

ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E ACETILCOLINESTERASE PELA FRAÇÃO METANÓLICA DE CROTON CAMPESTRIS EM DROSOPHILA MELANOGASTER

Karen Kich Gomes ¹

Giulianna Echeverria Macedo ²

Nathane Rosa Rodrigues ³

Jéssica Ferreira Rodrigues ⁴

Cynthia Camila Ziech ⁵

Thaís Posser ⁶

Resumo:

O uso de agroquímicos tem crescido muito, considerado o método mais eficiente para combate de organismos-praga na agricultura. O uso indiscriminado destes produtos pode levar a efeitos nocivos à natureza e a saúde humana, com aumento da incidência de doenças neurodegenerativas. Assim, a pesquisa por compostos que atuem na prevenção, tratamento de distúrbios associados à intoxicação por agroquímicos torna-se relevante. *Croton campestris* A. St.-Hil (pop. "velame do campo") é uma espécie da família Euphorbiaceae de uso medicinal. É uma planta nativa do Bioma Cerrado, encontrado principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. *Drosophila melanogaster*, (pop. "mosca da fruta"), apresenta características que a tornam um modelo alternativo excelente para estudos toxicológicos. Dentre estas, seu pequeno tamanho, ciclo de vida curto, fácil manipulação, tamanho reduzido, e similaridade de genes envolvidos com doenças em mamíferos. Trabalhos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram um efeito protetor da Fração metanólica de *Croton campestris* (FMCC) sob toxicidade do agroquímico clorpirifós, em *D. melanogaster*. Com isso, o objetivo do presente trabalho é avaliar uma possível alteração da atividade de enzimas antioxidantes e acetilcolinesterase frente à co-exposição de *D. melanogaster* com a (FMCC) e o inseticida Clorpirifós. A análise do perfil fitoquímico (FMCC) foi realizada por HPLC-DAD, para a presença de diferentes compostos. No modelo de exposição, moscas fêmeas da espécie *D. melanogaster* (1-4 dias) foram divididas em 4 grupos de 40 moscas por grupo em triplicata: controle (sacarose 1% pipetada em algodão), FMCC (0,1 mg/ml dissolvida em sacarose 1% pipetada sobre algodão), CP (0,25 ppm em sacarose 1%) e CP + FMCC por 48 horas. Após término do período de exposição foi realizada a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) e Acetilcolinesterase (AChE) por ensaios espectrofotométricos. O perfil cromatográfico da FMCC revelou a presença de ácidos gálico, clorogênico e caféico, catequinas, rutina, quercetina, quercetrina, campferol. Os compostos majoritários foram a quercetina, ácido caféico, e ácido clorogênico. No presente estudo, o tratamento com clorpirifós aumentou a atividade da enzima SOD. Este dado pode indicar um possível aumento de espécies reativas, entre estas o radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pelo CP. O co-tratamento de CP + FMCC impediu a indução da atividade da SOD causada pelo CP indicando uma ação antioxidante do composto. Somente o co-tratamento de CP e FMCC estimulou a atividade de GST em relação ao controle. A atividade da enzima Acetilcolinesterase foi inibida significativamente pelo CP. Esta inibição não ocorreu na presença da fração metanólica. A inibição da enzima Acetilcolinesterase no grupo CP está relacionada ao potencial anticolinesterásico dos organofosforados impedindo a hidrólise da acetilcolina, neurotransmissor encontrado no sistema nervoso. Exposição a estes compostos têm sido relacionada ao surgimento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson. Os dados obtidos sinalizam para uma ação terapêutica da planta frente ao danos neurológicos causados pelos organofosforados. Contudo, nossos dados demonstram o efeito antioxidante in vivo da FMCC e seu potencial em impedir a inibição da atividade acetilcolinesterase pelo organofosforado CP.

Palavras-chave: Neuroprotetor; Extrato; Agroquímico

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E ACETILCOLINESTERASE PELA FRAÇÃO METANÓLICA DE CROTON CAMPESTRIS EM DROSOPHILA MELANOGASTER

¹ Aluno de graduação. karenkich.bio@gmail.com. Autor principal

² Aluno de pós-graduação. giulianna.echeverria@gmail.com. Co-autor

³ Aluno de pós-graduação. nathane.r.rodrigues@gmail.com. Co-autor

⁴ Aluno de graduação. jfrodrigues@gmail.com. Co-autor

⁵ Aluno de graduação. cynthia.ziech@gmail.com. Co-autor

⁶ Docente. thaisposser@gmail.com. Orientador



ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E ACETILCOLINESTERASE PELA FRAÇÃO METANÓLICA DE *Croton campestris* EM *Drosophila melanogaster*

1. INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira sofreu um processo de expansão e aumento da produtividade nas últimas décadas trazendo por um lado, benefícios, como o aumento na demanda de produtos agrícolas e adoção de tecnologias modernas visando produtividade em massa e geração de renda (BONELLI, 2001). Por outro lado, a expansão da agricultura está associada ao uso de agroquímicos, considerado o método mais eficiente para combate de organismos-praga na agricultura. O uso constante destes produtos pode levar a efeitos nocivos à natureza e a saúde humana, com aumento da incidência de doenças neurodegenerativas (JARDIM et al., 2009). Segundo a OMS (1990) é estimado que ocorram no mundo cerca de três milhões de intoxicações agudas por agroquímicos com 220 mil mortes por ano (SOARES, 2010). Neste sentido, a pesquisa por compostos que atuem na prevenção e tratamento de distúrbios associados à intoxicação por agroquímicos torna-se relevante.

Croton campestris A. St.-Hil (pop. “velame do campo”) é uma espécie da família Euphorbiaceae de uso medicinal. É uma planta nativa do Bioma Cerrado, sendo um arbusto de 1-2 metros de altura, sendo encontrado principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste do Brasil (SANTOS; SCHRIPSEMA; KUSTER, 2005).

Drosophila melanogaster, conhecida como a mosca da fruta, apresenta uma série de características que a tornam um modelo alternativo excelente para estudos toxicológicos. Dentre estas, incluem-se seu pequeno tamanho, ciclo de vida curto, fácil manipulação, tamanho reduzido, dimorfismo sexual, e similaridade de genes envolvidos com doenças em mamíferos (PANDEY; NICHOLS, 2011)(PAULA et al., 2012).

Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo, a fim de investigar o efeito protetor da fração metanólica de *Croton campestris* frente ao dano causado pela exposição ao agroquímicos foi observado uma proteção frente à diminuição da sobrevivência causada pelo organofosforado Clorpirifós (CP) e restauração do déficit locomotor em *D. melanogaster* quando expostas CP). A partir destes resultados, demos continuidade ao estudo e avaliamos uma possível alteração da atividade de enzimas antioxidantes e acetilcolinesterase frente à co-exposição de *D. melanogaster* com a Fração Metanólica de *Croton campestris* (FMCC) e o inseticida organofosforado CP.

2. METODOLOGIA

As plantas foram coletadas na Chapada do Araripe, CE em colaboração com pesquisadores da URCA. A preparação da fração metanólica do extrato foi realizada de acordo com (MATOS, 1997). A análise do perfil fitoquímico da fração metanólica das folhas de *Croton campestris* (FMCC) foi realizada por HPLC-DAD, para a presença de diferentes compostos tendo como referência o tempo de retenção de padrões comerciais. No modelo de exposição, moscas fêmeas da espécie *Drosophila melanogaster* (1-4 dias) foram divididas em 4 grupos de 40 moscas por

grupo em triplicata: controle (sacarose 1% pipetada em algodão), FMCC (0,1 mg/ml dissolvida em sacarose 1% –pipetada sobre algodão), CP (0,25 ppm em sacarose 1%) e CP + FMCC por 48 horas. Após término do período de exposição, grupos de 20 moscas foram homogeneizadas em 1 mL de Hepes 20 mM, pH 7,0, e centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para medição da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) e Acetilcolinesterase (AChE) por ensaios espectrofotométricos conforme protocolos descritos por Kostyuk and Potapovich (1989), Jakoby and Habig (1981) e Ellman et al. (1961) respectivamente. Análise estatística foi realizada através do teste Anova de uma via seguida pelo teste de Tukey ou Newman-keuls, diferenças entre grupos foram consideradas significativas quanto $p < 0,05$.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

O perfil cromatográfico da FMCC revelou a presença de ácidos gálico, clorogênico e caféico, catequinas, rutina, quercetina, quercetrina, campferol. Os compostos majoritários foram a quercetina (30,29 mg/g), ácido caféico (27,64 mg/g) e ácido clorogênico (19,25 mg/g).

Em estudos já realizados, foi observado uma diminuição da sobrevivência de *D. melanogaster* (queda de 34,17%) e diminuição da atividade locomotora de *D. melanogaster* quando expostas CP (queda de 58%). A co-exposição da FMCC + CP impediu o dano associado ao CP. No presente estudo, o tratamento com clorpirifós aumentou a atividade da enzima SOD (de 736,59 mU/mg de proteína para 1357,27 mU/mg de proteína). Este dado pode indicar um possível aumento de espécies reativas, entre estas o radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pelo CP. O co-tratamento de CP + FMCC impediu a indução da atividade da SOD causada pelo CP indicando uma ação antioxidante do composto. Somente o co-tratamento de CP e FMCC estimulou a atividade de GST em relação ao controle (de 100,28 para 184,87 mU/mg de proteína).

A atividade da enzima Acetilcolinesterase foi inibida significativamente pelo CP (de 156,78 para 79,12 mU/mg de proteína). Esta inibição não ocorreu na presença da fração metanólica. A inibição da enzima Acetilcolinesterase no grupo CP está relacionada ao potencial anticolinesterásico dos organofosforados impedindo a hidrólise da acetilcolina, neurotransmissor encontrado no sistema nervoso implicado—na condução dos impulsos nervosos. Exposição a estes compostos têm sido relacionada ao surgimento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (SANTOS, et al. 2016). Os dados obtidos sinalizam para uma ação terapêutica da planta frente ao danos neurológicos causados pelos organofosforados.

Em conclusão nossos dados demonstram o efeito antioxidante *in vivo* da FMCC e seu potencial em impedir a inibição da atividade acetilcolinesterase pelo organofosforado CP. Este efeito pode ser atribuído à presença de diferentes compostos fenólicos na fração metanólica atuando de forma sinérgica.

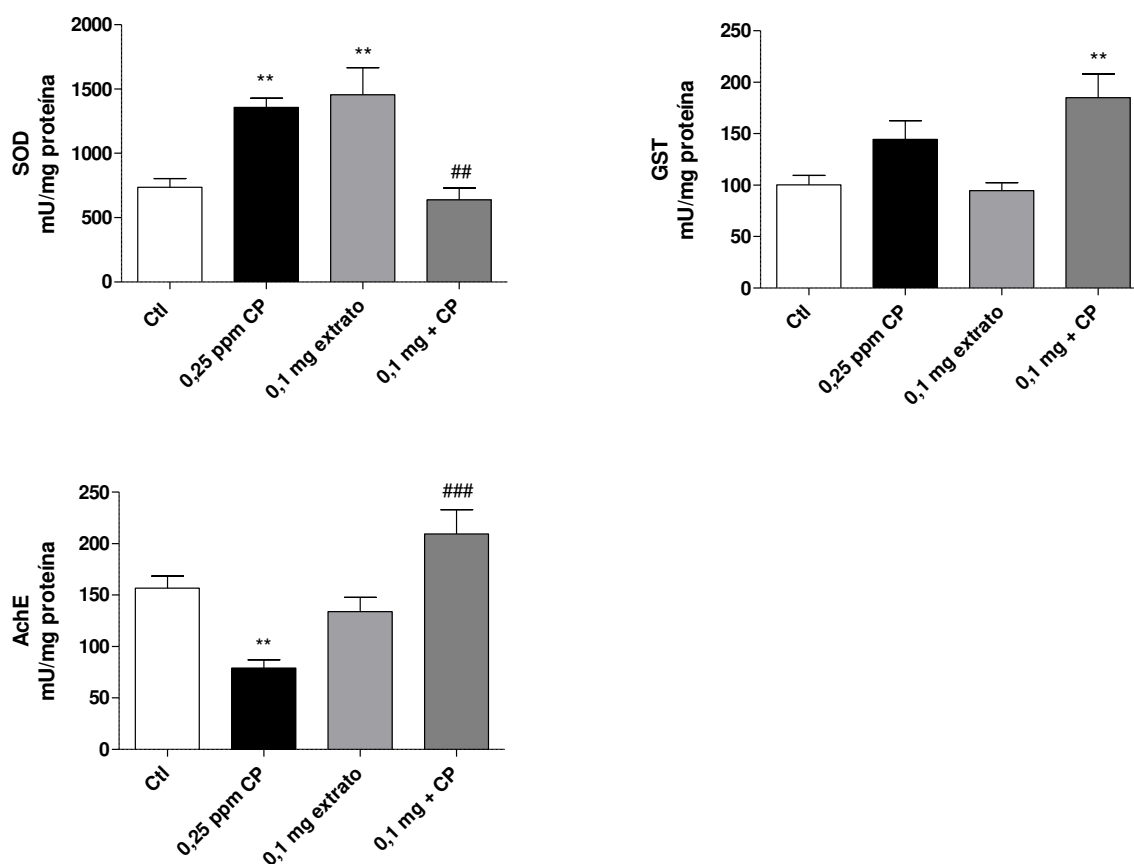


Figura 2. Análise da atividade das enzimas SOD, Calase e Acetilcolinesterase. Figura (A) Análise da atividade da enzima Superóxido Dismutase. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, ## $p < 0,01$ em relação ao grupo 0,25 ppm CP. (B) Análise da atividade da enzima Glutathione S transferase. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, (C) Análise da atividade da enzima Acetilcolinesterase. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, ### $p < 0,001$ em relação ao grupo 0,25 ppm CP.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados evidenciam o potencial protetor da FMCC frente à toxicidade causada pelo organofosforado CP *in vivo*. A exposição humana a este grupo de compostos está associada ao surgimento de doenças neurodegenerativas, que são caracterizadas pela perda dos neurônios dopaminérgicos. Entretanto, mais estudos são necessários para compreender os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos protetores da Fração metanólica de *Croton campestris*.

5. REFERÊNCIAS

BONELLI, Regis. Impactos econômicos e sociais de longo prazo da expansão agropecuária no Brasil: revolução invisível e inclusão social. Textos para discussão 838. Rio de Janeiro. Embrapa, 2001. [acesso em 19 set 2017].

Disponível em: http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/TDs/td_0838.pdf.

ELLMAN, George et al., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, vol. 7, p.88-90, 1961.

JAKOBY; HABIG Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol*, 1981.

JARDIM, Isabel et al., Residues of pesticides in food: a global environmental preoccupation Focussing on apples. *Química nova*, vol.32 no.4, 2009.

JÚNIOR, Francisco et al., Oxidant effects and toxicity of *Croton campestris* in *Drosophila melanogaster*. *Pharmaceutical Biology*, 2016.

KOSTYUK, Vlademir; POTAPOVICH, Alla. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochemistry International*. vol.19, p. 1117-1124, 1989.

MATOS, FJA. Introdução a Fitoquímica Experimental, 2ª ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

PANDEY, Udai; NICHOLS, Charles. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological Reviews*, v. 63, n. 2, p. 411–36, 2011.

PAULA, M.T. et al. Effects of Hg (II) exposure on MAPK phosphorylation and antioxidant system in *D. melanogaster*. *Environm: Toxicol*, v.29, p.621-30, 2012.

SANTOS, Paula; SCHRIPEMA, Jan; KUSTER, Ricardo. Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 4, p. 321-5, 2005.

SANTOS , et al, Acetylcholinesterase - AChE: A Pharmacological Interesting Enzyme. *ev. Virtual Quim*,8(6), 1818-1834, 2016. Data de publicação na Web:11 de novembro de 2016. [acesso em 19 set 2017].

Disponível em: <http://rvq.sbg.org.br/imagebank/pdf/v8n6a04.pdf>.

SOARES, Wagner. Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura. Tese (Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente) Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2010.