

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATO E LECTINA DE
SEMENTES DE *Moringa oleifera* (WSMoL) SOBRE LARVAS DE *Danio*
rerio (PEIXE PAULISTINHA)**

LIVIA LAIS DE SANTANA SILVA

**RECIFE
2016**

LIVIA LAIS DE SANTANA SILVA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATO E LECTINA DE
SEMENTES DE *Moringa oleifera* (WSMoL) SOBRE LARVAS DE *Danio
rerio* (PEIXE PAULISTINHA)**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de Pernambuco

Orientadora:

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador:

Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho

**RECIFE
2016**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Livia Laís de Santana

Avaliação da toxicidade de extrato e lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WsMoL) sobre larvas de *Danio rerio* (peixe paulistinha). / Livia Laís de Santana Silva- Recife: O Autor, 2016.

57 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador: Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referências

1. Lectinas 2. Testes de toxicidade 3. *Moringa oleifera* I. Paiva, Patrícia Maria Guedes (orient.) II. Carvalho, Paulo Sérgio Martins de (coorient.) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017- 410

LIVIA LAIS DE SANTANA SILVA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATO E LECTINA DE
SEMENTES DE *Moringa oleifera* (WSMoL) SOBRE LARVAS DE *Danio
rerio* (PEIXE PAULISTINHA)**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de Pernambuco

Banca Examinadora:

Profª. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Titular Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Titular Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral (Titular Externo)
Universidade Federal da Paraíba

APROVADA EM: 29 / 02 /2016

Dedico este trabalho a Deus, porque sei que sempre esteve comigo em momentos de dificuldades e à minha família pelo constante apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por não me desamparar nos momentos que mais preciso, me dando força e perseverança para atingir meus objetivos, me guiando sempre pelo melhor caminho e me proporcionando grandes vitórias.

Aos meus pais, Carlos e Rosângela, que sempre priorizaram meus estudos, e se esforçam até hoje para proporcionar a mim e ao meu irmão as melhores coisas possíveis, muitas vezes renunciando de suas próprias vontades para realizar nossos sonhos. Esse apoio foi incomparável e fundamental para o meu crescimento. Amo vocês!!

Ao meu querido irmão, Lucas, que apesar da diferença de idade, inconscientemente me ajudou muito para que eu chegasse aqui hoje, pois sempre quis ser uma referência pra ele e por isso me esforcei para fazer tudo da melhor forma para que ele pudesse se espelhar em mim de alguma maneira. Além disso, a sua alegria contagiante que deixa qualquer ambiente mais agradável, me ajudou bastante a passar por vários momentos de angústia. Te amo, coisinha da minha vida!

Ao meu namorado, mais um Lucas que foi colocado por Deus na minha vida, e não foi em vão. Sempre me incentivando na hora dos estudos e me dando forças nos momentos de estresse que pensei desistir de tudo. Foi uma pessoa muito importante nessa trajetória e só tenho a agradecer e dizer que amo muito você, amor!

À professora Patrícia Paiva, minha orientadora, por ter me acolhido desde o primeiro ano de graduação, confiando e acreditando em mim para realização de muitos trabalhos. Muito obrigada pela orientação,

pela dedicação, pela alegria e pelo entusiasmo contagiante que a diferencia de muitos. Sou extremamente grata!

Ao professor Paulo Carvalho que me recebeu muito bem em seu laboratório e esteve sempre disposto a me ajudar nos experimentos, além de não medir esforços na hora de sentar e tirar minhas dúvidas, nem que fosse preciso 1 ou 2 horas na frente do computador me explicando passo a passo do procedimento a ser realizado. Só tenho a agradecer ao senhor pela confiança nessa parceria.

A minha querida amiga, Ana Patrícia, que veio diretamente de Lajedo para nos prestigiar fazendo parte do laboratório. Sempre me dando força e uma injeção de ânimo em cada momento que me desesperava pensando que não ia conseguir realizar o que me foi sugerido, além de sempre me ajudar em tudo que precisei e nunca ter me negado nada. É um exemplo de força de vontade e dedicação, pode contar sempre comigo, muito obrigada minha eterna “co-có” linda!

Ao professor Thiago Henrique, que sempre esteve presente nos meus quatro anos de graduação e agora mais dois anos do mestrado. Mais que um professor, é um amigo que nunca mediu esforços para me ajudar. Uma pessoa humilde alegre, descontraída e que sempre “tem um jeitinho” pra tudo, além de ter um coração enorme, enfim, uma pessoa admirável. Muito obrigada, professor! Um dia eu quero ser igual ao senhor.

A todo pessoal do laboratório de Ecotoxicologia : Laura, Rômulo, Driele, Juliana, Luiz, Gaby, Lícia, Adélia e Aline que me ajudaram nas atividades e nos meus experimentos quando eu precisava.

Ao Laboratório de Ecologia Química, em especial à professora Daniela Navarro, pela disponibilidade e pela parceria com o nosso laboratório.

Aos grandes amigos que junto comigo fazem parte da “família Glicoproteínas” e fazem com que cada minuto de trabalho seja muito produtivo e divertido: Pollyanna, Dayvid, Léo, Thamara, Cláudio, Bob, Caio e Yasmim que sempre alegraram meus dias no laboratório.

A Wellington e Maciel que foram fundamentais nessa trajetória, me fazendo companhia todos os dias no laboratório me ajudando na maioria dos experimentos. Obrigada, meninos!!

E a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica.

Obrigada a todos!

Ensina-me o bom senso e o conhecimento,
pois confio em Teus mandamentos.

Sl.119:66

RESUMO

A WSMoL (do inglês *water-soluble Moringa oleifera lectin*) é uma lectina (proteína que reconhece carboidratos) proveniente das sementes da *Moringa oleifera*, as quais são utilizadas no tratamento de água. Algumas espécies de insetos podem atuar como vetores de doenças ou pragas agrícolas. O mosquito *Aedes aegypti* é o vetor da dengue e sabe-se que o extrato de sementes de *M. oleifera* e WSMoL são tóxicos para as larvas deste inseto. O extrato de sementes e WSMoL apresentaram uma concentração letal a 50% das larvas após 24 horas de exposição (CL₅₀) igual a 0,27 mg/mL e 0,197 mg/mL, respectivamente. Entretanto, para uma adequada utilização desse inseticida natural se faz necessário a realização de testes ecotoxicológicos a fim de avaliar os possíveis efeitos causados em organismos aquáticos não-alvo. Neste trabalho, foi avaliada a toxicidade de extrato de semente e WSMoL para larvas de *Danio rerio*, espécie de peixe muito utilizada na Ecotoxicologia devido à facilidade de observação de seu comportamento e desenvolvimento e serem sensíveis na fase larval. As larvas de *D. rerio* foram expostas a diferentes concentrações do extrato de sementes ou WSMoL por 168 horas (7 dias), tendo sido avaliados efeitos letais por meio da determinação da taxa de mortalidade. Além disso, efeitos sub-letais comportamentais e bioquímicos sobre a velocidade natatória das larvas e atividade da acetilcolinesterase, respectivamente, também foram avaliados. Foi observado um efeito dose dependente na taxa de mortalidade de *D. rerio* tanto para o extrato quanto para a lectina purificada. Após 24 horas, os valores de CL_{50/24h} foram 0,365 e 0,21 mg/mL para extrato e WSMoL, respectivamente. Esses resultados mostram que a susceptibilidade das larvas de *D. rerio* a WSMoL foi similar a das larvas de *A. aegypti* (6% de diferença nos valores de LC_{50/24h}) enquanto extrato é aproximadamente 34% mais potente para as larvas do mosquito. Após 96 horas, os valores de CL_{50/24h} para extrato e WSMoL foram 0,031 e 0,135 mg/mL, respectivamente. Com relação à velocidade natatória dos indivíduos expostos ao extrato, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) após incubação nas concentrações 0,03 e 0,27 mg/mL e uma diminuição para larvas incubadas com 0,81 mg/mL por esse mesmo período. Para incubação por 168 h, a velocidade foi maior que no grupo controle para os tratamentos a 0,27 e 0,81 mg/mL. Nos ensaios com WSMoL, a média da velocidade de natação de larvas expostas à lectina por 72 h foi significativamente ($p < 0,05$) menor que no controle nos tratamentos com 0,1 e 0,2 mg/mL. Para 168 h, a velocidade foi também menor que no controle no tratamento a 0,1 mg/mL enquanto para as concentrações de 0,02 e 0,05 mg/mL foi similar ($p > 0,05$) ao controle. Larvas expostas por 168 h ao extrato aquoso na concentração 0,81 mg/mL e a WSMoL na concentração de 0,1 mg/mL apresentaram uma redução significativa na atividade da acetilcolinesterase. Levando em consideração os resultados obtidos, esses inseticidas naturais devem ser usados cuidadosamente, uma vez que as concentrações necessárias para o controle de *A. aegypti* podem também causar efeitos tóxicos letais e sub-letais para organismos não-alvo como o peixe *D. rerio*. Recomenda-se o uso em recipientes de armazenamento de água, e não em ecossistemas aquáticos como lagoas e lagos.

Palavras-chaves: Ecotoxicidade. acetilcolinesterase. larvas. *Moringa oleifera*. *Danio rerio*.

ABSTRACT

Some insect species can act as vectors of diseases or as agricultural pests. The WSMoL (water soluble *Moringa oleifera* lectin) is a lectin (protein that recognizes carbohydrate) derived from the seeds of *Moringa oleifera*, which are used in water treatment. The mosquito *Aedes aegypti* is the vector of dengue and it is known that *M. oleifera* seed extract and WSMoL are toxic to larvae of this insect. The seed extract and WSMoL showed a lethal concentration to 50% of the larvae after 24 hours of exposure (LC_{50}) equal to 0.27 mg/mL and 0.197 mg/mL, respectively. However, for proper use of these natural insecticides, it is necessary to carry out ecotoxicological tests in order to assess the possible effects on non-target aquatic organisms. In this work, the toxicity of seed extract and WSMoL to zebrafish (*Danio rerio*) larvae was evaluated. *Danio rerio* is a fish species very used in Ecotoxicology due to the ease of observation of its behavior and development and for being sensitive in the larval stage. *D. rerio* larvae were exposed to different concentrations of the seed extract or WSMoL for 168 h (7 days) and the lethal effects were assessed by determining the mortality rate. Additionally, behavioral and biochemical sublethal effects on larval swimming velocity and acetylcholinesterase activity, respectively, were also evaluated. It was observed a dose dependence effect on *D. rerio* mortality rate for both the extract and the purified lectin. After 24 h, the values of $LC_{50/24h}$ were 0.365 and 0.21 mg/mL to extract and WSMoL, respectively. These results show that the *D. rerio* larvae susceptibility to the WSMoL was similar to *A. aegypti* larvae (6% difference in $LC_{50/24h}$ values) while extract was about 34% more potent against mosquito larvae. After 96 h, the values of $LC_{50/24h}$ for extract and WSMoL were 0.031 and 0.135 mg/mL, respectively. Concerning the swimming velocity of individuals exposed to the extract there was a significant increase ($p < 0.05$) after incubation for 72 h at 0.03 and 0.27 mg/mL and a decrease for larvae incubated at 0.81 mg/mL for this same period. For 168 h incubation, the velocity was higher than control group for treatments at 0.27 and 0.81 mg/mL. In tests with WSMoL, the average swimming velocity of larvae exposed to the lectin for 72 h was significantly ($p < 0.05$) lower than the control on treatments with 0.1 and 0.2 mg/mL. For 168 h, the velocity was also lower than the control on treatment with 0.1 mg/mL, and with concentrations of 0.02 and 0.05 mg/mL the values were similar ($p > 0.05$) to the control. Larvae exposed for 168 h to the aqueous extract at a concentration of 0.81 mg/mL and WSMoL at 0.1 mg/mL showed a significant reduction in the activity of acetylcholinesterase. Considering the results, these natural insecticides must be used carefully since the concentrations necessary for the control of *A. aegypti* also can cause lethal toxic effects and sub-lethal to non-target organisms such as *D. rerio* fish. It is not recommended to use these natural insecticides in aquatic ecosystems such as ponds and lakes, but in water storage containers.

Keywords: ecotoxicity. acetylcholinesterase. larvae. *Moringa oleifera*. *Danio rerio*.

Lista de Figuras

	Pág.
<u>Fundamentação teórica</u>	
Figura 1 Classificação estrutural de lectinas	18
Figura 2 Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos por lectina e aspecto da rede de aglutinação em placa de microtitulação.	19
Figura 3 Árvore de <i>Moringa oleífera</i>	21
Figura 4 <i>Danio rerio</i> adulto	27
Figura 5 Larva de <i>Danio rerio</i> 72 horas após fertilização.	28
<u>Artigo</u>	
Figure 1 Mortality of <i>D. rerio</i> larvae after exposition to <i>M. oleífera</i> seed extract (A) and purified WSMoL (B) during 7 days (168 h).	48
Figure 2 Swimming velocity estimated based on 30 min video recordings of larvae exposed to <i>M. oleífera</i> seed extract (A, B) or WSMoL (C, D) for 72 h (A, C) and 168 h (B, D).	50
Figure 3 AChE activity in larvae exposed to aqueous extracts or purified WSMoL for 168 h and to clean water (control), <i>M. oleífera</i> aqueous seed extract (A) and purified WSMoL (B).	52

Lista de Tabelas

Pág.

Artigo

Table 1 Lethal concentrations of *Moringa oleifera* seed extract and WSMoL required to kill 50% of *Danio rerio* larvae (LC_{50}) after 24 and 96 h of treatment. 47

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 Lectinas	17
2.2 <i>Moringa oleifera</i> Lam.	21
2.2.1 Atividade inseticida de WSMoL contra <i>Aedes aegypti</i>	24
2.3 Toxicidade aquática	25
2.4 <i>Danio rerio</i>	26
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 ARTIGO	38
Lethal and sublethal effects of aqueous extract and lectin from <i>Moringa oleifera</i> seeds to zebrafish (<i>Danio rerio</i>) larvae	
5 CONCLUSÃO	57

1 INTRODUÇÃO

Testes de toxicidade são úteis no entendimento dos efeitos de agentes químicos (por exemplo, pesticidas) sobre organismos não-alvo, bem como na avaliação de danos ambientais. Estudos toxicológicos utilizando animais aquáticos oferecem subsídios para pesquisadores, administradores e legisladores no momento de definir a segurança e as estratégias de uso de larvicidas e moluscicidas para controle de organismos aquáticos que são vetores de doenças (MACHADO, 1999).

Dentre as espécies indicadas para estes bioensaios, destacam-se alguns peixes de água doce e pequeno porte, como *Cheirodon notomelas* (piquirá), *Hemigrammus marginatus* (bandeirinha), *Hyphessobrycon callistus* (mato-grosso), *Poecilia reticulata* (guará ou lebistes) e *Danio rerio* (paulistinha) (BERTOLETTI, 2000). *D. rerio*, também conhecida como “peixe-zebra”, é amplamente utilizada graças à sua fácil manutenção em condições laboratoriais (MACHADO, 1999). Além disso, essa espécie tem como vantagens para uso em investigações de toxicidade a facilidade de realizar experimentos em grande escala para observação de alterações no desenvolvimento e comportamento, a facilidade de acesso a embriões fertilizados (uma vez que comportamento de desova é estritamente ligado ao fotoperíodo, ocorrendo no início da fase de luz) e a elevada sensibilidade das larvas (BERTOLETTI, 2000).

Moringa oleifera é uma planta pertencente à família Moringaceae, nativa da Índia e amplamente cultivada nos trópicos de todo o mundo (AMAGLO *et al.*, 2010). Nos países em desenvolvimento, as sementes de *M. oleifera* são amplamente utilizadas como coagulante natural para tratamento de água (SILVA *et al.*, 2010). As sementes contêm uma lectina solúvel em água (WSMoL, do inglês *water-soluble M. oleifera lectin*) que apresentou ação larvicida, ovicida e estimulante de oviposição sobre o mosquito *Aedes aegypti*, sendo

potencial candidata para utilização no controle da transmissão da dengue (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012). O extrato aquoso das sementes também apresentou ação larvicida e ovicida (MOURA, 2012). Contudo, estudos de ecotoxicidade são necessários para definir a segurança do uso do extrato e da lectina e indicar as situações em que esses agentes inseticidas possam ser utilizados sem prejuízo para organismos aquáticos não alvo presentes nos ecossistemas aquáticos. Nesse sentido, esse trabalho investigou os efeitos de extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* e WSMoL na sobrevivência, atividade natatória e na atividade da acetilcolinesterase de larvas de *D. rerio*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Lectinas

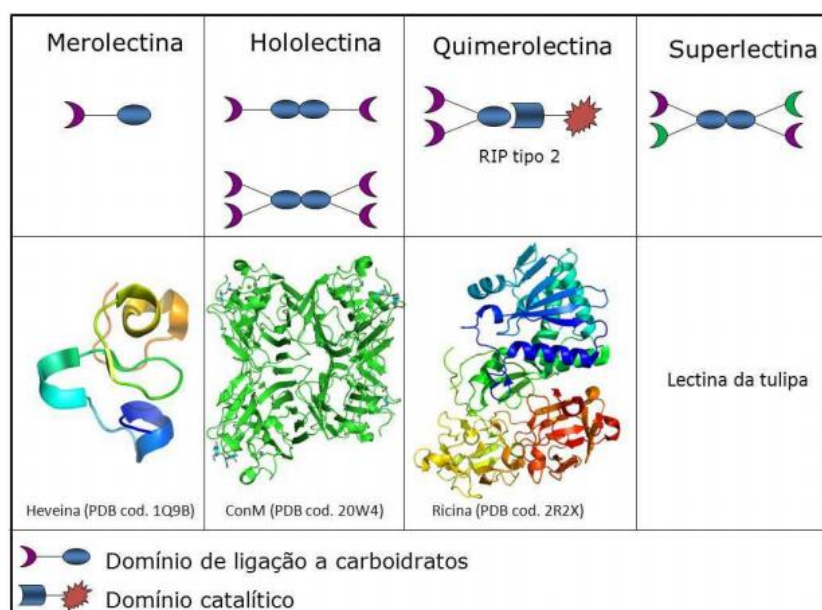
As lectinas constituem um grupo de proteínas presentes em diversos organismos vivos distintos, sobretudo em vegetais, que têm como característica se ligarem a carboidratos livres e a glicoconjugados, incluindo glicoproteínas ou glicolipídeos presentes nas superfícies celulares (NAPOLEÃO *et al.*, 2015). As lectinas se associam a carboidratos de forma reversível, com alta afinidade e especificidade sem, contudo, promoverem nenhuma alteração na estrutura covalente dos mesmos (ABREU *et al.*, 2010).

Dentre os grupos de lectinas estudadas, as lectinas vegetais são as mais bem caracterizadas e algumas funções já estabelecidas são: proteção contra patógenos e insetos, transporte e armazenamento de carboidratos, reconhecimento celular (dentro da célula, entre células ou entre organismos), proteínas de reserva ou reguladoras de crescimento (TEIXEIRA, 2012). As lectinas são encontradas em diferentes partes das plantas, podendo ser isoladas de sementes (OLIVEIRA *et al.*, 2011), folhas (NAPOLEÃO *et al.*, 2011), cascas (SÁ *et al.*, 2009) e raízes (SOUZA *et al.*, 2011).

O termo “lectina” é derivado do latim e remete às palavras “escolher” e “selecionar” devido ao fato da interação lectina-carboidrato ser tão específica quanto a interação que ocorre entre antígeno-anticorpo ou substrato-enzima. Estudos realizados nos últimos anos revelam que lectinas de diferentes fontes, apresentam sequências primárias e estruturas tridimensionais similares ou totalmente distintas. A função ligadora de carboidratos tem sido atribuída à existência de uma região denominada “sítio de ligação a carboidrato” ou “domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC)” (SHARON & LIS, 2004).

Peumans e Van Damme (1995) classificam as lectinas em: merolectinas, que possuem apenas um DRC, o qual se liga a açúcares simples, e não apresentam atividade aglutinante e catalítica; hololectinas (maioria), que possuem dois DRCs com elevada homologia e são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados; e quimerolectinas, possuindo ao menos um DRC, e outro domínio com atividade biológica distinta, como por exemplo, ação enzimática. Dependendo do número dos sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou como hololectinas. Por fim, as superlectinas são aquelas lectinas que se ligam pelo menos a dois tipos de carboidratos estruturalmente diferentes (Figura 1).

Figura 1. Classificação estrutural de lectinas.

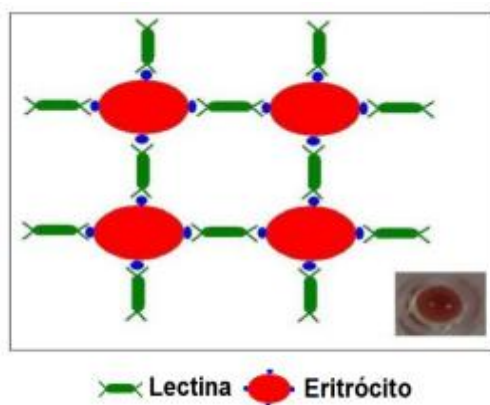


Esquema representando as merolectinas (Heveína;PDB; 1Q9B), hololectinas (ConM; PDB: 2OW4), quimerolectinas (Ricina; PDB: 2R2X) e superlectinas, estas últimas sem representantes com estrutura tridimensional elucidadas. Fonte: TEIXEIRA, 2012.

As lectinas podem ser detectadas numa amostra através de um ensaio de hemaglutinação (Figura 2). Esse ensaio é realizado em placas de microtitulação (PAIVA &

COELHO, 1992), na qual é realizada uma diluição seriada da amostra em solução salina e, em seguida, são adicionados os eritrócitos. A atividade hemaglutinante é evidenciada pela formação de uma rede de aglutinação e é quantificada como o inverso da maior diluição (título-1) capaz de promover aglutinação total dos eritrócitos. Depois da atividade hemaglutinante, realiza-se o teste de inibição com carboidratos ou glicoconjugados, pois ele assegura a natureza lectínica da hemaglutinação (KENNEDY et al, 1995).

Figura 2. Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos por lectina e aspecto da rede de aglutinação em placa de microtitulação.



(Fonte: Paiva et al., 2011)

As lectinas exibem uma variedade de propriedades biológicas devido a sua especificidade de ligação a carboidratos. Lectinas de plantas são utilizadas em estudos de eventos de reconhecimento a glicoconjugados importantes em vários processos biológicos, tais como infecções, bem como exibem atividades antiviral, antibacteriana, antifúngica e inseticida (SILVA *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2015). A caracterização físico-química é importante para o entendimento da relação estrutura-função das lectinas e envolve a definição da integridade e estabilidade da conformação secundária e terciária frente a diferentes agentes desnaturantes. Para os estudos de estabilidade

conformacional das lectinas existem as técnicas espectroscópicas de dicroísmo circular e fluorescência (KHAN *et al.*, 2013; GROSSI *et al.*, 2016).

As lectinas podem ser isoladas por técnicas gerais de purificação de proteínas, tais como cromatografias de afinidade, troca iônica, interação hidrofóbica, e gel filtração, entre outras (LAM & NG, 2011).

As lectinas têm apresentado atividade inseticida contra insetos de diversas ordens. A toxicidade das lectinas contra esses indivíduos tem sido atribuída à sua ligação a estruturas presentes no intestino do inseto, como os glicoconjugados na superfície das células epiteliais e a quitina encontrada na matriz peritrófica. Essas lectinas geralmente apresentam resistência a proteases digestivas (MACEDO *et al.*, 2007; NAPOLEÃO *et al.*, 2012) e podem causar a morte de microrganismos simbioses presentes no trato digestivo dos insetos (NAPOLEÃO *et al.*, 2011). No intestino dos insetos, as lectinas podem também se ligar à quitina presente na matriz peritrófica e a proteínas glicosiladas, tais como enzimas, interferindo na atividade catalítica (PAIVA *et al.*, 2011).

As lectinas de *Myracrodruon urundeuva* foram letais contra larvas do mosquito vetor da dengue, *Aedes aegypti*, com valores de CL₅₀ (concentração necessária para matar 50% das larvas em 24 h) de 0,04, 0,125 e 0,202 mg/mL para MuHL, MuBL e MuLL, respectivamente (SÁ *et al.*, 2009; NAPOLEÃO *et al.*, 2012). A mortalidade das larvas promovida por MuLL está provavelmente ligada à resistência à degradação proteolítica, inibição da atividade de tripsina e estimulação da atividade de amilase (NAPOLEÃO *et al.*, 2012).

Segundo Coelho *et al.* (2009) a WSMoL, lectina proveniente da semente da *Moringa oleifera*, também tem ação larvicida contra *Aedes aegypti* com CL_{50/24h} equivalente a 0,197 mg/mL. Além da função larvicida, foi constatado o poder ovicida dessa mesma lectina, contra ovos de *A. aegypti* com CE_{50/72h} igual a 0,1 mg/mL (SANTOS *et al.*, 2012).

2.2 *Moringa oleifera* Lam.

Moringa oleifera (Figura 3), pertencente à família Moringaceae, é uma planta nativa da Índia e amplamente cultivada nos trópicos de todo o mundo (AMAGLO *et al.*, 2010). No Brasil, foi introduzida para arborização de ruas e praças e é popularmente conhecida pelo nome de lírio, quiabo-de-quina ou simplesmente moringa. É uma árvore de crescimento rápido, tolerante a solos pobres, podendo alcançar 4 m de altura, gerando flores e frutos em um ano; múltiplas colheitas de sementes são possíveis em muitas partes do mundo (McCONNACHIE *et al.*, 1999; PRABHU *et al.*, 2011; RANGEL, 2011). Suas folhas, flores e sementes são utilizadas na alimentação humana e como forrageira na alimentação de animais (FERREIRA *et al.*, 2008).



Figura 3. Árvore de *Moringa oleifera*.

Foto: A autora

A excelente capacidade em se adaptar a solos pobres e climas áridos torna a moringa uma alternativa ao consumo de sementes leguminosas como fonte de proteínas de alta qualidade, de óleo e de compostos antioxidantes (FERREIRA *et al.*, 2008). As folhas da moringa contêm alto valor proteico (27% de proteína) são ricas em vitaminas A e C, além de cálcio, ferro e fósforo (RANGEL, 2011). O cultivo da moringa é proveitoso principalmente em regiões secas, devido a suas folhas poderem ser colhidas quando nenhum outro vegetal fresco está disponível (SANTOS *et al.*, 2015).

Seus tecidos apresentam múltiplas propriedades, tais como atividades antitumoral, antiinflamatória, antimicrobiana, antidiabética, antioxidante, diurética, anti-hipertensiva (GUPTA *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2015). A partir de suas sementes, foram isoladas as lectinas cMoL (do inglês, *coagulant M. oleifera* lectin) e WSMoL (do inglês, *water-soluble M. oleifera* lectin) (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009). Ambas apresentaram ação inseticida: cMoL (1% p/p) promoveu mortalidade de pupas de *Anagasta kuehniella* e aumentou o tempo total de desenvolvimento (OLIVEIRA *et al.*, 2011), enquanto WSMoL foi larvicida ($CL_{50} = 0,197$ mg/mL) e ovicida ($CE_{50} = 0,1$ mg/mL) contra população de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012).

A moringa é utilizada para os mais diversos fins na medicina popular, nos tratamentos de reumatismo e gota, como cicatrizante de feridas e, por ter propriedades antioxidantes, no tratamento de muitas doenças, como aterosclerose, câncer, reumatismo, dentre outras, que envolvem a participação de radicais livres e podem ser tratadas por agentes antioxidantes naturais. (BARRETO *et al.*, 2005). É usada medicinalmente em Guiné, La Reunion, Madagascar, Guiana e Burma (KARADI *et al.*, 2006) e as folhas jovens, flores e vagens verdes são consumidas por populações do sudoeste da Ásia que acreditam ter efeitos benéficos na visão (LIU *et al.*, 2007).

O óleo das sementes, por ser altamente resistente à oxidação, possui várias utilizações industriais, tais como na produção de cosméticos, lubrificantes de máquinas, e combustível para lâmpadas, sendo também muito utilizado na indústria de perfumaria devido a sua alta capacidade de retenção de odor (FERREIRA *et al.*, 2008).

As sementes de *M. oleifera* são utilizadas na purificação da água, principalmente áreas rurais onde recursos hídricos adequados não estão disponíveis. As sementes contêm proteínas coagulantes que podem ser facilmente extraídas em água e promovem a precipitação de partículas em suspensão, levando à diminuição na turbidez da água (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995; GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005; BHUPTAWAT *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2011). No tratamento de águas residuais, estudo combinando o extrato de moringa a 100 mg/L com coagulante químico (alúmen) a 10 mg/L demonstrou elevada remoção global (64%) na Demanda Química de Oxigênio (DQO) que seria um parâmetro que mede a quantidade de matéria orgânica suscetível de ser oxidada por meios químicos que existam em uma amostra líquida. (BHUPTAWAT *et al.*, 2007). Sementes de moringa foram também capazes de adsorver e remover Ag em soluções aquosas, apresentando-se vantajosas pelo baixo custo e elevado poder de adsorção (ARAÚJO *et al.*, 2010).

Além disso, o extrato aquoso de sementes de moringa apresentou atividades larvicida ($CL_{50/24h}$ de 0,27 mg/mL) e ovicida ($CE_{50/72h}$ de 0,32 mg/mL) contra *Aedes aegypti* (COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012). Extrato metanólico das sementes promoveu mortalidade de larvas e pupas de *Anopheles stephensis*, vetor da malária (PRABHU *et al.*, 2010). Outros tecidos da moringa também constituem potenciais fontes de inseticidas, como o extrato da casca que apresentou ação larvicida e adulticida contra os mosquitos vetores da filariose *Culex gelidus* e *Culex quinquefasciatus* (KAMARAJ & RAHUMAN, 2010). O extrato aquoso

de flores de moringa, contendo inibidor de protease, induziu a mortalidade de larvas de *A. aegypti* no segundo (L2), terceiro (L3) e quarto (L4) estágios (PONTUAL *et al.*, 2012).

Três lectinas foram isoladas a partir das sementes de *M. oleifera*, denominadas WSMoL (water-soluble *M. oleifera* lectin), cMoL (coagulant *M. oleifera* lectin) e MoL (*M. oleifera* lectin), as quais diferem quanto a características estruturais e físico-químicas, bem como propriedades biológicas (KATRE *et al.*, 2008; COELHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009).

2.2.1 Atividade inseticida de WSMoL contra *Aedes aegypti*

WSMoL é uma lectina isolada através de cromatografia de afinidade em coluna de quitina. A lectina é uma proteína ácida, possui elevada solubilidade em água e similaridade com as proteínas coagulantes MO2.1 e MO2.2 (SANTOS *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2009).

WSMoL foi agente larvicida contra larvas de *A. aegypti* (CL_{50/24h}: 0,197 mg/mL) e apresentou efeito ovicida sobre ovos frescos e estocados (CE_{50/72h}: 0,1 mg/mL) de *A. aegypti*. A ausência de epitélio subjacente no intestino de larvas mortas após o tratamento com WSMoL indica que a atividade larvicida lectina foi, provavelmente, devido a danos no intestino médio (COELHO *et al.*, 2009). Agra-Neto *et al.* (2014) demonstraram que o efeito larvicida de WSMoL pode estar relacionado com um efeito estimulatório sobre a atividade de enzimas proteolíticas presentes no trato intestinal das larvas. Com relação à atividade ovicida, Santos *et al.* (2012) sugeriram que WSMoL penetra no ovo, interferindo no desenvolvimento de embriões por meio dos mesmos mecanismos que matam as larvas.

WSMoL (0,1 mg/mL) apresentou também atividade estimulante de oviposição sobre fêmeas grávidas de *A. aegypti*, tanto em condições de laboratório quanto em campo simulado. Os estudos demonstraram que WSMoL atua como uma pista química para a oviposição

provavelmente devido à interação com receptores e sensores de contato (gustatórios) e não através de estímulos olfativos (SANTOS *et al.*, 2012, 2014).

Para utilização em programas de saúde pública, um larvicida deve ser ativo contra a espécie visada sem afetar populações de organismos não-alvo. Portanto nesse trabalho, foram realizados ensaios de toxicidade para *Danio rerio*, modelo animal bastante utilizado para testes de segurança ambiental.

2.3 Toxicidade aquática

Testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos). Nesses ensaios, organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados (RIBO, 1997; DORNFELD, 2002).

No Brasil, a Ecotoxicologia tem crescido a cada ano e os testes de toxicidade aquática são desenvolvidos por várias instituições de pesquisas e por órgãos de monitoramento ambiental do país (MELETTI, 2003). Como organismos-teste, são utilizados peixes, algas, bactérias e invertebrados aquáticos, planctônicos ou bentônicos, dentre outros. Os testes geralmente incluem avaliações de sobrevivência, crescimento e fecundidade, bem como parâmetros bioquímicos, fisiológicos, histológicos e comportamentais. Os testes de toxicidade aguda simulam, em laboratório, uma situação ambiental na qual o organismo é exposto, durante curto período de tempo, a concentrações elevadas de um provável agente tóxico.

Testes de toxicidade são ferramentas fundamentais para avaliar a qualidade das águas e a carga poluidora de efluentes, uma vez que somente as análises físico-químicas tradicionalmente realizadas, tais como demanda química de oxigênio (DQO), demanda

bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos suspensos, concentrações de metais e de outras substâncias de caráter orgânico ou inorgânico, cujos limites encontram-se estabelecidos nas legislações ambientais, não são capazes de distinguir entre as substâncias que afetam os sistemas biológicos e as que são inertes no ambiente e, por isso, não são suficientes para avaliar o potencial de risco ambiental dos contaminantes. Apesar disso, os testes de toxicidade não substituem as análises químicas tradicionais. Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos. Assim, as análises químicas e os testes de toxicidade se complementam (RONCO et al., 2004; GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990; HARMEL, 2004).

2.4 *Danio rerio*

Dentre as espécies indicadas para estes bioensaios, destacam-se alguns peixes de água doce e pequeno porte, como *Cheirodon notomelas* (piquira), *Hemigrammus marginatus* (bandeirinha), *Hyphessobrycon callistus* (mato-grosso), *Poecilia reticulata* (guarú ou lebistes) e *Danio rerio* (paulistinha) (BERTOLETTI, 2000). Essas espécies citadas são forrageiras (servem de alimento para outras espécies de peixes que são carnívoras) e, pelo seu tamanho, podem ser utilizadas com facilidade na execução de testes em laboratório (BERTOLETTI, 2000). Além disso, segundo os relatórios de 1979 e 1980 da CETESB, as espécies forrageiras demonstram ser quase sempre, mais sensíveis aos agentes químicos, tornando-as mais favoráveis quando se diz respeito a avaliação dos efeitos tóxicos.

Há mais de 30 anos atrás, George Streisinger escolhia o *D. rerio* como modelo para seu laboratório em estudos genéticos (DI PAOLO et al. 2015). Esse peixe dispõe de um

genoma sequenciado e um rico repertório de ferramentas de manipulação genética, molecular e celular (STRÄHLE *et al.*, 2012).

O *Danio rerio* (Figura 5), um teleósteo da família Cyprinidae popularmente chamado de peixe paulistinha ou peixe-zebra, tem várias vantagens como um sistema modelo para a investigação de toxicidade. Apresenta embriões transparentes e produzidos em grandes números, o que permite o rastreio de um grande número de características fenotípicas com o microscópio. É um peixe diurno, mais ativo durante a fase de luz do fotoperíodo e com diferenças claras na atividade locomotora e comportamento de desova entre as fases claras e escuras; ainda, pode ser utilizado com facilidade em experimentos em grande escala (BLANCO-VIVES *et al.*, 2009; HURD *et al.*, 1998), além de seu cultivo e comércio ocorrerem sem restrições em várias localidades do país (BERTOLETTI, 2000). O paulistinha também tem muitas vantagens sobre outros modelos de bioensaios de vertebrados no que diz respeito à facilidade de reprodução e grande quantidade de ovos gerados (SEGNER, 2009).

Figura 4. *Danio rerio* adulto.

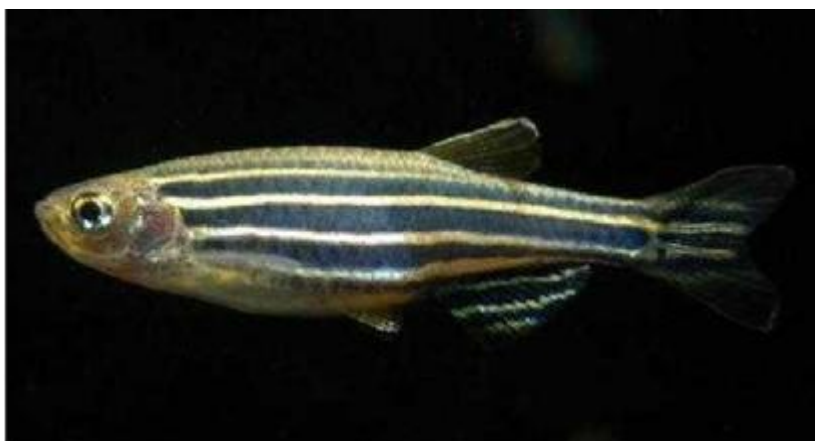


Foto: <http://www.aquarioepeixes.com.br/peixesornamentais/wp-content/uploads/2010/10/zebrafish.jpg>

A avaliação de efeitos agudos e crônicos em fases mais avançadas (juvenis e adultos) do desenvolvimento de *D. rerio* apresenta várias características que podem desfavorecer o ensaio *in vivo* incluindo um volume muito elevado de amostra para realização dos ensaios. Sendo assim, bioensaios com embriões e larvas de *D. rerio* são mais vantajosos nesse aspecto. Ainda, nenhuma alimentação externa é necessária para embriões e larvas (DI PAOLO *et al.* 2015) e é possível obter boas estimativas dos efeitos crônicos para a totalidade do ciclo vital. Dessa maneira, pode ser utilizada a fase larval (Figura 6) por curtos períodos, em testes denominados subcrônicos, ou em períodos maiores, caracterizando testes crônicos de curta duração (BERTOLETTI, 2000). Na Europa, atualmente se usa o paulistinha para testes com a fase de ovo fertilizado e embriões até 96h após fertilização (OECD, 2013). Já no Brasil, a ABNT define o protocolo para testes com larvas expostas da eclosão até 7 dias depois (ABNT, 2015).

Figura 5. Larva de *Danio rerio* 72 horas após fertilização.



Foto: A autora

As fêmeas espalham seus ovos sobre o fundo e não existe nenhum tipo de cuidado parental. Os ovos, que são demersais e não adesivos, desenvolvem-se e eclodem em 48-72 hora. Após essa eclosão, as larvas aderem à superfície por meio de células especializadas na cabeça. Em 24-48 horas após a eclosão, elas inflam suas bexigas natatórias e começam a se alimentar ativamente de pequenos zooplânctons (DAMMSKI *et al.*, 2011).

Alguns trabalhos foram realizados também para determinar toxicidade de inseticidas sobre *D. rerio*. Um deles teve como objetivo avaliar alguns inseticidas utilizados na cultura do arroz irrigado, usando juvenis de paulistinha (*Danio rerio*). Os inseticidas betaciflutrina, carbofurano, fipronil e lambdacialotrina apresentaram valores de CL₅₀ (48 h) de: 0,004, 1,3, 0,2 e 0,002 mg/L, respectivamente, e alto risco de impacto ecológico, de acordo com os índices de risco calculados (índice de Solomon, índice de risco da UESPA e índice de Kokta e Rothert), os quais levam em conta as concentrações de aplicação dos produtos, as concentrações tóxicas para organismos não-alvo e as concentrações encontradas no ambiente (NAKAGOME *et al.*, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito de extrato aquoso e lectina (WSMoL) de sementes de *Moringa oleifera* sobre larvas de peixes da espécie *Danio rerio*.

3.2 Específicos

- Avaliar os efeitos do extrato e da lectina purificada sobre a sobrevivência de larvas de *D. rerio*.
- Avaliar os efeitos do extrato e da lectina purificada sobre o comportamento natatório de larvas de *D. rerio*.
- Avaliar os efeitos do extrato e da lectina purificada na atividade de acetilcolinesterase de larvas incubadas de *D. rerio*.

REFERÊNCIAS

ABNT. **NBR 15499:2015 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes**. Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro, Brasil. 2010.

ABREU, C.M.P., SILVA, M.C., CORRÊA, A.D., DONIZETE, C., CRISTINA, F., MARCOS, A., MARIA, C., ABREU, P.. Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p.103-107, 2010.

AGRA-NETO, A.C., NAPOLEÃO, T.H., PONTUAL, E.V., DE LIMA SANTOS, N.D., DE ANDRADE LUZ, L., DE OLIVEIRA, C.M.F., DE MELO-SANTOS, M.A.V., COELHO, L.C.B.B., DO AMARAL FERRAZ NAVARRO, D.M., PAIVA, P.M.G. Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitology Research**, v. 113, p. 175–184, 2014.

AMAGLO, N.K., BENNETT, R.N., LO CURTO, R.B., ROSA, E.A.S., LO TURCO, V., GIUFFRIDA, A., CURTO, A. LO, CREA, F., TIMPO, G.M. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1047–1054, 2010.

ARAÚJO, C.S.T., MELO, E.I., ALVES, V.N., COELHO, N.M.M. *Moringa oleifera* Lam. Seeds as a natural solid adsorbent for removal of Ag¹ in aqueous solutions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1727-1732, 2010.

BARRETO, M. B., MARTINS NETO, J.S., BRASIL, N.V.G.P.S. **Atividade antioxidante e análise da toxicidade de extratos de *Moringa oleifera* Lam.** Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC, 2005.

BERTOLETTI, E. **Estimativa de efeitos tóxicos com *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2000.

BHUPTAWAT, H., FOLKARD, G.K., CHAUDHARI, S. Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating *Moringa oleifera* seed coagulant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 142, p. 477–482, 2007.

BLANCO-VIVES, B., SANCHEZ-VAZQUEZ, F.J. Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. *Physiology & Behavior*, v. 98, p. 268–275, 2009.

CARVALHO, A.S., SILVA, M.V., GOMES, F.S., PAIVA, P.M.G., MALAFAIA, C.B., SILVA, T.D., VAZ, A.F.M., SILVA, A.G., ARRUDA, I.R.S., NAPOLEÃO, T.H., CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G., CORREIA, M.T.S. . Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 402-408, 2015.

COELHO, J.S., SANTOS, N.D.L., NAPOLEÃO, T.H., GOMES, F.S., FERREIRA, R.S., ZINGALI, R.B., COELHO, L.C.B.B., LEITE, S.P., NAVARRO, D.M.A.F., PAIVA, P.M.G. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934–938, 2009.

DAMMSKI, A.P. *et al.* Zebra fish – Manual de criação em biotério. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

DI PAOLO, C., SEILER, T.-B., KEITER, S., HU, M., MUZ, M., BRACK, W., HOLLERT, H. The value of zebrafish as an integrative model in effect-directed analysis - a review. *Environmental Sciences Europe*, v. 27, artigo 8, 2015.

DORNFELD, C.B. Utilização de *Chironomus* sp (Diptera, Chironomidae) para a avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2002.

FERREIRA, P.P.M., FARIAS, D.F., OLIVEIRA, J.T.D.A., CARVALHO, A.D.F. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential *Moringa oleifera*: compostos bioativos e potencialidade nutricional. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 431–437, 2008.

FERREIRA, R.S., NAPOLEÃO, T.H., SANTOS, A.F.S., SÁ, R.A., CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G., MORAIS, M.M.C., SILVA-LUCCA, R.A., OLIVA, M.L. V, COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p. 186–192, 2011.

GASSENSCHMIDT, U., JANY, K.D., TAUSCHER, B., NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysics Acta**, v. 1243, p. 477-481, 1995.

GHEBREMICHAEL, K.A., GUNARATNA, K.R., HENRIKSSON, H., BRUMER, H., DALHAMMAR, G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water Research**, v. 39, p. 2338-2344, 2005.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E., BERTOLETTI, E., ZAGATTO, P.A., ARAÚJO, R.P.A., RAMOS, M.L.L.C. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de**

efluentes líquidos. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB): São Paulo, 1990.

GROSSI, A., OLSEN, K., BOLUMAR, T., OGENDAL, L. H., ORLIEN, V. The effect of high pressure on the functional properties of pork myofibrillar proteins. **Food Chemistry**. v. 196, p. 1005-1015, 2016.

GUO, J., CAO, Y., QIN, K., ZHAO, X., WANG, D., LI, Z., XIN, L., SHU, Y., ZHOU, J. Limited effect of recombinant human mannose-binding lectin on the infection of novel influenza A (H7N9) virus in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 458, p. 77-81, 2015.

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

HARMEL, V.C. **Padronização de um teste de toxicidade crônica com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* para análise de qualidade de águas superficiais.** Dissertação de Mestrado, Universidade Regional de Blumenau, Brasil, 2004.

HURD, M.W., DEBRUYNE, J., STRAUME, M., CAHILL, G.M. Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. **Physiology & Behavior**, v. 65, p. 465–472, 1998.

KAMARAJ, C., RAHUMAN, A.A.. Larvicidal and adulticidal potential of medicinal plant extracts from south India against vectors. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, p. 948–953, 2010.

KARADI, R.V., GADGE, N.B., ALAGAWADI, K.R., SAVADI, R.V. Effect of *Moringa oleifera* Lam. root- wood on ethylene glycol induced urolithiasis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 306–311, 2006.

KATRE, U.M.V., SURESH, C.G., ISLAM KHAN, M., SUSHAMA M., GAIKWAD, M. Structure– activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 203-207, 2008.

KENNEDY, J.F, PALVA, P.M.G., CORELLA, M.T.S., CAVALCANTI, M.S.M., COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

KHAN, J. M., QADEER, A., AHMAD, E., ASHRAF, R., BHUSHAN, B., CHATURVEDI, S. K., RABBANI, G., KHAN, R. H. Monomeric Banana Lectin at Acidic pH Overrides Conformational Stability of Its Native Dimeric Form. *PLoS ONE*, 8(4): e62428., 2013.

LAM, S.K., NG, T.B. Lectins: Production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 45–55, 2011.

LIU, Y., PERERA, C.O., SURESH, V. Comparison of three chosen vegetables with others from South East Asia for their lutein and zeaxanthin content. *Food Chemistry*, v. 101, p. 1533–1539, 2007.

MACEDO, M.L.R., FREIRE, M.G.M., SILVA, M.B.R., COELHO, L.C.B.B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry & Physiology A**, v. 146, p. 486–498 2007.

MACHADO, M.R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 1, p. 63–76, 1999.

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

MELETTI, P.C., ROCHA, O., MARTINEZ, C.B.R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: **Imunologia Fluvial: Um estudo no rio Mogi-Guaçu**, capítulo 9, pp. 149-180, 2003.

NAKAGOME, F.J., NOLDIN, J.A., RESGALLA JR., C. Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 17, p. 117-122, 2007.

NAPOLEÃO, T.H., AGRA-NETO, A.C., BELMONTE, B.R., PONTUAL, E.V., PAIVA, P.M.G. Biology, Ecology and Strategies for Control of Stored-Grain Beetles: A Review. In: Camilla Stack. (Org.). **Beetles: Biodiversity, Ecology and Role in the Environment**. New York: Nova Science Publishers Inc., 2015, p. 105-122.

NAPOLEÃO, T.H., GOMES, F.S., LIMA, T.A., SANTOS, N.D.L., SÁ, R.A., ALBUQUERQUE, A.C., COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G. Termiticidal activity of

lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 52–59, 2011.

NAPOLEÃO, T.H., PONTUAL, E.V., LIMA, T.A., SANTOS, N.D.L., SÁ, R.A., COELHO, L.C.B.B., NAVARRO, D.M.A.F., PAIVA, P.M.G. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, v. 110, 609–616, 2012.

OECD, 2013. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems test no. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.

OLIVEIRA, C.F.R., LUZ, L.A., PAIVA, P.M.G., COELHO, L.C.B.B., MARANGONI, S., MACEDO, M.L.R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 498–504, 2011.

PAIVA, P.M.G., NAPOLEÃO, T.H., SÁ, R.A., COELHO, L.C.B.B. Insecticide activity of lectins and secondary metabolites. In: Farzana Perveen. (Org.). **Insecticides - Advances in Integrated Pest Management**. Rijeka: InTech, pp. 579-598, 2011.

PAIVA, P.M.G., COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p.113–118, 1992.

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347–352, 1995.

PRABHU, K., MURUGAN, K. NARESKUMAR, A., RAMASUBRAMANIAN, N., BRAGADEESWARAN, S. Lavicidal and repellent potential of *Moringa oleifera* against malaria vector, *Anopheles stephensis* Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, p. 124-129, 2011.

RANGEL, M. S. *Moringa oleifera*. Um purificador natural de água e complemento alimentar para o Nordeste do Brasil. Disponível em: <<http://www.jardimdeflores.com.br/floresefolhas/A10moringa.htm>>. Acesso 17 de fevereiro 2016

RIBO, J. M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 12, p. 283-294, 1997.

RONCO, A., BÁEZ, M.C.D., GRANADOS, Y.P. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones.** In: Morales, G.C., ed.; Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, 2004.

SÁ, R.A., SANTOS, N.D.L., SILVA, C.S.B., NAPOLEÃO, T.H., GOMES, F.S., CAVADA, B.S., COELHO, L.C.B.B., NAVARRO, D.M.A.F., BIEBER, L.W., PAIVA, P.M.G., 2009. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 149, p.300–306, 2009.

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

SANTOS, A.F.S., LUZ, L.A., PONTUAL, E.V., NAPOLEÃO, T.H., PAIVA, P.M.G., COELHO, L.C.B.B. *Moringa oleifera*: Resource management and multiuse life tree. **Advances in Research**, v. 4, p. 388-402, 2015.

SANTOS, N.D.L., MOURA, K.S., NAPOLEÃO, T.H., SANTOS, G.K.N., COELHO, L.C.B.B., NAVARRO, D.M.A.F., PAIVA, P.M.G., 2012. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* Lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, v. 7, artigo e0044840, 2012.

SEGNER, H.A.R., C.J. COCKMAN. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 149, p. 187-195, 2009.

SHARON, N., LIS, H. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, p. 53–62, 2004.

SILVA, H.C., PINTO, L.S., TEIXEIRA, E.H., NASCIMENTO, K.S., CAVADA, B.S., SILVA, A.L.C. BUL: A novel lectin from *Bauhinia unguiculata* L. seeds with fungistatic and antiproliferative activities. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 203-209, 2014.

SOUZA, J.D., SILVA, M.B.R., ARGÔLO, A.C.C., NAPOLEÃO, T.H., SÁ, R.A., CORREIA, M.T.S., PAIVA, P.M.G., SILVA, M.D.C., COELHO, L.C.B.B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 696-702, 2011.

STRÄHLE, U., SCHOLZ, S., GEISLER, R., GREINER, P., HOLLERT, H., RASTEGAR, S., SCHUMACHER, A., SELDERSLAGHS, I., WEISS, C., WITTERS, H., BRAUNBECK, T. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments - A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. **Reproductive Toxicology**, v. 33, p. 128–132, 2012.

TEIXEIRA, C.S. Determinação da estrutura de uma lectina da semente de *Camptosema pedicellatum* Benth por cristalografia de raios X. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, 2012.

4 ARTIGO

Lethal and sublethal effects of aqueous extract and lectin from *Moringa oleifera* seeds to zebrafish (*Danio rerio*) larvae

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO “Chemosphere”

Lethal and sublethal effects of aqueous extract and lectin from *Moringa oleifera* seeds to zebrafish (*Danio rerio*) larvae

Livia Lais de Santana Silva^a, José Dayvid Ferreira da Silva^a, Ana Patrícia Silva de Oliveira^a
Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^b,
Thiago Henrique Napoleão^a, Paulo Sérgio Martins de Carvalho^c, Patrícia Maria Guedes
Paiva^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^c*Departamento de Química Fundamental-CCEN, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil.*

^a*Departamento de Zoologia-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*

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

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

Abstract

Aqueous extract and a water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds are larvicidal agents against *Aedes aegypti* with lethal concentrations to 50% of tested organisms after 24 h exposure ($LC_{50/24h}$) of 0.27 and 0.197 mg mL⁻¹, respectively. The evaluation of ecotoxicity of larvicidal agents is an essential step to establish the guidelines for the use of an insecticide. This work evaluated the toxicity of *M. oleifera* seed extract and purified WSMoL to *D. rerio* larvae during 7 days starting from hatch. The bioassays were performed using semi-static exposure systems with 5 larvae in each of 4 replicates in 100-mL beakers. The exposure treatments were: seed extract at 0.03, 0.09, 0.27 and 0.81 mg mL⁻¹; purified WSMoL at 0.02, 0.05, 0.1 and 0.2 mg mL⁻¹; and distilled water as controls. Dead larvae were recorded daily, and larval swimming velocities were analyzed after 72 h and 168 h of exposure through digital analysis of video recordings. Additionally, acetylcholinesterase (AChE) activity of larvae were determined at the end of exposures. The LC_{50} for exposures of 24 and 96 h were 0.365 and 0.031 mg mL⁻¹ for seed extract, and 0.21 and 0.135 mg mL⁻¹ for purified WSMoL, respectively. This result indicate that larvae of *D. rerio* and *A. aegypti* are similarly sensitive to WSMoL (6% difference in LC_{50-24h}) while seed extract is approximately 34% more potent towards *A. aegypti* larvae. *D. rerio* larvae exposed to the extract presented a hyperactivity in most of the treatments, except at 0.81 mg mL⁻¹, while it was observed that the velocity decreased with the increase of WSMoL concentration. Significant reduction of AChE activity were detected in larvae from treatments with seed extract at 0.81 mg mL⁻¹ and WSMoL at 0.1 mg mL⁻¹. In conclusion, the study demonstrated that the seed extract and WSMoL were toxic to *D. rerio* larvae being recommended that these larvicidal agents should not be applied in places where there are non-target organisms.

Keywords: *Moringa oleifera*. lectin. zebrafish. ecotoxicity.

1 Introduction

The dengue fever is one of the major public health problems worldwide, with a higher incidence in tropical and subtropical regions. According to the World Health Organization, about 390 million people are infected every year and about 500,000 require hospitalization as consequence of this infection. Currently, the strategy available to reduce the disease spreading is the control of its vector, the mosquito *Aedes aegypti*. In addition, this mosquito species act as vector of the viruses that cause chikungunya and zika, for which there are also no vaccines, similarly to dengue. Chikungunya outbreaks have been reported in the last three years in Europe, Caribbean islands, Latin America, and the United States of America. Zika virus disease outbreaks were reported in French Polynesia, Brazil, Colombia and Cape Verde (World Health Organization, 2016a,b,c). This scenario, combined with reports on toxicity to humans and emergence of mosquito resistance to the insecticides currently used, stimulates the search for new agents for use in control of *A. aegypti*.

Moringa oleifera (Moringaceae) is a plant native from India and broadly cultivated along the tropics (Amaglo et al., 2010). In developing countries, its seeds are use as natural coagulant for water treatment (Vieira et al., 2010). The seeds contain a water-soluble lectin (WSMoL), which showed larvicidal ($LC_{50/24h}$: 0.197 mg/mL), ovicidal ($EC_{50/72h}$: 0.1 mg/mL) and oviposition-stimulant (at 0.1 mg/mL) activities on the dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Coelho et al., 2009; Santos et al., 2012). In addition, the aqueous extract from *M. oleifera* seeds also showed larvicidal ($LC_{50/24h}$: 0.27 mg/mL) and ovicidal ($LC_{50/72h}$: 0.32 mg/mL) activities against this mosquito (Santos et al., 2012). These findings stimulate the evaluation of WSMoL effective use for combating the *A. aegypti*. However, since WSMoL could be used in freshwater reservoirs, aquatic organisms could be affected, Brazilian federal legislation from the Ministry of Health require that chemical or biological agents for use against

undesired disease vectors such as *A. aegypti*, should be tested for toxicity to non-target organisms.. Ecotoxicological studies using aquatic animals provide relevant information for evaluation of the potential risks of larvicides used for disease vector control (Bertoletti, 2000)

The zebrafish (*Danio rerio*) is a model organism used worldwide in ecotoxicology assays due to some characteristics such as small size, ease of culture, high fecundity, rapid development, external fertilization and development, and the transparency of the embryos. The embryos and early larvae have been broadly used in these studies, which allow the use of low sample volume and reduces the workload (Di Paolo et al., 2015). According to Strähle et al. (2012), the zebrafish larvae are independent of feeding from 120 h after fertilization based on the rates of yolk consumption, feeding and swimming behavior.

Among the measures used to evaluate the toxicity of a substance, there is the determination of the lethal concentration required to kill 50% of the organisms (LC₅₀) in a given period. The LC₅₀ determination is an important toxicity measure because it may be used to compare the toxic potency of different chemicals, even if they cause different toxic effects, as well as the toxicity level of the same compound to different organisms (Canadian Centre for Occupational Health and Safety, 2013). In ecotoxicity studies with fishes, the swimming behavior is frequently used to assess effects on physical capacity of the organisms at sub-lethal concentrations.

Therefore, this work aimed at evaluating the effects of *M. oleifera* seed extract and WSMoL on survival and on sublethal effects on swimming behavior and acetylcholinesterase activity in larvae of *D. rerio*.

2 Materials and methods

2.1 Danio rerio maintenance and breeding

Danio rerio fish were reared in the Ecotoxicology Laboratory at *Centro de Ciências Biológicas* of the *Universidade Federal de Pernambuco*. The water used for both rearing and ecotoxicological assays was pumped from a well, chlorinated with commercial sodium hypochloride NaClO, and dechlorinated by intense aeration. The measurement of the residual chloride was performed using a colorimetric kit (Merck, Germany). Physico-chemical characteristics of water were pH 7.5, dissolved oxygen above 6 mgO₂/L, 45 mg CaCO₃/L hardness, and experiments were performed at 25 °C. The fishes were fed with dry fish food with 40 % total protein and *Artemia* sp. nauplii.

Male and female adult fish were maintained in separate aquariums during 7 days and then transferred to an aquarium containing a spawning cage in the afternoon (Bertoletti and Domingues, 1991). The spawning cage was maintained in darkness until the next morning, when spawning and fertilization took place shortly after lights were turned on. The adult fishes were transferred to other aquariums, and the eggs were siphoned, collected with a sieve and placed in aquariums containing sterile maintenance water purified using a UV lamp. Embryos were also maintained in this water until hatch, and larvae less than 24 h after hatch were used in the ecotoxicological assays

2.2 *Moringa oleifera* seed extract

Seeds of *M. oleifera* were collected at the campus of the *Universidade Federal de Pernambuco* (Recife, Pernambuco, Brazil). The collection of plant material was authorized by the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* from the Brazilian Ministry of Environment (authorization number 38690). A voucher specimen (number 73,345) was deposited at the herbarium *Dárdano de Andrade Lima* from the *Instituto Agronômico de*

Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brazil). After collection, the seeds were powdered using a blender and stored at -20°C. Seed extract was prepared by homogenization of seed powder (10 g) in distilled water (100 mL) using a magnetic stirrer during 16 h at 25°C. The extract was obtained after filtration through filter paper followed by centrifugation (9,000 *g*; 15 min, 4°C) and evaluated for protein concentration and hemagglutinating activity as described below.

2.3 Isolation of WSMoL

WSMoL was isolated according to the procedure reported by Coelho et al. (2009). The proteins present in the seed extract were precipitated by treatment with ammonium sulphate at 60% saturation (Green and Hughes, 1955) during 4 h at 25°C. Next, the material was centrifuged (15 min, 9,000 *g*, 4°C) and the precipitated fraction was collected and dialyzed for removal of the ammonium sulphate against distilled water (4 h, with two changes). The dialyzed fraction was chromatographed on chitin column (7.5 ×1.5 cm) previously equilibrated with 0.15 M NaCl. After a washing step to remove unbound proteins, WSMoL was recovered with 1.0 M acetic acid and exhaustively dialyzed (6 h, with three changes) for eluent removal.

2.4 Protein concentration and hemagglutinating activity

Protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951) using a standard curve of bovine serum albumin (31.25–500 µg/mL). The lectin activity was monitored by hemagglutination assay, which was performed in 96-well V-bottomed microplates according to Paiva and Coelho (1992). In a microplate row, the extract or

WSMoL (50 μ L) was serially two-fold diluted in 0.15 M NaCl and thereafter each well received 50 μ L of a suspension (2.5 % v/v) of rabbit erythrocytes fixed with glutaraldehyde (Bing et al., 1967). In negative controls, the erythrocytes were incubated with 0.15 M NaCl. The number of hemagglutinating activity units was calculated as the reciprocal of the highest dilution of sample promoting full agglutination of the erythrocytes. Specific hemagglutinating activity was defined as the ratio between the titer and protein concentration (mg/mL).

2.5 Experimental design and exposure

The assay was performed according to standard procedures established by the Associação Brasileira de Normas Técnicas (Brazilian Association of Technical Procedures) (ABNT-NBR 15499) regarding the evaluation of chronic toxicity to the freshwater fish *Danio rerio*. Basically, these procedures involve the use of freshly hatched *Danio rerio* larvae, which are exposed during a total of 168 h (ABNT, 2015).

A semi-static system with renewal of the test solutions every 48 h was used, with four replicates per treatment of 5 larvae in each replicate beaker of 100 mL, constantly aerated. The treatments included seed extract concentrations of 0.03, 0.09, 0.27 and 0.81 mg mL⁻¹; purified WSMoL at concentrations of 0.02, 0.05, 0.1 and 0.2 mg mL⁻¹, and control larvae exposed to water. These concentration ranges were chosen in order to encompass values below and above the LC₅₀ values for *A. aegypti* larvae previously established (Coelho et al., 2009). The total exposure time was 168 h, and mortality rates recorded daily. Individual larvae swimming behavior was captured after 72 h and 168 h of exposure by 30 min video recordings using cameras coupled to a computer. Video recordings were then processed by Smart Video Tracking software version V2.5.21 (Panlab, S.L.U, Spain), and swimming velocity (cm/seg) and the traveled distance (cm) were estimated for each individual larvae.

2.6 Acetylcholinesterase (AChE) assays

The larvae that survived at the end of the ecotoxicological assays were collected and homogenized in 0.1 M potassium phosphate pH 7.5. After centrifugation (9,000 *g*, 4 °C, 15 min), the extracts were evaluated for protein concentration (Lowry et al., 1951). The AChE activity was determined by incubating 10 µL the larvae extract with 20 µL of 0.062 M acetylthiocholine and 200 µL of 0.25 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) during 3 min at 25°C. After this period, the release of thiocholine was monitored by determination of the absorbance at 405 nm according to Ellman (1961). One unit of AChE activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyses 1 µmol of acetylthiocholine per minute.

2.7 Statistical analysis

Mortality rates were corrected for control responses using Abbott's procedure and evaluated for fitness to probit model using the software StatPlus Pro 5.9.8 (AnalystSoft, Canada). The concentration required to kill 50% of larvae (LC_{50}) and 95% confidence intervals were calculated for exposures of 24 h and 96 h. Data for swimming velocities and distance swam and for AChE activities were analyzed using one-way ANOVA followed by the Tukey's test at a significance level of 5%.

3 Results and discussion

This work evaluated the toxicity of an aqueous extract and the lectin WSMoL from *M. oleifera* seeds to a non-target aquatic organism, which is important to characterize its potential risk to non-target aquatic organisms.

The mortality rates of *D. rerio* larvae exposed to *M. oleifera* seed extract and WSMoL for 168 h are shown in Figures 1A and 1B, respectively. It is possible to see that the effects of both seed extract and WSMoL lectin were dose-dependent. After 24 h, there was mortality of approximately 50% of the larvae in the treatments with the seed extract at 0.27 and 0.81 mgmL⁻¹, while for WSMoL treatments mortality higher than 50% was only detected after 48 h at 0.20 mgmL⁻¹. The data were submitted to probit analysis and the LC₅₀ for exposure durations of 24 and 96 h are presented in Table 1.

Table 1. Lethal concentrations of *Moringa oleifera* seed extract and WSMoL required to kill 50% of *Danio rerio* larvae (LC₅₀) after 24 and 96 h of treatment.

Sample	LC ₅₀ values (mg/mL)			
	24 h	SE	96 h	SE
Extract	0.365	0.025	0.031	0.017
WSMoL	0.210	0.063	0.135	0.135

SE: standard error.

WSMoL showed a slightly higher larvicidal potency towards *A. aegypti* larvae (LC_{50/24h}: 0.197 mg mL⁻¹) than seed aqueous extracts (LC_{50-24h}: 0.2 mg mL⁻¹) (Coelho et al., 2009; Santos et al., 2012). A similar pattern was found in this study after 24 h exposures of *D. rerio* larvae to purified WSMoL (LC_{50/24h}: 0.210 mg mL⁻¹) and seed aqueous extracts (LC_{50/24h}: 0.365 mg mL⁻¹). However, a reversed pattern was found after 96 h exposures, where seed extracts was more potent towards zebrafish larvae. A direct comparison of sensitivity between *A. aegypti* larvae and *D. rerio* larvae based on LC_{50/24h} values indicate that larvae of

both species are similarly sensitive to WSMoL(6% difference in LC_{50-24h}) and that seed extract is approximately 34% more potent towards *A. aegypti* larvae. Additionally, this study shows that 96 h exposures can lead to significant increases in lethal toxicity to *D. rerio* larvae, especially of water based seed extracts, more economically feasible for potential use as larvicidal agents.

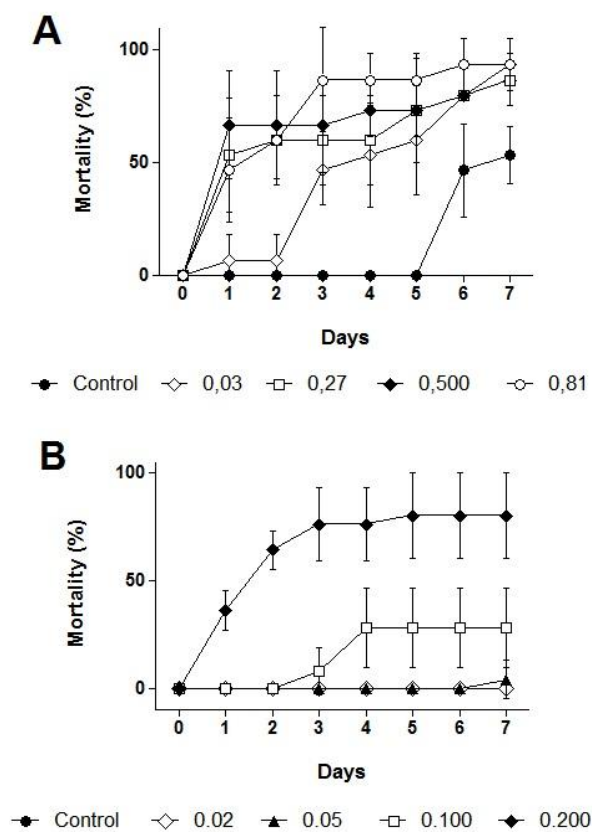


Figure 1. Mortality of *D. rerio* larvae after exposition to *M. oleifera* seed extract (A) and purified WSMoL (B) during 7 days (168 h).

Toxicity of *M. oleifera* seed extract was also tested on the freshwater guppy *Poecilia reticulata*, and the LC_{50-72h} of 1.885 mg mL^{-1} (Ohia *et al.*, 2013) indicates that this fish was significantly less sensitive than *D. rerio* larvae. In spite of that, the lethal toxicity of seed extract and purified WSMoL to *D. rerio* larvae detected in this study suggests that caution is needed when using this extract and this lectin in aquatic environments.

Comparison between LC_{50} values determined for 24 and 96 h revealed that WSMoL was more toxic than the seed extract for *D. rerio* larvae after 24 h incubation while was less toxic after 96 h incubation. Probably, the high toxicity of extract detected at the highest incubation time was due to other compounds than WSMoL. According Crivelenti (2011), it was found a LC_{50} of 0.375 mg L^{-1} to the fish *P. reticulata* for the insecticide Abate[®] (temephos concentration of 10 g kg^{-1}), used to combat dengue mosquito.

Evaluation of sublethal toxicity to protect non-target aquatic organisms is presently as important as evaluation of lethal effects, since they can typically occur at lower concentrations, and also lead to the decrease or extinction of several wild species (Newman and Clements, 2008). Figure 2 shows the data of swimming velocity for *D. rerio* larvae from assays with seed extract and WSMoL. According to our results, *D. rerio* larvae exposed to the aqueous extract for 72 h (Figure 2A) developed hyperactivity in treatments 0.03, 0.09, 0.27 and 0.81 mg mL^{-1} , with swimming velocities significantly higher than the control (One-way Anova $F=24.6503$, d.f. num: 4; d.f. den: 44; $p<0.05$). In larvae incubated for 168 h (Figure 2B), the hyperactivity was found for individuals exposed to 0.27 and 0.81 mg mL^{-1} (One-way Anova $F=10.4047$, d.f. num: 4; d.f. den: 46; $p<0.05$).

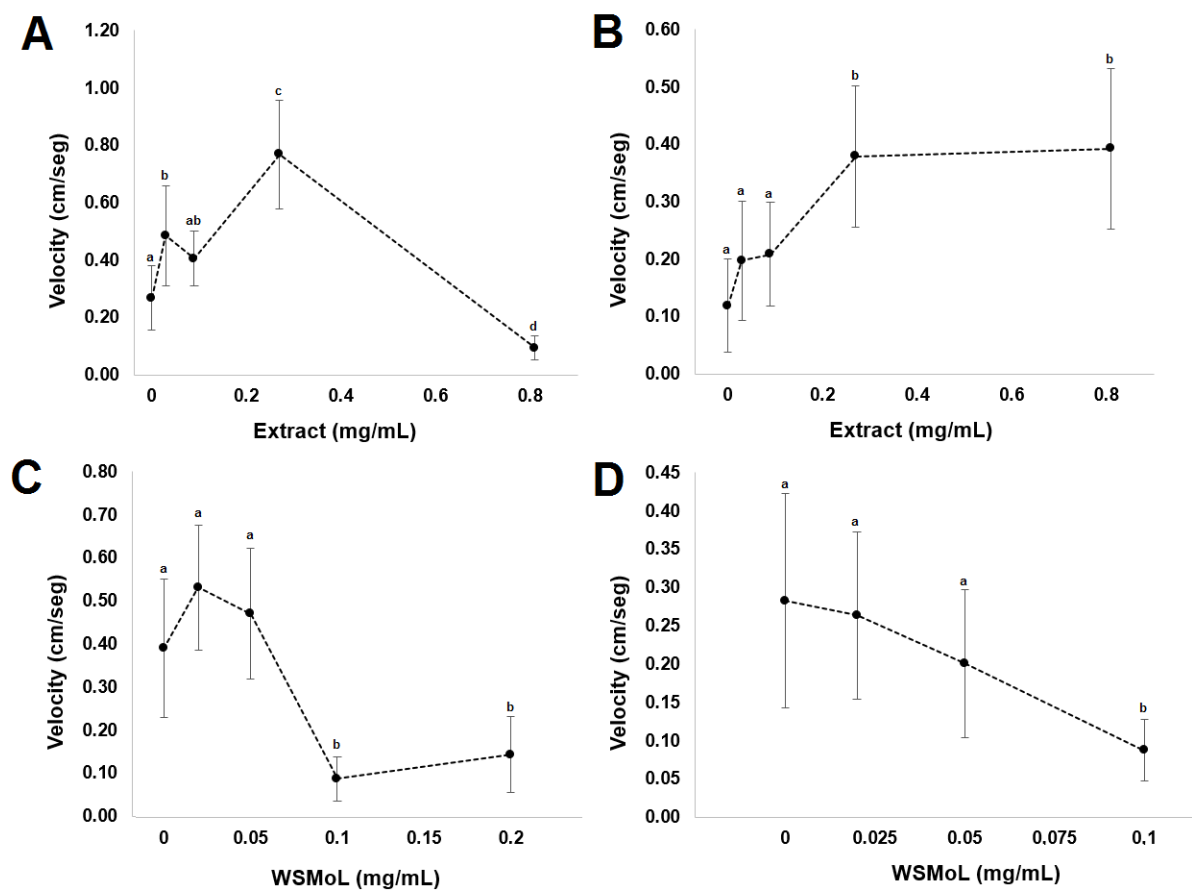


Figure 2. Swimming velocity estimated based on 30 min video recordings of larvae exposed to *M. oleifera* seed extract (A, B) or WSMoL (C, D) for 72 h (A, C) and 168 h (B, D).

On the other hand, *D. rerio* larvae exposed to purified WSMoL for 72 h (Figure 2C) showed swimming velocities significantly lower than the control in treatment at 0.1 and 0.2 mg mL⁻¹ (One-way Anova F=20.170, d.f. num: 4; d.f. den: 49; $p < 0.05$). Larvae exposed for 168 h (Figure 2D) developed hypoactivity only in treatment at 0.1 mg mL⁻¹ (One-way Anova F=7.916, d.f. num: 3; d.f. den: 47; $p < 0.05$); all the larvae from treatment at 0.2 mg/mL had died at this time. The results indicate that the extract and WSMoL interfered differently in the swimming behavior of the larvae. WSMoL caused underactive larvae exposed to higher concentrations and the extract caused hyperactivity in most concentrations.

When fish individuals are exposed to foreign substance, they can react showing hypoactivity or hyperactivity regarding the motility. For example, the exposure of the fish *Fundulus heteroclitus* to sub-lethal concentrations of the anesthetic MS222 resulted in increase of swimming velocity (Kane, 2004). The hyperactivity may be due to an escape response such as observed for *Fundulus heteroclitus* fish treated with sub-lethal doses of industrial effluent contaminated with Ni and Cr (Hadjinicolaou and Spraggs, 1988); however, in an aquatic environment, this may increase the chance of detection by predators. On the other hand, the hypoactivity corresponds to a different strategy to overpass the effects of the toxic compound; in this case, there is a reallocation of energy to other physiological processes such as osmoregulation and synthesis of stress proteins, leading to low energy for motility (Little et al., 1990; Triebskorn et al., 1997).

Acetylcholinesterase is an enzyme that degrades the neurotransmitter acetylcholine, which is involved in the transmission of nervous impulses for muscles. Once it was observed alterations in the motility of larvae incubated with the extract and WSMoL, we determined the AChE activity in extracts of larvae from control and test treatments. The results show that there was an inhibition of enzyme activity in larvae exposed to 0.81 mg mL⁻¹ of the aqueous extract (Figure 3A) and 0.1 mg mL⁻¹ of purified WSMoL (Figure 3B).

The inhibition of AChE is the mechanism of action of organophosphates and carbamate insecticides and leads the insect to death due to paralysis as consequence of interrupt muscular contraction (Aiub et al., 2002). The results indicate that, although the extract induced a hyperactivity of larvae exposed for 168 h, there was significant reduction in AChE level for larvae incubated with the concentration of 0.81 mg mL⁻¹. Then, this effect on swimming behavior of the larvae are not linked to changes induced by extract in the AChE levels. For WSMoL, the hypoactivity detected was also accompanied by reduction in AChE levels, indicating a correlation between AChE levels and the sublethal effects promoted by the

purified lectin. Since the inhibition of acetylcholinesterase may be dangerous for fish, Mainly for its swimming activity, compromising a feeding and a flight of its predators (Bálint et al., 1995).

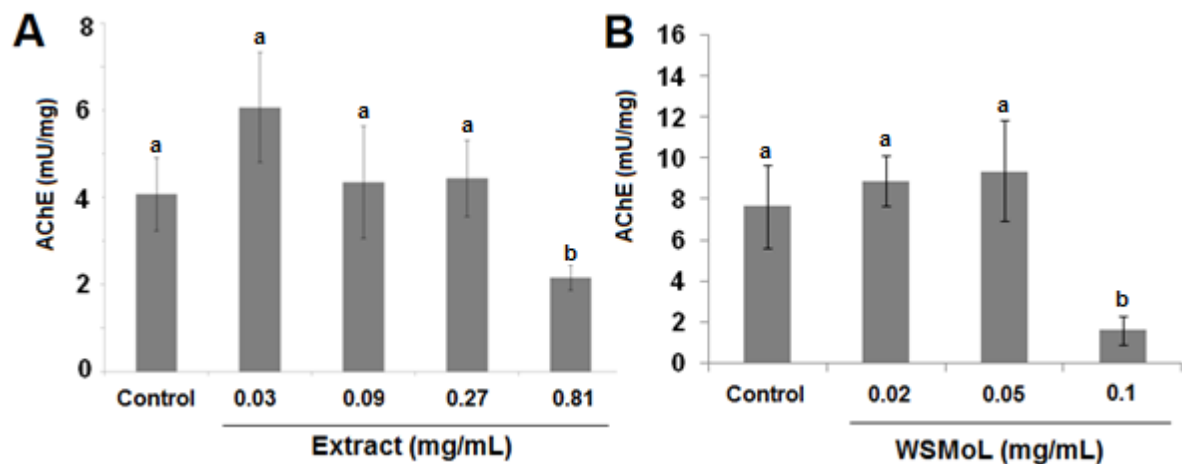


Figure 3. AChE activity in larvae exposed to aqueous extracts or purified WSMoL for 168 h and to clean water (control), *M. oleifera* aqueous seed extract (A) and purified WSMoL (B).

4 Conclusion

The study demonstrated that the aqueous extract and WSMoL can lead to significantly lethal effects to *D. rerio* larvae at concentrations effective for *Aedes aegypti* control. Additionally, sublethal effects on swimming behavior of surviving *D. rerio* larvae associated with inhibition of AChE were also observed in treatment with WSMoL. The use of aqueous seed extract and purified WSMoL as *A. aegypti* larvicidal agents should be used cautiously in aquatic reservoirs such as lagoons to protect non-target aquatic organisms.

Acknowledgments

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

References

- ABNT, 2015. NBR 15499:2015 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes. Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro, Brasil.
- Aiub, C.A.F., Coelho, E.C.A., Sodré, E., Pinto, L.F.R., Felzenszwalb, I., 2002. Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genet. Mol. Res.* 1, 159–166.
- Amaglo, N.K., Bennett, R.N., Lo Curto, R.B., Rosa, E.A.S., Lo Turco, V., Giuffrida, A., Curto, A. Lo, Crea, F., Timpo, G.M., 2010. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *Food Chem.* 122, 1047–1054.
- Bálint, T. et al. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. *Aquatic Toxicology*, v. 33, n. 3/4, p. 279-295, 1995.
- Bertoletti, E. 2000. Estimativa de efeitos tóxicos com *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo
- Bertoletti, E., Domingues, D.F. 1991. Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos. Volume II – Testes crônicos com peixes. São Paulo, CETESB. Relatório Técnico, p.18

Canadian Centre for Occupational Health and Safety, 2013. What is a LD₅₀ and LC₅₀? OSH
Answers Fact Sheets. Available in:

<https://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>

Coelho, J.S., Santos, N.D.L., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Ferreira, R.S., Zingali, R.B.,

Coelho, L.C.B.B., Leite, S.P., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., 2009. Effect of
Moringa oleifera lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae.
Chemosphere 77, 934–938.

Crivelenti, L.Z., Guilherme, L.C., Morelli, S., Borin, S., 2011. Toxicidade do Inseticida
Organofosforado Abate® em Alevinos de *Poecilia reticulata*. J. Brazilian Soc.
Ecotoxicol. 6, 65–68.

Di Paolo, C., Seiler, T.-B., Keiter, S., Hu, M., Muz, M., Brack, W., Hollert, H., 2015. The
value of zebrafish as an integrative model in effect-directed analysis - a review. Environ.
Sci. Eur. 27, 8.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid
colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88–
95.

Green, A.A., Hughes, L., 1955. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous
solution of salts and organic solvents, in: Colowick, S., Kaplan, N. (Eds.), Methods in
Enzymology. Academic Press, New York, pp. 67–90.

Hadjinicolaou J. & Spraggs L.D. 1988. Avoidance reactions of fish to an industrial effluent
and its toxic components. Gruber, D. & Diamond, J. (eds): Automated Biomonitoring:
living sensors as environmental monitors. Ellis Harwood Ltd / John Wiley & Sons, New
York.

- Kane, A.S., Salierno, J.D., Gipson, G.T., Molteno, T.C.A., Hunter, C., 2004. A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress responses of fish. *Water Res.* 38, 3993–4001.
- Little, E.E., Finger, S.E., 1990. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 13-19.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275
- Newman, M.C., Clementz, W.H., 2008. Sublethal effects. In: Newman, M.C., Clementz, W.H. (Eds.), *Ecotoxicology: A Comprehensive Treatment*. CRC Press, Boca Raton, pp. 163-187.
- Ohia, C. M. D; Ana, G. R. E. E and Bolaji, O. M., 2013. Larvicidal Activity of Aqueous Extract of, 2013. 176–185.
- Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36, 113-118.
- Santos, N.D.L., Moura, K.S., Napoleão, T.H., Santos, G.K.N., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., 2012. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. *PLoS ONE* 7, e0044840.
- Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., Braunbeck, T., 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments-A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod. Toxicol.* 33, 128–132.
- Triebkorn, K.W., Köler, H.R., Honnen, W., Schramm M., Adams S.M., Müller E.F., 1997. Induction of heat shock proteins, changes in liver structure, and alterations of fish

behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field J Aquat Ecosystem Stress and Recovery; 6:57-73

Vieira, A.M.S., Vieira, M.F., Silva, G.F., Araújo, Á.A., Fagundes-Klen, M.R., Veit, M.T., Bergamasco, R., 2010. Use of *Moringa oleifera* seed as a natural adsorbent for wastewater treatment. Water. Air. Soil Pollut. 206, 273–281.

World Health Organization, 2016a. Chikungunya. Fact sheet 327. Updated April 2016. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>

World Health Organization, 2016b. Dengue and severe dengue. Fact sheet 117. Updated July 2016. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>

World Health Organization, 2016c. Zika virus. Fact sheet. Updated 6 September 2016. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>

5 CONCLUSÃO

O extrato de sementes e WSMoL causaram efeitos letais e sub-letais para larvas de *D. rerio* em concentrações que são efetivas no controle do *A. aegypti*. Dessa forma, é recomendado que o extrato de sementes e WSMoL não sejam aplicados em locais onde existam organismos não-alvo.