



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

REBECA XAVIER DA CUNHA

**ATIVIDADE INSETICIDA CONTRA O MOSQUITO *Aedes Aegypti* DO  
EXTRATO CLOROFÓRMICO DE *Poincianella microphylla***

Recife

2019

REBECA XAVIER DA CUNHA

**ATIVIDADE INSETICIDA CONTRA O MOSQUITO *Aedes Aegypti* DO  
EXTRATO CLOROFÓRMICO DE *Poincianella microphylla***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia. Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador (a): Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes de Lima

Recife  
2019

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Cunha, Rebeca Xavier da  
Atividade inseticida contra o mosquito *Aedes aegypti* do extrato clorofórmico de *Poincianella microphylla* / Rebeca Xavier da Cunha. - 2019.

98 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes de Lima.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2019.  
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Inseticida. 2. *Aedes aegypti*. 3. Mosquitos – Controle. I. Lima, Vera Lúcia de Menezes (orientadora). II. Título.

632.951

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-264-2021

REBECA XAVIER DA CUNHA

**ATIVIDADE INSETICIDA CONTRA O MOSQUITO *Aedes Aegypti* DO  
EXTRATO CLOROFÓRMICO DE *Poincianaella microphylla***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia. Área de concentração: Ciências Biológicas

Aprovada em: 29/07/2019

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima  
Departamento de Bioquímica- UFPE

---

Dr. Weber Melo Nascimento  
Departamento de Bioquímica- UFPE

---

Dra. Ana Paula Sant'Anna da Silva  
Departamento de Bioquímica- UFPE

---

Prof. Dr. Caíque Silveira Martins da Fonseca  
Centro Universitário UNIFAVIP- Caruaru-PE

À Deus pai criador  
À meus pais e familiares  
Aos tantos que estão comigo em todos os momentos

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente pelo dom da vida e a oportunidade de cumprir realizações humanas, mesmo em meio a dificuldades. Que Ele está sempre ao meu lado é uma certeza, mas preciso agradecer a Ele a capacidade que Ele próprio me deu de sempre O ver mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradeço imensamente a meus pais por me conceberem, educarem e incentivarem na vida, mas principalmente os agradeço por sua compreensão nos momentos em que não pude estar muito presente. Vocês são meus melhores amigos, as duas pessoas com quem sei que posso sempre contar.

Também estendo meus agradecimentos a meus outros familiares que mesmo estando mais distantes ainda sim, de uma forma direta ou indireta contribuíram para que eu fosse quem sou. Em particular gostaria de fazer um agradecimento especial a minha prima Kátia, com quem tenho uma conexão muito forte e com quem consigo ser eu mesma sem reservas. Também um agradecimento especial a minha madrinha Veronica, a minha Tia Josefa, a meu Tio Joaquim, a meus padrinhos Givaldo e Esmeraldina e a minha prima Veronica Lucena, estas foram pessoas que desde pequena estão extremamente ligadas à minha formação, inclusive algumas destas são responsáveis por eu ter vindo estudar na UFPE.

Um importantíssimo agradecimento a minha orientadora Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima pelo apoio constante em minha caminhada acadêmica, pelas conversas sempre muito esclarecedoras e compreensivas, pela preocupação conosco não só no âmbito acadêmico, mas também por se preocupar em nós como seres humanos. Em particular, gostaria de agradecer pela orientação muito certa para que este trabalho fosse concretizado. Agradecendo a minha orientadora agradeço também a todos os professores que por minha vida passaram, alguns lembro o nome, outros minha mente já não os recorda, mas seus ensinamentos estão sempre em minha vida. Um agradecimento particular a Profa. Vera Cristina pelos ensinamentos a mim transmitidos e ao incentivo a mim dado na área acadêmica, me fazendo adquirir uma empatia muito grande por formação de pessoas.

Agradeço a todos que fazem parte da família LAB-DPN desde os ICs, que foram muitos durante este meu tempo no laboratório, então vou nomear três que me foram mais próximos que são Daywison, Iasmyn e Valquíria, e em nome destes agradeço aos demais e gostaria de dizê-los que em muitos momentos foram vocês que me ensinaram algo, muito mais do que eu os ensinei algo e neste processo de formação mútua me senti muito realizada. Os demais membros do laboratório a quem agradeço são os técnicos Alberico, Sr. João e

Bruno, a Dra. Bianka, Dr. José, Dra. Thaise, Dr. Thiago, Dr. Dewson, Dr<sup>a</sup> Janaína, Dr. Ilton, Dra. Priscila e ao Msc. Douglas. Também agradeço ao Msc. João Ricardhis por sua disponibilidade em sempre me ajudar, me escutar e incentivar e a Laiza Fernanda, a integrante mais nova do laboratório, com quem passei tantos momentos significativos em que nos ajudamos mutuamente e acumulamos novos conhecimentos em tão pouco tempo. Aos outros que aqui não estão nomeados também agradeço e tenho carinho, afinal somos uma família que principalmente no natal sempre se reencontra e celebra os laços que nos unem mesmo que cada um tenha seguido seus caminhos.

Agradeço a banca examinadora pela disponibilidade em avaliar e contribuir neste trabalho de dissertação, ao Dr. Weber Melo Nascimento, também por ter me ajudado muito no início de minha vida científica e continuar me ajudando na minha formação científica, sempre compartilhando seus ensinamentos conosco. À Dra. Ana Paula Sant'Anna, por sempre estar disponível para nos ajudar e por transmitir conhecimentos tão preciosos, principalmente na área de purificação. Ao Dr. Caíque Silveira Martins Fonseca por sempre compartilhar conosco seus preciosos conhecimentos em ensino acadêmico, e também seus conhecimentos e experiências no meio científico.

Nesta dissertação contei com uma ajuda enorme de muitos colaboradores, e sem eles este trabalho não teria sido finalizado. Agradeço ao Laboratório de Produtos Naturais (Departamento de Bioquímica-UFPE) na pessoa do Prof. Dr. Nicácio pelo apoio no processo de extração. Ao Laboratório de Biologia Molecular (Departamento de Bioquímica-UFPE) em especial a Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva e ao Dr. Alexandre Gomes da Silva (*in memoriam*) por toda ajuda científica em relação à planta deste estudo. Ao Laboratório de Ecologia (Química do Departamento de Química Fundamental-UFPE) em especial a Profa. Dra. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro, a Msc. Bheatriz Nunes de Lima Albuquerque e ao técnico deste laboratório pela ajuda no teste larvicida. Ao grupo de pesquisa em Biologia Celular e Molecular de Patógenos (Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz), em especial a Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo, ao Msc. Vanderlan Nogueira Holanda e aos ICs Welson Vicente da Silva e Pedro Henrique do Nascimento pela ajuda na análise microscópica das larvas do mosquito. Ao Laboratório de Enzimologia-LABENZ (Departamento de Bioquímica-UFPE), em particular ao Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra, ao Dr. Rafael David Souto de Azevedo e a Kívia Vanessa Gomes Falcão pela ajuda no experimento com o zebrafish.

Aos muitos amigos que fiz na Universidade, em especial meus amigos de graduação Izabelly, Maressa, Elidianne, Tuanne, Elys, Natánias, Catarina, Isabele, Rayane, Dayane e

Cicero, pelas boas risadas, pelos ombros amigos e pela ajuda acadêmica. Vossas maneiras de serem adicionam pedrinhas no mosaico que sou. Também agradeço aos amigos de mestrado Camila Pinho, Dayane Correia, Luana, Rafael Borba, Rafael Arthur e Wêndeo e tantos outros que direta ou indiretamente estiveram comigo nesta caminhada. Aqui também deixou meus agradecimentos à minhas vizinhas Dalva e Branca que se tornaram grandes amigas, que sempre ajudam a minha família.

Meu especial obrigado também, ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia (PGBqF) em nome da Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, Coordenadora, e da Profa. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte, Vice-Coordenadora, e de Maria Fernanda Cavalcanti Sousa Veloso, Secretária, e demais funcionários, muito obrigada por todo apoio.

Agradeço também a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pela graduação e mestrado que tive a oportunidade de desenvolver nesta instituição, por ter sido o lugar onde cresci como acadêmica e como pessoa e por ter sido também um lugar sempre aberto ao conhecimento.

Enfim agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse aqui. Muito obrigada!



“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”  
Cora Carolina

## RESUMO

*Poincianella microphylla* é uma planta conhecida popularmente como Catinga-de-porco, típica do domínio fitogeográfico da Caatinga. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade inseticida do extrato clorofórmico das folhas da *P. microphylla* contra o mosquito *Aedes aegypti*. Folhas foram secas, trituradas e em seguida submetidas a uma extração em aparelho Soxhlet com solventes em ordem crescente de polaridade: ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Para a atividade larvicida, inicialmente foi feito um teste de varredura com as concentrações de 10, 100, 250, 500, 600 e 1.000 ppm para todos estes extratos, e o extrato que melhor apresentou atividade larvicida teve seu LC50 e LC90, em 48 horas, determinado testando-se concentrações abaixo da de melhor atividade no teste de varredura. Visando determinar o possível mecanismo de ação, larvas expostas a concentrações correspondentes a LC50 e a 2xLC50 por 24 horas tiveram suas estruturas analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). O extrato de melhor atividade larvicida ainda teve sua constituição fitoquímica determinada através de cromatografia em camada delgada. Em seguida, este mesmo extrato, em diferentes concentrações, teve sua fitotoxicidade determinada em modelo de toxicidade à *Lactuca sativa* L. (alface) e parâmetros de crescimento e germinação das sementes foram utilizados na determinação da fitotoxicidade. Embriotoxicidade ao zebrafish também foi avaliada, submetendo os embriões a diferentes concentrações deste extrato e os avaliando após 24, 48 e 72 horas. Durante o teste, a mortalidade, o desenvolvimento dos embriões e os batimentos cardíacos foram avaliados e a mortalidade utilizada no cálculo da LC50. A citotoxicidade foi determinada por avaliação da porcentagem de hemólise expondo-se diferentes concentrações do extrato a eritrócitos humanos. Dos quatro extratos testados, apenas o extrato clorofórmico demonstrou atividade larvicida significativa, com um LC50 de 31,62 ppm. Na análise em MEV das larvas, nas duas concentrações testadas, as alterações mais pronunciadas se deram nas papilas anais e no tubo sifão, além de rupturas no abdômen e turgidez do corpo. O perfil fitoquímico revelou que os metabólitos mais presentes no extrato foram cumarinas, compostos fenólicos, lignanas, derivados antracênicos e saponinas. No teste de fitotoxicidade, o extrato apenas produziu redução significativa do dicótilo na concentração de 90 ppm quando comparada com a concentração de 60 ppm ( $p=0,0295$ ) e em relação aos índices de germinação todas concentrações foram consideradas não fitotóxicas. O teste em embriões de zebrafish apresentou uma LC50 de 61,05 ppm em 48 horas, no entanto, parâmetros analisados neste mesmo tempo e em 72 horas, em concentrações próximas a LC50 larvicida do extrato, o

extrato mostrou provocar alterações no desenvolvimento do embrião que não levam a significativa mortalidade. O extrato, em nenhuma das concentrações testadas provocou hemólise. Portanto, o extrato clorofórmio de *P. microphylla* constitui uma alternativa larvicida no combate ao *Ae. aegypti*, mosquito vetor de viroses preocupantes para a saúde pública, no entanto, trabalhos futuros são necessários para isolamento do princípio ativo presente no extrato e para uma melhor determinação de sua toxicidade.

**Palavras-chave:** Metabólitos secundários. Larvicida. Zebrafish. Fitotoxicidade. Citotoxicidade

## ABSTRACT

*Poincianella microphylla* is a plant popularly known as Catinga-de-porco, present in the phytogeographical domain Caatinga. The aim of this study was to evaluate *P. microphylla* leaves chloroform extract insecticidal activity against *Aedes aegypti* mosquito. Leaves were dried, crushed and then subjected to extraction in Soxhlet apparatus with solvents in increasing order of polarity: cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. For larvicidal activity, a screening test for all these extracts was carried out with concentrations of 10, 100, 250, 500, 600 and 1,000 ppm, and the extract that had better larvicidal activity had its LC50 and LC90 in 48 hours determined by testing concentrations below that which gave better activity in the screening test. Aiming to determine the possible mechanism of action, larvae were exposed to concentrations corresponding to LC50 and 2-fold LC50 for 24 hours, and their structures analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The best larvicidal extract also had its phytochemical constitution determined through thin layer chromatography. After this, the same extract, in different concentrations, had its phytotoxicity determined in a toxicity model to *Lactuca sativa* L. (lettuce). Growth and seed germination parameters were used in the determination of phytotoxicity. Embryotoxicity to zebrafish was also evaluated subjecting the embryos to different concentrations of this extract and evaluating them at 24, 48 and 72 hours. During the test, mortality, embryo development and heartbeat were evaluated, and mortality used in LC50 determination. Cytotoxicity was determined by evaluating the percentage of hemolysis, exposing different extract concentrations to human erythrocytes. Among the four extracts tested, only chloroform extract showed significant larvicidal activity with a LC50 of 31.62 ppm. In larvae SEM analysis, in the two concentrations tested, the most pronounced changes occurred in anal papillae and siphon tube, in addition to ruptures in abdomen and body turgidity. Phytochemical profile revealed that the most metabolites present in the extract were coumarins, phenolic compounds, lignans, anthracene derivatives and saponins. In phytotoxicity test, the extract only produced a significant reduction in the hypocotyl in the concentration of 90 ppm when compared to the concentration of 60 ppm ( $p=0.0295$ ) and in relation to germination indexes all concentrations were considered non-phytotoxic. Zebrafish embryo test showed a LC50 of 61.05 ppm in 48 hours, however, parameters analyzed at this same time and in 72 hours, at concentrations close to extract LC50 larvicidal, extract showed to cause alterations in the development of the embryo that do not lead to significant mortality. The extract at any of tested concentrations did not cause hemolysis. Therefore, *P. microphylla* chloroform extract showed to be a

larvicidal alternative in the combat against *Ae. aegypti*, mosquito vector of public health concerning, however, future studies are necessary to isolate the active compound present in the extract and to better determine its toxicity.

**Key-words:** Secondary metabolites. Larvicide. Zebrafish. Phytotoxicity. Citotoxicity

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão de literatura

Figura 1- Fases do ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	20
Figura 2 - Larva da subfamília Culicinae. 1: cabeça; 2: antena; 3: escova oral; 4: olho; 5: tórax; 7: abdômen com 8 segmentos; 8: lobo anal; 9: cerda 4-X ou escova ventral do lobo anal; 10: brânquias ou papilas anais; 11: sifão respiratório	20
Figura 3 - Detalhes da estrutura da larva. Ab: abdome; Ac: acúleo sifonal; ANT: antena; ApS: aparato sifonal (ápice do sifão); C: cabeça; D: vista dorsal; EPVIII: espinhas do pente do segmento VIII; EsS: espinho do pecten sifonal; LAT: vista lateral; M: mesotórax; P: protórax; Pa: papilas anais; Pe: pecten sifonal; Si: sifão; T: metatórax; To: tórax; V: vista ventral; I-VIII: segmentos abdominais; X: segmento X (ou lobo anal)	21
Figura 4 - Larva do quarto estágio do <i>Aedes aegypti</i> . (a) Visão dorsal da larva de quarto estágio (b) Representação mais próxima da comb scale (c) Visão dorsal da cabeça (d) Visão lateral do segmento termina. APP, papila anal; CS, comb scale; LH, cerda lateral (seta 1-X); Pt, dente do Pecten; S, sifão; ST, tubo sifonal (seta 1-S); 5-C, cabelo da cabeça superior; 6-C, cabelo da cabeça inferior, 7-C, cabelo da cabeça pre-antenal	22
Figura 5 - Distribuição global prevista para o mosquito <i>Aedes aegypti</i> mostrando a probabilidade de ocorrência do mosquito em escala de 0 (azul) a 1 (vermelho)	23
Figura 6 - Reemergência da febre amarela entre os anos de 2014 e 2018	25
Figura 7 - Algumas estratégias de controle biológico de mosquitos	28
Figura 8 - Publicações relacionadas a inseticidas botânicos entre 1980 e 2012	29
Figura 9 - Função dos metabólitos secundários nas plantas	30
Figura 10 - Arbusto de <i>Poincianella microphylla</i> . (a) Arbusto inteiro (b) Folhas em detalhes	33
Figura 11 - Teste de fitotoxicidade em placa de 6 poços. (a) Crescimento das plântulas da alface americana grandes lagos em placa (b) Detalhe da plântula mostrando a raiz e dicótilo	35
Figura 12 - Ciclo de desenvolvimento do <i>Danio rerio</i>	36
Figura 13 - Desenvolvimento do zebrafish em diferentes tempos em horas	37
Figura 14 - Amplificação e maturação dos eritrócitos a partir do proeritroblasto	38
Figura 15 - Estrutura da membrana eritrocitária	39

## LISTA DE TABELAS

### Revisão de literatura

Tabela 1- Levantamento Rápido de Índices de Infestação pelo <i>Aedes aegypti</i> (LIRAA) para municípios da região Nordeste	23
Tabela 2- Situação epidemiológica das principais arboviroses no Brasil	26
Tabela 3- Classificação dos terpenoides	32

### Artigo

Tabela 1- Sistemas de eluição e reveladores para caracterização dos metabólitos secundários	63
Tabela 2- Atividade larvicida de extratos de <i>Poincianella microphylla</i> contra <i>Aedes aegypti</i>	63
Tabela 3- Perfil fitoquímico do extrato clorofórmico de <i>Poincianella microphylla</i> determinado por cromatografia em camada delgada	64
Tabela 4- Efeito do extrato clorofórmico de <i>Poincianella microphylla</i> na porcentagem de germinação, porcentagem de germinação relativa de sementes, crescimento relativo da raiz e índice de germinação de <i>Lactuca sativa</i> L. dos Grandes Lagos após 7 dias (n = 4).	64
Tabela 5- Mortalidade, número de batimentos cardíacos e CL <sub>50</sub> para a exposição de embriões de zebrafish ao extrato clorofórmico de <i>Poincianella microphylla</i>	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANS	Agência Nacional de Saúde Suplementar
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. israelenses
DIVE	Diretoria de Vigilância Epidemiológica
DMSO	Dimethyl Sulfoxide (Dimetilsulfóxido)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico-ADN)
EPA	United States Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
L1	Primeiro estágio larval do mosquito <i>Aedes aegypti</i>
L2	Segundo estágio larval do mosquito <i>Aedes aegypti</i>
L3	Terceiro estágio larval do mosquito <i>Aedes aegypti</i>
L4	Quarto estágio larval do mosquito <i>Aedes aegypti</i>
LIRAA	Levantamento Rápido de Índices de Infestação pelo <i>Ae. aegypti</i>
MÊS	2- [N-morpholino] ethanesulfonic acid (ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico)
NaOH	Sodium Hydroxide (Hidróxido de Sódio)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)
OEPP/EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization/Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (Organização Europeia e Mediterrânica para a Proteção das Plantas)
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
PNI	Programa Nacional de Imunização
SE	Semana Epidemiológica
SEM	Scanning electron microscopy (Microscopia Eletrônica de Varredura-MEV)
TLC	thin - layer chromatography (cromatografia em camada fina)
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde-OMS)



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>19</b>
2.1 <i>AEDES AEGYPTI</i>	19
2.1.1 Larvas do <i>Ae. Aegypti</i>	20
2.1.2 Ocorrência do mosquito	22
2.1.3 Arboviroses cujo <i>Ae. aegypti</i> é vetor	23
2.2 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DO MOSQUITO	26
2.3 USO DAS PLANTAS NO CONTROLE DO <i>AE. AEGYPTI</i>	29
2.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS	30
2.5 <i>POINCIANELLA MICROPHYLLA</i>	33
2.6 TOXICIDADE EM ORGANISMO NÃO-ALVO	34
2.6.1 Fitotoxicidade	34
2.6.2 Toxicidade em zebrafish	35
2.6.3 Citotoxicidade em eritrócitos	37
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
<b>4 ARTIGO ATIVIDADE LARVICIDA DO EXTRATO DE <i>POINCIANELLA MICROPHYLLA</i> CONTRA O MOSQUITO VETOR <i>AEDES AEGYPTI</i></b>	<b>42</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICE A - ARTIGO <i>INDIGOFERA SUFFRUTICOSA</i> MILL. (ANIL): PLANT PROFILE, PHYTOCHEMISTRY, AND PHARMACOLOGY REVIEW, PUBLICADO NA REVISTA ADVANCES IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO A - INSTRUÇÃO PARA OS AUTORES DA REVISTA ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Aedes aegypti* é o mosquito vetor de arboviroses muito preocupantes em termos de saúde pública, já que as enfermidades a este mosquito relacionadas possuem consequências a saúde dos indivíduos, que clinicamente podem ser leves ou graves, de período curto ou longo de duração, trazendo impactos na morbidade e mortalidade da população. Doenças causadas por arbovírus não só trazem impacto em termos de saúde e qualidade de vida dos indivíduos, mas também trazem repercussões econômicas com os altos custos médicos no tratamento destas enfermidades e impactos trabalhistas, já que em algumas situações o indivíduo fica impossibilitado de desenvolver suas atividades rotineiras (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016; TEICH; ARINELLI; FAHHAM, 2017).

Das principais arboviroses de grande preocupação mundial (febre amarela, dengue, chikungunya e Zika), somente a febre amarela e a dengue possuem vacina disponível para a prevenção e imunização da população, no entanto, a vacina para dengue aprovada no Brasil em 2015 ainda não é oferecida no Programa Nacional de Imunização (PNI). Além disso para a febre amarela, o *Ae. aegypti* só está relacionado ao ciclo urbano e a transmissão via este ciclo e, portanto, via este mosquito, não ocorre no Brasil desde 1942 (ANVISA, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019b; SILVA et al., 2018). Assim sendo, uma das principais formas de prevenção e controle ainda é o combate ao mosquito vetor. Uma das mais difundidas formas de controle do mosquito é a remoção de potenciais locais de proliferação do vetor, assim como atividades de conscientização e educação, tentando tornar a população a promotora principal da redução dos índices de infestação por este mosquito (GUBLER; CLARK, 1996; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a).

Outra medida de controle também utilizada é o controle químico, com o uso dos chamados inseticidas, larvicidas ou repelentes sintéticos que são tidos como uma das mais eficazes formas de combate, no entanto, estes têm se mostrado serem tóxicos ao ser humano, ao ambiente e a outros organismos não-alvo. Um outro problema a ser enfrentado é a indução de resistência por estes compostos químicos em populações de mosquitos o que muito se deve ao uso não racional destes (MANJARRES-SUAREZ; OLIVERO-VERBEL, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a; MOYES et al., 2017).

Como foi visto, estas duas estratégias possuem entraves a serem superados, a primeira por que necessita que a população esteja disposta a se manter como promotora principal na erradicação dos focos deste mosquito, além de esta estratégia necessitar de uma participação

ativa do poder público e a segunda tem enfrentado problemas com questões de toxicidade e indução de resistência. Diante deste cenário, estratégias de controle biológico e estratégias de controle integrado vem ganhando espaço já que superam em grande parte os problemas relatados. A estratégia de controle biológico utiliza-se de organismos aquáticos predadores de larvas e pupas, microrganismos patogênicos como bactérias e fungos e mosquitos modificados, que de alguma forma impedem o ciclo de transmissão das arboviroses (BENELLI; JEFFRIES; WALKER, 2016; BOUZID et al., 2016; LIMA; GOULART; NETO, 2015; ZARA et al., 2016).

Produtos de origem natural, que também se enquadram nas estratégias de controle biológico, têm constituído uma grande fonte de inseticidas, ovicidas, larvicidas, pupicidas ou repelentes naturais que, em sua maioria, são menos tóxicos, alvo-específico, não causando danos a organismos não-alvo, e eficazes. Esta propriedade dos bioprodutos advindos de plantas se deve muito a uma propriedade intrínseca das plantas de estarem sempre se defendendo de agentes estressores através da produção de metabólitos secundários. Então, o que muitas vezes se faz é racionalizar cientificamente uma propriedade natural das plantas, extraindo os compostos responsáveis por esta propriedade e testando-os frente um dos mais importantes agentes estressores externos das plantas que são os insetos, aqui incluindo-se os mosquitos (BARBOSA et al., 2014; GHOSH; CHOWDHURY; CHANDRA, 2012; WINK, 2006).

No entanto, para que um inseticida natural seja valoroso é necessário, além de eficaz, ele seja seletivo, apresentando baixa toxicidade ambiental, biodegradabilidade, baixa toxicidade a animais e não apresentar fitotoxicidade; daí vem a importância de não somente provar a atividade inseticida, mas também de realizar testes de toxicidade a organismos não-alvos, como peixes, ensaios de fitotoxicidade e testes de citotoxicidade (BRAGANÇA et al., 2018; CORRÊA; VIEIRA, 2007; MOSSA; MOHAFRASH; CHANDRASEKARAN, 2018).

O presente estudo apresenta os esforços em propor uma ação inseticida contra o mosquito vetor *Aedes aegypti* pelo extrato clorofórmico da *Poincianella microphylla*, tentando esclarecer o mecanismo de ação e os possíveis compostos fitoquímicos relacionados a esta atividade. Também foi avaliada a toxicidade ao ser humano e a outros organismos não-alvo como o zebrafish e a alface, objetivando propor novas fontes naturais eficazes, baratas, com baixa toxicidade e que possuam ação inseticida contra o mosquito *Ae. aegypti*, considerando que atualmente a eliminação desse inseto é a melhor forma de combate às arboviroses emergentes no Brasil, as quais têm sido desafios para a saúde pública e trazendo implicações sérias para a população, além de consequências econômicas.

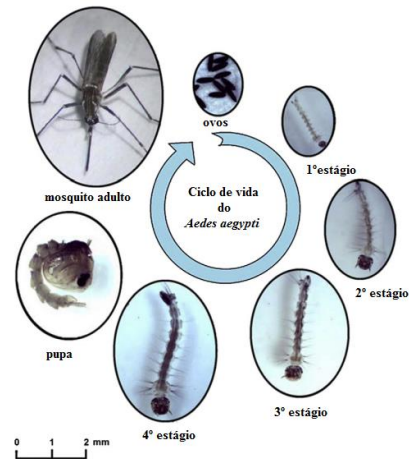
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Aedes aegypti*

*Aedes aegypti* Linnaeus (1762) inicialmente classificado com *Culex aegyptis*, atualmente membro da família Culicidae, pertencente ao subgênero Stegomyia e à ordem Diptera é vetor de importantes viroses como dengue, febre amarela, Zika e Chikungunya (HENRY, 2016; NCBI, 2018). O mosquito é originário da África e chegou as Américas provavelmente através das expedições colonizadoras europeias e tem preferência pelas regiões tropicais e subtropicais do globo. É um mosquito predominantemente cosmopolita que habita preferencialmente reservatórios domésticos contendo água (FORATTINI; DE BRITTO, 2003; PONTES; RUFFINO-NETTO, 1994).

O mosquito apresenta quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva (primeiro estágio [L1], segundo estágio [L2], terceiro estágio [L3] e quarto estágio [L4]), pupa e mosquito adulto (GERIS et al., 2012). O ciclo começa com fêmeas depositando seus ovos em locais contendo água, então a larva emerge deste ovo e passa a se alimentar de matéria orgânica presente na água enquanto passa do primeiro estágio para o quarto estágio, período no qual ocorre mudanças morfológicas relacionadas ao seu processo de crescimento. Do quarto, estágio a larva passa para pupa, que não se alimenta, apenas se presta ao desenvolvimento do mosquito adulto e, quando completamente formado, rompe a pele da pupa e passa a fase terrestre do ciclo (Figura 1). O tempo de duração do ciclo completo depende das condições ambientais, mas geralmente leva em torno de uma semana. O mosquito fêmea adulto é o único que realiza a hematofagia, pois ele se utiliza do sangue para o desenvolvimento dos ovos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Figura 1 – Fases do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*

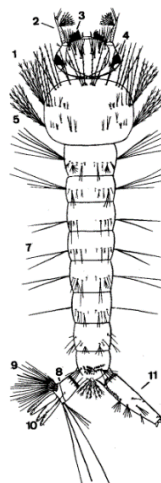


Fonte: Adaptado de GERIS et al. (2012)

### 2.1.1 Larvas do *Ae. Aegypti*

Tratam-se do primeiro estágio aquático do desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti* com coloração que vai de esbranquiçada a enegrecida e com corpo dividido em cabeça, tórax (dividido em mesotórax, protórax e metatórax) e abdome (Figura 2), sendo o abdômen dividido em 9 segmentos (segmentos I-VIII abdominais são bem semelhantes entre si, já o segmento X é o lobo anal onde tem-se o término do tubo digestivo da larva). Ao longo do corpo da larva há cerca de 222 pares de cerdas dispostas assimetricamente que variam em tamanho e número e ajudam na experiência sensorial e de flutuação da mesma (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

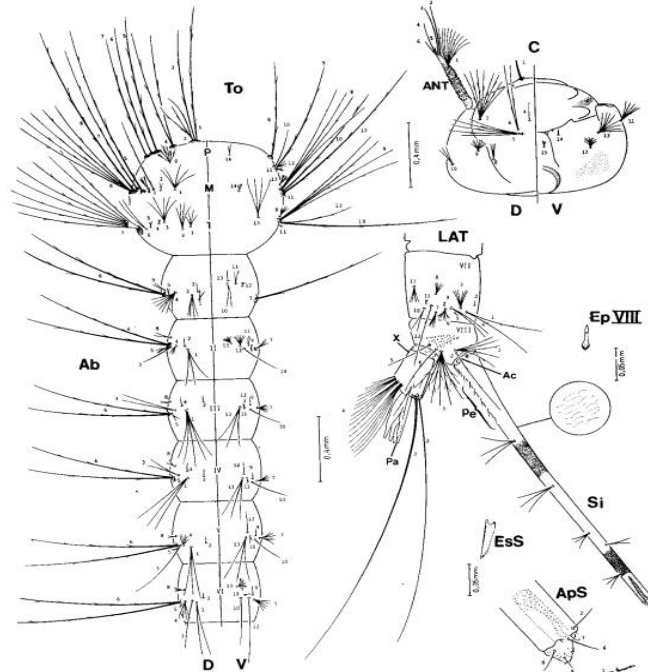
Figura 2 - Larva da subfamília Culicinae. 1: cabeça; 2: antena; 3: escova oral; 4: olho; 5: tórax; 7: abdômen com 8 segmentos; 8: lobo anal; 9: cerda 4-X ou escova ventral do lobo anal; 10: brânquias ou papilas anais; 11: sifão respiratório.



Fonte: CONSOLI; OLIVEIRA (1994)

A cabeça da larva possui um par de antenas, olhos e um aparelho bucal do tipo mastigador-raspador com mandíbulas e maxilas com dentes e cerdas fortes para auxiliar na mastigação. Do palato partem vários filamentos que fazem uma movimentação hídrica que traz para boca da larva o alimento. O lobo anal (segmento X) possui em seu ápice 4 estruturas semelhantes a uma língua que são denominadas papilas anais. Também ligado ao segmento VIII se liga uma estrutura chamada sifão respiratório que em sua base possui uma estrutura composta por quitina denominada acúleo (Figura 3) (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

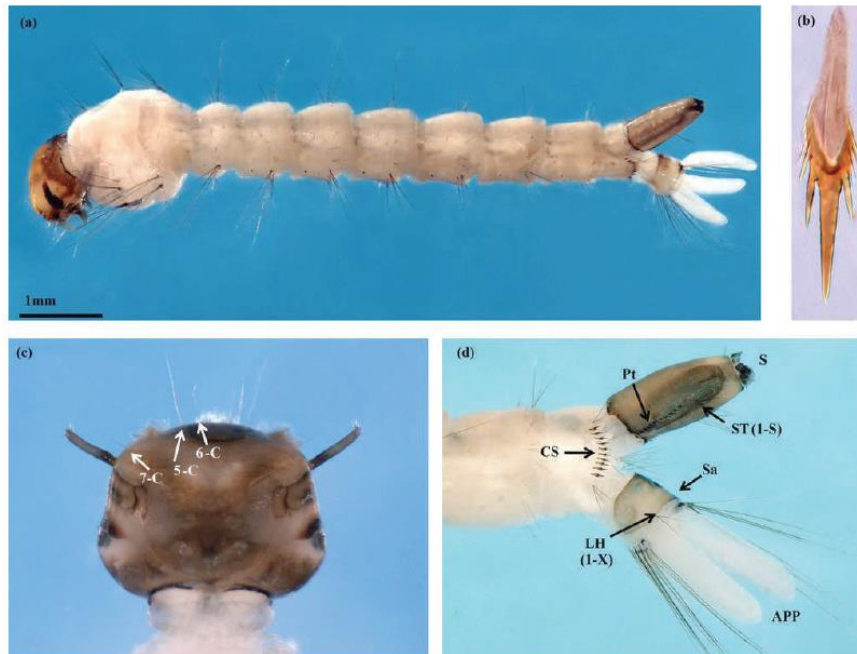
Figura 3 - Detalhes da estrutura da larva. Ab: abdome; Ac: acúleo sifonal; ANT: antena; ApS: aparato sifonal (ápice do sifão); C: cabeça; D: vista dorsal; EPVIII: espinhas do pente do segmento VIII; EsS: espinha do pecten sifonal; LAT: vista lateral; M: mesotórax; P: protórax; Pa: papilas anais; Pe: pecten sifonal; Si: sifão; T: metatórax; To: tórax; V: vista ventral; I-VIII: segmentos abdominais; X: segmento X (ou lobo anal).



Fonte: CONSOLI; OLIVEIRA (1994)

Analisando a microscopia eletrônica das larvas de *Ae. aegypti* em diferentes estágios, Schaper; Hernández-Chavarría (2006) avaliaram que os diferentes estágios não apresentavam diferenças significativas entre si em relação as principais estruturas, tanto em tamanho quanto distribuição destas estruturas. As diferenças mais marcantes encontram-se nas escovas laterais palatais, nos comb scales (estrutura indicada como CS na Figura 4) e no pecten (estrutura indicada como Pt na Figura 4).

Figura 4 - Larva do quarto estágio do *Aedes aegypti*. (a) Visão dorsal da larva de quarto estágio (b) Representação mais próxima da comb scale (c) Visão dorsal da cabeça (d) Visão lateral do segmento terminal. APP, papila anal; CS, comb scale; LH, cerda lateral (seta 1-X); Pt, dente do Pecten; S, sifão; ST, tubo sifonal (seta 1-S); 5-C, cabelo da cabeça superior; 6-C, cabelo da cabeça inferior, 7-C, cabelo da cabeça pre-antenal.



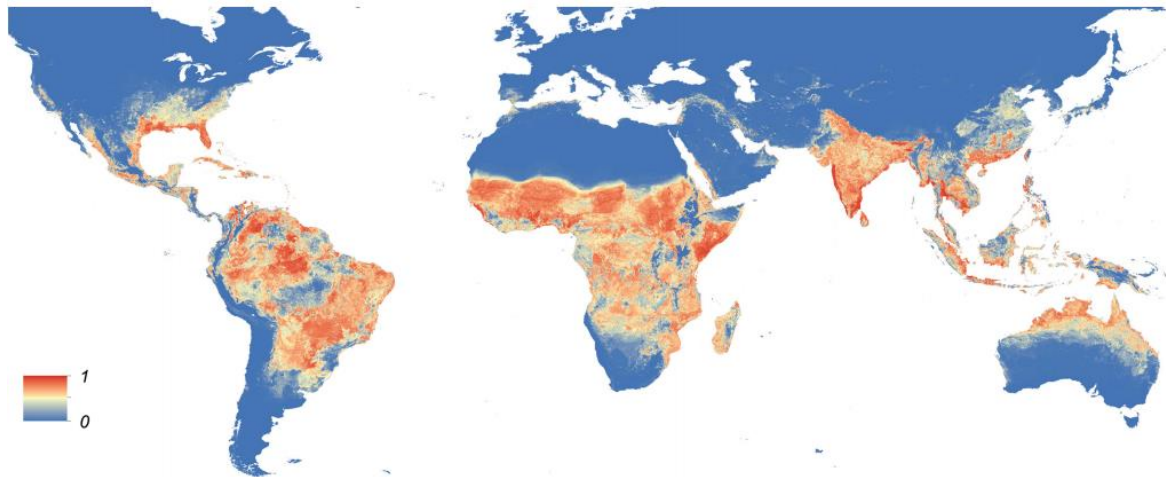
Fonte: FARAJOLLAHI; PRICE (2013)

As larvas do *Ae. aegypti* não resistem a longos períodos sem nutrientes e respiram vindo até a superfície da água através de movimentos serpenteados em forma de “S” e em movimentos bruscos ou grande intensidade de luz elas se deslocam para o fundo do recipiente em que estão, já que não toleram muito bem este tipo de situação (DIVE, 2007).

### 2.1.2 Ocorrência do mosquito

Com relação a ocorrência do mosquito no mundo, um estudo de coleta de dados com a colaboração de pesquisadores de alguns países revelou que >60% da ocorrência do mosquito *Ae. aegypti* encontra-se na Ásia e Oceania, 35 % nas Américas e 575 dados de ocorrência para África e Europa. Como se pode ver pelo mapa abaixo é previsto que sua ocorrência esteja concentrada a regiões tropicais e subtropicais, mais prevalentemente no sudeste asiático, norte do Brasil, muitas áreas da África, toda a Índia e a região temperada da América do Norte, mas poucas regiões da Europa (KRAEMER et al., 2015).

Figura 5 – Distribuição global prevista para o mosquito *Aedes aegypti* mostrando a probabilidade de ocorrência do mosquito em escala de 0 (azul) a 1 (vermelho)



Fonte: KRAEMER et al. (2015)

No Brasil, dados de 2019 do Levantamento Rápido de Índices de Infestação pelo *Aedes aegypti* (LIRAA) mostram que, dos 5.214 municípios participantes do levantamento, 994 municípios foram classificados como de alto risco por apresentarem um alto índice de infestação pelo mosquito, 2.160 como em alerta (incluindo Recife (PE)) e 1.804 em estado satisfatório. Na região nordeste, 464 municípios encontram-se em estado de risco, 717 em estado de alerta e 578 classificados como satisfatórios (Tabela 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019d).

Tabela 1- Levantamento Rápido de Índices de Infestação pelo *Aedes aegypti* (LIRAA) para municípios da região Nordeste\*

Estado	Número de municípios/Situação		
	Satisfatório	Alerta	Risco
Maranhão	33	91	78
Piauí	110	83	25
Ceará	97	67	20
Rio Grande do Norte	11	54	98
Paraíba	52	127	46
Pernambuco	39	85	59
Alagoas	31	44	22
Sergipe	20	40	12
Bahia	185	126	104
<b>Total</b>	<b>578</b>	<b>717</b>	<b>464</b>

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2019) \*Dados até abril de 2019

### 2.1.3 Arboviroses cujo *Ae. aegypti* é vetor



Doenças causadas pelos arbovírus são chamadas arbovirose e a definição arbovírus engloba aqueles que são transmitidos por artrópodes (insetos e aracnídeos) (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; RUST, 2012). Uma das principais arbovirose de interesse mundial são a dengue, Zika, chikungunya e febre amarela, cujo inseto vetor principal é o mosquito *Ae. aegypti* (CAVALCANTE; TAUIL, 2017; MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017; PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016).

A dengue é uma infecção viral aguda sistêmica transmitida por mosquito do gênero *Aedes*, primordialmente o *Ae. aegypti*. Causada por quatro sorotipos diferentes do vírus (gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*), a dengue pode apresentar três formas clínicas dengue febre indefinida, dengue clássica, febre hemorrágica da dengue. Esta última possui quatro graus de severidade, que incluem a síndrome do choque da dengue (SIMMONS et al., 2012; VERDEAL et al., 2011; WHO, 1997, 2009). A doença vem tomando grandes extensões geográficas, com risco de infecção em 3,9 bilhões de pessoas em 128 países, sendo endêmica em mais de 100 países no sudeste asiático, américas, pacífico ocidental, África e regiões do mediterrâneo oriental onde estas três primeiras regiões são as mais afetadas (BRADY et al., 2012; WHO, 2019a).

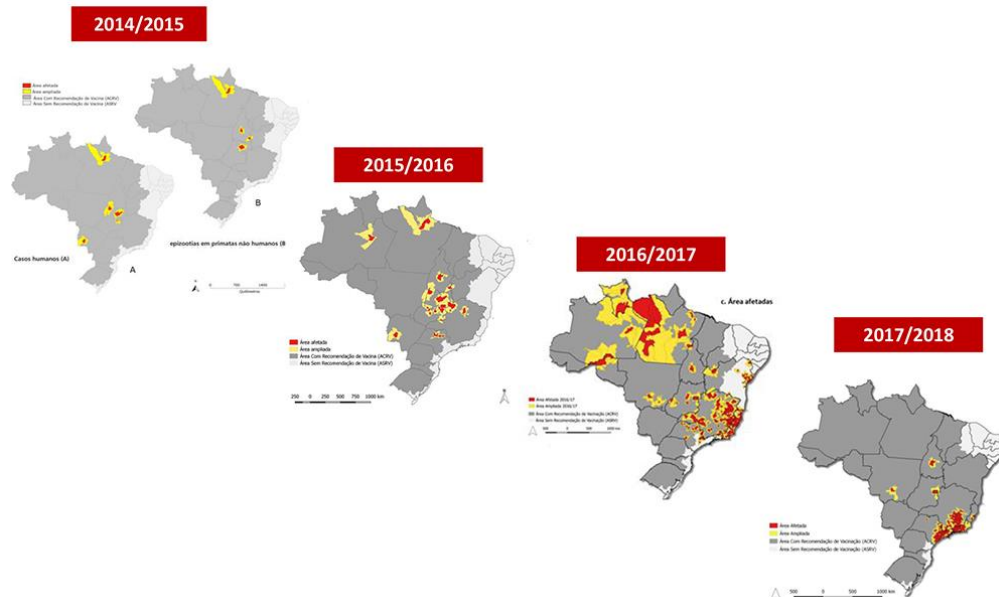
A Zika é uma doença causada pelo emergente vírus de mesmo nome que é também um flavivírus transmitido pelo mosquito do gênero *Aedes*. A primeira descrição do vírus foi em 1947 em macaco rhesus na Uganda. Em 1954 teve a primeira infecção humana descrita na Nigéria (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; MACNAMARA, 1954; WEAVER et al., 2016). Em 2007, ocorreu uma epidemia na ilha de Yap, Micronésia, e em 2013 e 2014, outra epidemia atingiu desta vez a Polinésia Francesa. O vírus se difundiu rapidamente até que em 2015 casos de Zika foram confirmados no Nordeste do Brasil (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; DUFFY et al., 2009; LORMEAU, 2013; MUSSO; GUBLER, 2016). A infecção pelo vírus Zika possui como sintomas febre, erupção cutânea, conjuntivite, dor de cabeça, dores musculares e nas articulações podendo, se apresentar também com alterações neurológicas severas como a síndrome de Guillain-Barré e a microcefalia (IOOS et al., 2014; WHO, 2019b).

A chikungunya também é uma doença transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*. No entanto, é causada por um alfavírus que leva o nome da doença primeiramente isolado na Tanzânia em 1952 (LUMSDEN, 1955). Em 2014, foram documentados os primeiros casos de sua transmissão no Brasil (TEIXEIRA et al., 2015). Seu sintoma mais pronunciado são os articulares, de onde advém o seu nome, que em dialeto africano significa “andar curvado”, as dores articulares podem persistir por meses ou até mesmo anos. Ela também apresenta um

estado febril que pode vir acompanhado de mialgia, dor de cabeça e erupção cutânea. Por estes sintomas, principalmente os articulares, a chikungunya afeta a qualidade de vida e impossibilita ao trabalho os indivíduos, trazendo além dos agravos de saúde também impactos econômicos (BURT et al., 2012; ROBINSON, 1955).

A febre amarela, também transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, é uma infecção viral causada por um flavivírus. Endêmica em regiões tropicais da África e América do Sul. No Brasil, recentemente houve muitos casos de infecção, mas somente relacionados ao ciclo silvestre (PAULES; FAUCI, 2017). O vírus possui três ciclos epidemiológicos: o ciclo silvestre, no qual o vetor é mosquito *Haemagogus*; um ciclo intermediário, em que várias espécies de *Aedes* se deslocam entre regiões de floresta e localidades onde há humanos, e estes irão ser hospedeiros no ciclo de transmissão; e o ciclo urbano, cujo vetor é o *Ae. Aegypti*. A transmissão se dá quando uma pessoa é picada no ambiente de floresta por um mosquito infectado e retorna ao meio urbano onde é picada pelo *Ae. aegypti* e dissemina o vírus da febre amarela (WHO, 2018). Febre, manifestações hemorrágicas, disfunções hepáticas, icterícia, falência renal, anormalidades cardiovasculares, disfunções neurológicas e choque são sinais e sintomas presentes nesta infecção (MONATH, 2001). Recentemente houve no Brasil uma reemergência da febre amarela (Figura 6), no entanto, esta está somente relacionada ao ciclo silvestre da febre amarela, pois os casos relacionados ao ciclo urbano e, portanto, ao *Ae. aegypti* não ocorrem no país desde 1942 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019b).

Figura 6 - Reemergência da febre amarela entre os anos de 2014 e 2018



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2019a)

Para a febre amarela e a dengue já existem vacinas disponíveis, no entanto, a vacina da dengue aprovada no Brasil desde 2015 ainda não faz parte do Programa Nacional de Imunização (PNI), assim não estando amplamente disponível. Portanto, majoritariamente a melhor forma de combate ainda é o controle do mosquito do gênero *Aedes* (ANVISA, 2018; SILVA et al., 2018), no entanto, este controle não é tão simples já que há uma grande necessidade de que a população e o poder público também colaborem nas ações de prevenção (GUBLER; CLARK, 1996; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a). Somado a isto, ainda se tem o problema de toxicidade e desenvolvimento de resistência que o controle químico apresenta, a urbanização desenfreada, as condições climáticas favoráveis à proliferação do mosquito e a gravidade dos sintomas clínicos atrelados a estas doenças, com alguns destes podendo perdurar por anos, o que é preocupante em termos de qualidade de vida da população e em gastos na saúde pública (NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES ENGINEERING AND MEDICINE, 2016) já que ainda é grande o número de indivíduos afetados por estas arboviroses, segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Situação epidemiológica das principais arboviroses no Brasil

MONITORAMENTO DA SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DAS ARBOVIROSES DENGUE, CHIKUNGUNYA E ZIKA NO BRASIL*			
Semanas de monitoramento			Atualização
Semana epidemiológica (SE) de 01 a 15 (30/12/2018 a 13/04/2019), com exceção de Zika SE13 (30/12/2018 a 30/03/2019)			15/04/2019
	Dengue	Chikungunya	Zika
Casos prováveis <sup>1</sup>	451.685	24.120	3.085
Confirmados	211.710	12.369	662
Óbitos confirmados	123	03	0
Descartados	125.052	6.181	2.441

Fonte: Sinan Online; \*Dados sujeitos a alteração.

<sup>1</sup>Entende-se por casos prováveis todos os casos notificados, excluindo-se os descartados.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2019b)

## 2.2 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DO MOSQUITO

Como as arboviroses estão intimamente ligadas a presença de um mosquito vetor, o combate a este ainda é a principal forma de enfrentamento destas doenças. O mosquito *Ae. aegypti* chegou a ser erradicado do Brasil entre os anos de 1958 e 1973, mas no ano de 1976 foi observada a reintrodução deste vetor no Brasil, e infelizmente tem crescido em número e distribuição pelo país (BRAGA; SAN MARTIN, 2015; FRANCO, 1969; NOBRE; ANTEZANA; TAUILL, 1994; SOPER, 1965). As estratégias de controle deste mosquito mais

amplamente difundida são o controle mecânico, eliminando os focos de presença do mosquito, o controle químico e as ações de conscientização e educação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a).

De modo geral, as estratégias de controle do mosquito são classificadas em controle químico, biológico, educacional e o controle integrado, este último propõe a integração de várias estratégias de uma maneira racional, visando uma maior eficácia e menores efeitos colaterais no controle dos insetos (BOUZID et al., 2016; LIMA; GOULART; NETO, 2015). A estratégia de controle baseada em atividades educacionais é aquela que conscientiza a população na remoção de todos os potenciais locais de acúmulo de água, na instalação de telas em janelas e portas e outras ações domiciliares de controle do mosquito (ANS, 2019). O controle químico é aquele que se utiliza de produtos químicos na destruição de larvas e insetos adultos, no entanto, muitos destes são tóxicos aos seres humanos, causam impactos ambientais e podem induzir a seleção de mosquitos resistentes (BRAGA; VALLE, 2007).

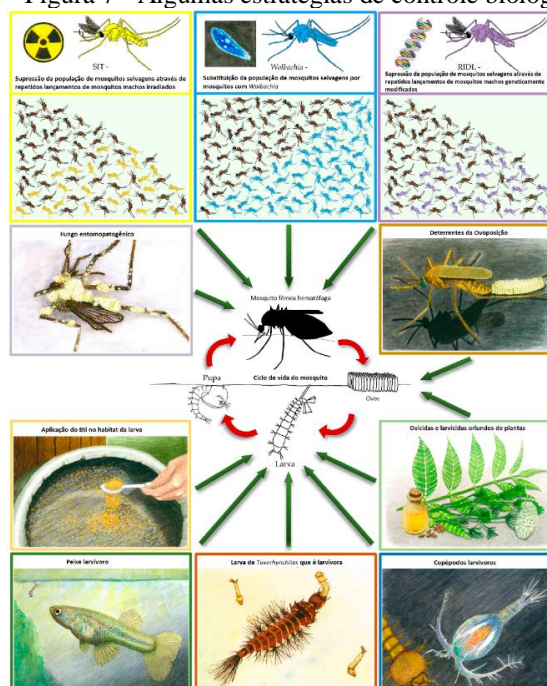
O controle de mosquitos por produtos químicos chamados inseticidas, repelentes ou larvicidas é uma das estratégias de controle recomendadas pelo Ministério da Saúde, desde que se use produtos previamente aprovados pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e se siga as instruções de uso corretamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a). As quatro maiores classes de inseticidas são os organoclorados, piretroides, carbamatos e organofosforados, no entanto, todos estes são neurotóxicos (BELLINATO et al., 2016; RANSON et al., 2010). No Brasil, ao longo de muitos anos, os temefós (organofosforados) foram utilizados no controle de populações de larvas do mosquito *Ae. aegypti*, no entanto, devido ao aparecimento de populações de mosquitos resistentes a este composto, em vários municípios do país, foi recomendada a substituição deste pelos seguintes produtos a serem adquiridos pelo Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD): Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*, cepa AM 65-52 (trata-se de um larvicida bacteriano), Diflubenzuron (grupo das benzoilureas), Novaluron (grupo das benzoilureas), Piryproxifen (análogo de hormônio juvenil), espinosade (larvicida do grupo das spinosinas). No documento que fala destas recomendações ainda se recomenda que para o manejo da resistência a estes produtos químicos deve-se ser adotada uma estratégia de rotatividade no uso destes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

A criação de populações de mosquitos resistentes é uma grande preocupação para as estratégias de controle do mosquito mundialmente. Os principais mecanismos moleculares de resistências do mosquito do gênero *Aedes* são mutações não sinônimas que afetem proteínas-alvo dos inseticidas (mutações alvo-específicas) ou aumento da biodegradação ou sequestro

enzimático (resistência metabólica) (HEMINGWAY et al., 2004; MOYES et al., 2017). Um estudo que avaliou a distribuição geográfica mundial da resistência a quatro principais classes de inseticidas, mostrou que em relação ao *Ae. aegypti*, para o temefós (organofosforado visto no estudo) o nível de resistência era maior para o Brasil, Guiana Francesa e Caribe, e menor resistência foi encontrada em algumas localidades da África Ocidental e variável em regiões do sul e sudeste da Ásia. Resistência a carbamatos é reportada na Ásia, África e América Latina. Para piretroides, resistências foram vistas na Ásia e Américas e para os organoclorados maiores resistências ocorrem na América, África e Ásia (MOYES et al., 2017).

Visando tentar contornar os problemas relacionados ao controle químico, têm surgido e se difundido diversas formas de controle biológico que, em sua maioria, se utilizam de predadores ou patógenos na redução da população de insetos (Figura 7). Predadores que se alimentam de larvas e pupas que podem ser peixes, anfíbios, copépodos, estágios jovens de odonatas, insetos aquáticos e larvas de outros insetos, *Bacillus thuringiensis* var. israelenses (Bti), fungos entomopatogênicos, *wolbachia* (bactéria passada no processo de reprodução que impede o estabelecimento do vírus da dengue), técnicas genéticas de esterilização dos mosquitos e outros tipos de modificações genéticas, mosquitos irradiados e estratégias que fazem uso de conhecimentos comportamentais do mosquito são exemplos de práticas de controle biológico (BENELLI; JEFFRIES; WALKER, 2016; ZARA et al., 2016).

Figura 7 - Algumas estratégias de controle biológico de mosquitos

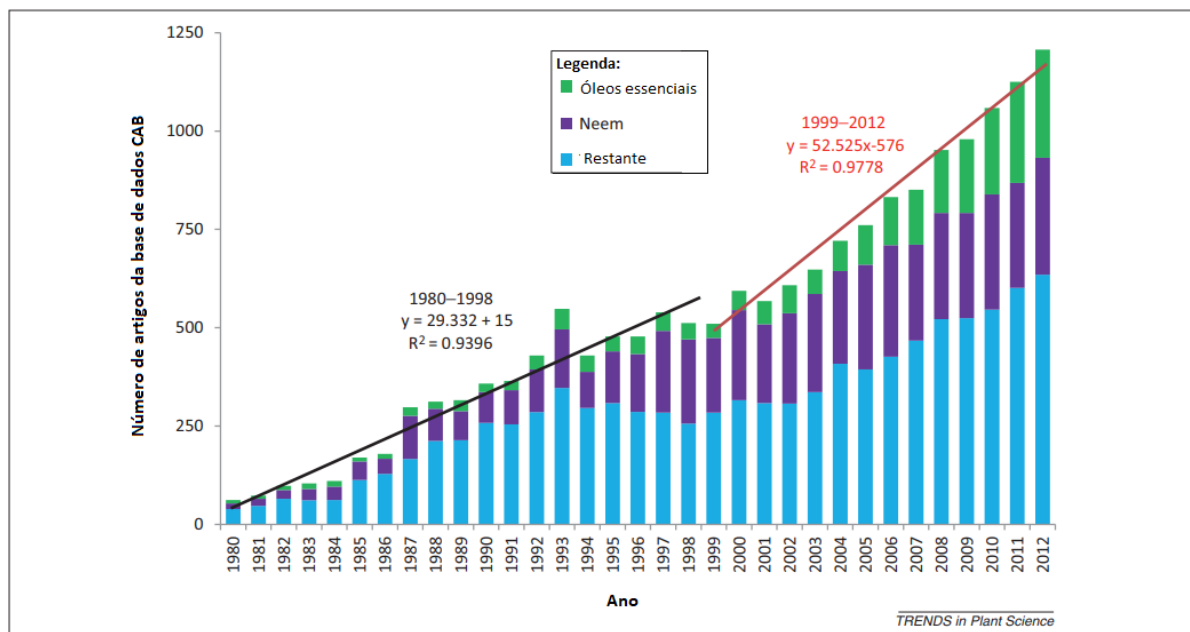


Fonte: Adaptado de BENELLI; JEFFRIES; WALKER (2016)

### 2.3 USO DAS PLANTAS NO CONTROLE DO *AE. AEGYPTI*

Devido à toxicidade ambiental e para o ser humano que muitos dos inseticidas ou larvicidas atualmente disponíveis possuem, além do grande problema atual que é o desenvolvimento de mosquitos resistentes, os inseticidas de origem natural, fitoinseticidas ou inseticidas botânicos, que se incluem nas estratégias de controle biológico, têm se constituído uma alternativa para superar estes efeitos colaterais provocados pelos métodos de controle químico. Um estudo que analisou mais de 20.000 trabalhos na área de inseticidas de origem em plantas, do ano de 1980 a 2012, demonstrou que o número de trabalhos publicados aumentou crescentemente no decorrer destes anos. Em 1980 haviam 61, já em 2012 haviam 1.207 trabalhos publicados. Há um bom número de trabalhos relacionando os óleos essenciais e a planta Nim, no entanto, a maioria dos trabalhos se concentram em outros produtos oriundos de plantas (ISMAN; GRIENEISEN, 2014) conforme pode ser visto na Figura 8.

Figura 8 – Publicações relacionadas a inseticidas botânicos entre 1980 e 2012



Fonte: Adaptado de ISMAN; GRIENEISEN (2014)

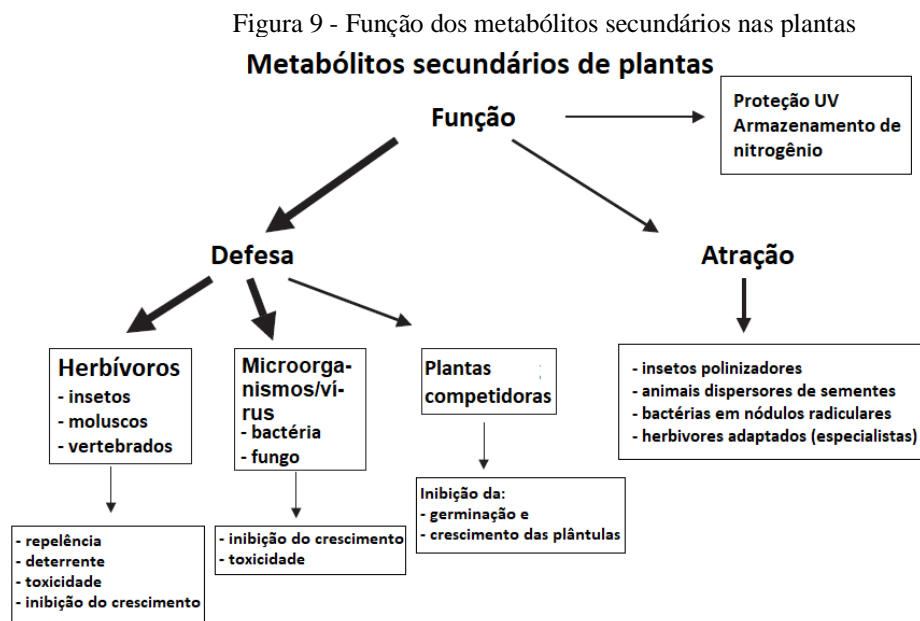
Vários produtos de origem natural já foram relatados na literatura como tendo ação inseticida, estes em sua maioria são extrato vegetais brutos ou óleos essenciais (SHAALAN et al., 2005; ZOUBIRI; BAALIOUAMER, 2014). Em uma extensa revisão de literatura foi encontrado que 429 espécies de plantas apresentam atividade inseticida compreendidas em 101 famílias botânicas (40 delas da família Fabaceae), 29 espécies apresentaram ótimas atividades inseticidas. Neste estudo foram observados vários aspectos importantes da

atividade inseticida como a espécie de planta utilizada, a espécie de mosquito testada, o estágio de desenvolvimento do mosquito, parte da planta utilizada e o método de extração utilizado (PAVELA et al., 2019). Os inseticidas de origem vegetal, de modo geral, constituem uma promissora alternativa já que são menos tóxicos, biodegradáveis, de baixo custo, alvo-específico e que não agredem o meio ambiente (GHOSH; CHOWDHURY; CHANDRA, 2012).

O sucesso de os produtos de origem vegetal apresentarem atividade contra insetos adultos ou alguns dos estágios mais jovens de desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti* se devem muito em parte a propriedade de defesa natural que as plantas possuem, que advém muito da produção de metabólitos secundários (PAVELA et al., 2019; WINK, 2006).

#### 2.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS

Metabólitos secundários de plantas são compostos orgânicos produzidos pelas plantas (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006). Há um grande número de metabólitos secundários produzidos por plantas que se dividem em três grandes grupos: compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides (AGOSTINI-COSTA et al., 2012). Os metabólitos secundários podem ter por funções principais na plantas proteger contra os raios ultravioletas (UV), servir de estocagem de compostos nitrogenados, agir na atração, por exemplo, de organismos polinizadores e também agir como moléculas envolvidas na defesa das plantas contra herbívoros, microrganismos e vírus ou plantas competidoras (WINK, 2006)(Figura 9).



Fonte: Adaptado de WINK (2006)

Os metabólitos secundários, como se pode ver, não estão envolvidos em processos intrínsecos à planta, como geração de energia, estando mais envolvidos em mediar a interação das plantas com o meio externo. Neste sentido eles podem ser constitutivamente produzidos, ou, em algumas situações, ser produzidos somente sob indução por um elemento estressor (YANG et al., 2018).

Os compostos fenólicos representam o maior grupo de metabólitos secundários de plantas. Sua estrutura principal em comum é a presença de um ou mais grupos fenólicos ligados a um ou mais grupos hidroxilas e sua origem advém do aminoácido fenilalanina. Eles podem ser estruturas simples, com apenas um anel aromático, até estruturas poliméricas mais complexas. Podem ser classificados em compostos fenólicos simples, taninos, cumarinas, flavonoides, cromonas e xantonas, stilbenos e lignanas. Há ainda uma outra subdivisão que os classifica em compostos flavonoides e não flavonoides (HUSSEIN; EL-ANSSARY, 2018; WALTON; BROWN, 1999).

Os alcaloides são compostos cuja estrutura básica é formada por átomos de nitrogênio, somado a presença de átomos de carbono e hidrogênio. No entanto, compostos relacionados a este podem conter ácidos neutros ou fracos além de presença de oxigênio, enxofre e raramente outros como cloro, bromo e fósforo. Atualmente a classificação destes se baseia na similaridade do esqueleto carbônico. São metabólitos de distribuição bem restrita, aparecendo principalmente em Angiospermas. Como também estão envolvidos no processo de síntese proteica nas plantas, normalmente sua disponibilidade é baixa, estando mais presentes em locais de armazenamento como raízes, sementes e frutos (KABERA et al., 2014; NICOLAOU; CHEN, 2011; WALTON; BROWN, 1999).

Terpenoides também são compostos muito abundantes e diversos, que possuem como originário químico unidades de isopreno, de 5 carbonos. Biossinteticamente originados do isopentenil e dimetilalil pirofosfato, sendo muito conhecidos por suas propriedades lipofílicas. Estes são classificados com base no número de unidades isoprênicas (HUSSEIN; EL-ANSSARY, 2018; WALTON; BROWN, 1999), como mostrado na Tabela 3.



Tabela 3- Classificação dos terpenoides

Número de carbonos	Nome
C <sub>5</sub>	Hemiterpeno
C <sub>10</sub>	Monoterpeno
C <sub>15</sub>	Sesquiterpeno
C <sub>20</sub>	Diterpeno
C <sub>25</sub>	Sesterpernos
C <sub>30</sub>	Triterpeno
C <sub>40</sub>	Tetraterpeno
C <sub>&gt;40</sub>	Politerpeno

Fonte: Adaptado de KABERA et al. (2014)

Os metabólitos secundários de plantas estão intimamente relacionados a atividade inseticida que as plantas apresentam e que vêm sendo confirmadas cientificamente. Para todas as maiores classes de metabólitos descritas acima já existem atividades inseticidas relacionadas contra algum inseto, sejam aqueles relacionados a doenças humanas ou insetos peste. Alcaloides têm sido relatados como inseticidas, mesmo em baixas concentrações e seus principais mecanismos para tal ação são por interferência em canais de membrana de sódio presentes em nervos e também através de inferência nos receptores de acetilcolina do sistema nervoso. Compostos fenólicos também afetam negativamente o desenvolvimento dos insetos, no entanto, seu modo de ação ainda não está claro até o momento, assim como os terpenoides que também ainda não possuem seu mecanismo de ação totalmente esclarecido (RATTAN, 2010).

Um estudo recente, que fez uma revisão de toda a literatura disponível que relacionava extratos de plantas com atividades larvicidas, encontrou que 429 espécies de plantas tinham descritas na literatura sua atividade larvicida, destas 29 tinham atividades larvicidas ótimas (Concentração que mata 50% (LC<sub>50</sub>) <10 ppm (partes por milhão)), mas somente em 19 destas realmente foi capaz de se relacionar esta atividade a um composto fitoquímico específico. As principais classes de metabólicos larvicidas foram acetogeninas, alcalóides, alcanidas, antraquinonas, cumarinas, flavonóides, limonóides, poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas, esteróis, tiofenos, triterpenóides e xantonas. Alguns dos mecanismos de ação descritas para este fitoquímicos foram fototoxicidade, interação com enzimas importantes como transaminases e a citocromo P450 monoxigenase, toxicidade neuronal, dano ao intestino, geração de espécies reativas de oxigênio, inibição da alimentação e desenvolvimento, genotoxicidade e mutagenicidade (PAVELA et al., 2019).

## 2.5 POINCIANELLA MICROPHYLLA

*Poincianella microphylla* (Mart. ex G. Don) L.P. Queiroz (tem como sinônimos *Caesalpinia microphylla* Mart. ex G. Don e *Cenostigma microphyllum* (Mart. ex G. Don) E. Gagnon & G.P. Lewis) é um arbusto da família Fabaceae de 1 - 5 metros de altura, com tronco de casca lisa, folíolos alternados a subopostos e flores com pétalas de cor amarelo-ouro (Figura 10). Conhecida popularmente como Catinga-de-porco, esta planta é típica do bioma Caatinga e endêmica da região do sul do Piauí, sul de Pernambuco e norte da Bahia e bem característica da região do baixo-médio São Francisco (FLORA DO BRASIL, 2019; QUEIROZ, 2009).

Figura 10 - Arbusto de *Poincianella microphylla*. (a) Arbusto inteiro (b) Folhas em detalhes



Fonte: Adaptado de QUEIROZ (2014)

Suas folhas são fonte de alimentação para o gado e, na medicina popular, é utilizada para problemas de estômago e febre, já a casca do caule é relatada como digestiva e sedativa (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007). Folha e entrecasca, da também chamada cantigueira rasteira, foram relatadas por Albuquerque et al., 2007 com uso terapêutico medicinal para impotência sexual e reumatismo. Ela também tem uma importância agroeconômica, sendo utilizada como adubo, cerca viva e na produção de mel (PICCIN, 2017).

Na literatura científica, atividades biológicas relacionadas a esta planta são muito escassas, havendo apenas dois trabalhos publicados. Um deles mostrou atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de folhas e frutos contra o *Bacillus subtilis*,

*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e a *Klebsiella pneumoniae* com flavonoides, terpenoides e taninos descritos como metabólitos encontrados (SILVA et al., 2006). Outro estudo, com o extrato aquoso das frutas, demonstrou atividade antibiofilme para *S. epidermidis*, sem inibição do crescimento bacteriano, também foi avaliada a citotoxicidade em células Vero e demonstrou diminuir a viabilidade celular nas maiores concentrações, mas não foi citotóxico na menor concentração. Na avaliação fitoquímica foi demonstrada a presença de flavonoides, terpenoides, esteroides, aminas e polifenóis (SILVA et al., 2015).

## 2.6 TOXICIDADE EM ORGANISMO NÃO-ALVO

### 2.6.1 Fitotoxicidade

Além de não demonstrar induzir resistência aos mosquitos, um inseticida deve ser alvo-específico, demonstrando ser atóxico ou de baixa toxicidade a organismos não-alvo, como é o caso das plantas. Fitotóxico diz-se de qualquer produto que temporariamente ou por longo tempo cause danos as plantas, como perda da planta inteira, atraso da emergência ou crescimento, florescimento ou aparecimento do fruto, descoloração da planta ou partes dela, necrose do tecido da planta, murcharção e deformações da planta ou partes dela (FAO, 2006).

Os testes de fitotoxicidade são importantes ferramentas na avaliação da eficácia, segurança e seletividade de um produto que será aplicado próximo ou na planta em si, como é o caso de inseticidas, herbicidas, fungicidas ou outro produto relacionado sendo, portanto, um teste importante para avaliação do risco ambiental que estes compostos podem representar. Os métodos para avaliação da toxicidade a plantas usam de informações como tempo de germinação, porcentagem de germinação, medidas de crescimento da planta, número de órgãos, peso, diâmetro e modificações de cor, necrose ou deformações para determinar se um produto é fitotóxico ou não (OEPP/EPPO, 2007).

Os mecanismos moleculares de como um composto leva a toxicidade em plantas podem ser inibição da fotossíntese, divisão celular, função enzimática e influências no desenvolvimento da raiz, broto e folhas. Também pode haver interferências na síntese de pigmentos, proteínas ou DNA (ácido desoxirribonucleico), desestabilização da membrana celular ou promoção de crescimento incontrolável (BRAGANÇA et al., 2018).

Organizações como a EPA (United States Environmental Protection Agency), OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) e a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) defendem veemente que testes de segurança e eficácia,

como o teste de fitotoxicidade, devem fazer parte do caminho até a implementação dos inseticidas ou pesticidas como efetivos controladores de insetos. Além da necessidade e importância da condução deste tipo de teste, ainda há muitas vantagens intrínsecas ao desenvolvimento do ensaio como a possibilidade de se obter informações para compostos ou metabólitos tóxicos, uso de materiais fáceis de obtenção, a possibilidade e o teste pode ser feito tanto *ex situ* quanto *in situ*, a duração deste teste que normalmente é curta e uma metodologia simples e de baixo custo (BRAGANÇA et al., 2018; EPA, 2019; FAO, 2006; MAILA; CLOETE, 2005; OECD, 2003).

Uma das mais populares metodologias disponíveis para a avaliação fitotóxica é a que avalia a germinação e crescimento a partir da incubação de plântulas com o composto a ser avaliado e a espécie de plântula mais comumente utilizada é a alface (*Lactuca sativa* L.) (Figura 11), que apresenta sensibilidade a diferentes substâncias, facilidade de cultivo, baixo custo e crescimento homogêneo (EPA, 1996; SILVEIRA et al., 2017; SIMÕES et al., 2013; TIGRE et al., 2012).

Figura 11 - Teste de fitotoxicidade em placa de 6 poços. (a) Crescimento das plântulas da alface americana grandes lagos em placa (b) Detalhe da plântula mostrando a raiz e dicótilo.



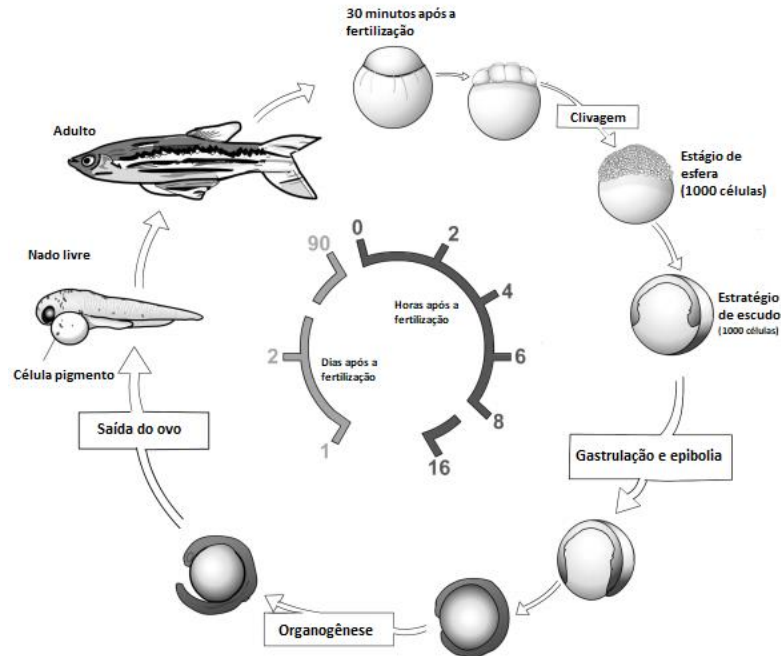
Fonte: O autor (2019)

## 2.6.2 Toxicidade em zebrafish

*Danio rerio* ou zebrafish é um peixe tropical de água doce de aproximadamente 3 cm e nativo da Índia. Ele é muito utilizado como peixe ornamental, mas também tem muito espaço no meio científico. Os machos apresentam listras longitudinais dispostas ao longo do corpo delgado e em formato de torpedo e em suas barbatanas e barriga geralmente apresentam coloração dourada. As fêmeas, por outro lado, não possuem coloração dourada em seu corpo e quanto carregadas de ovos estas aumentam de volume (DAMMSKI et al., 2011; WIXON, 2000).

O desenvolvimento do zebrafish começa com um zigoto, de apenas uma célula, que fica sob uma grande célula gema. Este zigoto passa por um processo de várias clivagens seguida por período de blástula, e após aproximadamente 6 horas de fertilização tem início o processo de gastrulação e epibolia. Após a gastrulação, o peixe em desenvolvimento passa por um passo mais complexo, que é a formação dos órgãos (organogênese). 2 dias após a fertilização ocorre a eclosão de uma larva de nado livre. O zebrafish atinge a maturidade sexual aos 3 meses e pode viver até 5 anos (D’COSTA; SHEPHERD, 2009).

Figura 12 – Ciclo de desenvolvimento do *Danio rerio*



Fonte: Adaptado de D’COSTA; SHEPHERD (2009)

Eventos importantes ocorrem em períodos específicos de desenvolvimento do peixe, como por exemplo com 24 horas, quando se tem o aparecimento da pigmentação inicial na retina e pele, presença de glóbulos vermelhos na gema e batimento cardíaco. Em 48 horas, tem-se uma pigmentação mais aparente, aparecendo também uma coloração amarelada,

circulação em arcos aórticos e vasos segmentares já ocorrendo e a presença de movimentação dos cílios olfativos. Com 72 horas, a boca do embrião já está aberta, olhos já estão presentes, corpo com coloração amarelada e presença de cartilagem no arco branquial (KIMMEL et al., 1995).

Figura 13 – Desenvolvimento do zebrafish em diferentes tempos em horas



Fonte: Adaptado de HOOD (2011)

O uso do zebrafish em modelos de estudo é bem estabelecido e amplamente utilizado em estudos da biologia do desenvolvimento, pesquisas em câncer, estudos de toxicologia, na descoberta de drogas, pesquisas em genética molecular e também como modelo genético para espécies aquícolas e pesquisas em toxicogenômica, além de seu uso em modelos de doenças para avaliação de biomedicamentos humanos (KHAN; ALHEWAIIRINI, 2018).

Vantagens no uso do *D. rerio* como modelo de estudo são a transparência característica dos embriões fertilizados, fertilização externa permitindo um fácil acesso a observação e manipulação dos embriões, rápido desenvolvimento externo, possibilidade de manipulação genética, grande número de embriões gerados, fisiologia e anatomia homólogas a dos mamíferos e genética semelhante à dos seres humanos (DHILLON et al., 2019; EIMON; RUBINSTEIN, 2009; LIESCHKE; CURRIE, 2007; WIXON, 2000).

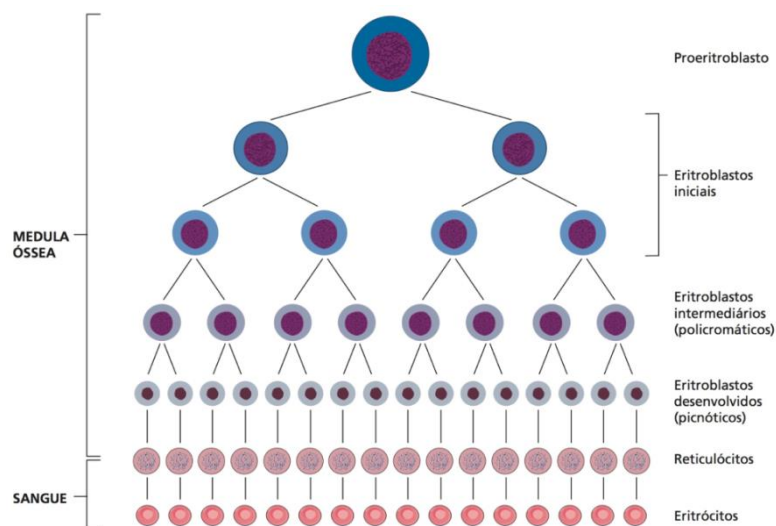
### 2.6.3 Citotoxicidade em eritrócitos

Para que um produto natural chegue a seu uso aprovado e seguro é necessário que etapas de testes e estudos sejam cumpridas, uma etapa importante deste processo é a

determinação da segurança e toxicidade do produto em modelos experimentais (WHO, 2000). Para os produtos advindos de plantas que agem no combate de insetos, a segurança para o ser humano é algo particularmente importante principalmente quando se trata dos ovicidas, larvicidas e pupicidas que têm que ser aplicados à água, já que os ovos, larvas e pupas participam da fase aquática do ciclo de desenvolvimento. Para evitar que o ser humano faça a ingestão ou tenha o contato com água com possíveis compostos tóxicos advindos dos inseticidas é importante a realização de testes de toxicidade (MOSSA; MOHAFRASH; CHANDRASEKARAN, 2018).

Um dos muitos exemplos de testes de citotoxicidade é aquele que possui como modelo os glóbulos vermelhos. Estes, que também podem ser chamados de eritrócitos ou hemácias, são, junto com os leucócitos e as plaquetas, os componentes celulares do sangue. As hemácias são células nucleadas em forma de disco bicôncavo que medem 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro e que, em circulação, possuem um tempo de vida de 120 dias (HOFFBRAND; MOSS, 2013). Sua origem se dá na medula óssea a partir de um precursor eritroide, o proeritroblasto, em um processo denominado de eritropoese (Figura 4). A função principal dos glóbulos vermelhos é o transporte de oxigênio ( $\text{O}_2$ ) aos tecidos e a retirada dos tecidos do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) para sua troca nos pulmões (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014).

Figura 14 - Amplificação e maturação dos eritrócitos a partir do proeritroblasto

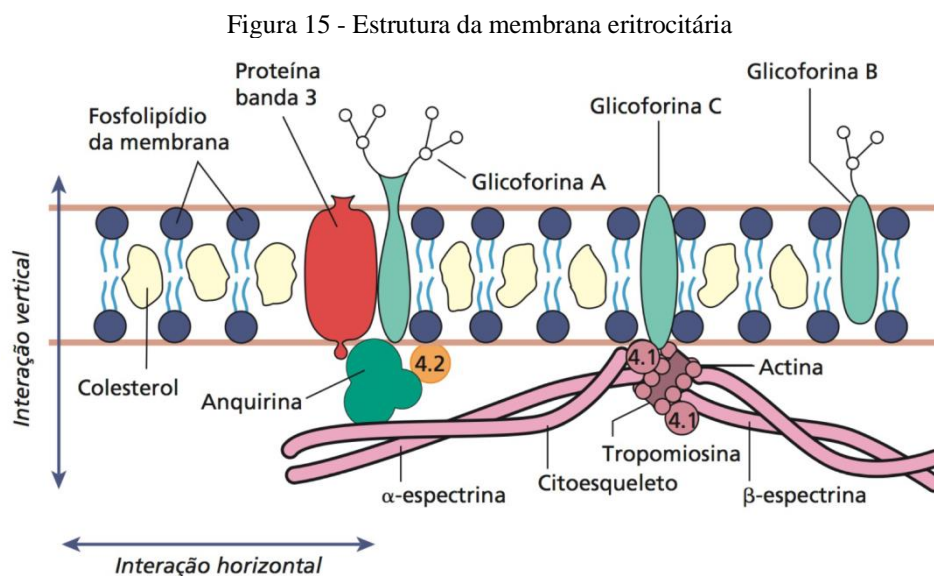


Fonte: HOFFBRAND; MOSS (2013)

O principal componente proteico das hemácias é a hemoglobina, uma heme proteína composta por uma porção proteica e um grupo prostético heme. A porção proteica da hemoglobina é formada por 2 polipeptídeos  $\alpha$ -globina e 2 polipeptídeos  $\beta$ -globina. O grupo

prostético heme presente em cada um destes polipeptídeos é composto por uma porfirina com um átomo de ferro no estado ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) ligado a ela. O oxigênio se liga de forma reversível a este átomo de ferro para assim ser transportado, proporcionando as hemácias desempenhar sua função de oxigenação dos tecidos (BAYNES; DOMINICZAK, 2015; NELSON; COX, 2014).

A membrana eritrocitária é composta por uma bicamada lipídica, proteínas, que podem ser periféricas ou integrais, e carboidratos que ficam expostos externamente na membrana (Figura 15). Sua função é manter a composição interna e delimitar os meios interno e externo, além de proporcionar a resistência e a elasticidade necessárias a estas células. Os lipídios constituintes das hemácias são os fosfolipídeos, o colesterol e os glicolipídeos, que se organizam de modo a formar uma membrana bipolar com suas porções hidrofílicas expostas ao meio externo e as hidrofóbicas voltadas para o citoplasma. As proteínas periféricas estão localizadas na parte externa da membrana e não a atravessam, como é o caso das espectrinas e da banda 4.1. Já as proteínas integrais são aquelas que perpassam a membrana como é o exemplo das glicoforinas e da banda 3. Estas proteínas desempenham diversas funções na célula como o transporte de substâncias, a interação com outras estruturas e a sinalização celular. Em sua função na membrana eritrocitária estas são classificadas em: proteínas estruturais integrais de membrana (banda 3 e glicoforina), proteínas de ancoragem do citoesqueleto a membrana plasmática (anquirina) e as proteínas do citoesqueleto (banda 4.1, espectrina e actina) (MOHANDAS; GALLAGHER, 2008; NARLA; MOHANDAS, 2017; OLIVEIRA; RIBEIRO; VIZZONI, 2013).



Fonte: HOFFBRAND; MOSS (2013)



Por diversos motivos e mecanismos a membrana eritrocitária pode se romper liberando o seu conteúdo de hemoglobina, em um processo denominado hemólise. Algumas substâncias ou compostos apresentam toxicidade frente aos eritrócitos causando a ruptura de sua membrana, o que inviabiliza seu uso. Para fornecer uma primeira etapa no conhecimento da citotoxicidade de produtos com potencial uso humano, os glóbulos vermelhos são utilizados como referência, pois são células cuja membrana guarda semelhanças com membranas de outras células, além de serem fáceis de obter-se e trabalhar em relação a outros modelos (GAUTAM, 2013; JESWANI, 2015; ZOHRA; FAWZIA, 2014).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade Inseticida contra o *Aedes aegypti* de Extrato Clorofórmico de *Poincianella microphylla*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e obter o extrato clorofórmio das folhas de *P. microphylla*;
- Determinação do perfil fitoquímico do extrato cloroformico;
- Avaliar a atividade larvicida do extrato clorofórmico em *Ae. aegypti*;
- Elucidar o mecanismo de ação larvicida através de análise em microscopia eletrônica de varredura;
- Investigar a fitotoxicidade do extrato clorofórmico;
- Verificar a embriotoxicidade em Zebrafish do extrato clorofórmico;
- Analisar a citotoxicidade frente a eritrócitos humanos do extrato clorofórmico.

**4 ARTIGO ATIVIDADE LARVICIDA DO EXTRATO DE *POINCIANELLA MICROPHYLLA* CONTRA O MOSQUITO VETOR *AEDES AEGYPTI***



Artigo a ser submetido ao periódico *Environmental Science and Pollution Research* no formato *Research article* (**FI**: 2.914; **Qualis CB II**: B1).

**Atividade larvicida do extrato de *Poincianella microphylla* contra o mosquito vetor *Aedes aegypti***

Rebeca Xavier da Cunha<sup>1</sup> Ana Paula Sant'Ana da Silva<sup>1</sup> Alexandre Gomes da Silva (*in memorian*)<sup>2,3</sup> Márcia Vanusa da Silva<sup>3,4</sup> Juliane Maria dos Santos Silva<sup>5</sup> Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida<sup>5</sup> Bheatriz Nunes de Lima Albuquerque<sup>6</sup> Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro<sup>6</sup> Vanderlan Nogueira Holanda<sup>1,7</sup> Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo<sup>7</sup> Rafael David Souto de Azevedo<sup>8</sup> Kívia Vanessa Gomes Falcão<sup>8</sup> Ranilson de Souza Bezerra<sup>8</sup> Vera Lúcia de Menezes Lima<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Lipídios e Aplicação de Biomoléculas em Doenças Prevalentes e Negligenciadas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-560, Recife, PE, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-560, Recife, PE, Brazil.

<sup>3</sup> Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido, Paraíba, Brazil.

<sup>4</sup> Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-560, Recife, PE, Brazil.

<sup>5</sup> Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56304-205, Petrolina, PE, Brazil.

<sup>6</sup> Laboratório de Ecologia Química Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-560, Recife, PE, Brazil.

<sup>7</sup> Biologia Celular e Molecular de Patógenos, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brazil

<sup>8</sup> Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-560, Recife, PE, Brazil.

**Corresponding Author**

V. L. M. Lima

Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP 50.670-501, Recife, PE, Brasil.

lima.vera.ufpe@gmail.com

## Resumo

Visando fornecer uma alternativa larvicida menos tóxica, extratos de *Poincianella microphylla* tiveram sua atividade larvicida avaliada em *Aedes aegypti*. Folhas trituradas foram extraídas em ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. A atividade larvicida foi realizada com larvas iniciais de quatro instares e suas CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> determinadas em 48 horas. As larvas expostas ao LC<sub>50</sub> e 2 X LC<sub>50</sub> tiveram sua ultraestrutura analisada. Além disso, a toxicidade contra organismos não-alvo foi avaliada para *Lactuca sativa* L., *Danio rerio* e eritrócitos. Entre os quatro extratos, apenas o clorofórmio apresentou atividade larvicida significativa com CL<sub>50</sub> de 31,62 ppm. A análise ultraestrutural das larvas revelou alterações da papila anal e do tubo sifão, rupturas abdominais e turgescência corporal. No teste de organismos não-alvo, o extrato de clorofórmio reduziu o comprimento do hipocótilo na concentração de 90 ppm em comparação com 60 ppm ( $p = 0,0295$ ) e não foi fitotóxico para a germinação. Para a embriotoxicidade de *D. rerio*, apresentou CL<sub>50</sub> de 61,05 ppm em 48 horas, mas concentrações próximas à CL<sub>50</sub> larvicida causaram alterações no desenvolvimento do embrião que não levam a mortalidade significativa. Não foi observada hemólise. Portanto, o extrato de clorofórmio de *P. microphylla* pode ser uma alternativa larvicida contra *Ae. aegypti*, entretanto, estudos futuros são necessários para o isolamento do princípio ativo e melhor determinação da toxicidade.

**Palavras-chave** Metabólitos secundários. Larvicida. Mosquito vetor. Zebrafish. Fitotoxicidade. Citotoxicidade

## Introdução

Febre amarela, Zika, dengue e chikungunya são uma das doenças transmitidas por mosquitos mais preocupantes mundialmente, relacionadas ao mosquito *Aedes aegypti*, e que de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) mais da metade das pessoas que vivem no mundo estão na verdade, em áreas onde essa espécie de mosquito está presente (OMS 2019). Um mapa dos casos globais para essas doenças arbovirais relatou que de um total de 250 países/ territórios analisados em todo o mundo, 85 foram afetados por zika, 111 pela dengue, 106 pela chikungunya e 43 pela febre amarela (Leta et al. 2018). Com exceção da febre amarela e dengue que tem vacinação disponível, as demais ainda têm ações de controle do mosquito como principal prevenção (Silva et al. 2018).

Uma das estratégias de controle do mosquito mais difundidas é o uso de produtos químicos sintéticos. A classe de produtos químicos sintéticos ou não sintéticos que matam os estágios larvais de desenvolvimento do mosquito é chamada de larvicidas. Os larvicidas são uma ótima forma de controle do mosquito pois evitam que os estágios iniciais passem para o mosquito hematófago adulto e se tornem um potencial agente transmissor de arbovírus (Novak e Lampman 2010). Porém o controle químico vem sofrendo com algumas barreiras que questionam seu uso, uma vez que estas podem ser prejudiciais ao homem, tóxicas ao meio ambiente e podem desenvolver mosquitos resistentes a produtos químicos (Bellinato et al. 2016; Moyes et al. 2017).

Os produtos vegetais tornaram-se uma alternativa promissora aos atuais controles químicos usados em programas de manejo de mosquitos. Fitoquímicos derivados do metabolismo secundário que naturalmente são conhecidos como agentes protetores contra insetos têm sido uma fonte próspera de metabólitos como alcalóides, alcalamidas, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas, esteróis, triterpenóides e xantonas que inibem o desenvolvimento do mosquito. A eficácia dos inseticidas botânicos depende de vários fatores, como espécies de plantas utilizadas, o tipo de mosquito testado, parte da planta utilizada, método de extração utilizado ou a polaridade do solvente utilizado na extração (Shalan et al. 2005; Ghosh et al. 2012; Pavela et al. 2019).

*Poincianella microphylla* (Mart. Ex G. Don) L.P. Queiroz (sinônimo de *Caesalpinia microphylla* Mart. Ex G. Don e *Cenostigma microphyllum* (Mart. Ex G. Don) E. Gagnon & GP Lewis) é um arbusto da família Fabaceae com 1 - 5 metros de altura popularmente conhecida como Catinga-de-porco. Tipicamente presente no domínio fitogeográfico da

Caatinga e endêmica da região sul do Piauí, sul de Pernambuco e norte da Bahia, estados do Brasil (Queiroz 2009; Flora do Brasil 2019). As folhas são usadas como fonte de alimento para o gado e na medicina popular são usadas para problemas de estômago e febre e a casca do caule é relatada como digestiva e sedativa (Agra et al. 2007). Folha e entrecasca foram relatadas com uso terapêutico medicinal para impotência sexual e reumatismo (Albuquerque et al. 2007). Estudos científicos descobriram que esta planta também possui atividades antimicrobiana e antibiofilme (Silva et al. 2006, 2015).

É bem sabido que um larvicida deve ser um produto eficaz contra um mosquito vetor, mas também deve apresentar um dano mínimo ao homem e ao meio ambiente. Este é o primeiro estudo a investigar uma relação entre extratos de *P. microphylla* e uma atividade larvicida contra *Ae. aegypti*. Também avaliamos sua toxicidade contra organismos não-alvo, com o objetivo de fornecer um larvicida à base de plantas com segurança e eficácia no controle de mosquitos.

## **Materiais e Métodos**

### **Preparação do extrato da planta**

A planta foi coletada no Parque Nacional do Catimbau (Buíque - Pernambuco, Brasil), SisGen (A149769), identificada e depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima - Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) sob o número de registro 84880. As folhas foram separadas e secas a 40°C por 2 dias e a seguir triturado em liquidificador industrial (Metalurgic Vithory Ltda., Brasil) até a obtenção de um pó fino. A extração em Soxhlet foi realizada com 100g de pó fino de material vegetal que foi colocado em um papel de filtro (papel de filtro qualitativo Unifil 80 g/m<sup>2</sup>) usando 1L de quatro solventes diferentes (a temperatura foi ajustada de acordo com a propriedade de ebulição de cada solvente) de polaridade variável (ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol). Todos os extratos foram concentrados usando evaporador rotativo a vácuo. Os rendimentos dos extratos foram 5,483%, 0,997%, 1,117% e 17,094%, respectivamente.

### **Teste larvicida do mosquito**

A colônia utilizada no ensaio pertence à cepa Rockefeller e foi mantida no Laboratório de Ecologia Química da Universidade Federal de Pernambuco a 27±1°C e 78 ± 2% de umidade e um ciclo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Os mosquitos adultos foram mantidos em caixas e alimentados com solução de glicose a 10%. As fêmeas foram

alimentadas com sangue de galinha para o desenvolvimento dos ovos que, quando liberados pelas fêmeas, foram coletados e destinados ao desenvolvimento das larvas. Larvas foram acondicionadas em recipientes plásticos com água e ração para gatos (Wiskas®, Brasil). O teste larvicida para o mosquito vetor *Aedes aegypti* foi realizado de acordo com a OMS (2005) com algumas adaptações. Para este ensaio, inicialmente, foi feita uma triagem larvicida com todos os extratos vegetais diluídos em água destilada/tween 80 para se obter soluções correspondentes a 10, 100, 250, 500, 600 e 1.000 ppm em um volume final de 20 ml e então incubadas com 20 larvas de *Ae. aegypti* em estágio inicial do quarto instar. As larvas mortas foram registradas em 24 e 48 horas após o início do teste. O extrato que efetivamente atuou nessas concentrações de triagem foi após submetido a um teste com as concentrações de corte obtidas na triagem como segue, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 90, 100 ppm, em seguida foi realizado o teste de corte. As larvas foram consideradas mortas quando não respondem às batidas leves no recipiente. Este teste foi feito em quatro repetições para cada concentração de teste, e o controle foi de 20 ml de água destilada/tween 80. O número total de mortes em 48 horas foi usado para fazer as estatísticas e obter os valores  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  por análise Probit.

### **Análise estrutural da larva**

As concentrações correspondentes ao  $CL_{50}$  e  $2 \times CL_{50}$  foram incubadas com *Ae. aegypti* em estágio inicial do quarto instar como citado e, usando como controles uma solução água destilada/tween 80 e água destilada. Após 24 horas, as larvas foram lavadas com PBS (pH 7,2) e então fixadas por 3 horas à temperatura ambiente em solução de glutaraldeído 2,5%/4% paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 e, em seguida, lavadas com este mesmo tampão. A pós-fixação foi realizada por 1 h com solução contendo tetraóxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2). Após lavadas, novamente, em tampão cacodilato de sódio, as amostras foram desidratadas com concentrações crescentes de álcool etílico (15%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% e superseca). Em seguida, as larvas foram colocadas em fitas de carbono e secas em ponto crítico (Bal-Tec © CPD 030 Critical Point Dryer), metalizadas com ouro (Denton Vacuum Desk II) e analisadas por microscopia eletrônica de varredura (JEOL T-200).

### **Análise da composição química**

As amostras foram solubilizadas de acordo com sua polaridade. Uma alíquota do extrato foi submetida à análise em placas de cromatografia em camada delgada de Silicycle TLC - Aluminium F254 (Merck Millipore) com 5 cm de comprimento. O extrato foi aplicado



a 1 cm da borda inferior com um capilar de vidro e as placas foram eluidas com diferentes sistemas de solventes a fim de identificar os principais grupos de metabólitos secundários de acordo com a metodologia descrita por Wagner e Bladt (1996) (Tabela 1).

### **Ensaio de fitotoxicidade**

Esse teste foi realizado de acordo com Torres et al. (2018) com pequenas modificações. Um disco de papel de filtro de 6,2 cm de diâmetro (papel de filtro qualitativo Unifil 80 g/m<sup>2</sup>) foi colocado em uma microplaca de 6 poços (Kasvi) e, em seguida, 1 ml de extrato de clorofórmio de *P. microphylla* nas concentrações de 10 ppm, 30 ppm, 60 ppm e 90 ppm diluídos em tampão MES/ NaOH com DMSO 0,5% foram adicionados a oito aquênios de *Lactuca sativa* L. (Feltrin Lettuce Great Lakes 659). Para controle negativo e controle positivo foi adicionado 1 ml do tampão e do herbicida glifosato (Citromax®), respectivamente. Essas microplacas foram colocadas por 7 dias em fotoperíodo de 12 horas a uma temperatura variando entre 25-32°C. Após esse tempo, as placas foram acondicionadas em freezer (-20°C) por 24 horas, depois foram descongeladas e as mudas colocadas em um scanner (HP Deskjet 2540 All-in-one series®) para a formação da imagem. Essa imagem foi usada para medir o comprimento da raiz e do hipocótilo no programa ImageJ®. Além disso, foram calculados a porcentagem de germinação (PG), a porcentagem de germinação relativa de sementes (GRS), o crescimento relativo da raiz (CRR) e o índice de germinação (IG) conforme as seguintes fórmulas (Zucconi et al. 1985; Hoekstra et al. 2002):

$$PG (\%) = \frac{\text{Contagem final do número de sementes germinadas}}{\text{Número total de conjuntos de sementes para bioensaio}} \times 100$$

$$GRS (\%) = \frac{\text{Número de sementes germinadas na amostra}}{\text{Número de sementes germinadas no controle}} \times 100$$

$$CRR (\%) = \frac{\text{Comprimento médio da raiz na amostra}}{\text{Comprimento médio da raiz no controle}} \times 100$$

$$IG (\%) = \frac{GRS \times CRR}{100}$$

### **Embriotoxicidade em zebrafish**

O teste foi realizado de acordo com Braunbeck e Lammer (2006); OCDE (2013). Zebrafish adultos foram mantidos em tanques de peixes no Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Pernambuco a  $26 \pm 1$  ° C e fotoperíodo de 12 - 16 horas e, em

seguida, machos e fêmeas (proporção 2:1) foram colocados para fertilizar e desovar. Após a fertilização, os embriões recém-fertilizados foram coletados e colocados sob um microscópio óptico (Zeiss Primo Star) com uma ampliação de 40x para confirmar sua viabilidade. Os viáveis foram colocados em uma microplaca esterilizada (Kasvi), dez embriões para cada poço. Em seguida, os embriões foram expostos a 2 ml de extrato de clorofórmio de *P. microphylla* a 10 ppm, 30 ppm, 60 ppm, 90 ppm, 120 ppm, 150 ppm e 180 ppm diluídos em PBS (0,01M, pH 7,4). Os controles foram feitos com PBS e água do aquário. As placas foram incubadas a  $26 \pm 1$  ° C e a mortalidade foi determinada às 24h, 48h e 72h. Embriões coagulados, ausência de formação de somito, não desprendimento da cauda ou ausência de batimento cardíaco foram os parâmetros utilizados para determinar a mortalidade. Esses parâmetros foram analisados em lupa, em seguida por microscopia ótica, e os embriões mortos foram contados e após isto retirados da placa. A presença de melanócitos, eclosão e outros sinais de desenvolvimento ou ausência deste foram observados durante todo o tempo de teste. Às 72 h, também, os batimentos cardíacos foram registrados por contagem visual em microscópio óptico, quatro embriões de cada tratamento. A porcentagem de mortalidade (número de embriões mortos/número total de embriões x 100) e o CL<sub>50</sub> foram calculados para cada tempo de exposição.

### **Atividade hemolítica**

A atividade hemolítica foi determinada de acordo com Oliveira et al. (2012) com modificações. 4 ml de sangue humano foram coletados por punção venosa em tubo de citrato de sódio 3,2% e depois centrifugados a 2.500 rpm por 10 minutos para obter os glóbulos vermelhos que foram então lavados três vezes em PBS (0,01M, pH 7,4). Com os eritrócitos lavados, foi feita uma suspensão de 0,5% dos eritrócitos em PBS. A suspensão de hemácias (1,1 ml) foi adicionada à 400 µl de diluições em série de extrato clorofórmio de *P. microphylla* (2.000-31,25 ppm diluído em PBS). Triton X-100 0,1% foi usado como controle positivo e PBS como negativo. Após 60 minutos de incubação, as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi lido a 540 nm. Além disso, diluições em série do extrato de clorofórmio de *P. microphylla* sozinho foram lidas neste espectro e o valor de absorbância descontado da absorbância obtido quando incubado com a suspensão de eritrócitos. O teste foi realizado em triplicata e o percentual de hemólise foi determinado de acordo com a fórmula:

% de hemólise:  $\frac{\text{Abs da amostra} - (\text{Abs do controle negativo} + \text{Abs do extrato apenas})}{\text{Abs do controle positivo} - \text{Abs do controle negativo}} \times 100$ , onde Abs significa absorbância.

### **Análise estatística**

Larvicidal CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> foram determinados por Análise Probit usando o software Stat-Plus 2006® (AnalystSoft, Canadá). Os parâmetros de crescimento (média e desvio padrão) no ensaio fitotóxico foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tuckey (p <0,05), e os valores de CL<sub>50</sub> para o teste de embriotoxicidade do zebrafish foram calculados por regressão não linear (intervalo de confiança de 95%) no software Prism 8 (Graphpad, Estados Unidos).

### **Resultados e discussão**

O teste de triagem larvicida mostrou que os extratos ciclohexano, acetato de etila e metanol não apresentaram atividade larvicida mesmo na concentração mais alta, enquanto o extrato clorofórmio mostrou-se fortemente larvicida com 48 horas já na concentração de 100 ppm, que matou 18 das 20 larvas, e nas seguintes concentrações, 250, 500, 600 e 1.000 ppm, mataram todas as larvas.

Como o extrato de clorofórmio foi o único eficaz contra larvas, testamos este com concentrações abaixo de 100 ppm e descobriu-se que o CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> para o extrato de clorofórmio de *P. microphylla* foram, respectivamente, 31,62 ppm e 101,34 ppm (Tabela 2). Com este resultado, concluímos que possivelmente, o composto responsável por esta ação larvicida é um composto de natureza apolar e particularmente extraído por afinidade ao clorofórmio, uma vez que a atividade só foi observada neste solvente utilizado no processo de extração.

Esses resultados corroboram com o amplo conhecimento de que dependendo do solvente do extrato, espécie vegetal, localização geográfica, parte da planta e metodologia de extração utilizada, a eficácia de um inseticida botânico é diferente (Ghosh et al. 2012; Chore et al. 2014; Hari e Mathew 2018). Além disso, de acordo com a OMS, extratos vegetais brutos com valores de CL<sub>50</sub> <40 ppm têm potencial para serem compostos larvicidas, indicando que o extrato clorofórmio de *P. microphylla* é uma fonte promissora de produtos larvicidas vegetais (OMS 1993; Santos et al. 2012).

O extrato etanólico de *Poincianella pyramidalis* de diferentes partes desta planta (raízes, caules, casca do caule e folhas), outra planta pertencente ao mesmo gênero e também

presente na Caatinga, não apresentou atividade contra larvas de *Ae. Aegypti* (Santos et al. 2012), mas um estudo mais recente com esta mesma planta avaliou o extrato da semente em fosfato de sódio contra o *Ae. aegypti* e encontraram uma  $CL_{50}$  de 12,64 mg/ml em 48 horas (12.640 ppm) (Barbosa et al. 2014). Em 24 horas a fração diclorometano do extrato etanólico de raízes de *Poincianella bracteosa* (também pertencente ao mesmo gênero) foi a que apresentou melhor atividade contra as larvas do mosquito entre as demais frações testadas (acetato de etila e hexano), e mesmo em relação ao próprio extrato etanólico, com valor de  $CL_{50}$  de 0,241 mg/ml (241 ppm), em estudo realizado por Cruz et al. (2015). Govindarajan e Karuppanan (2011) relataram para o extrato de clorofórmio das folhas de *Eclipta alba* um valor  $CL_{50}$  em 24 horas de 146,88 ppm e os outros extratos (benzeno, hexano, acetato de etila e metanol) tinham 151,38 ppm, 165,10 ppm, 154,88 ppm e 127,64 ppm, respectivamente. Outro trabalho que submeteu folhas de *Andrographis paniculata* aos mesmos solventes do estudo anterior mostrou que o extrato de clorofórmio em 24 horas tinha 99,54 ppm de  $CL_{50}$  e os demais extratos 119,58 ppm, 146,34 ppm, 124,24 ppm e 110,12 ppm, respectivamente (Govindarajan 2011). O extrato de benzeno e acetato de etila de folhas de *Ervatania coronaria* apresentou  $CL_{50}$  de 89,59 mg/L (89,59 ppm) e 97,53 mg/L (97,53 ppm), respectivamente; enquanto que a *Caesalpinia pulcheriana* teve 136,36 mg/L (136,36 ppm) e 144,67 mg / ml (144,67 ppm) para os mesmos solventes, respectivamente (Govindarajan et al. 2011). Extratos clorofórmicos de *Clerodendrum philippinum* (folha), *Senecio laelus* (raiz e folha) e *Acanthospermum hispidum* (folha) avaliados na atividade larvicida encontraram valores de  $CL_{50}$  também superior ao de nosso estudo, com 546,15 ppm, 73,48 ppm (raiz), 103,34 ppm (folha) e 65,221 ppm, respectivamente, para cada planta (Ali et al. 2018; Dhal et al. 2018; Vivekanandhan et al. 2018).

Um estudo de Hari e Mathew (2018) testou extratos de folhas de *Hyptis suaveolens*, *Lantana camara*, *Nerium oleander* e *Tecoma stans* (metanol, clorofórmio e éter de petróleo) e, também os resultados mostraram que a atividade larvicida é devida a compostos não polares, desde o extrato de metanol agiu apenas para a planta *N. oleander* ( $CL_{50}$  84,09 mg/L ou 84,09 ppm), mas diferentemente do nosso estudo, nenhum dos extratos de plantas clorofórmio foi eficaz contra as larvas ( $CL_{50} > 300$  mg/L ou  $> 300$  ppm). Da atividade larvicida de 94 extratos de dez plantas, apenas uma apresentou valor  $CL_{50}$  inferior ao nosso, que foi o extrato hexânico de hastes de *Rourea doniana* 12,1 µg / ml (12,1 ppm) (Oliveira et al. 2010).

Imagens de microscopia eletrônica de varredura de larvas *Ae. aegypti* após 24 horas de exposição aos tratamentos mostra que na presença de água destilada e uma solução de água destilada/tween 80 (Figura 1 a-h) não há alterações morfológicas significativas em nenhuma das estruturas do corpo da larva (cabeça, tórax, abdômen, sifão respiratório ou papila anal). No valor da  $CL_{50}$  da atividade larvicida, a cabeça e o tórax não apresentavam alteração morfológica (Figura 1 i), o abdômen em algumas partes estava intacto e bem segmentado (Figura 1 j e l), porém, fenda no abdômen da larva foi observada (detalhe não mostrado). O sifão respiratório estava preservado, mas havia perda das papilas anais (Figura 1 k). No sifão respiratório no valor de  $2xCL_{50}$ , as papilas anais incluindo o lobo anal estavam gravemente danificadas (Figura 1 m e o), também o abdome estava túrgido (Figura 1 n) e com uma fissura como marcado com um círculo vermelho na Figura 1 p. Em observações gerais, observou-se que as larvas expostas às duas concentrações do extrato estavam túrgidas (principalmente as larvas tratadas com  $2xCL_{50}$ ) e também havia perda de cerdas ao longo do corpo da larva. As estruturas de dano mais pronunciado foram o abdômen, lobo anal e papila anal.

Yu et al. (2015) também mostraram que alterações nas áreas de sifão e papilas anais de *Ae. aegypti* foram as principais estruturas danificadas. Neste estudo, larvas tratadas com extrato de metanol de *Sargassum binderi* mostraram papilas anais deformadas com cutícula escurecida e encolhida, corpo distorcido, escurecido e pálido e danos na placa estigmal no ápice do sifão quando analisadas em estereomicroscópio e microscópio eletrônico de varredura.

Outros estudos também elucidam o mecanismo de ação de seus produtos vegetais, encontrando algumas semelhanças com o nosso estudo. Rocha et al. (2015), na análise estereomicroscópica, também encontraram alterações morfológicas nas papilas anais de *Ae. aegypti* quando em contato com os óleos essenciais de *Foeniculum vulgare* e seus dois compostos principais. Soonwera e Phasomkusolsil (2016), quando expos larvas de *Ae. aegypti* e *Anopheles dirus* a óleos de *Cymbopogon citratus* e *Syzygium aromaticum*, encontraram alterações nos corpos das larvas, alongamento do pescoço, tórax dilatado, trato digestivo e traqueia respiratória pouco visíveis, ausência de características normais no abdômen e ausência de tubo sifão, sela e tufo de cabelo. Por outro lado, Procópio et al. (2015) descobriram que o intestino médio larval foi a principal estrutura danificada quando a larva foi exposta ao extrato salino das folhas de *Schinus terebinthifolius*.

As papilas anais são uma conhecida estrutura responsável pela regulação osmótica das larvas. Em nosso estudo, demonstramos que, para ambas as concentrações, essa estrutura foi uma das mais danificadas, somada aos achados de turgidez e ruptura no corpo da larva. Além disso, o sifão respiratório foi danificado, e esta estrutura está envolvida no processo respiratório, portanto podemos propor que desregulações osmóticas e alterações do processo respiratório são provavelmente o mecanismo de ação larvicida dos compostos extraídos do extrato clorofórmico de *P. microphylla*.

O perfil fitoquímico do extrato de clorofórmio de *P. microphylla* revelou que as classes mais abundantes de constituintes fitoquímicos foram cumarinas, compostos fenólicos, lignanas, derivados do antraceno e saponinas, e os compostos menores presentes foram alcalóides, mono, sesqui, diterpenos, triterpenos e esteróides (Tabela 3). O extrato aquoso de frutas da mesma planta do nosso estudo encontrou a presença de flavonoides, terpenóides, esteróides, aminas e polifenóis (Silva et al. 2015). E ainda, o extrato hidroetanólico de folhas e frutos da mesma planta apresentou a presença de flavonoides, terpenóides e taninos (Silva et al. 2006).

Na literatura, os metabólitos secundários mais abundantes presentes no extrato de clorofórmio de *P. microphylla* já são conhecidos por sua ação de controle do mosquito vetor *Ae. aegypti*. Duas cumarinas obtidas para uma fração hexânica do extrato da fruta de *Cnidium monnieri* e onze cumarinas comercialmente orgânicas e uma mistura de derivados cumarínicos da fração hexânica das raízes do extrato etanólico de *Esenbeckia grandiflora* foram eficazes contra as larvas do mosquito (Oliveira et al. 2005; Wang et al. 2012).

Compostos fenólicos também já são conhecidos como agentes de controle vetorial, no extrato metanólico da folha de *Tephrosia purpurea*, alto teor de flavonoides e médio teor de alcaloides foram relacionados aos efeitos tóxicos em *Ae. aegypti* (Venkadachalam et al. 2017). Além disso, ácidos fenólicos de *Chaetomorpha antennina* (Vimaladevi et al. 2012) e extratos alcaloides, fenólicos e terpenóides das folhas de *Ziziphus jujuba*, cujo extrato fenólico foi o mais larvicida (Devi e Bora 2017).

A atividade larvicida de lignanas foi identificada em raízes de *Phryma leptostachya* var. asiatica (Park et al. 2005). A lignana grandisin isolada de *Piper solmsianum* também foi ativa contra as larvas de *Ae. aegypti* (Leite et al. 2012) e lignanas de *Piper fimbriulatum* também (Solís et al. 2005). Antracenos do fungo *Neosartorya pseudofischeri* foram relatados para combater o mosquito *Ae. aegypti* no estudo de Masi et al. (2017). A saponina também foi

relacionada a ação contra esse mosquito, o conteúdo de saponina do extrato de acetato de etila de *Achyranthes aspera* foi relatado com ação contra o *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* no estudo de Bagavan et al. (2008) e outras saponinas de extratos e frações do mesocarpo do fruto de *Balanites aegyptiaca* foram fortemente relacionadas com a atividade larvicida contra *Ae. aegypti* (Wiesman e Chapagain 2006).

Um extrato de clorofórmio que teve um  $CL_{50}$  semelhante ao nosso estudo ( $CL_{50}$  em LCS: 38,404 ppm e  $CL_{50}$  LCI: 32,907 ppm) mostrou um perfil fitoquímico fortemente positivo para a presença de carboidratos, taninos, quinonas, terpenóides e cianina, positivo para a presença de cumarinas e glicosídeos cardíacos e vestígios de ácidos (Elumalai et al. 2017).

Porém, para um inseticida natural ter valor, ele deve ser eficaz, mas também deve ser seletivo com baixa toxicidade ambiental (Corrêa e Vieira 2007). Com base nisso, decidimos testar a toxicidade de nosso extrato ativo em organismos não-alvo. A influência de diferentes concentrações de extrato clorofórmico de *P. microphylla* na germinação e crescimento de mudas de *Lactuca sativa* L. dos Grandes Lagos revelou que não há diferença significativa entre as concentrações testadas quando comparadas às sementes no tampão (Figura 2 a-d). Não há germinação no tratamento com herbicida, portanto, quando comparado aos demais tratamentos, o grau de significância é maior ( $p < 0,0001$ ). No comprimento do hipocótilo, a comparação entre as concentrações de 60 ppm e 90 ppm resultou em um valor significativo de  $p = 0,0295$ .

Os extratos metanólicos aquosos de *Ocimum tenuiflorum* mostraram uma redução significativa do crescimento da parte aérea e da raiz da alface e outras espécies de plantas testadas (Islam e Kato-Noguchi 2014). Extratos aquosos de folhas de seis espécies de árvores testadas também mostraram inibição de crescimento em ensaio com sementes de alface (Sunmonu e Van Staden 2014). Extratos hidroalcoólicos de folhas de *Solanum muricatum* e *Solanum betaceum* afetaram a germinação e o crescimento de sementes de *L. sativa* em diferentes graus (Santos et al. 2018). Extratos aquosos de frutas, folhas frescas e secas de *Morus nigra* causaram efeitos inibitórios nos parâmetros de germinação e crescimento de *L. sativa* (Vieira et al. 2018).

De acordo com Sousa et al. (2017), produtos que têm um índice de germinação variando entre 80-100% são classificados como não fitotóxicos e com variação entre 60-80% como moderadamente fitotóxicos, então, levando esta classificação em consideração, todas as

concentrações testadas são não fitotóxicas. Após 48 horas, as sementes de alface sofreram redução da germinação a partir da concentração de 0,5 g/L (500 ppm) para *Amaranthus retroflexus*, e 1,0 g/L (1.000 ppm) para as demais plantas de *Amaranthus* testadas. Os compostos químicos que essa espécie tinha em comum eram ácido orgânico, carotenóides e esteróides (Carvalho et al. 2019). As frações de clorofórmio, n-hexano e acetato de etila, e o próprio extrato metanólico de *Artemisia arborescens* inibiram a germinação de sementes de *L. sativa* na dose efetiva de 50% (DE<sub>50</sub>) 1,68 mg/mL (1.680 ppm), 5,31 mg/mL (5.310 ppm), 1,29 mg/mL (1.290 ppm) e 1,77 mg/mL (1.770 ppm), respectivamente (Araniti et al. 2016).

A embriotoxicidade no zebrafish revelou que o CL<sub>50</sub> em 48 horas é maior do que o CL<sub>50</sub> larvicida o que significa que para ser 50% letal para os peixes é necessário quase 2 vezes o CL<sub>50</sub> aplicado para matar 50% das larvas de *Ae. aegypti*. As observações em 24 horas mostraram movimentos dentro dos embriões indicando que, possivelmente, eram viáveis em termos de desenvolvimento (Tabela 5).

Em 48 horas, a partir de 30 ppm, observamos que alguns deles não apresentavam melanócitos e em 60 ppm os que ainda estavam vivos não apresentavam melanócitos. No controle e no tratamento com PBS, houve presença normal de melanócitos (setas vermelhas na Figura 3). Em 72 horas, um grande número de embriões já eclodira, enquanto que em 30 ppm um grande número não eclodiou. Além disso, em 72 horas para a concentração de 30 ppm ocorreu uma redução significativa dos batimentos cardíacos quando comparada aos demais tratamentos. Assim, em concentrações próximas ao larvicida CL<sub>50</sub> nosso extrato interfere no desenvolvimento embriogênico dos peixes, mas não o suficiente para causar mortalidade significativa (Tabela 5).

Estudo de Procópio et al. (2015) encontraram que o extrato salino das folhas de *Schinus terebenthifolius* matou 100% dos náuplios de *Artemia salina* em todas as concentrações testadas, sendo tóxico em concentrações larvicidas para *Ae. aegypti*. Outro estudo descobriu que de 14 extratos de plantas testados em seus respectivas CL<sub>50</sub> larvicidas contra o peixe guppy, seis deles produziram 100% de mortalidade (Promsiri et al. 2006). O óleo essencial de *Pinus kesiya* apresentou um valor CL<sub>50</sub> muito mais alto (8390 µg/ml ou 8390 ppm) de mortalidade para o peixe *Gambusia affinis* (Govindarajan et al. 2016). E, uma toxicidade ainda maior foi encontrada para *Bowellia ovalifoliolata* quando exposto ao peixe *G. affinis* que apresentou um CL<sub>50</sub> de 14.783,21 µg / ml (14.783,21 ppm) (Benelli et al. 2018),



para o mesmo peixe, uma mistura quaternária de alguns extratos de solvente mostrou também uma  $CL_{50}$  mais alta de 90,21 mg/L (90,21 ppm) (Hari e Mathew 2018).

Muitos estudos avaliam a atividade hemolítica de compostos naturais de plantas, pois é importante que os compostos com potencial para serem utilizados por humanos determinem sua toxicidade para garantir seu uso seguro. Também é importante avaliar a toxicidade, pois os produtos naturais não garantem segurança ao homem e especificidade aos organismos-alvo. A atividade hemolítica é uma primeira etapa para entender como um produto se comporta no nível celular (Kalaivani et al. 2011; Kumar et al. 2011; Mossa et al. 2018). Nosso estudo não encontrou nenhum efeito hemolítico contra os eritrócitos em nenhuma concentração de extrato de clorofórmio de *P. microphylla* de 2.000 a 31,25 ppm.

Anteriormente, a mesma espécie de planta de nosso estudo teve seu extrato aquoso de fruta determinado para citotoxicidade em células Vero, e este demonstrou diminuir a viabilidade celular nas concentrações mais altas (4 mg/ml ou 4.000 ppm e 2 mg/ml ou 2.000 ppm), mas não foi citotóxico na concentração mais baixa (0,4 mg/ml ou 400 ppm) (Silva et al. 2015). Kalita (2011) observou no extrato aquoso de *Lantana camara* uma atividade hemolítica de  $7,93 \pm 0,23\%$  na concentração de 1mg/ml (1000 ppm). Rasool et al. (2015) no extrato metanólico (1mg / ml) de *Aitchisonia rosea* obteve percentual de hemólise de  $9,4 \pm 0,04\%$ . Em contrapartida, a atividade hemolítica observada no estudo de Araújo (2012) que testou extratos de folhas de *Leiothix spiralis* (1mg/ml) apresentou valor superior a 20%. Assim, podemos concluir que em um modelo de citotoxicidade de hemácias, nosso extrato não apresentou toxicidade celular, mas como essa espécie de planta já demonstrou um leve grau de toxicidade, estudos mais robustos são necessários.

## **Conclusão**

Em conclusão, nosso estudo descobriu que apenas o extrato de clorofórmio de *P. microphylla* foi ativo contra larvas de *Ae. aegypti*, provavelmente devido aos compostos desta planta com afinidade particular ao clorofórmio. Além disso, demonstramos que este extrato não era fitotóxico, não citotóxico, mas com uma toxicidade de desenvolvimento embrionário leve para o zebrafish que não reflete em uma mortalidade significativa. Os resultados obtidos permitem concluir que o extrato de clorofórmio de *P. microphylla* é uma alternativa larvicida no controle do mosquito que necessita de mais estudos a fim de isolar seu princípio ativo e também elucidar melhor sua toxicidade.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela viabilização deste trabalho. Agradecemos também o Laboratório de Produtos Naturais, o Laboratório de Ecologia Química, o Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Patógenos e o Laboratório de Enzimologia, aos alunos de Iniciação Científica Daywison Silva Rodrigues Gamboa, Welson Vicente da Silva e Pedro Henrique do Nascimento, doutorando João Ricardhis Saturnino de Oliveira e os técnicos de laboratório que ajudaram neste estudo.

## Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## Referências

- Agra M de F, Freitas PF de, Barbosa-Filho JM (2007) Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian J Pharmacogn* 17:114–140. doi: 10.1016/j.jep.2006.12.007
- Albuquerque UP de, de Medeiros PM, de Almeida ALS, et al (2007) Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 114:325–354. doi: 10.1016/j.jep.2007.08.017
- Ali MS, Ravikumar S, Beula JM (2012) Spatial and temporal distribution of mosquito larvicidal compounds in mangroves. *Asian Pacific J Trop Dis* 2:401–404. doi: 10.1016/S2222-1808(12)60087-5
- Ali SI, Gopalakrishnan B, Venkatesalu V (2018) Evaluation of larvicidal activity of *Senecio laetus* Edgew. against the malarial vector, *Anopheles stephensi*, dengue vector, *Aedes aegypti* and Bancroftian filariasis vector, *Culex quinquefasciatus*. *South African J Bot* 114:117–125. doi: 10.1016/j.sajb.2017.10.018
- Araniti F, Gullì T, Marrelli M, et al (2016) *Artemisia arborescens* L. leaf litter: phytotoxic activity and phytochemical characterization. *Acta Physiol Plant* 38:1–12. doi: 10.1007/s11738-016-2141-7
- Araújo IF de, Araújo PHF de, Ferreira RMA, et al (2018) Larvicidal effect of hydroethanolic extract from the leaves of *Acmella oleracea* L. R. K. Jansen in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *South African J Bot* 117:134–140. doi: 10.1016/j.sajb.2018.05.008
- Araújo MGF et al. (2012) Correlation among antioxidant, antimicrobial, hemolytic, and antiproliferative properties of *Leiothrix spiralis* leaves extract. *Int J Mol Sci* 13:9260–9277
- Bagavan A, Rahuman AA, Kamaraj C, Geetha K (2008) Larvicidal activity of saponin from *Achyranthes aspera* against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera:

- Culicidae). *Parasitol Res* 103:223–229. doi: 10.1007/s00436-008-0962-z
- Barbosa PBBM, Oliveira JM de, Chagas JM, et al (2014) Evaluation of seed extracts from plants found in the Caatinga biome for the control of *Aedes aegypti*. *Parasitol Res* 113:3565–3580. doi: 10.1007/s00436-014-4022-6
- Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Araújo SC, et al (2016) Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* populations. *Biomed Res Int* 2016:1–6. doi: 10.1155/2016/8603263
- Benelli G, Rajeswary M, Vijayan P, et al (2018) *Boswellia ovalifoliolata* (Burseraceae) essential oil as an eco-friendly larvicide? Toxicity against six mosquito vectors of public health importance, non-target mosquito fishes, backswimmers, and water bugs. *Environ Sci Pollut Res* 25:10264–10271. doi: 10.1007/s11356-017-8820-0
- Braunbeck T, Lammer E (2006) Background Paper on Fish Embryo Toxicity Assays. German Fed Environ Agency
- Carvalho MSS, Andrade-Vieira LF, Santos FE dos, et al (2019) Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of *Amaranthus* spp. in the plant model *Lactuca sativa*. *Sci Hortic (Amsterdam)* 245:90–98. doi: 10.1016/j.scienta.2018.10.001
- Chore JK, Obonyo M, Wachira FN, Mireji PO (2014) Larvicidal Activity of Selected *Aloe* Species Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Insect Sci* 14:1–3. doi: 10.1093/jisesa/ieu064
- Corrêa AG, Vieira PC (2007) Produtos naturais no controle de insetos, 2nd edn. EdUFSCar, São Paulo
- Cruz RCD da, Carvalho K da S, Silva SL da C e, et al (2015) Bioatividade da raiz de *Poincianella bracteosa* (Tul.) L. P. Queiroz (Fabaceae) sobre larvas do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Brazilian J Biosci* 13:259–264
- Devi U, Bora D (2017) Growth inhibitory effect of phenolic extracts of *Ziziphus jujuba* Mill. in dengue vector *Aedes aegypti* (L) in parent and F1 generation. *Asian Pac J Trop Med* 10:787–791. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.08.003
- Dhal P, Rout JR, Dash PK, et al (2018) Larvicidal and Pupicidal activity of *Clerodendrum philippinum* Schauer Leaf Extracts against *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Pharmacogn J* 10:1137–1142. doi: 10.5530/pj.2018.6.194
- Elumalai D, Hemalatha P, Kaleena PK (2017) Larvicidal activity and GC–MS analysis of *Leucas aspera* against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *J Saudi Soc Agric Sci* 16:306–313. doi: 10.1016/j.jssas.2015.10.003
- Flora do Brasil (2019) *Cenostigma microphyllum* (Mart. ex G. Don) E. Gagnon & G.P. Lewis. In: *Jard. Botânico do Rio Janeiro*. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB605752>. Accessed 5 Jul 2019
- Ghosh A, Chowdhury N, Chandra G (2012) Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian J Med Res* 135:581–598
- Govindarajan M (2011) Evaluation of *Andrographis paniculata* Burm.f.

- (Family:Acanthaceae) extracts against *Culex quinquefasciatus* (Say.) and *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera:Culicidae). Asian Pac J Trop Med 4:176–181. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60064-3
- Govindarajan M, Karuppanan P (2011) Mosquito larvicidal and ovicidal properties of *Eclipta alba* (L.) Hassk (Asteraceae) against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). Asian Pac J Trop Med 4:24–28. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60026-6
- Govindarajan M, Mathivanan T, Elumalai K, et al (2011) Mosquito larvicidal, ovicidal, and repellent properties of botanical extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res 109:353–367. doi: 10.1007/s00436-011-2263-1
- Govindarajan M, Rajeswary M, Benelli G (2016) Chemical composition, toxicity and non-target effects of *Pinus kesiya* essential oil: An eco-friendly and novel larvicide against malaria, dengue and lymphatic filariasis mosquito vectors. Ecotoxicol Environ Saf 129:85–90. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.03.007
- Hari I, Mathew N (2018) Larvicidal activity of selected plant extracts and their combination against the mosquito vectors *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. Environ Sci Pollut Res 25:9176–9185. doi: 10.1007/s11356-018-1515-3
- Hoekstra NJ, Bosker T, Lantinga EA (2002) Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.). Agric Ecosyst Environ 93:189–196
- Islam AKMM, Kato-Noguchi H (2014) Phytotoxic activity of *Ocimum tenuiflorum* extracts on germination and seedling growth of different plant species. Sci World J 2014:1–8. doi: 10.1155/2014/676242
- Kalaivani T, Rajasekaran C, Mathew L (2011) Free radical scavenging, cytotoxic, and hemolytic activities of an active antioxidant compound ethyl gallate from leaves of *Acacia nilotica* (L.) wild. Ex. Delile subsp. Indica (Benth.) Brenan. J Food Sci 76:
- Kalita S et al (2011) Phytochemical composition and in vitro hemolytic activity of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) leaves. Pharmacol online News Lett 1:59–67
- Kumar G, Karthik L, Rao KVB (2011) Haemolytic activity of Indian medicinal plants toward human erythrocytes: an in vitro study. Elixir Appl Bot 40:5534–5537
- Leite ACCF, Kato MJ, Soares ROA, et al (2012) Grandisin caused morphological changes larval and toxicity on *Aedes aegypti*. Brazilian J Pharmacogn 22:517–521. doi: 10.1590/S0102-695X2012005000016
- Leta S, Beyene TJ, De Clercq EM, et al (2018) Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* HHS Public Access. Int J Infect Dis 67:25–35. doi: 10.1016/j.ijid.2017.11.026
- Masi M, Cimmino A, Tabanca N, et al (2017) A survey of bacterial, fungal and plant metabolites against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of yellow and dengue fevers and Zika virus. Open Chem 15:156–166. doi: 10.1515/chem-2017-0019
- Mossa A-TH, Mohafresh SMM, Chandrasekaran N (2018) Safety of Natural Insecticides:

- Toxic Effects on Experimental Animals. *Biomed Res Int* 2018:1–17. doi: 10.1155/2018/4308054
- Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, et al (2017) Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e005625. doi: 10.1371/journal.pntd.0005625
- Novak RJ, Lampman RL (2010) Public Health Pesticides. In: Krieger R (ed) Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, 3rd edn. Elsevier, Amsterdam, pp 231–256
- OECD (2013) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test. 1–22
- Oliveira PES de, Conserva LM, Brito AC, Lemos RPL (2005) Coumarin derivatives from *Esenbeckia grandiflora* and its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Pharm Biol* 43:53–57. doi: 10.1080/13880200590903363
- Oliveira YLC de, Silva LCN da, Silva AG da, et al (2012) Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretoideae). *Sci World J* 2012:1–6. doi: 10.1100/2012/849302
- Oliveira P V., Ferreira JC, Moura FS, et al (2010) Larvicidal activity of 94 extracts from ten plant species of northeastern of Brazil against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 107:403–407. doi: 10.1007/s00436-010-1880-4
- Park IK, Shin SC, Kim CS, et al (2005) Larvicidal activity of lignans identified in *Phryma leptostachya* var. *asiatica* roots against three mosquito species. *J Agric Food Chem* 53:969–972. doi: 10.1021/jf048208h
- Pavela R, Maggi F, Iannarelli R, Benelli G (2019) Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. *Acta Trop* 193:236–271. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.01.019
- Procópio TF, Fernandes KM, Pontual EV, et al (2015) *Schinus terebinthifolius* Leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. *PLoS One* 10:1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0126612
- Promsiri S, Naksathit A, Kruatrachue M, Thavara U (2006) Evaluations of larvicidal activity of medicinal plant extracts to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and other effects on a non target fish. *Insect Sci* 13:179–188. doi: 10.1111/j.1744-7917.2006.00080.x
- Queiroz LP de (2009) Leguminosas da caatinga. Universidade Estadual de Feira de Santana: Royal Botanic Gardens, Kew: Associação Plantas do Nordeste, Feira de Santana
- Rasool S, Khan FZ, Ahmad M (2015) Evaluation of anticonvulsant, antimicrobial and hemolytic activity of *Aitchisonia rosea*. *Bangladesh J Pharmacol* 10:980–987
- Rocha DK, Matos O, Novo MT, et al (2015) Larvicidal Activity against *Aedes Aegypti* of *Foeniculum Vulgare* Essential Oils from Portugal and Cape Verde. *Nat Prod Commun* 10:677–682. doi: 10.1177/1934578x1501000438
- Santos EA Dos, Carvalho CMD, Costa ALS, et al (2012) Bioactivity evaluation of plant extracts used in indigenous medicine against the snail, *Biomphalaria glabrata*, and the larvae of *Aedes aegypti*. *Evidence-based Complement Altern Med* 2012:1–9. doi:

10.1155/2012/846583

- Santos FE dos, Carvalho MSS, Silveira GL, et al (2018) Phytotoxicity and cytogenotoxicity of hydroalcoholic extracts from *Solanum muricatum* Ait. and *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae) in the plant model *Lactuca sativa*. Environ Sci Pollut Res 1–11. doi: 10.1007/s11356-017-1015-x
- Shalan EA-S, Canyon D, Younes MWF, et al (2005) A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. Environ Int 31:1149–1166. doi: 10.1016/j.envint.2005.03.003
- Silva AG da, Silva LCN da, Filho CMB, et al (2006) Antimicrobial activity of medicinal of medical plants of caatinga ( semi-arid ) vegetation of NE Brazil. Curr Top Phytochem 11:81–94
- Silva JVJ, Lopes TRR, Oliveira-Filho EF d., et al (2018) Current status, challenges and perspectives in the development of vaccines against yellow fever, dengue, Zika and chikungunya viruses. Acta Trop 182:257–263. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.03.009
- Silva LN, Trentin DDS, Zimmer KR, et al (2015) Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. Pharm Biol 53:464–468. doi: 10.3109/13880209.2014.922587
- Solís PN, Olmedo D, Nakamura N, et al (2005) A new larvicidal lignan from *Piper fimbriatum*. Pharm Biol 43:378–381. doi: 10.1080/13880200590951865
- Soonwera M, Phasomkusolsil S (2016) Effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and *Syzygium aromaticum* (clove) oils on the morphology and mortality of *Aedes aegypti* and *Anopheles dirus* larvae. Parasitol Res 115:1691–1703. doi: 10.1007/s00436-016-4910-z
- Sousa R de CP de, Guimarães PVP, Silva MR da, et al (2017) African Journal of Plant Science Phytotoxicity of extracts of *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh bioprocessed in vegetable crop sensitive to allelochemicals. African J Plant Sci 11:244–251. doi: 10.5897/AJPS2016.1491
- Sunmonu TO, Van Staden J (2014) Phytotoxicity evaluation of six fast-growing tree species in South Africa. South African J Bot 90:101–106. doi: 10.1016/j.sajb.2013.10.010
- Torres P, Novaes P, Pires JS, et al (2018) Protocolo para avaliação dos efeitos de extratos vegetais sobre a germinação e crescimento inicial de alface em microplacas de seis poços. Inst Biociências, Univ São Paulo 1–9
- Venkadachalam R, Subramaniyan V, Palani M, et al (2017) Mosquito Larvicidal and Pupicidal Activity of *Tephrosia purpurea* Linn. (Family: Fabaceae) and *Bacillus sphaericus* against, Dengue Vector, *Aedes aegypti*. Pharmacogn J 9:737–742. doi: 10.5530/pj.2017.6.116
- Vieira LR, Silva ER da, Soares GLG, et al (2018) Phytotoxic effects of *Morus nigra* aqueous extract on germination and seedling growth of *Lactuca sativa*. Rodriguesia 69:2153–2161. doi: 10.1590/2175-7860201869443
- Vimaladevi S, Mahesh A, Dhayanithi BN, Karthikeyan N (2012) Mosquito larvicidal efficacy of phenolic acids of seaweed *Chaetomorpha antennina* (Bory) Kuetz. against *Aedes aegypti*. Biologia (Bratisl) 67:212–216. doi: 10.2478/s11756-011-0152-9

- Vivekanandhan P, Senthil-Nathan S, Shivakumar MS (2018) Larvicidal, pupicidal and adult smoke toxic effects of *Acanthospermum hispidum* (DC) leaf crude extracts against mosquito vectors. *Physiol Mol Plant Pathol* 101:156–162. doi: 10.1016/j.pmpp.2017.05.005
- Wagner H, Bladt S (1996) *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd edn. Springer, Berlin
- Wang Z, Kim JR, Wang M, et al (2012) Larvicidal activity of *Cnidium monnieri* fruit coumarins and structurally related compounds against insecticide-susceptible and insecticide-resistant *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti*. *Pest Manag Sci* 68:1041–1047. doi: 10.1002/ps.3265
- WHO (2019) Mosquito-borne diseases: Mosquitoes cause millions of deaths every year. <https://www.who.int/test/hm/vector-borne/>. Accessed 6 Jul 2019
- WHO (2005) *Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides*. World Health Organization, Geneva
- WHO (1993) *Tropical Disease Research*. World Health Organization, Geneva
- Wiesman Z, Chapagain BP (2006) Larvicidal activity of saponin containing extracts and fractions of fruit mesocarp of *Balanites aegyptiaca*. *Fitoterapia* 77:420–424. doi: 10.1016/j.fitote.2006.05.012
- Yu KX, Wong CL, Ahmad R, Jantan I (2015) Larvicidal activity, inhibition effect on development, histopathological alteration and morphological aberration induced by seaweed extracts in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Asian Pac J Trop Med* 8:1006–1012. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.11.011
- Zucconi F, Monaco A, Forte M, De Bertoldi M (1985) Phytotoxins during the stabilization of organic matter. In: Gasser JKR (ed) *Composting of Agricultural and Other Wastes*. Elsevier, London, UK, pp 73–86

**Tabela 1** Sistemas de eluição e reveladores para caracterização dos metabólitos secundários

Classe química	Eluente	Revelador
Alcalóides	Tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10)	Dragendorff
Saponinas	Clorofórmio: acetato de etila: metanol: água (64: 32: 12: 8)	Anisaldeído-sulfúrico 5-10 min a 100 °C
Cumarinas	Tolueno: éter etílico (1: 1) Saturado com ácido acético a 10%	Hidróxido de potássio 10%
Lignanas	Clorofórmio: metanol: água (70: 30: 4)	Vanilina fosfórica
Antraquinonas	Éter de petróleo: acetato de etila: ácido fórmico (75: 25: 1)	Ácido Fosfomolibdico / Ácido Sulfúrico Etanólico 10%
Taninos condensados	Acetato de etila: ácido acético glacial: ácido fórmico: água (100: 11: 11: 26)	Vanilina clorídrico
Antocianinas	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100: 11: 11: 26)	Anisaldeído sulfúrico 8 min a 110 °C
Xantinas	Acetato de etila: metanol: água (100: 13,5: 10)	Iodo: iodeto de potássio: ácido clorídrico
Naftoquinonas	Tolueno: ácido fórmico (93: 7)	Hidróxido de potássio 10%
Taninos hidrolisáveis	Butanol: acetona: tampão de fosfato pH 5,0 (40:50:10)	Sulfato de ferro amoniacal
Triterpenos e esteróides	Tolueno: clorofórmio: etanol (40:40:10)	Lieberman-Burchard 5-10 min a 110 °C
Derivados Antracênicos	Acetato de etila: metanol: água (100: 13,5: 10)	Hidróxido de potássio 10%
Mono, sesqui e diterpenos	Tolueno: ácido fórmico (93: 7)	Vanilina sulfúrica
Compostos fenólicos	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100: 11: 11: 26)	1% de ácido etil-borilaminoéster em etanol

Adaptado de Wagner and Bladt (1996).

**Tabela 2** Atividade larvicida de extratos de *Poincianella microphylla* contra *Aedes aegypti*.

Extrato	CL <sub>50</sub> (LCI-LCS) (ppm)	CL <sub>90</sub> (ppm)	Chi-squared ( $\chi^2$ )
Ciclohexano	>1.000	>1.000	-
Clorofórmio	31,62 (27,19-36,06)	101,34	1,17
Acetato de etila	>1.000	>1.000	-
Metanol	>1.000	>1.000	-

Graus de liberdade (6); LCI, limite de confiança inferior; LCS, Limite de confiança superior



**Tabela 3** Perfil fitoquímico do extrato clorofórmico de *Poincianella microphylla* determinado por cromatografia em camada delgada

Constituintes fitoquímicos	Presença
Taninos condensados	-
Antraquinonas	-
Cumarinas	++
Alcalóides	+
Antocianinas	-
Compostos fenólicos	++
Lignanas	++
Mono-, sesqui-, diterpenos	+
Triterpenos e esteróides	+
Derivados de antraceno	++
Saponinas	++
Naftoquinonas	-

(-) ausência, (+) baixa intensidade e (++) média intensidade

**Tabela 4** Efeito do extrato clorofórmico de *Poincianella microphylla* na porcentagem de germinação, porcentagem de germinação relativa de sementes, crescimento relativo da raiz e índice de germinação de *Lactuca sativa* L. dos Grandes Lagos após 7 dias (n = 4).

Tratamentos	PG (%)	GRS (%)	CRR (%)	IG (%)
Controle	87,50	-	-	-
10 ppm	78,12	89,28	104,50	93,30
30 ppm	90,62	103,57	100,00	103,57
60 ppm	78,12	89,28	93,40	83,40
90 ppm	84,38	96,42	90,70	87,45

PG, porcentagem de germinação; GRS, porcentagem de germinação relativa das sementes; CRR, crescimento relativo da raiz; IG, índice de germinação

**Tabela 5** Mortalidade, número de batimentos cardíacos e CL<sub>50</sub> para a exposição de embriões de zebrafish ao extrato clorofórmico de *Poincianella microphylla*

Tratamentos	% Mortalidade			Número médio de batimentos cardíacos / min (72h)
	24h	48h	72h	
10 ppm	-	-	3,33±5,77	129,50
30 ppm	-	-	23,33±15,28	63
60 ppm	-	26,67±5,77	100,00	-
90 ppm	-	100,00	100,00	-
120 ppm	-	100,00	100,00	-
150 ppm	10±17,32	100,00	100,00	-
180 ppm	-	100,00	100,00	-
PBS	-	-	-	111,25
Controle	-	-	-	126,50
CL <sub>50</sub> (ppm)	~127,60	~61,05	~31,68	

Alguns resultados são expressos como média ± DP; ppm, partes por milhão; PBS, tampão fosfato salina; -, ausência

## 5 CONCLUSÃO

- O extrato de clorofórmio de *P. microphylla* foi ativo contra larvas de *Ae. aegypti*, provavelmente devido a compostos vegetais com particular afinidade ao clorofórmio;
- A análise ultraestrutural das larvas revelou alterações da papila anal e do tubo sifão, rupturas abdominais e turgescência corporal, portanto podemos propor que desregulações osmóticas e alterações do processo respiratório são os prováveis mecanismos de ação;
- O extrato de clorofórmico de *P. microphylla* foi não fitotóxico, não citotóxica em modelo de hemácias, mas com uma toxicidade embrionária moderada ao zebrafish que não reflete em uma mortalidade significativa;
- O extrato clorofórmico de *P. microphylla* é uma alternativa larvicida no controle de mosquitos que necessita de mais estudos posteriores para o isolamento de seu princípio ativo e também melhor elucidação da sua toxicidade.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T. da S. et al. Secondary metabolites. In: DHANARASU, S. (Org.). **Chromatography and its Application**. London: IntechOpen, 2012. p. 131–163.
- AGRA, M. de F.; FREITAS, P. F. de; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114–140, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P. de et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.
- ANS. **Combate ao mosquito *Aedes aegypti***. Disponível em: <http://www.ans.gov.br/prevencao-e-combate/combate-ao-mosquito-aedes-aegypti>. Acesso em: 3 jul. 2019.
- ANVISA. **Vacina dengue: Esclarecimentos**. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201). Acesso em: 11 jul. 2019.
- BARBOSA, P. B. B. M. et al. Evaluation of seed extracts from plants found in the Caatinga biome for the control of *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 10, p. 3565–3580, 2014.
- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- BELLINATO, D. F. et al. Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* populations. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–6, 2016.
- BENELLI, G.; JEFFRIES, C. L.; WALKER, T. Biological control of mosquito vectors: Past, present, and future. **Insects**, v. 7, n. 52, p. 1–18, 2016.
- BOUZID, M. et al. Public health interventions for *Aedes* control in the time of Zikavirus– A meta-review on effectiveness of vector control strategies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005176, 2016.
- BRADY, O. J. et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1760, 2012.
- BRAGA, I.A.; SAN MARTIN, J.L. Histórico do controle de *Aedes aegypti*. In: VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; CUNHA, R. V. da (Org.). **Dengue: Teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2015. p. 61–73.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: History of control in Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113–118, 2007.
- BRAGANÇA, I. et al. Ecotoxicological effects of insecticides in plants assessed by germination and other phytotoxicity tools. In: S., V. (Org.). **Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants**. Singapore: Springer Nature, 2018. p. 47–76.
- BURT, F. J. et al. Chikungunya: a re-emerging virus. **The Lancet**, v. 379, p. 662–671, 2012.

- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.
- CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P. L. Risk of re-emergence of urban yellow fever in Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saude**, v. 26, n. 3, p. 1–3, 2017.
- CONSOLI, R. A. G.B.; OLIVEIRA, R. L. de. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994.
- CORRÊA, A.G.; VIEIRA, P.C. **Produtos naturais no controle de insetos**. 2. ed. São Paulo: EdUFSCar, 2007.
- CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites occurrence, structure and role in the human diet**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.
- D`COSTA, A.; SHEPHERD, I. T. Zebrafish development and genetics: Introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. **Zebrafish**, v. 6, n. 2, p. 169–177, 2009.
- DAMMSKI, A. P. et al. **Zebrafish manual de criação em biotério**. 1. ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2011.
- DHILLON, S. S. et al. Metabolic profiling of zebrafish embryo development from blastula period to early larval stages. **PLoS ONE**, v. 14, n. 5, p. 1–13, 2019.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.
- DIVE. **Orientações técnicas para pessoal de campo. Adaptado do manual de normas técnicas do Ministério da Saúde de 2001**. Santa Catarina: Diretoria de Vigilância Epidemiológica do Estado de Santa Catarina, 2007. Disponível em: [http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/manuais\\_cartilhas/Manual\\_de\\_Campo\\_Dengue.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/manuais_cartilhas/Manual_de_Campo_Dengue.pdf). Acesso em: 11 jul. 2019.
- DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.
- EIMON, P. M.; RUBINSTEIN, A. L. The use of *in vivo* zebrafish assays in drug toxicity screening. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 5, n. 4, p. 393–401, 2009.
- EPA. **Ecological effects test guidelines OPPTS (850.4200): Seed germination/root elongation toxicity test**. Washington, DC: EPA, 1996.
- \_\_\_\_\_. **Technical overview of ecological risk assessment - Analysis phase: Ecological effects characterization**. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0>. Acesso em: 2 jul. 2018.
- FAO. **International code of conduct on the distribution and use of pesticides guidelines on efficacy evaluation for the registration of plant protection products**. Rome: FAO, 2006. Disponível em: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/Code/Efficacy](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/Efficacy).

pdf. Acesso em: 2 jul. 2019.

FARAJOLLAHI, A.; PRICE, D. C. A Rapid identification guide for larvae of the most common north american container-inhabiting *Aedes* Species of medical importance. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 29, n. 3, p. 203–221, 2013.

FLORA DO BRASIL. *Cenostigma microphyllum* (Mart. ex G. Don) E. Gagnon & G.P. Lewis. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB605752>. Acesso em: 5 jul. 2019.

FORATTINI, O. P.; BRITTO, M. de. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 5, p. 676–677, 2003.

FRANCO, O. Reinfestação do Pará por *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 21, n. 4, p. 729–731, 1969.

GAUTAM, A. et al. Hemolytik: a database of experimentally determined hemolytic and non-hemolytic peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D444–D449, 2013.

GERIS, R. et al. Bioactive natural products as potential candidates to control *Aedes aegypti*, the vector of dengue. In: ATTA-UR-RAHMAN (Org.). **Studies in Natural Products Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2012. v. 37. p. 277–376.

GHOSH, A.; CHOWDHURY, N.; CHANDRA, G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. **Indian Journal of Medical Research**, v. 135, n. 5, p. 581–598, 2012.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Community involvement in the control of *Aedes aegypti*. **Acta Tropica**, v. 61, n. 1996, p. 169–179, 1996.

HEMINGWAY, J. et al. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 2004, p. 653–665, 2004.

HENRY, R. Etymologia: *Aedes aegypti*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 10, p. 1807, 2016.

HOFFBRAND, A.V.; MOSS, P.A.H. **Fundamentos em hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HOOD, R. D. **Developmental and reproductive toxicology: A practical approach**. Indianopolis: CRC press, 2011.

HUSSEIN, R. A.; EL-ANSSARY, A. A. Plants secondary metabolites: The key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. In: BUILDERS, P. (Org.). **Herbal Medicine** Oxford: IntechOpen, 2018. p. 11–30.

IOOS, S. et al. General review current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 44, n. 2014, p. 302–307, 2014.

ISMAN, M. B.; GRIENEISEN, M. L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 3, p. 140–145, 2014.

JESWANI, G. et al. Recent approaches for reducing hemolytic activity of chemotherapeutic agents. **Journal of Controlled Release**, v. 211, p. 10–21, 2015.

KABERA, J. N. et al. Plant secondary metabolites: Biosynthesis, classification, function and

pharmacological properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 7, p. 377–392, 2014.

KHAN, F. R.; ALHEWAIRINI, S. S. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. **Current Trends Cancer Management**. London: IntechOpen, 2018. p. 1–16.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the Zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, p. 253–310, 1995.

KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife**, v. 4, p. 1–18, 2015.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 353–367, 2007.

LIMA, E. P.; GOULART, M. O. F.; NETO, M. L. R. Meta-analysis of studies on chemical, physical and biological agents in the control of *Aedes aegypti*. **BMC Public Health**, v. 15, n. 858, p. 1–14, 2015.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. General features and epidemiology of emerging arboviruses in Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saude**, v. 5, n. 3, p. 55–64, 2014.

CAO LORMEAU, Van-Mai et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 6, p. 1085–1086, 2013.

LUMSDEN, W. H. R. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33–57, 1955.

MACNAMARA, F N. Zika virus: A Report on three cases of human infection during an epidemic of Jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.

MAILA, M. P.; CLOETE, T. E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants-perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, n. 2005, p. 1–8, 2005.

MANJARRES-SUAREZ, A.; OLIVERO-VERBEL, J. Chemical control of *Aedes aegypti*: a historical perspective. **Revista Costarricense de Salud Pública**, v. 22, n. 1, p. 68–75, 2013.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Combate ao *Aedes Aegypti*: prevenção e controle da dengue, chikungunya e Zika**. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/aedes-aegypti>. Acesso em: 3 jul. 2019a.

\_\_\_\_\_. **Dengue, instruções para pessoal de combate ao vetor - Manual de normas técnicas**. 3. ed. Brasil: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

\_\_\_\_\_. **Febre amarela: sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao>. Acesso

em: 4 jul. 2019b.

\_\_\_\_\_. **II Seminário internacional para avaliação de ações de controle químico de *Aedes aegypti* no Brasil.** Disponível em:

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/16/Resumo-Executivo-II-Semin--rio-Aedes-aegypti-final.pdf>. Acesso em: 3 jul. 2019.

\_\_\_\_\_. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika) até a semana epidemiológica 15 de 2019.** Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde-Ministério da Saúde, 2019c. Disponível em:

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/30/informe-arboviroses-15.pdf>. Acesso em: 2 jul. 2019.

\_\_\_\_\_. **Tabela LIRAA.** Disponível em:

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/30/liraa-1-2019.pdf>. Acesso em: 4 jul. 2019d.

MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: Past, present, and future. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3939–3948, 2008.

MONATH, T. P. Yellow fever: An update. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 11–20, 2001.

MOSSA, A.-T. H.; MOHAFRASH, S. M. M.; CHANDRASEKARAN, N. Safety of natural insecticides: Toxic effects on experimental animals. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–17, 16 out. 2018.

MOYES, C. L. et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e005625, 2017.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, 2016.

NARLA, J.; MOHANDAS, N. Red cell membrane disorders. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 39, n. S1, p. 47–52, 2017.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES ENGINEERING AND MEDICINE. **Global health impacts of vector-borne diseases: Workshop summary.** Washington, DC: The National Academies Press, 2016.

NCBI. **Taxonomy browser: *Aedes aegypti*.** Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=7159>. Acesso em: 23 jul. 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NICOLAOU, K. C.; CHEN, J. S. **Classics in total synthesis III: Further targets, strategies, methods.** New Jersey: John Wiley and Sons, 2011.

NOBRE, A.; ANTEZANA, D.; TAUILL, P. L. Febre amarela e dengue no Brasil:

Epidemiologia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. supl III, p. 59–66, 1994.



OECD. **OECD guideline for the testing of chemicals proposal for updating guideline 208 terrestrial plant test: 208: Seedling emergence and seedling growth test**. Paris: OECD, 2003. Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/33653757.pdf>. Acesso em: 2 jul. 2019.

OEPP/EPPO. Efficacy evaluation of plant protection products: Phytotoxicity assessment. **Bulletin OEPP/EPPO**, v. 37, p. 4–10, 2007.

OLIVEIRA, M.B.S.C.; RIBEIRO, F.C.; VIZZONI, A.G.(Org.). **Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2013.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and chikungunya: Emerging arboviruses in the new world. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. XVII, n. 6, p. 671–679, 2016.

PAULES, C. I.; FAUCI, A. S. Yellow fever — Once again on the radar screen in the Americas. **The New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 15, p. 1397–1399, 2017.

PAVELA, R. et al. Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. **Acta Tropica**, v. 193, n. 2019, p. 236–271, 2019.

PICCIN, M. B. (coord.). **Tecnologias de produção, cooperação e agroindústria**. v. 3 ed. Rio de Janeiro: Bonecker Editora, 2017.

PONTES, R. J. S.; RUFFINO-NETTO, A. Dengue in urban locality of Southeastern, Brazil: Epidemiological aspects. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 218–227, 1994.

QUEIROZ, L. P. de. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana: Royal Botanic Gardens, Kew: Associação Plantas do Nordeste, 2009.

QUEIROZ, R. T. de. **Plantas do Brasil Leguminosae (Fabaceae)**. Disponível em: <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com/2014/07/fabaceae-cenostigma-microphyllum-mart.html>. Acesso em: 5 jul. 2019.

RANSON, H. et al. Insecticide resistance in dengue vectors. **TropIKA. net [online]**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2010.

RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, v. 29, n. 9, p. 913–920, 2010.

ROBINSON, M. C. An Epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952-53 I. Clinical features. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 1952–53, 1955.

RUST, R. S. Human arboviral encephalitis. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 19, p. 130–151, 2012.

SCHAPER, S.; HERNÁNDEZ-CHAVARRÍA, F. Scanning electron microscopy of the four larval instars of the dengue fever vector. **Revista de Biología Tropical**, v. 54, n. 3, p. 847–852, 2006.

SHAALAN, E. A.-S. et al. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environmental International**, v. 31, n. 2005, p. 1149–1166, 2005.

SILVA, A. G. da et al. Antimicrobial activity of medicinal of medical plants of caatinga (

semi-arid ) vegetation of NE Brazil. **Current Topics in Phytochemistry**, v. 11, p. 81–94, 2006.

SILVA, J. V.J. et al. Current status, challenges and perspectives in the development of vaccines against yellow fever, dengue, Zika and chikungunya viruses. **Acta Tropica**, v. 182, n. February, p. 257–263, 2018.

SILVA, L. N. et al. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 3, p. 464–468, 2015.

SILVEIRA, G. L. et al. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, n. 2017, p. 359–367, 2017.

SIMMONS, C. P. et al. Current concepts dengue. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, p. 1423–1455, 2012.

SIMÕES, M. S. et al. Bioassay standardization for the detection of allelopathic compounds and environmental toxicants using lettuce. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 29–36, 2013.

SOPER, F. L. The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 14, n. 6, p. 887–891, 1965.

TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. *Aedes aegypti* and society: The economic burden of arboviruses in Brazil. **Journal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 9, n. 3, p. 267–276, 2017.

TEIXEIRA, M. G. et al. East/Central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 906–908, 2015.

TIGRE, R. C. et al. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, n. 2012, p. 125–132, 2012.

VERDEAL, J. C. R. et al. Guidelines for the management of patients with severe forms of dengue. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 125–133, 2011.

WALTON, N.J.; BROWN, D.E. **Chemicals from plants: Perspective on plant secondary products**. London: Imperial College Press, 1999.

WEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Research**, v. 130, n. 2016, p. 69–80, 2016.

WHO. **A global strategy to eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE) 2017-2026**. Geneva: World Health Organization, 2018.

\_\_\_\_\_. **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 4 jul. 2019a.

\_\_\_\_\_. **Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva: World Health Organization, 2009.

\_\_\_\_\_. **Dengue haemorrhagic fever diagnosis, treatment, prevention and control**. 2. ed. Geneva: World Health Organization, 1997.

\_\_\_\_\_. **General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional**

**medicine.** Geneva: World Health Organization, 2000.

\_\_\_\_\_. **Zika virus.** Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>. Acesso em: 4 jul. 2019b.

WINK, M. Importance of plant secondary metabolites for protection against insects and microbial infections. **Advances in Phytomedicine**, v. 3, p. 251–268, 2006.

WIXON, J. Featured organism: *Danio rerio*, the zebrafish. **Yeast**, v. 17, n. 3, p. 225–231, 2000.

YANG, L. et al. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 1–26, 2018.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Tratado de hematologia**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2014.

ZARA, A. L. de S. A. et al. *Aedes aegypti* control strategies: A review. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391–404, 2016.

ZOHRA, M.; FAWZIA, A. Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 5, p. 495–500, 2014.

ZOUBIRI, S.; BAALIOUAMER, A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 6, p. 925–938, dez. 2014.


APÊNDICE A - ARTIGO *INDIGOFERA SUFFRUTICOSA* MILL. (ANIL): PLANT PROFILE, PHYTOCHEMISTRY, AND PHARMACOLOGY REVIEW, PUBLICADO NA REVISTA ADVANCES IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES

Hindawi  
Advances in Pharmacological Sciences  
Volume 2018, Article ID 8168526, 6 pages  
<https://doi.org/10.1155/2018/8168526>



Review Article

***Indigofera suffruticosa* Mill. (Anil): Plant Profile, Phytochemistry, and Pharmacology Review**

Janaina K. L. Campos <sup>1,2</sup>, Tiago F. da S. Araújo,<sup>3</sup> Thaise G. da S. Brito,<sup>2</sup> Ana P. S. da Silva,<sup>2</sup> Rebeca X. da Cunha,<sup>2</sup> Mônica B. Martins,<sup>2</sup> Nicácio H. da Silva,<sup>2</sup> Blanka S. dos Santos,<sup>1,2</sup> César A. da Silva,<sup>4</sup> and Vera L. de M. Lima<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Núcleo de Ciências da Vida, Centro Acadêmico do Agreste, Laboratório Morfofuncional, Rodovia BR 104, Km 62, S/N-Nova Caruaru, Caruaru, PE 55014-908, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Bioquímica, Av. Prof. Moraes Rego, 1235-Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil

<sup>3</sup>Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Farmácia, Av. José de Sá Maniçoba, S/N-Centro, Petrolina, PE 56304-917, Brazil

<sup>4</sup>Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Medicina, Av. José de Sá Maniçoba, S/N-Centro, Petrolina, PE 56304-917, Brazil

Correspondence should be addressed to Janaina K. L. Campos; [janaina.klcampos@ufpe.br](mailto:janaina.klcampos@ufpe.br)

Received 29 August 2018; Revised 25 October 2018; Accepted 12 November 2018; Published 2 December 2018

Guest Editor: Zeliha Selamoglu

Copyright © 2018 Janaina K. L. Campos et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Indigofera suffruticosa* Mill. (Fabaceae) is known as anil or anileira and also with other names, due to the production of a blue pigment, which is commonly used for yarn dyeing. It is distributed in some states of Brazil (Pernambuco, Paraíba, Mato Grosso, São Paulo, Bahia, Pará, and others) and is used in the popular medicine as a febrifuge, antispasmodic, diuretic, abortive, analgesic, purgative, or soothing agent against stomach and urinary problems, jaundice, and ulcers and also as an insecticide. In addition, *I. suffruticosa* can be used as animal feed. This review aimed at providing important data on the botanical, distribution, ethno-pharmacology, phytochemical, pharmacological, and toxicity of *I. suffruticosa* based on the scientific literature. Information on *I. suffruticosa* was gathered via the Internet (from Elsevier, NCBI, and Sci-Hub) and libraries in the period from February to March 2016. More than 40 chemical compounds have been identified and a few compounds isolated, and the main origins are the essential oils, organic extracts, and aqueous extracts of different parts of the plant. *I. suffruticosa* and its active compounds possess wide pharmacological actions in the literature, such as anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antioxidative, antitumor, antimutagenic, anticonvulsant, gastroprotective, and hepatoprotective activities. Therefore, as an important traditional popular medicine, further studies on *I. suffruticosa* are required for the development of new drugs and therapeutics for various diseases.

**1. Introduction**

Fabaceae, present in the Brazilian biodiversity, is considered the third largest family of plants, which has about 19,500 species [1], and it is divided into three subfamilies: Mimosoideae, Caesalpinioideae, and Papilionoideae, and it shows a common feature in almost all fruits and vegetables, known as pods [2]. Papilionoideae is a subfamily with greater wealth in the Caatinga. Among diverse species, the *Indigofera* species is taxonomically present [3].

This family is considered of great importance because among the several varieties, many species are used for food purposes and is used as animal feed, latex, resins, raw materials in the manufacture of paints, pesticides, and medicinal drugs, before undergoing processing and purifications (*Dioclea megacarpa*, *Vatairea paraensis*, and *Dipteryx punctata*), and ornamental trees. Examples of species used as food sources are chickpea (*Cicer arietinum*), peas (*Pisum sativum*), beans (*Phaseolus vulgaris*), lentil (*Lens culinaris*), and soybean (*Glycine max*) [4].

The genus *Indigofera* belonging to the Fabaceae family stands out for being used as fodder [5], green manure, and ground cover [6]. This genus has about 700 species distributed in Asia, tropical Africa, Australia, and North and South America; in Brazil, it is possible to find three species with same popular name "anileira": *Indigofera truxillensis*, *I. hirsuta*, and *I. suffruticosa* [7].

A few decades ago, the investigations of *I. suffruticosa* have focused on their biological activities, including their antitumor [8], anti-inflammatory [9], antimicrobial [10, 11], and antiepileptic [12] properties, but now scientific studies have diversified and deepened their knowledge about this species. These studies evaluated the biological potential of different parts of the plant, with chemical compounds from extractions isolated by using various solvents. This review aimed at providing important data on the botanical, distribution, ethnopharmacology, phytochemical, pharmacological, and toxicity of *I. suffruticosa* based on the scientific literature.

## 2. Botanical Characterization and Distribution

*I. suffruticosa* is described as a shrub plant, measuring 1 m to 2 m height, having branches pubescent, stem angular, of grayish color, pinnate leaves composed of 7–15 oblong or oval leaflets, hairless on the face and back, with small flowers, numerous albo-pink or yellow, in axillary racemes, and its fruit is a small sickle pod with 6–10 seeds measuring 25 mm in length [13]. Having strong adaptability, they are considered wild plants that grow in all types of soils, tolerating drought, floods, and high salinities.

*I. suffruticosa* Mill. (Figure 1) is a species from the Antilla and Central America [14] and more prevalent throughout the tropical America. In Brazil, it is distributed in some states: São Paulo, Sergipe, Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Maranhão [15, 16], Mato Grosso [17], Alagoas [4], Paraíba [18], Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, and Pará [19].

## 3. Traditional Use and Ethnopharmacology

*Indigofera suffruticosa* is popularly known as "indigo" or "anileira." Such a nickname comes from the German language, meaning "blue pigment," which is extracted through fermentation by hot infusion of its leaves and was used in the textile industries to dye yarns. Currently, this extract is processed by industrial chemical processes, and the use of this plant in the textile industries was abandoned [7]. *I. suffruticosa* may also be related to other popular names such as jiquilite, tzitzupu, indigo fields, anileira guinea, real anileira, caá-chica, caá-chira, timbó-mirim, timbozinho, and indigueira. The species is widely used in folk medicine to cure many health problems, with uses based on infusions and decoctions of different parts of this plant [20]. They are attributed to this plant's febrifuge, antispasmodic, diuretic, abortive, and analgesic properties against stomach and urinary problems, jaundice, ulcers and purgative, sedative, and insecticidal properties [21].



(a)



(b)

(c)

(d)

FIGURE 1: (a) Shrub *Indigofera suffruticosa* measuring approximately 1.15 m; (b) leaf and inflorescence; (c) branches with leaves and seeds; (d) branches with flowers, leaves, and inflorescence.

## 4. Chemical Constituents

Several studies have identified and isolated some chemical constituents of *I. suffruticosa*, including flavonoids, alkaloids, coumarins, triterpenoids, and carbohydrates. Early investigations of the chemical components of *I. suffruticosa* were made by Miller and Smith, 1973, using seed extract, with a highlight of the rich presence of amino acids and possible toxic effects. According to the Natural Products Alert [22] and Chemical Abstracts, the phytochemical profile of this species reveals the presence of alkaloids, polyphenols, terpenoids, steroids, reducing sugars, proteins, and indigoids.

Paiva et al. [23] quantified proteins and natural fibers of this species, showing its use as feed for ruminants. Isolation of 3-nitropropanoic acid glucose esters is featured by having toxic effects due to its conversion to the 3-nitropropanoic acid, a respiratory toxin that inhibits mitochondrial enzymes [24, 25]. In addition, *D*-(+)-pinitol,  $\beta$ -sitosterol, and lousifiserone have been isolated from this plant [25]. Apart from these isolated compounds, Kamal and Mangla [26] identified, characterized, and quantified six rotenoids from different parts of *I. suffruticosa*. Preliminary studies of leaves, seeds, and stems of *I. suffruticosa* demonstrate the presence

of polyphenols (coumarin and chlorogenic acid) and flavonoids (quercetin, rutin, and gallic acid), alkaloids, triterpenoids, and carbohydrates [9, 27].

The main flavonoids identified and isolated from the methanol extract of *I. suffruticosa* leaves include quercetin 7-O- $\beta$ -*D*-glucopyranoside, quercetin 3-O- $[\beta$ -*D*-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -*D*-galactopyranoside], quercetin 3-O- $[\alpha$ -*L*-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -*D*-glucopyranoside], and quercetin 3-O- $[\beta$ -*D*-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -*D*-glucopyranoside]. In addition to these compounds, indigo and indirubin were also isolated [27].

Pentadecanoic acid, 14-methyl-, *n*-hexadecanoic acid, *z*-[13, 14-epoxy]tetradec-11-en-1-ol acetate, oleic acid, 9-octadecenoic acid[*z*]-, 2-hydroxy-1-[hydroxyl methyl], heptanoic acid, docosyl ester, octadecanoic acid, 7-hydroxy-, 6-octadecenoic acid[*z*]-, and 8-octadecenoic acid [28] were also found.

Chen et al. [29] using aqueous and ethanol extracts of *I. suffruticosa* identified the following different phenolic compounds: syringic acid, *p*-coumaric acid, vanillin, syringaldehyde, salicylic acid, quercetin, isoliquiritigenin, and formononetin.

The presence of such compounds in the leaf oil of *I. suffruticosa*, (*z*)-3-hexenyl benzoate, methyl hexadecanoate, phytol, linoleic acid, methyl linoleate, *n*-docosane, *n*-tricosane, was also found [30].

## 5. Pharmacological Activities

**5.1. Embryotoxic and Cytotoxic Activity.** Leite et al. [10] investigated the cytotoxic potential of aqueous extracts from leaves of *I. suffruticosa* in mouse embryos and found that, at high concentrations of the extract, the growth of the embryos was inhibited, preventing them reaching the final stage of embryogenesis, indicating that their use in high doses in humans can be harmful.

Vieira et al. [8] realized in his studies that aqueous extracts of leaves of *I. suffruticosa* by infusion and maceration in different concentrations (from 6.25 to 50  $\mu$ g/ml) tested in cell lines of HEP-2 by the MTT method did not produce any cytotoxic effect (>30  $\mu$ g/ml) when compared with the control and DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium).

In another study, the indigo ethanol extract purifier of *I. suffruticosa* showed a potent cytotoxic agent, showing the value of 0.89 for the breast tumor cell line (LM2) and lung tumor cell line (LP07), clarifying that the extract has cellular responses such as inducing apoptosis [31].

Carli et al. [32] also observed the cytotoxic effect on cell viability assays with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), having inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of 200  $\mu$ g/ml.

Bioactive compounds of natural origin are essential in antineoplastic therapy, since they show promising effects on carcinogenesis and contribute to new medicinal interests. Therefore, such information has great relevance in understanding the use of this species and its promising future.

Vieira et al. [33] used aqueous *I. suffruticosa* extracts at varying doses (250–1000 mg/ml) in models for embryotoxicity in the development and oviposition of *Aedes*

*aegypti*. In the study, a significant repellent effect was found on oviposition and an embryotoxicity was also observed, slowing the normal growth of the larvae of *Aedes aegypti*.

The use of plant extracts is an alternative method for insect control, which can minimize the harmful effects of some insecticides on nontarget insect species, humans, and the environment, leading to new opportunities for the development of commercial products of natural origin and of great importance.

**5.2. Antitumor Activity.** Vieira et al. [8] evaluated the effect of aqueous extracts of *I. suffruticosa* processed by maceration and infusion at a dose of 50 mg/kg on sarcoma 180 and found that both forms had significant effect on reducing the tumor (62.6 and 64.5%), respectively.

Cancer is still the leading cause of death in the world, and plants used in traditional medicines may be a potential source of powerful chemopreventive agents because they are enriching source of beneficial secondary components. There are many plant species that have relevant biological data in the scientific literature and even commercial use for this purpose. However, the use of *I. suffruticosa* is still poorly studied, and new studies should investigate the possibility of using as an antitumor drug.

**5.3. In Vivo Activity against Ectoparasite (*Pediculus capitis*).** García et al. [34] used tincture of *I. suffruticosa* to 5% in the population reduction of *Pediculus capitis* and observed the population reduction of lice mainly in cases of persistence in patients of 55 years. After 2 days of application, the results confirmed the insecticidal activity of *I. suffruticosa* tincture; this treatment seems to be a valuable and effective alternative to existing treatments.

**5.4. Antimutagenic Activity.** Calvo et al. [35] evaluated the effect of the ethanol extract of the aerial parts of *I. suffruticosa* in trials on Salmonella, which showed mutagenic activity, suggesting that such an action is due to the presence of indigo pigment. Since plants are primary food sources and cure, the natural products need to be evaluated with regard to their toxicity and dosage because the indiscriminate use of homemade preparations of plants can be dangerous to health.

**5.5. Antioxidant Activity.** Ethanolic extracts of leaves of *I. suffruticosa* stand out with potent antioxidant activity in an experimental model in vitro with the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH), and this method is a rapid way to measure the antioxidant capacity of compounds, it is based on the reduction of DPPH in solution, and this action is attributed to the presence of high concentrations of gallic acid in the extract [30]. Plants contain several phytochemicals, such as phenolic compounds, which have promising antioxidant activity, mainly in the prevention of chronic diseases.

**5.6. Hepatoprotective Activity.** The aqueous extract of *I. suffruticosa* (50 mg/kg, ip) showed the protective effect on

liver tissue of mice bearing sarcoma 180 [36]. Lima et al. [37], using the purified indigo compound from the leaves of *I. suffruticosa*, did not observe a reduction in sarcoma 180 tumor but found that liver cells remained preserved, emphasizing its hepatoprotective effect.

Lima et al. [37] investigated the antitumor action of *indica*, a compound extracted from the leaves of *I. suffruticosa*, on mice bearing sarcoma 180 cell lines and found that such a compound did not promote a reduction in tumor growth; however, it is found that treatment with *indica* does not allow to alter the architecture of the liver cells, suggesting a hepatoprotective effect.

Such an effect is considered of extreme importance since liver diseases have become a global public health problem, and much of them are a consequence of the prolonged use of chemicals and drugs.

**5.7. Antimicrobial Activity.** Santos et al. [38] evaluated the antimicrobial activity of ether, chloroform, and acetone extracts of *I. suffruticosa* against nine strains of *Staphylococcus aureus*, with minimal inhibitory concentration (MIC) ranging from 0.78 to 6.25 mg/ml. The methanol extract of the aerial parts of *I. suffruticosa* showed a significant effect against *Mycobacterium tuberculosis* with an MIC of 125 µg/mL, suggesting the presence of an important bactericidal agent [32].

The endophytic fungi isolated from *I. suffruticosa* also showed activity against different bacteria such as *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *P. aeruginosa*, with an MIC ranging from 0.39 to 6.25 mg/ml, emphasizing that this species has a potential to inhibit bacterial growth [39].

The aqueous extract of the leaves of *I. suffruticosa* displays significant results against two strains of *Trichophyton rubrum* and *Microsporium canis*, with concentrations of 5 and 10 mg/ml with variation in MIC between 20 and 15 mm, with a similar effect to the standard drug ketoconazole (MIC –20 mm) [11].

The results obtained in these studies suggest that the extracts used had bioactive compounds responsible for the efficacy of the organic material studied. Not only the plant extracts but also those produced by microorganisms can be a source for the industrial manufacture of drugs and useful in the therapy of some microbial infections.

**5.8. Anticonvulsant Activity.** The *I. suffruticosa* fluid extract (0.06 g/kg for 10 days) in experimental models of shock promotes protective effect in both doses administered orally or intraperitoneally on seizures induced by this model, highlighting the antiepileptic potential of such an extract [40].

At the concentration of 0.06 g/kg, the fluid extract of *I. suffruticosa* was tested in models of chronic epilepsy, which reduced the concentration of inhibitory amino acids (glycine and tannin) and increased the excitatory amino acid (glutamic acid) [41].

In models of seizures, the methanol extract of the leaves of *I. suffruticosa* showed significant activities, and its action is due to the presence of secondary metabolites such as

flavonoids and linalool having an action on the GABAergic system [42].

The anticonvulsant effect of the aqueous extract of *I. suffruticosa* was confirmed following behavior and electrophysiological analyses in rats. The systematic analysis of seizure behavior and its potentials was also recorded [36].

The findings of these studies stimulate the continuity of research in the search for new treatments for epilepsy. Although traditional therapy has good efficacy, it has high toxicity, and about 20–30% of patients who use this therapy are unable to control their seizures appropriately and have severe side effects. Therefore, new alternatives that reduce clinical manifestations and chronic conditions become essential.

**5.9. Gastroprotective Activity.** Luiz-Ferreira et al. [43] explored the gastroprotective effect of chloroform and methanolic extracts of the aerial parts of *I. suffruticosa*, partitioned with ethyl acetate and administered at a dose of 100 mg/kg, which significantly inhibited the gastric mucosal lesions induced by ethanol and nonsteroidal drugs in rats.

In traditional medicine, several plants are used in the treatment of gastric disorders, and from the evidence presented here, it could be stated that extracts obtained from the aerial parts of *I. suffruticosa* are interesting sources for the development of a phytotherapeutic formulation to treat gastric ulcer.

**5.10. Immunostimulatory Activities.** Carli et al. [32] investigated the effect of the ethanol extracts of *I. suffruticosa* on immune activity *in vitro* and observed that the extract triggered a high nitric oxide production and stimulated the synthesis and release of TNF- $\alpha$ , thus triggering the activation of macrophages and promoting the production of other molecules that improve or restore the responsiveness of the innate immune system reaction against infections.

In another study, using a purified compound of *I. suffruticosa*, the indigo, also in experimental models *in vitro*, showed an increase in the production and release of nitric oxide and TNF- $\alpha$  [31].

The immune system is of fundamental importance to every living being, and its malfunction can cause various biological damages. Drugs that stimulate the production and action of the components of this system are of great biological relevance, primarily in immunodeficient individuals who are more susceptible to infections. In this way, the good results obtained for this species favor even more effective use in several diseases.

**5.11. Anti-Inflammatory Activity.** Aqueous extracts of *I. suffruticosa* (250 mg/kg) in inflammation experimental models of mice showed significant anti-inflammatory effect, with similar action to the commercial standard drug, acetyl salicylic acid [9].

In another study, aqueous and ethanolic extracts of leaves of *I. suffruticosa* were used in experimental models of inflammation induced by lipopolysaccharides (LPS) in

macrophages, and it was possible to observe a significant anti-inflammatory effect [29].

The prolonged use of anti-inflammatories promotes several biological damages and the search for new drug therapies that reversibly abuse the harmful effect, and the low cost is still incessant. The studies already published show that *I. suffruticosa* is a strong candidate to be applied in this activity.

**5.12. Gynecological Problems/Issues.** Yazbek et al. [44] reported that, in Brazilian folk medicine, leaves and root of *I. suffruticosa* have been commonly used to prepare tea for inflammatory diseases of the gynecological tract, mainly organs such as ovaries and/or uterus.

In many places, the main therapeutic resource for the treatment of discomforts and diseases of gynecological origin is still commonly represented by medicinal plants. However, few studies, such as [44], show the promising effect that may resonate on new beneficial therapeutic approaches and on strengthening the practice of women's periodic care.

## 6. Toxicity

Studies using aqueous extracts obtained by infusing leaves of *I. suffruticosa* in acute toxicity in mice demonstrated the presence of deaths in the tested groups. Some signs of toxicity were noted after a few hours of intraperitoneal administration from a lower concentration to a higher concentration tested dose (2400 mg·kg<sup>-1</sup>): agitation, piloerection, exhaustion, sleepiness, irritability, and spasms. Also, it was found that the LD50 of the acute toxicity of the aqueous extract of leaves of *I. suffruticosa* made by infusion administered in different doses in mice showed no mortality during 72 h of observation [33].

The methanol extract of leaves of *I. suffruticosa* showed a low toxicity with an LD50 of 1600 mg/kg (ip) in mice. The results exhibit a lower significant change in individual behavioral and parameters that slight decrease in spontaneous locomotor activity and an increase in breathing frequency [42].

## 7. Conclusions

Plants since ancient times have been used as medicine and have been daily providing inspiration for new research, aiming to highlight the diverse potential and expand the library of biologically active molecules.

In recent years, *I. suffruticosa* has attracted the attention of many researchers because of its high therapeutic value in the population. Different extracts of this species have presented significant results in several pharmacological activities, such as antitumor, antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, antiepileptic, antifungal, anticonvulsant, gastroprotective, and hepatoprotective.

These studies were tested *in vivo* in laboratory animals, and the results presented are not enough for humans to use. Based on the low toxicity presented by the statement and little research of their phytochemicals, new clinical trials

should be conducted to fill the gaps in research to establish baseline data for medicinal use, eliminating potential harmful risks and promoting beneficial effects.

## Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

This research was funded by FACEPE.

## References

- [1] D. M. T. Oliveira and E. A. S. Paiva, "Pterodon emarginatus (Fabaceae: Faboideae) seed," *Brazilian Journal of Biology*, vol. 65, no. 3, pp. 483–494, 2005.
- [2] V. F. Dutra, M. C. T. B. Messias, and F. C. P. Garcia, "Papilionoideae (Leguminosae) dos campos ferruginosos do Parque Estadual do Itacolomi, MG, Brasil: florística e fenologia," *Revista Brasileira de Botânica*, vol. 28, pp. 493–504, 2005.
- [3] P. S. M. Ferreira, D. M. D. B. M. Trovão, and J. I. M. D. Melo, "Leguminosae at APA do Cariri, Paraíba State, Brazil," *Hoehnea*, vol. 42, no. 3, pp. 531–547, 2015.
- [4] I. M. Ribeiro, M. A. Silva, and J. H. A. R. Rangel, *Levantamento Botânico de Leguminosas Forrageiras Nativas da Bacia Leiteira do Estado de Alagoas*, EPEAL, Maceió, 1984.
- [5] P. J. Sherman, *Tropical Forage Legumes*, Food Agricultural Organization, Rome, Italy, 1982.
- [6] B. Froman, *Na Illustrateg Guide to the Pasture Legumes of Ethiopia*, Rural Development Studies n° 3. Rural Development Section and Departamento f Plant Husbandary, College of Agriculture, Uppsala, Sweden, 1975.
- [7] F. Pesavento, "O azul fluminense: um estudo sobre o comércio do anil no Rio de Janeiro Colonial," *Revista Econômica*, vol. 7, no. 2, pp. 207–231, 2005.
- [8] J. R. C. Vieira, I. A. Souza, S. C. Nascimento, and S. P. Leite, "Indigofera suffruticosa: an alternative anticancer therapy," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 4, no. 3, pp. 355–359, 2007.
- [9] S. P. Leite, L. L. S. Silva, M. T. J. A. Catanho, E. O. Lima, and V. L. M. Lima, "Atividade anti-inflamatória do extrato de Indigofera suffruticosa," *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, vol. 7, no. 1, pp. 47–52, 2003.
- [10] S. P. Leite, P. L. Medeiros, E. C. Silva, M. B. S. Maia, V. L. M. Lima, and D. E. Sauld, "Embryotoxicity *in vitro* with extract of Indigofera suffruticosa leaves," *Reproductive Toxicology*, vol. 18, no. 5, pp. 701–705, 2004.
- [11] S. P. Leite, J. R. C. Vieira, P. L. Medeiros et al., "Antimicrobial activity of Indigofera suffruticosa," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 3, no. 2, pp. 261–265, 2006.
- [12] T. Roig and J. T. Mesa, *Plantas Medicinales Aromáticas y Venenosas de Cuba*, Editorial Ciencia y Técnica Instituto del Libro, La Habana Cuba, 1974.
- [13] R. Braga, *Plantas do Nordeste Especialmente do Ceara*, Escola Superior de Agricultura, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil, 3rd edition, 1976.
- [14] E. R. Almeida, *Plantas Mediciniais Brasileiras: Conhecimentos Populares e Científicos*, Hermus Editora Ltda, São Paulo, Brazil, 1993.



- [15] J. L. A. Moreira and A. M. G. Azevedo-Tozzi, "Indigofera L. (Leguminosae, Papilionoideae) no estado de São Paulo, Brasil," *Revista Brasileira de Botânica*, vol. 20, no. 1, pp. 97–117, 1997.
- [16] S. T. S. Mioto and J. R. V. Iganci, *Indigofera* in: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 2015, <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/floradobrasil/FB22979>.
- [17] A. Fernandes, *Noções de Toxicologia e Plantas Tóxicas*, BNB, Fortaleza, Brazil, 2nd edition, 1987.
- [18] F. Riet-Correa, *Comunicação Pessoal*, Lab Diagnóstico, UFPel, Pelotas, Brazil, 2000.
- [19] J. D. B. Neto, C. M. C. Oliveira, I. B. P. Barbosa, P. V. Peixoto, S. C. Ávila, and C. H. Tokarnia, "Anemia hemolítica causada por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoideae) em bovinos," *Pesquisa Veterinária Brasileira*, vol. 21, no. 1, pp. 18–22, 2001.
- [20] F. J. A. Matos, *Plantas da Medicina Popular do Nordeste: Propriedades Atribuídas e Confirmadas*, Editora UFC, Fortaleza, Brazil, 1999.
- [21] R. B. Hastings, "Medicinal legumes of Mexico: Fabaceae, papilionoideae, part one," *Economic Botany*, vol. 44, pp. 336–348, 1990.
- [22] NAPRALERT, *Natural Products Alert*, Illinois University, Chicago, IL, USA, 2015, <http://www.uic.edu/pharmacy/depts/pcrps/napralert.html>.
- [23] M. A. S. Paiva, A. C. D. Barbosa, and H. L. J. Alves, "*Indigofera suffruticosa* Mill. (Leguminosae) com potencial forrageiro em uma região de Caatinga no Semi-árido de Pernambuco. (Alagoinha)," in *Proceedings of the XXXVIII Congresso Nacional de Botânica*, p. 422, Sociedade Nacional de Botânica, São Paulo, Brazil, 1987.
- [24] F. R. Garcez, S. Scramin, M. C. Nascimento, and W. B. Mors, "Prenylated flavonoids as evolutionary indicators in the genus *Dahlstedtia*," *Phytochemistry*, vol. 27, no. 4, pp. 1079–1083, 1988.
- [25] W. S. Garcez, F. R. Garcez, N. K. Honda, and A. J. R. Silva, "A nitropropanoyl-glucopyranoside from *Indigofera suffruticosa*," *Phytochemistry*, vol. 28, no. 4, pp. 1251–1252, 1989.
- [26] R. Kamal and M. Mangla, "In vivo, in vitro, Investigation on rotenoids from *Indigofera suffruticosa* and their bioefficacy against the larvae of *Anopheles stephensi* and adults of *Callosobruchus chinensis*," *Journal of Biosciences*, vol. 18, no. 1, pp. 93–110, 1993.
- [27] T. R. Calvo, "Uso sustentável de biodiversidade brasileira-prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Alchornea glandulosa*, *Alchorneatriplinervia* (Euphorbiaceae), *Indigofera truxillensis* e *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae)," Doctoral thesis, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brazil, 2007.
- [28] E. D. Vijisara and S. Arumugam, "GC-MS analysis of bioactive constituents of *Indigofera suffruticosa* leaves," *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 6, no. 8, pp. 294–300, 2014.
- [29] T. Y. Chen, H. L. Sun, H. T. Yao et al., "Suppressive effects of *Indigofera suffruticosa* Mill. extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine RAW 264.7 macrophages," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 55, pp. 257–264, 2013.
- [30] A. M. C. Arriaga, T. L. G. Lemos, G. M. P. Santiago et al., "Chemical composition and antioxidant activity of *Indigofera suffruticosa*," *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 49, no. 1, pp. 150–151, 2013.
- [31] F. C. M. Lopes, T. R. Calvo, L. L. Colombo, W. Vilegas, and I. Z. Carlos, "Immunostimulatory and cytotoxic activities of *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae)," *Natural Product Research*, vol. 25, no. 19, pp. 1796–1806, 2011.
- [32] C. B. A. Carli, M. B. Quilles, D. C. G. Maia et al., "Antimycobacterial activity of *Indigofera suffruticosa* with activation potential of the innate immune system," *Pharmaceutical Biology*, vol. 48, no. 8, pp. 878–882, 2010.
- [33] J. R. C. Vieira, R. M. P. Leite, I. R. Lima, D. A. F. Navarro, E. M. Bianco, and S. P. Leite, "Oviposition and embryotoxicity of *Indigofera suffruticosa* on early development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, Article ID 741638, 5 pages, 2012.
- [34] C. T. García, G. M. E. Rodríguez, W. M. C. Pinera, M. M. A. Martínez, S. Y. Santana, and C. N. Hernández, "Effective treatment of a patient infested with *pedicular capitis* by using 5% *Indigofera suffruticosa* Mill. tincture," *Revista Cubana de Medicina Tropical*, vol. 63, no. 3, pp. 275–277, 2011.
- [35] T. R. Calvo, R. P. C. Cardoso, A. C. S. Moura et al., "Mutagenic activity of *Indigofera truxillensis* and *I. suffruticosa* aerial parts," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2011, Article ID 323276, 9 pages, 2011.
- [36] I. B. Silva, I. R. Lima, M. A. N. Santana, R. M. P. Leite, and S. P. Leite, "*Indigofera suffruticosa* Mill. (Fabaceae): hepatic responses in mice bearing sarcoma 180," *International Journal of Morphology*, vol. 32, no. 4, pp. 1228–1233, 2014.
- [37] I. R. Lima, J. R. C. Vieira, I. B. Silva, R. M. P. Leite, M. B. Maia, and S. P. Leite, "Indican from *Añil* (*Indigofera suffruticosa* Miller) as an herbal protective agent to the liver," *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, vol. 36, no. 1, pp. 41–45, 2014.
- [38] A. T. B. Santos, T. F. S. Araújo, L. C. N. Silva et al., "Organic extracts from *Indigofera suffruticosa* leaves have antimicrobial and synergic actions with Erythromycin against *Staphylococcus aureus*," *Frontiers in Microbiology*, vol. 6, p. 13, 2015.
- [39] I. P. Santos, J. D. P. Bezerra, C. M. Sousa-Mota, M. S. Cavalcanti, and V. L. M. Lima, "Endophytic mycobiota from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae): the relationship between seasonal change in Atlantic Coastal Forest and tropical dry forest (Caatinga), Brazil," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 9, no. 18, pp. 1227–1235, 2015.
- [40] J. L. P. Alejo, R. Miranda, and G. Rodríguez, "Actividad anticonvulsivante (antiepileptica) de extracto fluido de *Indigofera suffruticosa* (Añil/Cimarrón)," *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 1, no. 2, pp. 7–10, 1996.
- [41] M. B. Wong, N. S. Rodríguez, J. L. P. Alejo, and M. F. Pérez, "Actividad de la *Indigofera suffruticosa* millen la epilepsia crónica experimental y su relación con aminoácidos neurotransmisores," *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 1, no. 4, pp. 18–21, 1999.
- [42] E. R. Almeida, M. T. Chaves, R. L. A. Luna et al., "Anticonvulsant effect of *Indigofera suffruticosa* Mill.: indication of involvement of the GABAergic system," *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 7, no. 11, pp. 622–628, 2013.
- [43] A. Luiz-Ferreira, M. Cola, V. Barbastefano et al., "*Indigofera suffruticosa* Mill. as new source of healing agent: involvement of prostaglandin and mucus and heat shock proteins," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 137, no. 1, pp. 192–198, 2011.
- [44] P. B. Yazbek, J. Tezoto, F. Cassas, and E. Rodrigues, "Plants used during maternity, menstrual cycle and other women's health conditions among Brazilian cultures," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 179, pp. 310–331, 2016.

# ANEXO A - INSTRUÇÃO PARA OS AUTORES DA REVISTA ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH

26/06/2019

Environmental Science and Pollution Research - Incl. option to publish open access

Environmental Sciences | Environmental Science and Pollution Research - Incl. option to publish open access



www.springer.com

Environmental Sciences Home > Environmental Sciences

We're working on a new version of this journal site - [preview it now](#)

SUBDISCIPLINES JOURNALS BOOKS SERIES TEXTBOOKS



## Environmental Science and Pollution Research

Editor-in-Chief: Philippe Garrigues

ISSN: 0944-1344 (print version)

ISSN: 1614-7499 (electronic version)

Journal no. 11356



**80,33 €** Personal Rate e-only

[Get Subscription](#)

Online subscription, valid from January through December of current calendar year

Immediate access to this year's Issues via SpringerLink

1 Volume(-s) with 36 Issue(-s) per annual subscription

Automatic annual renewal

More information: >> [FAQs](#) // >> [Policy](#)

[MEET THE EDITORS](#) [ABOUT THIS JOURNAL](#) [EDITORIAL BOARD](#) [EUCHEMS DCE](#)  
[INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)

[MORE](#)

## Instructions for Authors

### Types of Papers

Peer-reviewed contributions:

- Research Articles (full papers)
- Short Original Communications and Discussion Articles
- Review Articles
- Research Communications

Please ensure that the length of your paper is in harmony with your research area and with the science presented.

All papers – excluding Editorials, Letters to the Editor, Conference Reports – are subject to peer-review by a minimum of two and a maximum of three experts.

While submitting your paper you will be asked for three potential reviewers. Indicating three reviewers is mandatory.

To authors from non-English language countries:

26/05/2019

Environmental Science and Pollution Research - Incl. option to publish open access

To have the best possible pre-requisition for the review process, please ask a native speaker to check the quality of the English, before you submit the complete paper.

#### MANUSCRIPT SUBMISSION

##### Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the Institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

##### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

##### Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

#### TITLE PAGE

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
  - Please avoid acronyms in the title of your article
  - For local studies, please indicate the name of the region and country in the title.
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

##### Abstract

Please provide an abstract of about 10 to 15 lines.

##### Keywords

Please provide 6 to 8 keywords which can be used for indexing purposes.

#### TEXT

##### Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.

26/06/2019

Environmental Science and Pollution Research - Incl. option to publish open access

- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 183 kB)

### Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

### Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

### Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

### REFERENCES

#### Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

#### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

#### ▫ Journal article

- Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

- Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325-329

26/06/2019

Environmental Science and Pollution Research - Incl. option to publish open access

- ▣ Article by DOI
  - Sitika MK, Whitton JL (2000) Clinical Implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* <https://doi.org/10.1007/s001090000086>
- ▣ Book
  - South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics.* Blackwell, London
- ▣ Book chapter
  - Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics, 3rd edn.* Wiley, New York, pp 230-257
- ▣ Online document
  - Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- ▣ Dissertation
  - Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure.* Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of In-text citations and reference list.

#### Specific Remarks

Online documents:

wikipedia documents are not acceptable as references.

Language

References should be in English with an appropriate title in English. If it's in a different language the language should be indicated

Zhu J, Wu F-C, Deng Q-J, Shao S-X, Mo C-L, Pan X-L, Li W, Zhang R-Y (2009) Environmental characteristics of water near the Xikuangshan antimony mine. *Acta Scientiae Circumstantiae* 29:655-661 (in Chinese)

#### TABLES

- ▣ All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- ▣ Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- ▣ For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- ▣ Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- ▣ Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

#### ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

##### Electronic Figure Submission

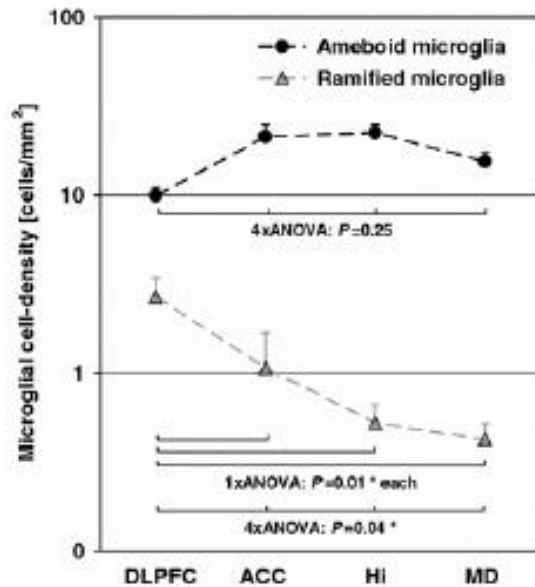
- ▣ Supply all figures electronically.
- ▣ Indicate what graphics program was used to create the artwork.

26/06/2019

Environmental Science and Pollution Research - Incl. option to publish open access

- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

#### Line Art



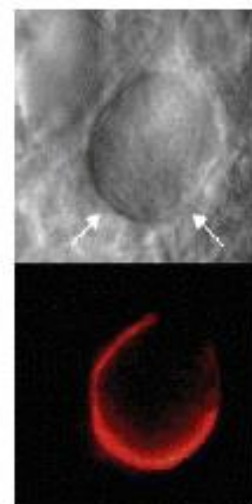
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

#### Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

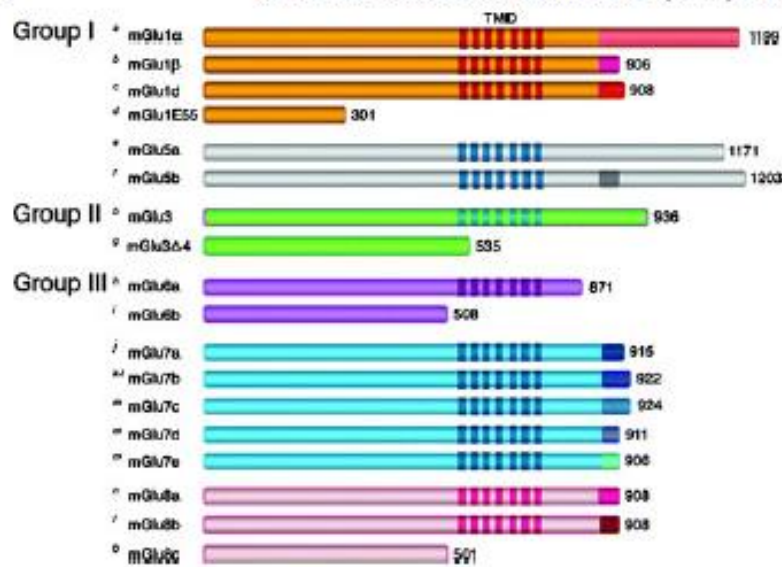
Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



#### Combination Art

26/06/2019

Environmental Science and Pollution Research - Incl. option to publish open access



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

#### Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

#### Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

#### Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

#### Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

#### Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.

For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

#### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

#### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

#### Please note:

Color art is free of charge for online and print publication.

#### ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

#### Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.



25/06/2019

Environmental Science and Pollution Research - Incl. option to publish open access

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

#### Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3  
 Maximum file size: 25 GB  
 Minimum video duration: 1 sec  
 Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

#### Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.  
 A collection of figures may also be combined in a PDF file.

#### Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

#### Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

#### Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

#### Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.  
 Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".  
 Name the files consecutively, e.g. "ESM\_3.mpg", "ESM\_4.pdf".

#### Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

#### Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

#### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material  
 Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

#### ENGLISH LANGUAGE EDITING

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

[https://www.springer.com/environment/journal/11356?detailsPage=pltc\\_1060392](https://www.springer.com/environment/journal/11356?detailsPage=pltc_1060392)

8/18

25/05/2019

Environmental Science and Pollution Research - incl. option to publish open access

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.  
 Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.  
 Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review.  
 Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

English language tutorial  
 Nature Research Editing Service  
 American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

。 。

为便于编辑和评审专家准确评估您稿件中陈述的研究工作，您需要确保您的英语语言质量足以令人理解，如果您需要英文写作方面的帮助，您可以考虑：

- 请一位以英语为母语的同事审核您的稿件是否表意清晰。
- 查看一些有关英语写作中常见语言错误的教程。
- 使用专业语言编辑服务，编辑人员会对英语进行润色，以确保您的意思表达清晰，并识别需要您复核的问题，我们的附属机构 **Nature Research Editing Service** 和合作伙伴 **American Journal Experts** 即可提供此类服务。

教程  
 Nature Research Editing Service  
 American Journal Experts

请注意，使用语言编辑服务并非在期刊上发表文章的必要条件，同时也并不意味或保证文章将被选中进行同行评议或被接受。

如果您的稿件被接受，在发表之前，我们的文字编辑会检查您的文稿拼写是否规范以及文体是否正式。

。 。

エディターと査読者があなたの論文を正しく評価するには、使用されている英語の質が十分に高いことが必要とされます。英語での論文執筆に際してサポートが必要な場合には、次のオプションがあります：

- 英語を母国語とする同僚に、原稿で使用されている英語が明確であるかを確認してもらる。
- 英語で執筆する際によくある間違いに関する英語のチュートリアルを参照する。
- プロの英文校正サービスを利用する。校正者が原稿の意味を明確にしたり、問題点を指摘し、英語の質を向上させます。**Nature Research Editing Service** と **American Journal Experts** の2つは弊社と提携しているサービスです。Springer の言者は、いずれのサービスも初めて利用する際には10%の割引を受けることができます。以下のリンクを参照ください。

英語のチュートリアル  
 Nature Research Editing Service  
 American Journal Experts

[https://www.springer.com/environment/journal/11356?detailsPage=pitci\\_1060392](https://www.springer.com/environment/journal/11356?detailsPage=pitci_1060392)

9/18

英文校正サービスの利用は、投稿先のジャーナルに掲載されるための条件ではないこと、また論文審査や受理を保証するものではないことに留意してください。

原稿が受理されると、出版前に弊社のコピーエディターがスペルと体裁のチェックを行います。

.

영어 원고의 경우, 에디터 및 리뷰어들이 귀하의 원고에 실린 결과물을 정확하게 평가할 수 있도록, 그들이 충분히 이해할 수 있을 만한 수준으로 작성되어야 합니다. 만약 영작문과 관련하여 도움을 받기를 원하신다면 다음의 사항들을 고려하여 주십시오:

- 귀하의 원고의 표현을 명확히 해줄 영어 원어민 동료들 찾아서 리뷰를 의뢰합니다.
- 영어 튜토리얼 페이지에 방문하여 영어로 글을 쓸 때 자주하는 실수들을 확인합니다.
- 리뷰에 대비하여, 원고의 의미를 명확하게 해주고 리뷰에서 요구하는 문제점들을 식별해서 영문 수준을 향상시켜주는 전문 영문 교정 서비스를 이용합니다. Nature Research Editing Service와 American Journal Experts에서 저희와 협약을 통해 서비스를 제공하고 있습니다. Springer 저자들이 쓴 교정 서비스를 첫 논문 투고를 위해 사용하시는 경우 10%의 할인이 적용되며, 아래의 링크를 통하여 확인이 가능합니다.

영어 튜토리얼 페이지

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

영문 교정 서비스는 게재를 위한 요구사항은 아니며, 해당 서비스의 이용이 피어 리뷰에 논문이 선택되거나 게재가 수락되는 것을 의미하거나 보장하지 않습니다.

원고가 수락될 경우, 출판 전 저회측 편집자에 의해 원고의 철자 및 문체를 검수하는 과정을 거치게 됩니다.

#### ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include\*:

- \* The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- \* The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').
- \* A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').
- \* Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.
- \* Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.
- \* No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes

26/06/2019

Environmental Science and Pollution Research - Incl. option to publish open access

material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

**Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.**

Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/web surveys and scales in their studies (if appropriate). Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person. Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others). Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

\*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:

- an erratum/correction may be placed with the article
- an expression of concern may be placed with the article
- or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author's institution may be informed

A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

#### **Fundamental errors**

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

#### **Suggesting / excluding reviewers**

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

#### AUTHORSHIP PRINCIPLES

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

#### Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines\*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

\* Based on/adapted from:

ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,  
Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt et al, PNAS February 27, 2018

#### Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

#### Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations. Please check the instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions.

#### Role of the Corresponding Author

26/06/2019

Environmental Science and Pollution Research - Incl. option to publish open access

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

- ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;
- managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;\*
- providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;
- making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

\* The requirement of managing all communication between the Journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

#### Author contributions

Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions regarding contribution statements.

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the end of the submission.

Examples of such statement(s) are shown below:

• Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

• Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name], ...; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For review articles where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the student's dissertation or thesis, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006

#### Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

#### Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

**Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!**

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that Journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

#### Author identification

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

#### Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

#### Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

#### Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

#### COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest  
 Research involving Human Participants and/or Animals  
 Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-

26/05/2019

Environmental Science and Pollution Research - Incl. option to publish open access

mentioned guidelines.

#### DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

**Funding:** This study was funded by X (grant number X).

**Conflict of Interest:** Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

#### RESEARCH DATA POLICY

The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature's list of repositories and research data policy.



26/06/2019

Environmental Science and Pollution Research - Incl. option to publish open access

List of Repositories

Research Data Policy

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may also be used.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), Identifier.

DataCite

Springer Nature provides a research data policy support service for authors and editors, which can be contacted at [researchdata@springernature.com](mailto:researchdata@springernature.com).

This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.

Helpdesk

#### AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

#### Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

#### Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

#### Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

#### Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

#### Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

#### OPEN CHOICE

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature Journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – [view the full list](#)

26/06/2019

Environmental Science and Pollution Research - Incl. option to publish open access

**Benefits:**

Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an Internet connection, immediately on publication.

Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average\*.

Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

\*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid Journal OA Impact analysis, 2018.

[Open Choice](#)

[Funding and Support pages](#)

**Copyright and license term – CC BY**

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

[Find more about the license agreement](#)

**READ THIS JOURNAL ON SPRINGERLINK**

[Online First Articles](#)

[All Volumes & Issues](#)

[Special Issues](#)

[Top Cited Articles Published in 2015](#)

**FOR AUTHORS AND EDITORS**

2018 Impact Factor

**2.914**

[Aims and Scope](#)

[Submit Online](#)

[Open Choice - Your Way to Open Access](#)

[Instructions for Authors](#)

[Ethics & Disclosures](#)

**SERVICES FOR THE JOURNAL**

[Contacts](#)

[Download Product Flyer](#)

[Shipping Dates](#)

25/06/2019

Environmental Science and Pollution Research - Incl. option to publish open access

[Order Back Issues](#)[Bulk Orders](#)[Article Reprints](#)**ALERTS FOR THIS JOURNAL**

Get the table of contents of every new issue published in Environmental Science and Pollution Research.

[LOGIN](#)

Please send me information on new Springer publications in Environment (general).

**ADDITIONAL INFORMATION**[ICCE 2019 \(pdf, 158 kB\)](#)[ISPAC 2019 \(pdf, 264 kB\)](#)[NCEC 2019 \(jpg, 6.3 MB\)](#)**RELATED BOOKS - SERIES - JOURNALS**

Journal

**Environmental  
Sciences Europe**Editor» Editor-in-Chief: Henner  
Hollert[BACK](#)   [NEXT](#)

1/10