; JAAL, Z.; KENG, C. L. Bioefficacy of crude extract of *Cyperus aromaticus* (Family: Cyperaceae) cultured cells, against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, p. 767-775, 2013.

KANIS, L. A.; RABELO, B. D.; MOTERLE, D.; NOGARETTI, R. M.; NUNES, T.; SANTOS DA SILVA, O.; PROPHIRO, J. S. Standardized extract of *Piper ovatum* (Piperaceae) to control *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 816-820, 2013.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. How many species are there in Brazil? **Conservation Biology**, v. 19, p. 619-624, 2005.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J. P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 137–147, 2006.

LINDENMAIER, D. S. **Etnobotânica em Comunidades Indígenas Guaranis no Rio Grande do Sul**. Universidade de Santa Cruz do Sul. Rio Grande do Sul, 2008.

LLOYD, H. A.; JAOUNI, T. M.; EVANS, S. L.; MORTON, J. F. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1301–1302, 1977.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa, Plantarum, 2008.

MACIEL-DE-FREITAS, R.; AVENDANHO, F. C.; SANTOS, R.; SYLVESTRE, G.; ARAÚJO, S. C.; LIMA, J. B. P.; MARTINS, A. J.; COELHO, G. E.; VALLE, D. Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. **PLoS ONE**, v. 9, artigo e92424, 2014.

MALIK, M. S., MAHMUD, S., SATTER, A. Studies on the essential oil of *Schinus terebinthifolius*. **Science International (Lahore)**, v. 6, p. 351–352, 1994.

MARTINEZ, M. J.; BETANCOURT, J.; ALONSO-GONZÁLES, N.; JAUREQUI, A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 171–174, 1996.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Ed. UFV; 2000.

MATOS, F. J. A. *et al.* **Aroeira do Sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). Estudo farmacognóstico, químico e farmacológico**. 2ª ed. Fortaleza: Edições UFC, 1995.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Nordeste**. O Povo – Universidade aberta. Fortaleza, 1988.

MATSUO, A. L.; FIGUEIREDO, C. R.; ARRUDA, D. C.; PEREIRA, F. V.; SCUTTI, J. A. B.; MASSAOKA, M. H.; TRAVASSOS, L. R.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. G. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, p. 449–454, 2011.

MELO JUNIOR, E. J. M. *et al.* Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: Microbiological and microscopic analysis. **Phytomedicine**, v. 9, p. 109–116, 2002.

MELO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interaction: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, p. 71-81, 2002.

MELO-SANTOS, M.A.V., VARJAL-MELO, J.J.M., ARAÚJO, A.P., GOMES, T.C.S., PAIVA, M.H.S., REGIS, L.N., FURTADO, A.F., MAGALHÃES, T., MACORIS M.L.G., ANDRIGHETTI, M.T.M., AYRES, C.F.J. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Tropica**, v. 113, p. 180–189, 2010.

MERCER, D. R. Effects of larval density on the size of *Aedes polynesiensis* adults (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 36, p. 702-708, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue - Portal da Saúde. Disponível em: www.saude.gov.br. Acesso: 10/09/2014a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Febre Amarela – Viajantes. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/febreamarela/viajantes.php>. Acesso em 02 set. 2014b.

MURRAY, T.; MILES, C.; DANIELS, C. **Natural insecticides**. Washington State University, Oregon State University, University of Idaho. PNW649, 2013.

NAVARRO, D. M. A. F.; SILVA, P. C. B., SILVA, M. R., NAPOLEÃO, T. H., PAIVA, P. M. G. Larvicidal activity of plant and algae extracts, essential oils and isolated chemical constituents against *Aedes aegypti*. **The Natural Products Journal**, v. 3, p. 268-291, 2013.

NEVES, C. A.; SERRÃO, J. E.; GITIRANA, L. B. Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. **Sociobiology**, v. 41, p. 443-459, 2003.

OMENA, M. C.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAULA, J. E.; LUNA, J. S.; LIMA, M. R. F.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2549–2556, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue and severe dengue**. Fact sheet nº 117, 2014.

PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; CORREIA, M. T. S.; NAVARRO, D. M. A. F.; COELHO, L. C. B. B. Plant compounds with *Aedes aegypti* larvicidal activity and other biological properties. In: LIONG, M-T. (Ed.) **Bioprocess Sciences and Technology**. New York: Nova Science Publishes, 2011, pp. 269-294.

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 toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, p. 395-400, 2001.

PAWLOWSKI, Â.; KALTCHUK-SANTOS, E.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B.; SOARES, G. L. G. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. **South African Journal of Botany**, v. 80, p. 96–103, 2012.

PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S.; XAVIER, H. S.; NAVARRO, D. M. A. F.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 79, p. 135-152, 2012.

PONTUAL, E.V.; SANTOS, N. D. L.; MOURA, M. C.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. 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. **Parasitol Research**, v. 113, p. 727-733, 2014.

PORTAL DA SAÚDE. Ministério da Saúde. **SVS informa procedimentos a serem adotados para a vigilância da Febre do Chikungunya no Brasil**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/9545>. Acesso em 02 set. 2014.

POUPARDIN, R., REYNAUD, S., STRODE, C., RANSON, H., VONTAS, J., DAVID, J.P. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 540–551, 2008.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

RIBAS, M. O. *et al.* Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Revista Odonto Ciência**, v. 21, p. 245-252, 2006.

RUPPERT, E. E. & BARNES, D. R. **Zoologia dos invertebrados**. São Paulo, Rocca, 7^a ed., 2005.

SARWAR M, AHMAD N, TOUFIQ M. Host plant resistance relationships in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against gram pod borer (*Helicoverpa armigera* Hubner). **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, p. 3047-3052, 2009.

SHARMA, P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 403-423, 2011.

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. In: **Advances in Botanical Research**, v. 26, New York: Academic Press, 1997. pp. 135-192.

SILVA, J. S.; MARIANO Z. F.; SCOPEL, I. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle. **Hygeia**, v. 3, p. 163-175, 2008.

SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; BARBIN, D.; VILLA NOVA, N. **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo, **Agronômica Ceres**, 1976.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, p. 9, 2007.

SOUZA, P. A. *et al.* Estabelecimento de espécies arbóreas em recuperação de área degradada pela extração de areia. **Cerne**, v. 7, p. 43-52, 2001.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2^a ed. Nova. Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.

STAHL, E., KELLER, K., BLINN, C. Cardanol, a skin irritant in Pink Pepper. **Planta Medica**, v. 48, p. 5–9, 1983.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. pp. 342-372,

TAUBER, M.J.; TAUBER, C.A.; MASAKI, S. **Seazonal adaptations of insects**. New York, Oxford University Press, 1986.

TEXEIRA, M. G.; SIQUEIRA, J. B.; FERREIRA, G. L. C.; BRICKS, L.; JOINT, G. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000–2010): A systematic literature search and analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, artigo e2520, 2013.

TERRA, W. R. Evolution of digestive systems of insects. **Annual Review in Entomology**, v. 35, p. 181-200, 1990.

WARIKO, R.; RAY, A.; SANDHU, J. K.; SAMAL, R.; WAHAB, N.; KUMAR, S. Larvicidal and irritant activities of hexane leaf extracts of *Citrus sinensis* against the dengue vector *Aedes aegypti* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 152-155, 2012.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 5, p. 518–528, 2007.

ZHU, J.; ZENG, X.; YANMA, L. T.; QIAN, K.; HAN, Y. *et al.* Adult repellency and larvicidal activity of five plant essential oils against mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 3, p. 515-522, 2006.

5. ARTIGO

***Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage,
interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae**

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO “PLOS ONE”



Fator de Impacto: 3.534 (JCR-2013)

Qualis A2 (CAPES- Ciências Biológicas II)

***Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae**

Thamara Figueiredo Procópio¹, Kenner Moraes Fernandes², Emmanuel Viana Pontual^{1,3}, Rafael Matos Ximenes⁴, Aline Rafaella Cardoso de Oliveira¹, Carolina de Santana Souza¹, Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo⁵, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro⁶, Patrícia Maria Guedes Paiva¹, Gustavo Ferreira Martins², Thiago Henrique Napoleão^{1*}

1 Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil, **2** Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. **3** Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil, **4** Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil. **5** Departamento de Biofísica e Radiobiologia-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil, **6** Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50740-560, Recife, Pernambuco, Brazil.

*E-mail: thiagohn86@yahoo.com.br

Abstract

In this study, a leaf extract from *Schinus terebinthifolius* was evaluated for effects on survival, development, and midgut of *A. aegypti* fourth instar larvae (L4), as well as for toxic effect on *Artemia salina*. Leaf extract was obtained using 0.15 M NaCl and evaluated for phytochemical composition and lectin activity. Early L4 larvae were incubated with the extract (0.3–1.35%, w/v) for 8 days, in presence or absence of food. Polymeric proanthocyanidins, hydrolysable tannins, heterosid and aglycone flavonoids, cinnamic acid derivatives, traces of steroids, and lectin activity were detected in the extract, which killed the larvae at an LC_{50} of 0.62% (unfed larvae) and 1.03% (fed larvae). Further, the larvae incubated with the extract reacted by eliminating the gut content. No larvae reached the pupal stage in treatments at concentrations between 0.5% and 1.35%, while in the control (fed larvae), 61.7% of individuals emerged as adults. The extract (1.0%) promoted intense disorganization of larval midgut epithelium, including deformation and hypertrophy of cells, disruption of microvilli, and vacuolization of cytoplasm, affecting digestive, enteroendocrine, regenerative, and proliferating cells. In addition, cells with fragmented DNA were observed. Separation of extract components by solid phase extraction revealed that cinnamic acid derivatives and flavonoids are involved in larvicidal effect of the extract, being the first most efficient in a short time after larvae treatment. The lectin present in the extract was isolated, but did not show deleterious effects on larvae. The extract and cinnamic acid derivatives were toxic to *A. salina* nauplii, while the flavonoids showed low toxicity. *S. terebinthifolius* leaf extract caused damage to the midgut of *A. aegypti* larvae, interfering with survival and development. The larvicidal effect of the extract can be attributed to cinnamic acid derivatives and flavonoids. The data obtained using *A. salina* indicates that caution should be used when employing this extract as a larvicidal agent.

Keywords: Brazilian pepper tree; larvicidal activity; dengue mosquito; midgut cells; *Artemia salina*.

INTRODUCTION

The mosquito *Aedes aegypti* is the main vector of dengue, chikungunya, and yellow fever viruses. Vaccine is only available for yellow fever, and dengue can assume potentially lethal forms. About 2.3 million cases of dengue were reported in the Americas in 2013, and thus, dengue was ranked among the most important viruses transmitted by arthropods [1], [2]. Prophylactic methods mainly focus on the control of vector population with insecticides, improvement of sanitation, and strengthening community efforts in order to eliminate breeding sites [3].

Currently, chemical control of *A. aegypti* has faced a number of difficulties such as environmental persistence and unselective toxicity of the commonly used insecticides; further, the emergence of resistant populations has been reported [4], [5], [6], [7], [8]. A reasonable alternative is to search for natural insecticides for the control of mosquito populations since they are usually highly biodegradable, and the availability of more alternatives broadens the range for regular interchange and alternation of insecticides, minimizing resistance development [9], [10].

Plants produce many defensive compounds, which have been widely evaluated as insecticides. Plant extracts and essential oils contain several types of secondary metabolites that exert deleterious effects on insects. Proteins such as protease inhibitors and lectins have been also reported to act as insecticidal agents. In addition to causing insect mortality at all life stages, plant-derived insecticides may also disrupt metamorphosis, promote morphological alterations, and exert irritant and repellent effects [11], [12], [13], [14], [15], [16].

Many plant insecticides primarily target the midgut of the mosquito larvae, and some are able to interfere with the larval development into adult stage, even at sub-lethal

concentrations [17]. The metamorphosis of *A. aegypti* larvae comprises comprehensive transformations of the insect body, including a remodeling of the midgut, where larval digestive cells are completely replaced [18], [19], [20]. In this sense, deleterious effects of plant compounds on the midgut may interfere with larval development.

Schinus terebinthifolius Raddi (Brazilian pepper tree) is a plant from the Anacardiaceae family native to Central and South America, and found in Brazil from the northeast to the south, in plant communities such as the Atlantic Forest and the Cerrado [21]. It is a source of many bioactive compounds, and its leaves are popularly used in remedies for healing ulcers and wounds, combating oral candidiasis in children, and for producing infusions considered to have anti-rheumatic properties [22], [23]. Some of the compounds from *S. terebinthifolius* leaves with proven biological activities are terpenes that induce melanoma apoptosis and protect against metastasis [24], [25], essential oil that inhibits mitosis in lettuce and onion [26], aromatic compounds with the ability to treat allergies [27], and a lectin (called *S. terebinthifolius* leaf lectin, SteLL) with antimicrobial properties [28]. Larvicidal activity against *A. aegypti* has been detected in a dichloromethane extract from *S. terebinthifolius* leaves and an essential oil extracted from its fruit [29], [30].

This study shows the effects of a saline extract from *S. terebinthifolius* leaves on the survival, development, and midgut of *A. aegypti* fourth instar larvae (L₄). The extract was also evaluated for phytochemical composition and toxicity to *Artemia salina*. Solid phase extraction of the main secondary metabolites detected in the extract separated them into three fractions. In addition, the lectin SteLL was isolated from the extract. The fractions and the lectin were then evaluated for deleterious effects on larvae.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The leaves of *S. terebinthifolius* were collected in the campus of the *Universidade Federal de Pernambuco* at Recife, Brazil, and left to dry at 28°C during 3–4 days. Next, the leaves were powdered using a blender and stored at -20°C. A voucher specimen is archived under number 73,431 at the herbarium from the *Instituto Agronômico de Pernambuco* (IPA), Recife, Brazil. Plant collection was performed with authorization (number 36301-2) of the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio) from the Brazilian Ministry of Environment.

***Aedes aegypti* larvae**

Larvae were reared in insectaries from the *Laboratório de Ecologia Química* (LEQ) of the *Universidade Federal de Pernambuco* and from the *Departamento de Biologia Geral* (DBG) of the *Universidade Federal de Viçosa*. The colonies belong to the Rockefeller (LEQ) and PPCampos (DBG) strains, respectively. Rockefeller and PPCampos larvae were hatched in dechlorinated water containing cat food (Whiskas[®]) and the colonies were reared at a 26 ± 1°C, relative humidity 75 ± 10%, and photoperiod 12L:12D. The larvae were collected for use in the bioassays when they reached the early fourth instar (L₄) stage.

***Schinus terebinthifolius* leaf extract**

The extract preparation was started by homogenizing 10 g of leaf powder with 100 mL of 0.15 M NaCl during 16 h at 28°C, using a magnetic stirrer. Next, the suspension was filtered through filter paper and centrifuged (3,000 g, 15 min) and dialyzed (4 h) against

distilled water. The dialyzed supernatant, corresponding to the leaf extract, was then lyophilized to dryness for 24 h using a freeze-dryer (LIOTOP L101, Liobras, São Carlos, Brazil) at a temperature of -45°C and a vacuum of 300 μmHg below atmospheric pressure. After lyophilization, the leaf extract was resuspended in 0.15 M NaCl to a concentration of 2.7% (dry weight/volume).

Phytochemical analysis, hemagglutinating activity and evaluation of microorganism presence in leaf extract

The phytochemical screening of the extract was performed by thin-layer chromatography (TLC) on silica plates (60F254, aluminum backed, 200 μm layer thickness, 8.0 x 5.0 cm, Merck, Darmstadt, Germany). The presence of alkaloids, triterpenes, steroids, cinnamic acid derivatives, heterosid and aglycone flavonoids, hydrolysable tannins, and proanthocyanidins were investigated using the adequate development systems and revealers listed in Table 1 [31], [32], [33]. After development, the plates were air dried and sprayed with the revealers in a fume hood.

The presence of lectin in leaf extract was investigated by determining the hemagglutinating activity in 96-well microtiter plates (TPP-Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland). The assay was performed by a twofold serial dilution of extract (50 μL) in 0.15 M NaCl followed by addition to each well of 50 μL of a suspension (2.5% v/v) of glutaraldehyde-treated rabbit erythrocytes in 0.15 M NaCl. The plate was incubated at 27°C for 45 min. Hemagglutinating activity was quantified as the reciprocal value of the highest dilution of sample that promotes full agglutination of erythrocytes [34]. Specific activity was calculated by the ratio between the hemagglutinating activity and the protein concentration, which was determined according to Lowry et al. [35].

Table 1. Development systems and revealers used for analysis by thin-layer chromatography of secondary metabolites in *S. terebinthifolius* leaf extract.

Secondary metabolites	Development system	Revealer
Alkaloids	EtOAc/HCOOH/AcOH/H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Dragendoff's reagent
Triterpenes and steroids	EtOAc/HCOOH/AcOH/H ₂ O (100:0.5:0.5:0.5 v/v)	Lieberman-Burchard's reagent
Aglycone and flavonoid heterosids	EtOAc/HCOOH/AcOH/H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Neu's reagent
Proanthocyanidins	EtOAc/HCOOH/AcOH/H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Vanilin-chloridric acid
Cinnamic acid derivatives	EtOAc/HCOOH/AcOH/H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Neu's reagent

In order to evaluate the presence of microorganisms in leaf extract, aliquots (100 µL) of the extract were smeared on petri dishes containing Mueller Hinton Agar, Sabouraud-Dextrose Agar or Potato-Dextrose Agar. Plates were incubated at 37°C for 24 h. After this period, the microbial growth was observed, and the number of colony forming units (CFU) was determined.

Effects of leaf extract on survival and development of *A. aegypti* larvae

First, bioassays were performed without addition of food (unfed larvae), according to the method described by Navarro et al. [36] and following the instructions of the World Health Organization [37]. The leaf extract was diluted with distilled water in order to obtain test solutions in the concentration range 0.3–1.35% (w/v). In each assay, 20 early L₄ larvae (Rockefeller strain) were placed into disposable plastic cups containing 20 mL of the test solution or 0.15 M NaCl (control). The assays were maintained at 26 ± 1°C, relative humidity

75 $\pm$ 10%, and photoperiod 12L:12D. Two independent experiments were performed in triplicate. The number of live and dead larvae, pupae, and adults was counted daily until the 8th day.

Next, the bioassays were performed with food supplied to larvae (fed larvae). At the beginning of the incubation period, 0.05 g of cat food (Whiskas[®]) was added per cup. The tested concentrations and laboratory conditions were the same described above.

Effects of leaf extract on the midgut of the larvae

Bioassays and fixation of midguts

Leaf extract was diluted with distilled water in order to obtain a test solution at 1.0% (w/v). Next, 20 early L₄ larvae (PPCampos strain) were transferred to plastic vessels containing 20 mL of the test solution or 0.15 M NaCl (control). Food was added (0.05 g) in each vessel. The assays were maintained at 26 $\pm$ 1°C, relative humidity 75 $\pm$ 10%, and photoperiod 12L:12D. After 12 h, the midguts of ten larvae from each treatment were dissected in a physiologic solution for insects (0.1 M NaCl, 20 mM KH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄). Some larvae and midguts were observed using a stereomicroscope and photographed using a digital camera. The dissected midguts were fixed in formaldehyde and picric acid solution (Zamboni's solution), except those to be analyzed using a transmission electron microscope, which were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.2) for 2 h. Midguts obtained from the control larvae were photographed and fixed in a similar manner.

To assess the occurrence of melanization in the midgut of treated larvae, 20 L₄ were exposed to the extract at 1.0% (w/v), containing the phenoloxidase inhibitor phenylthiourea

(PTU) (0.01 M). A separate group of larvae was incubated only with PTU. Treated and control larvae received food as described above. After incubation for 12 h, the midguts were dissected, and observed under the stereomicroscope.

Histology analysis

Fixed midguts (of larvae from controls and treatment with the extract alone) were washed with distilled water, dehydrated in a graded series of ethanol (70–100%), and embedded in Historesin (Leica, Solms, Germany). Next, the material was cut into 3- μ m sections, stained with toluidine blue, and mounted in Eukitt medium (Fluka, USA). The stained midguts were observed under an optical microscope (Olympus BX60, Olympus America, Inc., NY, USA) and photographed using a digital camera.

Transmission electron microscopy

Fixed midgut fragments were washed in cacodylate buffer and post-fixed in 1% osmium tetroxide for 2 h in the dark. Following post-fixation, the material was washed twice with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), dehydrated in an increasing series of ethanol concentrations (70–100%), and pre-infiltrated in a LR white resin solution and 100% ethanol (2:1) for 1 h. The samples were then embedded in pure resin and maintained at 25°C for 16 h, followed by polymerization in gelatin capsules (Electron Microscopy Sciences) at 60°C for 24 h. Ultrathin sections were placed on copper grids and incubated for 20 min in 1% aqueous uranyl acetate and lead citrate. The samples were observed and photographed using a Zeiss EM 109 microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany).

Fluorescence microscopy

The nuclei of cells from the fixed midgut were stained with diamidino-2-phenylindole (DAPI; Biotium, USA) for 30 min. The midguts were mounted on slides using Mowiol antifading solution (Sigma-Aldrich, MO, USA) and analyzed in an epifluorescence microscope Olympus BX-60 coupled to the capture system Olympus Q-Color 3 (Olympus America, Inc., NY, USA). Six areas of each region (anterior and posterior) of the midgut were randomly photographed with a 40× objective lens (total area = 0.414 mm²) [38]. The number of digestive cells (larger nuclei and present at the apical region of digestive epithelium) and regenerative cells (small nuclei and found at the basal region of epithelium) in the midgut were counted as described elsewhere [19], [20].

Enteroendocrine cells were identified by labeling the peptide FMRFamide [20], which is usually abundant in endocrine cells of the digestive tract in insects. Fixed midguts were washed three times for 30 min with PBST (phosphate buffered saline with 0.05% Tween – Sigma-Aldrich, USA), and then incubated for 24 h at 4°C with a solution of anti-FMRFamide primary antibody (Peninsula Lab, UK) prepared (1:400) in 1% PBST. After washing with PBS three times (5 min each), the midguts were incubated with a secondary antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma-Aldrich, USA) for 24 h at 4°C. The midguts were washed three times with PBS, mounted using Mowiol solution, and observed under the epifluorescence microscope for counting of enteroendocrine cells.

Proliferating cells in the midgut were investigated by *in situ* labeling of the mitosis marker phospho-histone H3 [39]. Fixed guts were incubated for 24 h at 4°C with the primary antibody anti-phospho-histone H3 (Cell Signaling, USA) prepared (1:100) in PBS with 1% Tween (PBST). Samples were washed three times with PBS and incubated for 24 h at 4°C with the FITC-conjugated secondary antibody (Sigma-Aldrich, USA) diluted (1:500) in PBS.

After three 10-min washing steps with PBS, the slides were mounted using Mowiol solution, analyzed, and photographed in a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Positive cells were counted along the entire midgut.

DNA fragmentation was identified *in situ* using the Cell Death Detection kit, Fluorescein (TUNEL reaction), from Roche (Basel, Sweden). Fixed midguts were treated with proteinase K (Sigma-Aldrich, USA) at 10-20 µg/mL, in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, for 60 min at 37 °C. Next, they were washed with PBS and incubated for 60 min with TUNEL solution at 37°C. The slides were then mounted and analyzed as described above.

Separation of secondary metabolites, lectin isolation and bioassays

Secondary metabolites in the leaf extract were semi-purified by solid phase extraction (SPE) on a 24-port vacuum manifold (Supelco, PA, USA). The SPE cartridges, Chromabond® C18 (500 mg/3 mL) from Macherey-Nagel (Düren, Germany), were preconditioned with 1 mL of methanol and equilibrated with 3 mL of 0.1 M Tris-HCl pH 9.0. The extract was dissolved in Tris buffer to 25 mg/mL and filtered through a 0.45 µm syringe filter. Then, 1 mL of the extract solution was loaded into the cartridge, which was washed with Tris buffer for the elution of the cinnamic acid derivatives (fraction 1, F1). Flavonoids were then eluted with 2 mL of methanol (fraction 2, F2), and hydrolysable tannins were eluted with 2 mL of 1:1 (v/v) methanol-acetic acid (fraction 3, F3). F1 was dialyzed for removal of Tris molecules. After evaporation of the solvents, the fractions were once again submitted to phytochemical screening by TLC as described above.

The *S. terebinthifolius* leaf lectin (SteLL) was isolated from leaf extract according to the procedure described by Gomes et al. [28]. The extract was loaded onto a chitin (Sigma-Aldrich, MO, USA) column (7.5×1.5 cm) equilibrated with 0.15 NaCl at a flow rate of 20

mL/h. The unadsorbed material was removed with equilibrating solution after absorbance at 280 nm was lower than 0.020. Next, SteLL was eluted from the column with 1.0 M acetic acid. The isolated lectin was then dialyzed in a 10-kDa cut-off membrane (Sigma-Aldrich, MO, USA) against distilled water (4 h) and evaluated for hemagglutinating activity and protein concentration.

Larvicidal assays with F1, F2 and F3 (1.0% w/v, dissolved in distilled water) and SteLL (0.05–1.0 mg/mL, in water) were performed as described above, with food addition. The number of live and dead larvae, pupae, and adults was counted daily until the 8th day.

Environmental toxicity assay using *Artemia salina*

A. salina eggs were acquired from local pet shops. The eggs were incubated at 27±2°C in natural seawater with pH adjusted to 8.0. After 24 h, the hatched nauplii were collected and used in bioassays. Groups of 12–15 larvae were exposed to 5-mL solutions of leaf extract (0.125–1.0 %), F1 (1.0%, w/v) or F2 (1.0%, w/v) diluted in natural seawater and, after 24 h, the survival rates (%) were recorded [40]. In the control group, larvae were incubated in seawater. Three independent experiments were performed in triplicate.

Statistical analysis

Standard deviations (SD) were calculated using GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA), and the data were expressed as replicate means ± SD. The lethal concentrations required for killing 50% of *A. aegypti* larvae (LC₅₀) after 3 and 8 days were calculated by probit analysis with a reliability interval of 95% using the StatPlus[®] 2006 software (AnalystSoft, Canada). The results from midgut cell

counting were submitted to variance analysis (ANOVA) when distribution was considered normal or to Kruskal-Wallis's test in cases with non-normal distribution.

RESULTS

Phytochemical screening of leaf extract revealed the presence of polymeric proanthocyanidins, heterosids and aglycone flavonoids, hydrolysable tannins, and mainly cinnamic acid derivatives. Trace amounts of steroids were also detected, as well as lectin (specific hemagglutinating activity of 81). No microbial growth, including bacteria and yeasts, was observed in the leaf extract smeared on plates with the culture media.

After 24 h, mortality rates of unfed larvae at concentrations from 0.5% to 1.35% ranged between 3.3% and 25%, while in concentrations below 0.5% and in the control there was no mortality (Table 2). Interestingly, in all treatments with extract, there were larvae that eliminated the gut content, which was enclosed in the peritrophic matrix (Fig. 1A). All the larvae exposed to highest extract concentrations showed this reaction (Table 2).

The LC_{50} values of 1.05% and 0.62% were determined for unfed larvae after 3 and 8 days, respectively, with no mortality in the control during these periods. At the 8th day, the number of individuals at pupa stage was significantly higher ($p < 0.05$) in the control than in all other treatments while the number of emerged adults was similar to the control ($p > 0.05$) only in the treatments at concentrations of 0.3% and 0.4% (Table 3). In the bioassays at the concentrations of 1.2% and 1.35%, all the individuals died at the larval or pupal stages.

For fed larvae, *S. terebinthifolius* leaf extract had somewhat distinct effects on mosquito survival. Table 2 shows that there was no mortality after 24 h using the extract at 0.3–0.75% concentrations, and the mortality rate at 1.2% was much lower than when food was unavailable. On the other hand, the number of dead larvae at the concentration of 1.35%

was similar in bioassays with unfed and fed larvae. The estimated LC_{50} for 3 (1.3%) and 8 (1.03%) days were higher than those for bioassays without food. After 24 h, the fed and treated larvae also eliminated the contents of the gut, in numbers similar to those in assays of unfed larvae (Table 2).

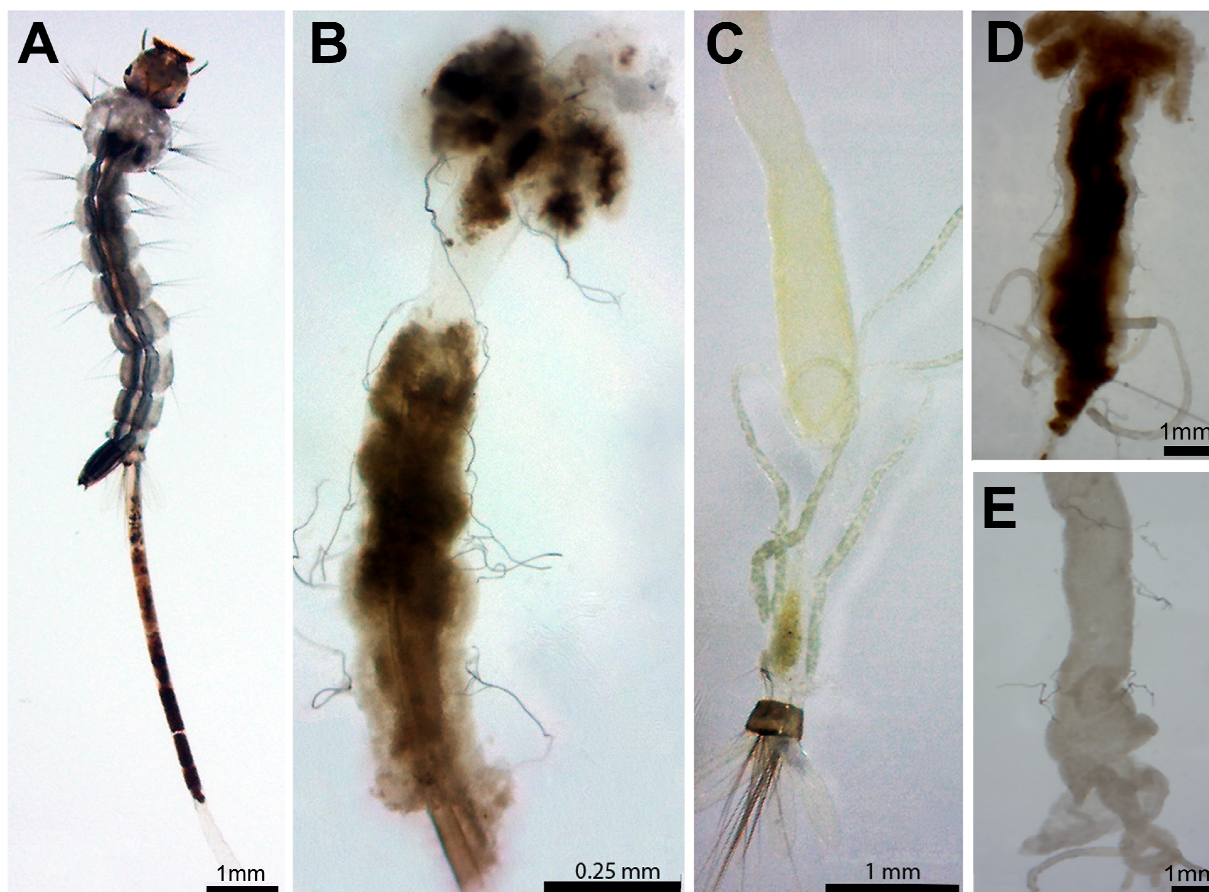


Figure 1. *Aedes aegypti* L₄ larvae incubated for 12 h with *Schinus terebinthifolius* leaf extract (1.0%, w/v). (A) Larva eliminating the gut content covered by the peritrophic matrix. (B) Shrunken and pigmented midgut dissected from a larva incubated with the leaf extract. (C) Midgut dissected from a control larvae, after removal of gut content and peritrophic matrix, without apparent alterations. (D) Midgut dissected from a larva incubated with the leaf extract containing the 0.01 M phenylthiourea (PTU), a phenoloxidase inhibitor. (E) Midgut dissected from a larva incubated with 0.01 M PTU.

Table 2. Acute effects of *Schinus terebinthifolius* leaf extract on *Aedes aegypti* larvae after 24 h, in bioassays performed adding or not food in the start of experiment.

Concentration (%)	Mortality rate (%)		Larvae that eliminated gut content (%)	
	Without food	With food	Without food	With food
	addition	addition	addition	addition
0.3	0.0 a	0.0 a	5.0 ± 0.0 a	6.7 ± 2.8 a
0.4	0.0 a	0.0 a	10.0 ± 5.0 b	11.7 ± 2.8 b
0.5	3.3 ± 2.8 b	0.0 a #	15.0 ± 0.0 c	18.3 ± 2.8 c
0.75	8.3 ± 2.8 c	0.0 a #	40.0 ± 0.0 d	35.0 ± 0.0 d #
1.2	21.6 ± 2.8 d	5.3 ± 0.2 b #	100 e	100 e
1.35	25.0 ± 0.0 e	30.0 ± 0.0 c #	100 e	100 e
Control	0.0 a	0.0 a	0.0 f	0.0 f

Different letters at the same column indicate significant differences ($p < 0.05$) between control and the treatments at different concentrations. The symbol # indicates significant difference ($p < 0.05$) between the value in assay with food addition and that obtained in assay without food addition.

Table 3. Mortality and life stages reached after 8 days by *A. aegypti* individuals incubated with *S. terebinthifolius* from the fourth larval stage.

Treatment /	Life stage				
Concentration	Larvae (%)		Pupae (%)		Adults (%)
	Live	Dead	Live	Dead	
<i>Without food</i>					
Control	71.6 ± 2.8 a	0.0 a	16.7 ± 2.8 a	0.0 a	11.7 ± 2.8 a
0.3%	73.3 ± 2.8 a	10.3 ± 0.6 b	3.3 ± 2.8 b	0.0 a	13.0 ± 2.6 a
0.4%	66.7 ± 2.8 a	16.7 ± 2.8 c	3.3 ± 2.8 b	0.0 a	13.3 ± 2.8 a
0.5%	71.6 ± 2.8 a	20.0 ± 5.0 c	3.3 ± 2.8 b	0.0 a	5.0 ± 0.0 b
0.75%	13.3 ± 2.8 b	83.3 ± 2.8 d	0.0 c	0.0 a	3.3 ± 2.8 c
1.2%	0.0 c	98.3 ± 2.8 e	0.0 c	1.6 ± 2.8 b	0.0 d
1.35%	0.0 c	100 f	0.0 c	0.0 a	0.0d
<i>With food</i>					
Control	28.3 ± 2.8 a #	0.0 a	10.0 ± 0.0 a #	0.0 a	61.7 ± 2.8 a #
0.3%	70.0 ± 0.0 b	0.0 a #	5.0 ± 0.0 b	0.0 a	25.0 ± 0.0 b #
0.4%	85.0 ± 0.0 c #	10.0 ± 0.0 b #	0.0 c #	0.0 a	5.0 ± 0.0 c #
0.5%	73.3 ± 2.8 d	26.7 ± 2.8 c	0.0 c #	0.0 a	0.0 d #
0.75%	68.3 ± 2.8 bd #	31.6 ± 2.8 c #	0.0 c	0.0 a	0.0 d #
1.2%	58.3 ± 2.8 e #	41.6 ± 2.8 d #	0.0 c	0.0 a #	0.0 d
1.35%	0.0 f	98.3 ± 2.8 e	0.0 c	1.7 ± 2.8 b #	0.0 d

Different letters at the same column indicate significant differences ($p < 0.05$) between control and the treatments at different concentrations. The symbol # indicates significant difference ($p < 0.05$) between the value in assay with food addition and that obtained in assay without food addition.

The leaf extract clearly led to disruptions in development of *A. aegypti* in the assay with fed larvae (Table 3). By the 8th day, most of the individuals (61.7%) had emerged as adults in the control, while in the treatments with extract at 0.3% and 0.4%, this number was 25.0 and 5.0%, respectively, and there was no emergence of adults in bioassays at any of the other concentrations.

Larvae from PPCampos strain were treated with the leaf extract at 1.0% (w/v) and the mortality rate was similar to that detected for Rockefeller larvae; also, the PPCampos larvae (100%) eliminated the gut content. Figure 1B shows a shrunken and dark midgut dissected from a fed larva incubated (12 h) with the extract (1.0%). The midgut darkening was still observed after larvae incubation with the leaf extract (1.0%) containing 0.01 M PTU (Fig. 1D). The midgut of larvae incubated only with PTU (Fig. 1E) was similar to that of control (Fig. 1C) (i.e., without the extract and/or PTU).

Histology analysis revealed that the midgut epithelium of fed larvae incubated with the extract had remarkable disorganization in comparison to the control, with several spaces between cells and the presence of tissue/cell debris in the luminal space (Fig. 2A and 2B). A thin peritrophic matrix can still be seen in the midgut of exposed larvae. Deformations and hypertrophy of epithelial cells were also observed, as well as the presence of structures resembling vacuoles (Fig. 2D). Ultrastructural analysis by transmission electron microscopy displayed drastic cell disruption in the midgut. Digestive cells from larvae treated with leaf extract showed disrupted microvilli, cytoplasm electron-lucent, and vacuolated cytoplasm (Fig. 3).

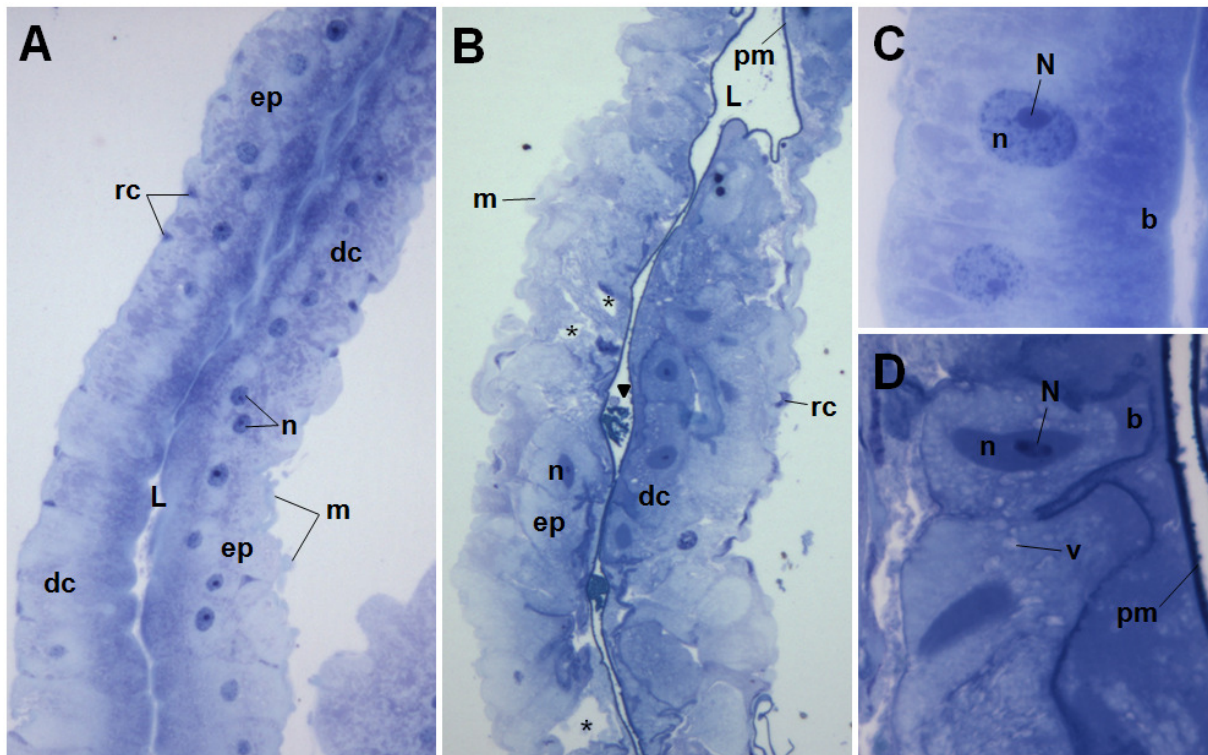


Figure 2. Toluidine Blue stained histological sections of the midgut of *Aedes aegypti* L4 from control (A) and incubated for 12 h with the *Schinus terebinthifolius* leaf extract (B). Midgut from control larva (A) showed a single-layered epithelium (ep) comprised of digestive (dc) and regenerative cells (rc) with preserved morphology (C). L, midgut lumen; m, muscle; n, digestive cell nuclei. Midgut from treated larva (B) showed intense disorganization of the epithelial layer (ep) with several spaces between cells (*) and some hypertrophied digestive cells (dc). Tissue/cell debris (arrowhead) is seen in the midgut lumen. m, muscle; n, digestive cell nucleus; pm, peritrophic matrix. Details of columnar digestive cells for control (C) and treated (D) larvae. Structure resembling vacuoles (v) are seen in D. n, cell nucleus; N, nucleolus; B, brush border.

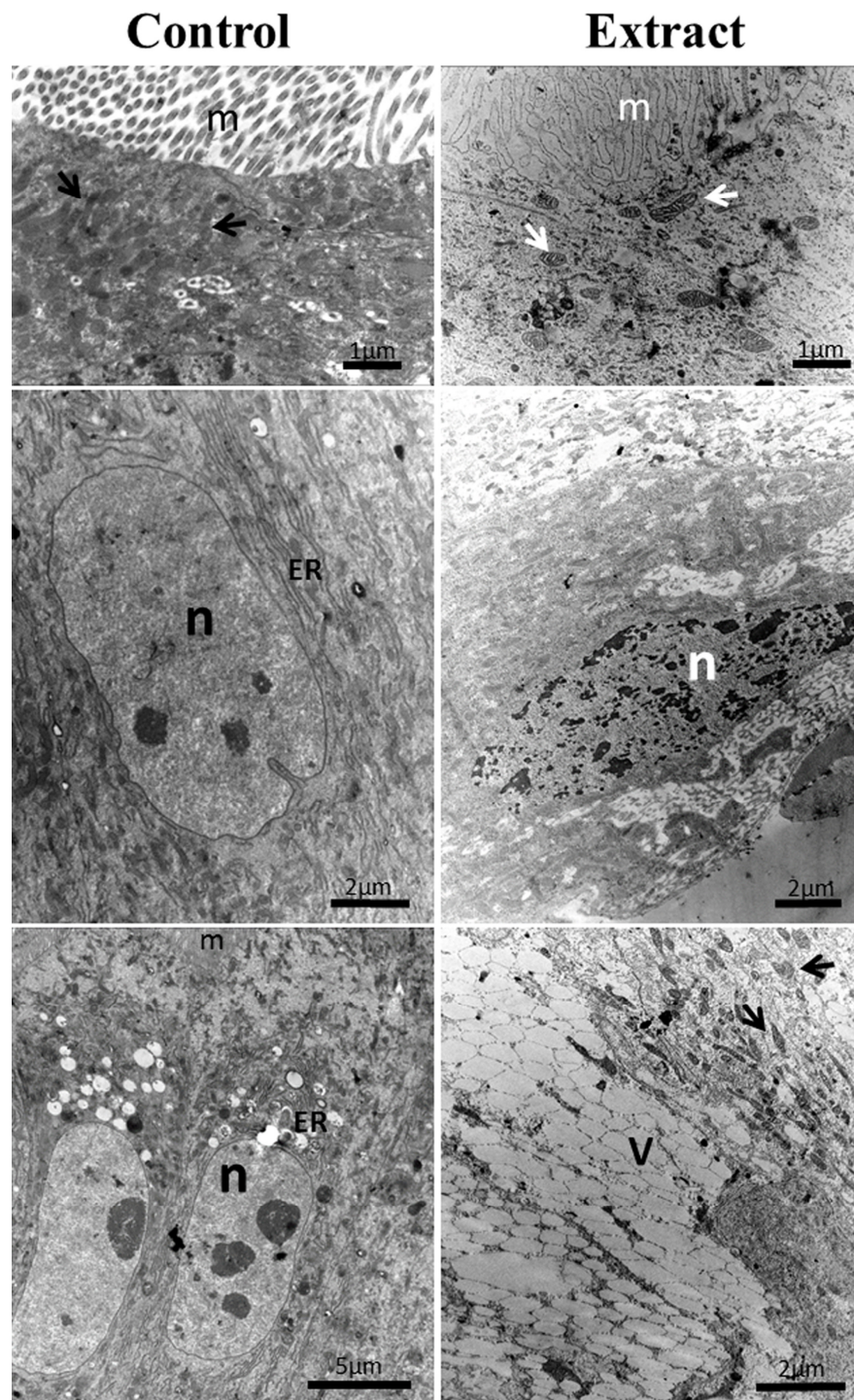


Figure 3. Electron micrographs of the midguts of *Aedes aegypti* L4 from control and those treated with *Schinus terebinthifolius* leaf extract at 1.0% (w/v). Mitochondria (arrowheads); microvilli (m); electron-lucent vacuoles (V); endoplasmic reticulum (ER); nucleus (n).

Cell nuclei from the midgut were intensely stained with DAPI in the control treatments, but only weakly stained nuclei could be seen in midgut of treated larvae (Figure 4A). In addition, enteroendocrine (FMRF-immunoreactive) cells were seen in the midgut of control larvae, but they were rarely seen in the midgut of treated individuals (Fig. 4B). The numbers of digestive, regenerative, and enteroendocrine cells counted in the midgut of treated larvae were remarkably lower than that in the control (Fig. 5A).

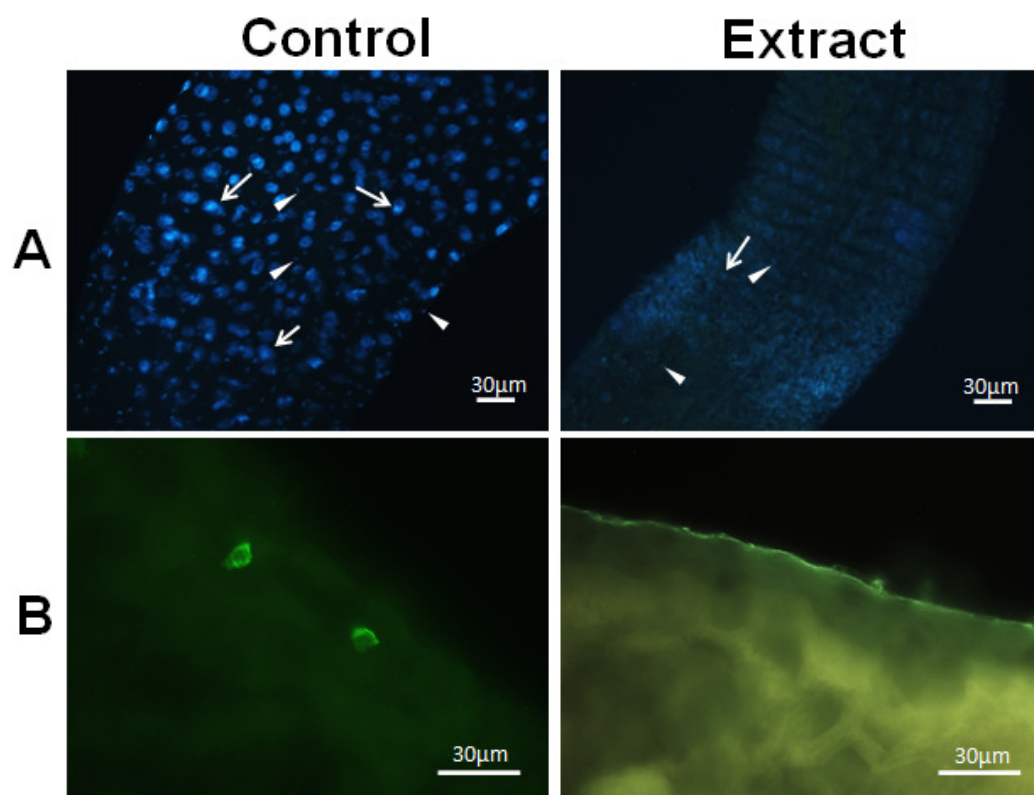


Figure 4. Midgut of *Aedes aegypti* L4 incubated for 12 h with distilled water (control) and *Schinus terebinthifolius* leaf extract at 1.0% (w/v). (A) Total mounting of larvae midgut stained with DAPI (blue) and displaying the nuclei of digestive (arrow) and regenerative (arrowhead) cells. (B) Staining of enteroendocrine (FMRF-immunoreactive) cells at the posterior region of midgut.

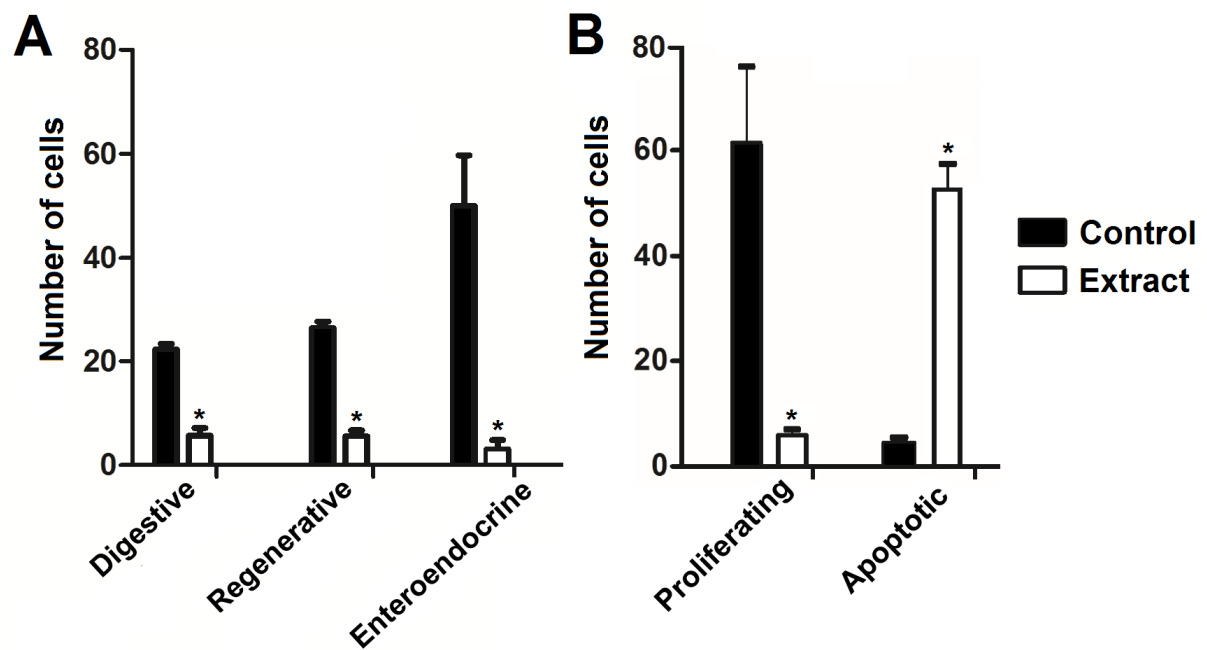


Figure 5. Number of different cell types in the midgut of *Aedes aegypti* L₄ from control and those incubated for 12 h with the *Schinus terebinthifolius* leaf extract (1.0%, w/v). (A) Digestive, regenerative, and enteroendocrine cells from the midgut epithelium were counted under the fluorescence microscope. (B) Number of proliferating regenerative cells or cells with nuclear DNA damage (TUNEL positive) in the midgut epithelium were determined by fluorescence microscopy. (*) indicates significant difference ($p < 0.05$) in comparison to the control.

Many proliferating cells (phosphohistone H3-positive) were seen in the midgut of the control larvae but they were scarce in the midgut of treated larvae (Fig. 5B and 6A). In addition, DNA fragmentation was detected by the TUNEL reaction in the midgut of larvae exposed to the leaf extract at much higher levels than in the control (Fig. 5B and 6B).

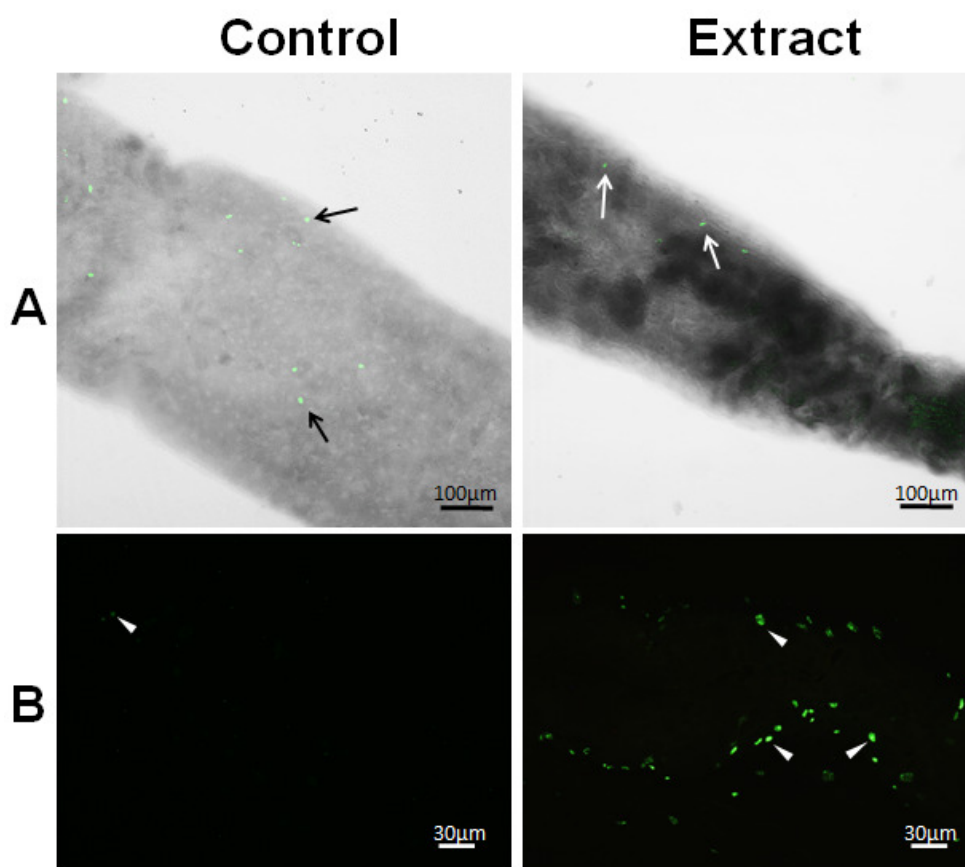


Figure 6. Proliferating regenerative cells or cells with nuclear DNA damage in the midgut of *Aedes aegypti* L₄ incubated for 12 h with distilled water (control) and *Schinus terebinthifolius* leaf extract at 1.0% (w/v). (A) Nuclei of proliferating (phosphohistone H3-positive) regenerative cells (arrow) at the posterior region of the midgut. (B) Nuclei of digestive and regenerative cells positive for DNA damage/fragmentation (arrowhead).

After the phytochemical screening, the leaf extract was semi-purified by SPE for separation of the main classes of secondary metabolites. The TLC revealed that F1 contained only cinnamic acid derivatives, F2 contained flavonoids and traces of cinnamic acid derivatives, and F3 contained hydrolysable tannins. Polymeric proanthocyanidins irreversibly bound the cartridge matrix and could not be recovered.

Table 4 shows the effects of F1, F2, and F3 treatments on *A. aegypti* larvae. The gut content elimination was detected 24 h after F1 incubation, while larval death was detected 24

h after F2 incubation. Three days after F1 or F2 incubations, the mortality rates were significantly higher ($p < 0.05$) than in the control. F1 killed 100% of the larvae 3 days after incubation, while F2 killed 66.7% of the larvae 8 days after incubation. No individual pupated after F2 incubation, while in the control individuals became adults. F3 incubation did not affect survival and development of larvae.

The lectin SteLL isolated from the leaf extract had a specific hemagglutinating activity of 27,334, and a purification fold of 337 compared to the extract. However, SteLL did not kill or affect the development of *A. aegypti* larvae at any tested concentration, and also did not induce elimination of the gut content by the larvae.

S. terebinthifolius leaf extract killed 100% of *A. salina* nauplii at all tested concentrations (0.125–1.0%), indicating that the leaf extract is potentially toxic to the environment at the concentrations that kill *A. aegypti* larvae. F1 and F2 at 1.0% (w/v) killed $73.3 \pm 5.8\%$ and $13.3 \pm 5.8\%$ of *A. salina* nauplii, respectively.

DISCUSSION

Integrated pest management has been considered an advance because it relies on a combination of common-sense practices and the most cost-effective methods for control of pests with the least possible hazard to people and the environment. The low cost and high efficacy make plant extracts an interesting possibility in integrated pest management programs [41]. Studies on the effects of essential oils from *S. terebinthifolius* fruits on mosquito larvae were performed with promising results, indicating the presence of larvicidal compounds in this plant [30], [42]. In this work, we evaluated a saline extract from *S. terebinthifolius* leaves for the presence of larvicidal agents with polar feature, and thus more advantageous than other insecticides with low solubility in aqueous systems.

Table 4. *Aedes aegypti* L4 mortality rates after incubation with fractions (F1, F2, and F3) obtained after the separation of secondary metabolites from *Schinus terebinthifolius* leaf extract.

Parameter	Sample			
	F1	F2	F3	Control
Mortality rate (%)				
24 hours	0.0 a	10.0 ± 0.0 b	0.0 a	0.0 a
3 days	100.0 a	33.3 ± 5.7 b	6.7 ± 2.8 c	3.3 ± 2.8 c
8 days	100.0 a	66.7 ± 2.8 b	6.7 ± 2.8 c	3.3 ± 2.8 c
Pupation (%)	0.0 a	0.0 a	11.6 ± 5.7 b	10.0 ± 0.0 b
Adult emergence (%)	0.0 a	0.0 a	58.3 ± 5.7 b	68.3 ± 7.6 b
Larvae that eliminated gut content (%)	30.0 ± 5.0 a	0.0 b	0.0 b	0.0 b

F1: fraction eluted with Tris buffer, containing cinnamic acid derivatives. F2: fraction eluted with methanol, containing flavonoids and traces of cinnamic acid derivatives. F3: fraction eluted with methanol-acetic acid, containing hydrolysable tannins. Elimination of gut content was evaluated with 24 h of experiment. Pupation and adult emergence rates were calculated 8 days after larval incubation. Different letters at the same line indicate significant differences ($p < 0.05$) between the treatments.

After 12-h incubation, the *S. terebinthifolius* leaf extract induced acute reactions in *A. aegypti* larvae, being the most evident the elimination of the gut content and the darkening of the midgut. The elimination of the gut content enclosed in the peritrophic matrix indicated that the leaf extract interfered with food passage along the digestive tract, and suggests that the presence of the extract in the larval environment disturbed the structural organization of

the midgut. Expelling gut contents has been reported as a defense mechanism of mosquito larvae aiming to excrete unabsorbed harmful compounds, such as DDT and some plant-derived insecticides [43], [44]. However, attempts of larvae to eliminate the harmful components of *S. terebinthifolius* leaf extract were not enough to prevent deleterious effects, since it chronically reduced larval survival, and interfered with development, even at concentrations lower than LC_{50} . It is plausible that some of the toxic compounds from the extract remained inside the larvae midgut or may have been absorbed leading to mortality. In addition, there was a considerable loss of nutrients when the larvae expelled the gut content, which may also be linked to mortality.

Metamorphosis of the unfed individuals may have been prevented by food limitation in the experimental conditions since it has been shown that *A. aegypti* larvae will inhibit pupation if sufficient resources are unavailable [45]. Indeed, the pupation rate in the control was also very low. Therefore, in order to investigate if development was damaged mainly due to effects of the extract or to food restrictions, we performed the bioassays with the addition of food.

Treated fed larvae also eliminated the gut content after 24 h, but larval death was delayed in comparison with unfed larvae. This result may be ascribed to the availability of food resources that helped the larvae to compensate for part of the nutrient losses with the expulsion of the gut content. In spite of the delay of death in fed larvae, chronic disruption in development was evident, indicating that the extract was able to exert its deleterious effects even when food is provided. Thus, *S. terebinthifolius* leaf extract is clearly able to impair larval development even when there is no restriction in food availability.

The darkening of the midgut and hindgut, as well as of their contents, may have many reasons, and results from a number of mechanisms, including melanization due to activation of phenoloxidase cascade [46]. In turn, this activation can be due to several factors such as

microbial infection, presence of components of cell walls from microorganisms and algae, parasitoids, action of proteolytic enzymes and tissue damage [47], [48], [49]. To verify if the darkening of the midgut of mosquito larvae incubated with the leaf extract was due to melanization, we added phenylthiourea (PTU, a strong phenoloxidase inhibitor) to the *S. terebinthifolius* leaf extract. The results showed that the strong pigmentation of larval midgut was still observed even in the presence of PTU, indicating that the midgut darkening was not related to melanization or resulted from other mechanisms, such as tissue injuries caused by the extract, or due to the accumulation of leaf extract into the larval midgut.

The absence of bacteria and yeasts in the leaf extract reveals that there were no microorganisms being introduced in the larval environment together with the extract, and thus there would be no elicitation of midgut melanization after incubation with the extract. In addition, the larval death could not be related to the presence of toxins released by microorganisms in the extract, but due to extract components solely.

Other plant-derived insecticides have shown deleterious effects in the midgut of mosquitoes, similar to the *S. terebinthifolius* leaf extract. For example, vacuolization and cell hypertrophy were caused by the ethanolic extract from *Magonia pubescens* bark [50], the methanolic extract from *Derris urucu* root [44], and an acetogenin from *Annona squamosa* [51] in the midgut of *A. aegypti*. Vacuolization, microvilli damage as well as cell lysis and death were reported as some of the effects of *Melia azedarach* extract on the midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae [41]. The alkaloid pellitorine caused degeneration of epithelial cells at the anterior and posterior midgut regions of *A. aegypti* larvae, affecting the ability to osmoregulate, as well as damaged the gastric caeca, including cells important in ion transport [52].

The damage to digestive cells in the midgut of *A. aegypti* larvae caused by the *S. terebinthifolius* leaf extract may have impaired digestive and absorption processes in the

larval midgut, compromising survival, and disrupting larval mosquito development. The regenerative cells play an important role in development since they start their division in the last larval instar and finish in the early pupal stage, resulting in renewing of intestinal epithelium, an essential step in metamorphosis [53]. Once regenerative cell division was reduced in treated larvae, it prevented transformation of the midgut, and organ remodeling during pupation.

Damage to enteroendocrine cells have the potential to disrupt homeostasis throughout the larval body, since these cells have been reported to release peptides, monoamines, and other substances that supposedly have paracrine effects on regenerative cells and enzyme production by digestive cells [54].

Results from TUNEL assay revealed that components of *S. terebinthifolius* leaf extract caused cleavage of DNA in the midgut cells. This can result from activation of apoptotic, necrotic, and autolysis processes or severe DNA damage caused by the extract [55].

In summary, the *S. terebinthifolius* leaf extract promoted larval mortality probably due to: 1) induction of acute reaction by larvae, which expelled the gut contents resulting in lost food nutrients; 2) blocking of digestion and absorption of nutrients due to cytotoxic effects on digestive cells and disruption of microvilli; 3) deregulation of digestion and secretion of substances either in the gut lumen or in the hemolymph due to impairment of enteroendocrine cells; and 4) disruption of gut homeostasis due to the partial detachment of the peritrophic matrix and extensive tissue disorganization in the midgut.

Secondary metabolites from leaf extract of *S. terebinthifolius* were semi-purified in order to check the deleterious effects of each class of secondary metabolites in *A. aegypti* larvae. The fraction containing cinnamic acid derivatives (F1) was able to kill all larvae in 3 days, while the fraction containing mainly flavonoids (F2) promoted high mortality after 8

days. These results indicate that the cinnamic acid derivatives are the main responsible for the lethal effect, but the flavonoids are also larvicidal components of the extract.

Cinnamic acid derivatives and aglycone flavonoids have been previously reported to have insecticidal effects. Aglycone flavonoids, such as quercetin and kaempferol, were detected in larvicidal extracts from *Moringa oleifera* flowers [9] and *Gardenia ternifolia* aerial parts [56], and these flavonoids, when isolated, were able to inhibit the cytochrome P-450 dependent ecdysone 20-monooxygenase activity in *A. aegypti* [57]. Quercetin also negatively affected weight gain of *Bombyx mori* larvae, as well as induced detoxifying enzyme activity [58]. The toxicity of methanolic *D. urucu* root extract, which induced larvae to excrete feces and caused midgut damage, has been attributed to an isoflavonoid called rotenone [44]. The cinnamic acid derivatives, cinnamaldehyde and cinnamyl acetate, showed strong larvicidal properties against fourth-instar larvae of *A. aegypti* [59].

When mosquito larvae were incubated with F1, the gut content was also eliminated, suggesting the involvement of cinnamic acid derivatives in this phenomenon. However, the number of larvae with this phenotype was lower than in the set of larvae treated with the complete extract, indicating that not only cinnamic acid derivatives induce the elimination of the gut content, but also other extract components. The elimination of the gut content is probably a response to an overload of foreign and potentially toxic compounds in the gut lumen, as discussed above. Indeed, some compounds that are low active or inactive when isolated may cause strong effects when in combination with other active principles [60].

The main secondary metabolites detected in the extract belonged to aglycone flavonoid and cinnamic acid derivatives groups, which have been previously reported to have insecticidal effects. Aglycone flavonoids, such as quercetin and kaempferol, were detected in larvicidal extracts from *Moringa oleifera* flowers [9] and *Gardenia ternifolia* aerial parts [56], and these flavonoids, when isolated, were able to inhibit the cytochrome P-450 dependent

ecdysone 20-monooxygenase activity in *A. aegypti* [57]. Quercetin also negatively affected weight gain of *Bombyx mori* larvae, as well as induced detoxifying enzyme activity [58]. The cinnamic acid derivatives, cinnamaldehyde and cinnamyl acetate, showed strong larvicidal properties against fourth-instar larvae of *A. aegypti* [59]. The toxicity of methanolic *D. urucu* root extract, which induced larvae to excrete feces and caused midgut damage, has been attributed to an isoflavonoid called rotenone [44].

The leaf extract used here was prepared using the same procedure described by Gomes et al. [28] for obtaining crude extract from which the lectin SteLL was isolated. Since lectins have been reported as larvicidal agents against *A. aegypti* [34], [61], [62], [63], we hypothesized that SteLL could be involved in the deleterious effects of *S. terebinthifolius* leaf extract on larvae. However, SteLL did not kill the larvae or induce gut content elimination, which suggests that it is not a component of the larvicidal property of the extract, or is not effective when separated of other extract components. This is reinforced by the very high purification fold of the sample tested, which indicates that lectin molecules were more concentrated in SteLL than in the extract, and thus, larvae should be affected if the lectin was involved in the deleterious effects of *S. terebinthifolius* leaf extract.

Plant compounds are usually less hazardous to the environment than synthetic insecticides, but this does not exclude the possibility that a natural insecticide could be harmful to non-target organisms. Thus, we evaluated the environmental toxicity of *S. terebinthifolius* leaf extract by determining its potential in promoting death of *A. salina* nauplii. The extract and F1 were toxic to *A. salina* nauplii, while F2 showed low toxicity to this species. These findings revealed that although the cinnamic acid derivatives have had a faster larvicidal effect than the flavonoids, these last would be a better alternative from an environmental standpoint. The extract and preparations containing the cinnamic acid derivatives can be effectively used, for example, in flowerpot plates, gully traps, the collar of

toilet bowls, roof gutters, scupper drains, air-conditioner trays, old tires, and bottles, among others. However, use in domestic containers for storage of water intended for human and animal consumption, such as water tanks, aquariums, and fountains should not currently be considered safe.

CONCLUSIONS

S. terebinthifolius leaf extract showed larvicidal activity on *A. aegypti* as well as interfered with development from pupal to adult stages. These effects are linked to damage of digestive, enteroendocrine, and regenerative cells in midgut of the larvae, as well as induction of structural disorganization of the gut and elimination of the gut content. Caution is required in the use of the extract as a larvicide against *A. aegypti* due to the toxic effects detected in the *A. salina* assay. Cinnamic acid derivatives and flavonoids are responsible for larvicidal effect of the extract. The cinnamic acid derivatives killed individuals in a shorter time but were toxic to *A. salina*, while the flavonoids, although effective in a longer period, were exempt from toxicity to this microcrustacean. On the other hand, the lectin (SteLL) seems not to be involved in the *A. aegypti* larvae damage.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their gratitude to the *Núcleo de Microscopia e Microanálise* (NMM) from the *Universidade Federal de Viçosa* due to the support in all microscopy analysis.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: TFP, KMF, RMX, GFM, THN. Performed the experiments: TFP, KMF, EVP, RMX, ARCO, CSS, GFM, THN. Analyzed the data: TFP, KMF, EVP, RMX, DMAFN, PMGP, GFM, THN. Contributed reagents/materials/analysis tools: RMX, AMMAM, DMAFN, PMGP, GFM, THN. Wrote the paper: TFP, KMF, EVP, RMX, GFM, THN.

REFERENCES

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496: 504-507.
2. World Health Organization (2014) Dengue and severe dengue. Fact sheet N° 117.
3. Maciel-de-Freitas R, Avendanho FC, Santos R, Sylvestre G, Araújo SC, et al. Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. *PLoS ONE*. 2014;9: e92424.
4. Aiub CAF, Coelho ECA, Sodré E, Pinto LFR, Felzenszwalb I. Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genet Mol Res*. 2002;1: 159-166.
5. Melo-Santos MAV, Varjal-Melo JJM, Araújo AP, Gomes TCS, Paiva MHS, et al. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Trop*. 2010;113: 180-189.
6. Ocampo C, Salazar-Terreros M, Mina N, Mcallister J, Brogdon W. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities of Colombia. *Acta Trop*. 2011;118: 37-44.
7. Polson KA, Brogdon WG, Rawlins SC, Chadee DD Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Trop*. 2011;117: 31-38.

8. Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A, Ranson H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pest Biochem Physiol.* 2012;104: 126-131.
9. Pontual EV, Napoleão TH, Assis CRD, Bezerra RS, Xavier HS, et al. Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2012;79: 135-152.
10. Murray T, Miles C, Daniels C. Natural insecticides. Washington State University, Oregon State University, University of Idaho. PNW649; 2013.
11. Amer A, Mehlhorn H. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitol Res.* 2006;99: 466-472.
12. Costa MS, Pinheiro DO, Serrão JE, Pereira MJB. Morphological changes in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae following exposure to an *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonaceae) extract. *Neotrop Entomol.* 2012;41: 311-314.
13. Deletre E, Martin T, Campagne P, Bourguet D, Cadin A, et al. Repellent, irritant and toxic effects of 20 plant extracts on adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* mosquito. *PLoS ONE.* 2013;8: e82103.
14. Kamiabi F, Jaal Z, Keng CL. Bioefficacy of crude extract of *Cyperus aromaticus* (Family: Cyperaceae) cultured cells, against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Asian Pac J Trop Biomedic.* 2013;3: 767-775.
15. Navarro DMAF, Oliveira PES, Potting RJP, Brito AC, Fital SJF, Sant'Ana AEG. The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Dipt., Culicidae). *J Appl Entomol.* 2003;127: 46-50.
16. Pontual EV, Santos NDL, Moura MC, Coelho LCBB, Navarro DMAF, et al. Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of

- Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. Parasitol Res. 2014;113: 727-733.
17. Paiva PMG, Pontual EV, Napoleão TH, Coelho LCBB. Lectins and trypsin inhibitors from plants: Biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae. New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2013.
 18. Brusca GJ, Brusca RC. Invertebrates. Sunderland: Sinauer Associates; 2003.
 19. Ray K, Mercedes M, Chan D, Choi CY, Nishiura JT. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. J Insect Sci. 2007;9: 1-13.
 20. Fernandes KM, Neves CA, Serrão JE, Martins GF. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. Parasitol Int. 2014;63: 506-512.
 21. Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum; 2008;
 22. Balbachas A. As plantas curam. São Paulo: Missionária; 1959.
 23. Lindenmaier DS. Etnobotânica em comunidades indígenas Guaranis no Rio Grande do Sul. Santa Cruz do Sul: Universidade de Santa Cruz do Sul; 2008.
 24. Jain MK, Yu BZ, Rogers JM, Smith AE, Boger ETA, et al. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. Phytochemistry. 1995;39: 537-547.
 25. Matsuo AL, Figueiredo CR, Arruda DC, Pereira FV; Scutti JAB, et al. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. Biochem Biophys Res Commun. 2011;411: 449-454.
 26. Pawlowski Â, Kaltchuk-Santos E, Zini CA, Caramão EB, Soares GLG. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. South Afric J Bot. 2012;80: 96-103.

27. Cavalher-Machado SC, Rosas EC, Brito FA, Heringe AP, Oliveira RR, et al. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *Int Immunopharmacol*. 2008;8: 1552-1560.
28. Gomes FS, Procópio TF, Napoleão TH, Coelho LCBB, Paiva PMG. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *J Appl Microbiol*. 2013;114: 672-679.
29. Coelho AAM, de Paula JE, Espíndola LS. Atividade larvívica de extratos vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), em condições de laboratório. *BioAssay*. 2009;4: 3.
30. Silva AG, Almeida DL, Ronchi SN, Bento AC, Scherer R, Ramos AC, Cruz ZMA. The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). *Parasit Vectors*. 2010;3: 79.
31. Roberts EH, Cartwright RA, Wood DJ. The flavonols of tea. *J Sci Food Agric*. 1956;7: 637-646.
32. Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis*. New York: Springer; 1996.
33. Harborne JB. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. London: Chapman & Hall; 1998.
34. Napoleão TH, Pontual EV, Lima TA, Santos NDL, Sá RA, et al. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitol Res*. 2012;110: 609-616.
35. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193: 265-275.
36. Navarro DMAF, Silva PCB, Silva MR, Napoleão TH, Paiva PMG. Larvicidal activity of plant and algae extracts, essential oils and isolated chemical constituents against *Aedes aegypti*. *Nat Prod J*. 2013;3: 268-291.

37. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC/81.807. p 1-6; 1981.
38. Fernandes KM, Araújo VA, Serrão JE, Martins GF, Campos LAO, Neves CA. Quantitative Analyses of the digestive and regenerative cells of the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera; Apidae). Sociobiology. 2010;56: 489-505.
39. Preuss U, Landsberg G, Scheidtmann KH. Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. Nucleic Acids Res. 2003;31: 878-885.
40. Meyer BN, Ferrigini NR, Putman JE, Jacobson LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med. 1982;45: 31-34.
41. Al-Mehmadi RM, Al-Khalaf AA. Larvicidal and histological effects of *Melia azedarach* extract on *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). J King Saud Univ. 2010;22: 77-85.
42. Pratti DLA, Ramos AC, Scherer R, Cruz ZMA, Ary G. Mechanistic basis for morphological damage induced by essential oil from Brazilian pepper tree, *Schinus terebinthifolia*, on larvae of *Stegomyia aegypti*, the dengue vector. Parasit Vectors. 2015;8: 136.
43. Abedi, ZH, Brown AWA. Peritrophic membrane as vehicle for DDT and DDE excretion in *Aedes aegypti* larvae. Ann Entomol Soc America. 1961;54: 539-542.
44. Gusmão DS, Páscoa V, Mathias L, Vieira IJC, Braz-Filho R, Lemos FJA. *Derris* (*Lonchocarpus*) *urucu* (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97: 371-375.
45. Levi T, Ben-Dov E, Shahi P, Borovsky D, Zaritsky A. Growth and development of *Aedes aegypti* larvae at limiting food concentrations. Acta Trop. 2014;133: 42-44.

46. Shao Q, Yang B, Xu Q, Li X, Lu Z, Wang C, Huang Y, Söderhäll K, Ling E. Hindgut innate immunity and regulation of fecal microbiota through melanization in insects. *J Biol Chem*. 2012;287: 14270-14279.
47. Ashida M, Ishizaki Y, Iwahana H. Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell wall or β -1,3-glucans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;113: 562-564.
48. Rowley AF; Brookman JL, Ratcliffe NA. Possible involvement of the prophenoloxidase system of the locust, *Locusta migratoria*, in antimicrobial activity. *J Inv Pathol*. 1990;56: 31-38.
49. Silva CCA. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. *Biotechnol Ciên Desenv*. 2002;24: 68-72.
50. Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36: 17-25.
51. Costa MS, Cossolin JFS, Pereira MJB, Sant'Ana AEG, Lima MD, et al. Larvicidal and cytotoxic potential of squamocin on the midgut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Toxins*. 2014;6: 1169-1176.
52. Perumalsamy H, Kim J-R, Oh SM, Jung JW, Ahn Y-J, Kwon HW. Novel histopathological and molecular effects of natural compound pellitorine on larval midgut epithelium and anal gills of *Aedes aegypti*. *PLoS ONE*. 2013;8: e80226.
53. Nishiura JT, Ho P, Ray K. Methoprene interferes with mosquito midgut remodeling during metamorphosis. *J Med Entomol*. 2003;40: 498-507.
54. Brown MR, Raikhel AS, Lea AO. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. *Tissue Cell*. 1985;17: 709-721.
55. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*. 2005;73: 1907-1916.

56. Ochieng CO, Midiwo JO, Owuor PO. Anti-plasmodial and larvicidal effects of surface exudates of *Gardenia ternifolia* aerial parts. Res J Pharmacol. 2010;4: 45-50.
57. Mitchell MJ, Keogh DP, Crooks JR, Smith SL. Effects of plant flavonoids and other allelochemicals on insect cytochrome P-450 dependent steroid hydroxylase activity. Insect Biochem Mol Biol. 1993;23: 65-71.
58. Zhang YE, Ma HJ, Feng DD, Lai XF, Chen ZM, et al. Induction of detoxification enzymes by quercetin in the silkworm. J Econ Entomol. 2012;105: 1034-1042.
59. Cheng SS, Liu JY, Tsai KH, Chen WJ, Chang ST. Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. J Agric Food Chem. 2004;14: 4935-4400.
60. Shaalan, EA, Canyon D, Younes MWF, Abdel-Wahab M, Mansour A-H. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. Environ Int. 2005;31: 1149-1166.
61. Coelho JS, Santos NDL, Napoleão TH, Gomes FS, Ferreira RS, et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. Chemosphere. 2009;77: 934-938.
62. Sá RA, Santos NDL, Silva CSB, Napoleão TH, Gomes FS, et al. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. Comp. Biochem. Physiol C. 2009;149: 300-306.
63. Agra-Neto AC, Napoleão TH, Pontual EV, Santos NDL, Luz LA, et al. Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. Parasitol Res. 2014;113: 175-184.

6. CONCLUSÃO

O extrato de folhas de *S. terebinthifolius* apresentou atividade larvicida contra *A. aegypti*, bem como interferiu no desenvolvimento das larvas a pupas e adultos. Esses efeitos provavelmente resultam dos danos causados às células digestivas, regenerativas e enteroendócrinas do intestino médio das larvas, bem como da desorganização estrutural do intestino e indução da eliminação do conteúdo alimentar. Derivados de ácido cinâmico e flavonoides são responsáveis pelo efeito larvicida do extrato, sendo os derivados de ácido cinâmico mais eficientes por causaram mortalidade em menor tempo. No entanto, o extrato e fração contendo derivados cinâmicos foram tóxicos para *A. salina*, sendo necessária cautela no uso como agente larvicida. Por outro lado, fração contendo flavonoides foi isenta de toxicidade para esse microcrustáceo.