NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR EXTRATO E FRAÇÕES DE MANILKARA RUFULA EM BARATAS DA ESPÉCIE NAUPHOETA CINEREA

Bruna Trindade Borges [1]

Raquel Soares Oliveira [2]

Maria Eduarda Rosa [3]

Chariston André Dal Belo [4]

Yuri Correia Barreto [5]

Lúcia Helena do Canto Vinadé [6]

Patrícia de Brum Vieira [7]

Resumo:

Plantas adaptadas a regiões de clima extremo como o bioma da Caatinga possuem uma variedade de metabólitos secundários. A Manilkara rufula é uma planta nativa dessa região, havendo poucos relatos sobre sua ação biológica. Buscando estudar a espécie M. rufula, análises entomotóxicas foram realizadas com o objetivo de avaliar a atividade do extrato bruto e frações enriquecidas desta planta sobre o sistema nervoso de insetos. Para isso, baratas da espécie Nauphoeta cinerea foram utilizadas como modelo experimental. O extrato bruto de M. rufula (EBMR) e suas frações metanólicas (FMMR) e aquosas (FAMR) foram preparadas em Milli-Q e DMSO 0,5% nas seguintes concentrações: 25, 50 e 100 (EBMR) e 10, 20 e 40 µg/g de animal (frações). Também foram ensaiados os neuromoduladores octopamina (15 µg/g de animal) e fentolamina (0,01 µg/g de animal), um antagonista de receptores octopaminérgicos. Como testes comportamentais foram realizados: ensaio de grooming e ensaio dos padrões de locomoção. Para teste eletrofisiológico foi utilizado o ensaio com registros dos potenciais de ação espontâneos sensoriais (PAES) da pata dos insetos. Houve uma diminuição da atividade locomotora, perfil exploratório e comportamento de grooming para todas as doses administradas do EBMR. Sendo o grooming de pernas modulado pela via octopaminérgica, a octopamina induziu o aumento desse parâmetro, que foi novamente diminuido pela administração prévia do EBMR. Todas as doses do EBMR induziram um aumento da amplitude máxima do pico dos (PAES). Esse parâmetro teve uma diminuição quando a octopamina foi administrada, porém, sofreu um aumento com a administração prévia de EBMR; semelhante à ação da fentolamina, que teve seu efeito complementado pelo EBMR. O número de eventos (spikes) não sofreu alterações pela ação isolada do EBMR, porém, quando este foi administrado previamente, reverteu o efeito da octopamina e complementou a ação da fentolamina para esse parâmetro. Ambas FAMR e FMMR (10 e 40 µg/g de animal) induziram um aumento na amplitude dos PAES. Porém, apenas a FAMR aumentou a duração destes eventos. Considerando que a FMMR não obteve modulação sobre esse parâmetro, sugere-se que a FAMR seja necessária para os efeitos do EBMR. Os dados obtidos demonstram o potencial biotecnológico da planta Manilkara rufula, bem como seu efeito entomotóxico em baratas da espécie Nauphoeta cinerea. Sugere-se que o EBMR e suas frações possuam uma ação equivalente a antagonistas de receptores octopaminérgicos, tendo em vista que os resultados obtidos com a administração da octopamina indicam a atividade dos compostos principalmente nesta via.

Palavras-chave: Entomotoxicidade; Sistema nervoso; Eletrofisiologia; Metabolismo secundário; Bioinseticida

Modalidade de Participação: Pós-Graduação

NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR EXTRATO E FRAÇÕES DE MANILKARA RUFULA EM BARATAS DA ESPÉCIE NAUPHOETA CINEREA

[1] Aluno de pós-graduação. bru.tborges@gmail.com. Autor principal

[2] Aluno de Pós-graduação. raquelsoaresoliv@gmail.com. Co-autor

[3] Aluno de graduação. rosaedumaria@gmail.com. Co-autor

[4] Docente. charistondb@gmail.com. Co-autor

[5] Aluno de graduação. y.barreto9507@gmail.com. Co-autor

[6] Docente. luvinade@gmail.com. Orientador

[7] Pesquisadora. patriciasbrum@yahoo.com.br. Co-orientador

NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR EXTRATO E FRAÇÕES DE *Manilkara rufula* EM BARATAS DA ESPÉCIE *Nauphoeta cinerea*

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de evolução garantiu às plantas a capacidade de sintetizar metabólitos secundários de suma importância à sobrevivência. Muitos destes metabólitos estão envolvidos na defesa das plantas contra herbívoros e outras pragas, despertando o interesse no uso destes como bioinseticidas (MEDEIROS, 2010).

A Caatinga, bioma exclusivamente brasileiro, apresenta uma grande biodiversidade. Inúmeras espécies endêmicas e nunca estudas de plantas são encontradas neste bioma, as quais estão adaptadas ao clima extremo da Caatinga, resultando na produção de metabólitos secundários raros e inéditos (GOMES et al. 2008), destacando o potencial e o interesse destes compostos. *Manilkara rufula* é uma planta endêmica da Caatinga, no entanto, poucos estudos são encontrados na literatura acerca desta espécie. Os que são encontrados demonstram a atividade antiparasitária da planta frente ao parasito *Trichomonas vaginalis,* deixando evidente o potencial da planta *M. rufula* (DE BRUM VIEIRA et al. 2017).

Alternativas ao uso de inseticidas químicos são necessárias, pois estes compostos ocasionam prejuízos ao meio ambiente e apresentam crescente desenvolvimento de resistência. Desta forma, inseticidas de origem vegetal demonstram um elevado potencial. Para isso, um modelo de estudo bastante utilizado é a barata da espécie *Nauphoeta cinerea*, nosso grupo tem demonstrado resultados promissores no âmbito da eletrofisiologia e do potencial farmacológico de compostos naturais (STURMER et al., 2014; LEAL et al., 2018). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade do extrato bruto e de frações enriquecidas da planta *M. rufula* sobre o sistema nervoso de baratas da espécie *N. cinerea*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo foram utilizadas baratas adultas da espécie *N. cinerea*. O extrato bruto (EBMR) e as frações aquosa (FAMR) e metanólica (FMMR) foram dissolvidos em DMSO 0,5%, obtendo as seguintes concentrações: 25, 50 e 100 µg/g de animal (EBMR) e 10, 20 e 40 µg/g de animal (frações). Os testes comportamentais foram realizados por dois métodos: ensaio de *grooming* (n=30) (STURMER et al. 2014) e ensaios de locomoção (n=34) (LEAL et al. 2018). Neste último, foram avaliados parâmetros como distância percorrida, número de paradas e perfil exploratório do inseto. Como teste eletrofisiológico foi utilizado o ensaio com registros de potenciais de ação espontâneos sensoriais (PAES) da pata do inseto (n=6), onde eletrodos foram inseridos no fêmur e os sinais do estímulo (1.0 kHz) foram registrados durante 1 hora (LEAL et al. 2018). Além do EBMR e as frações da planta *M. rufula*, neuromoduladores como a octopamina (15 µg/g de animal) e a fentolamina (0,1 µg/g de animal), antagonista de receptores octopaminérgicos também foram utilizados em determinados protocolos. A não ser que especificado, a concentração de extrato utilizada nos experimentos de cotratamento é 50 µg/g de animal. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M). As análises estatísticas foram conduzidas pelo teste *t* de Student ou ANOVA, seguido de Tukey, Dunnett ou Bonferroni ($p<0,05$). Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism 6.0 (Software Inc., San Diego, CA).

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

O extrato e as frações da *M. rufula* induziram mudanças significativas no comportamento e na eletrofisiologia dos insetos. A atividade locomotora sofreu alterações em

todos os parâmetros avaliados, de forma dose-dependente (Fig. 1). O EBMR (50 e 100 µg/g de animal) induziu uma diminuição da distância percorrida pelo inseto (Fig. 1A) que, consequentemente, resultou no aumento no tempo de parada (Fig. 1C). Em relação à imobilidade, o grupo tratado com 100 µg/g de EBMR demonstrou um aumento no número de episódios de imobilidade (903±8 n/min), comparado aos 545±4 n/min do controle (Fig. 1B). Esses dados indicam a indução de letargia pelo extrato bruto de *M. rufula* nos insetos e na maior dose (100 µg/g de animal) observou-se um perfil exploratório significativamente reduzido quando comparado ao controle (Fig. 1D).

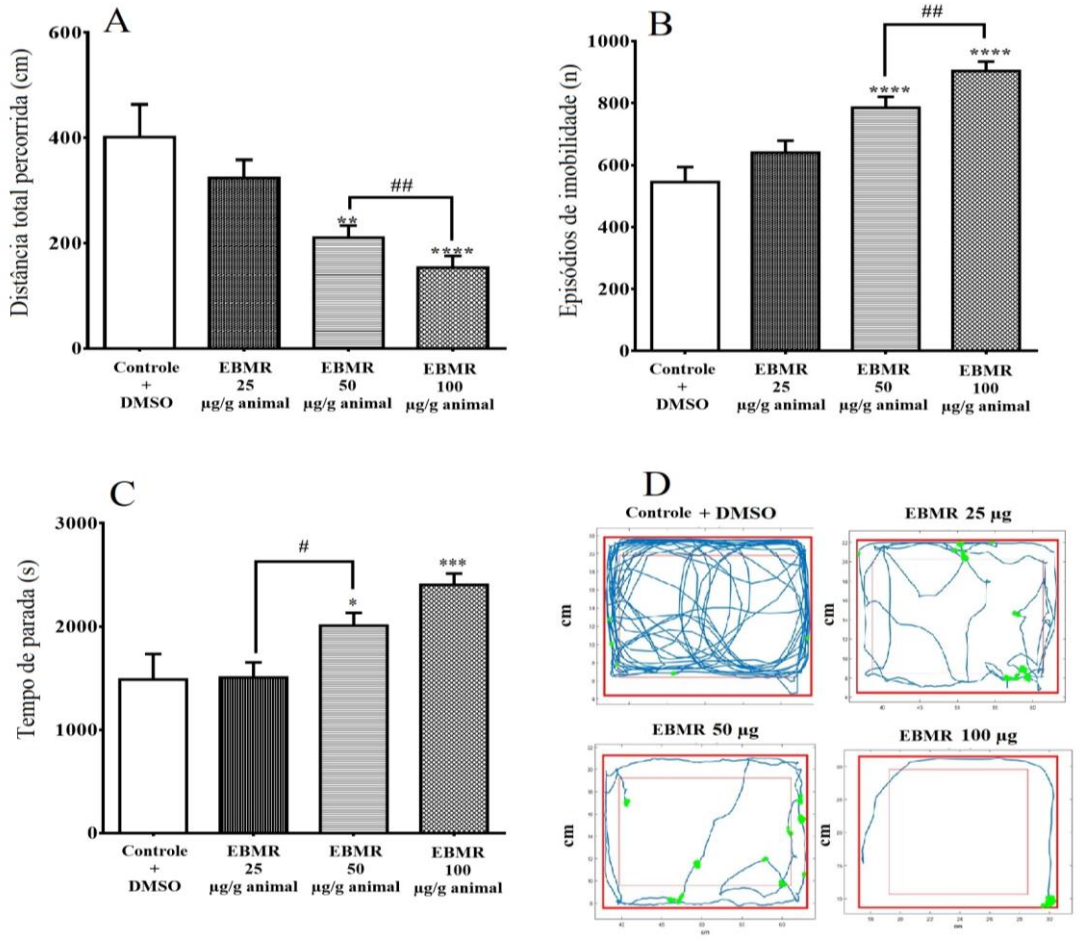


Figure 1: Efeito modulatório de EBMR na atividade locomotora de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. Dados expressos como média ± E.P.M. One-way Anova seguido de teste Dunnett (*p<0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001) e Tukey para comparações entre os tratamentos (#p<0,05, ##p<0,01). A autora (2018).

O extrato bruto induziu alterações no *grooming* de perna (Fig. 2). Os animais tratados com o EBMR (50 µg/g de animal) e o controle apresentaram um tempo de *grooming* de perna de 5±4 s/30 min e 59±8 s/30 min., respectivamente (Fig.2A). Considerando que o padrão de locomoção dos insetos é controlado por iniciadores centrais que partem dos gânglios torácicos, e estes são modulados por vias octopaminérgicas (MARDER, 2001), sugere-se o envolvimento desta via nos efeitos induzidos pelo EBMR. Além disso, sabendo-se que a octopamina está envolvida diretamente no *grooming* de pernas do animal (WEISEL-EICHLER, 1999). Desta forma, octopamina (15 µg/g de animal) foi administrada nos insetos, resultando em um aumento significativo do tempo de *grooming* de perna (158±19 s/30 min.). O antagonista do receptor octopaminérgico, fentolamina (0,1 µg/g de animal), induziu uma diminuição do tempo de *grooming* de perna (17±3 s/30min). Em ensaios onde a octopamina foi administrada 15 min. antes do EBMR, observou-se a diminuição do tempo de *grooming* de

perna (62±10 s/30 min) comparado ao grupo octopamina (Fig. 2B). Esses dados indicam que os efeitos modulatórios do EBMR estão relacionados à octopamina, podendo ser inferida uma ação fentolamina-like do extrato, visto que o extrato reverte o efeito da monoamina.

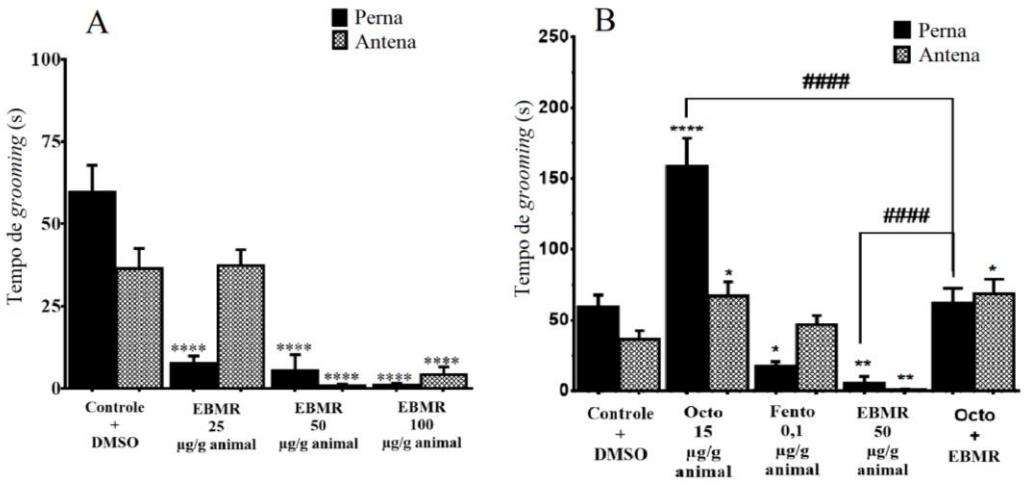


Figure 2: Efeito do EBMR, octopamina e fentolamina no *grooming* de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. Dados expressos como média ± E.P.M. One-way Anova seguido de teste Dunnett (**p*<0,05, ***p*< 0,01, ****p*< 0,001) e Tukey para comparações entre os tratamentos (#*p*<0,05, ##*p*<0,01). A autora (2018).

Observou-se uma modulação do extrato bruto de *Manilkara rufula* sobre o perfil dos potenciais de ação espontâneos sensoriais (PAES) (Fig. 3). Embora o número de eventos (spikes) não sido alterado significativamente (Fig. 3A), a amplitude máxima do pico dos PAES foi significativamente maior para todas as doses de EBMR administradas (Fig. 3B). Além disso, a duração dos potenciais de membrana sofreu um aumento significativo na dose de 50 µg/g de animal de EBMR (1,22±0,09 ms) em comparação com o controle (0,96±0,04 ms) (Fig. 3C). Esses dados sugerem uma atividade despolarizante do EBMR sobre as sensilas da perna do inseto, o que corrobora com o perfil letárgico do animal observado durante os ensaios comportamentais.

Para avaliar a participação da via octopaminérgica, os insetos foram administrados com octopamina (15 µg/g de animal), que reduziu significativamente a amplitude máxima do pico dos PAES (0,056±0,006 mV) em comparação ao controle (0,069±0,002 mV) (Fig. 3D). Quando a octopamina foi adicionada 10 min. após o EBMR, observou-se aumento desse parâmetro (0,074±0,01 mV) (Fig. 3D). O antagonista fentolamina (0,1 µg/g de animal), aumentou a amplitude máxima do pico dos PAES (0,14±0,02 mV) quando comparado ao controle (0,069±0,002 mV). Este efeito foi incrementado (0,21±0,01 mV) quando o EBMR foi administrado previamente nos animais (Fig. 3D).

Em relação ao número de eventos, o EBMR (50 µg/g de animal), isoladamente, não alterou significativamente o número de *spikes* (Fig. 3A). Porém, quando EBMR foi administrado previamente à octopamina (15 µg/g de animal), o extrato reverteu o aumento causado pela monoamina (número de eventos da octopamina e em cotratamento com extrato: 6078±161 e 4537±474 eventos, respectivamente) (Fig. 3E). Além disso, o EBMR também reforçou o efeito induzido pela fentolamina (0,1 µg/g de animal) (3638±373 eventos), diminuindo significativamente o número de spikes do antagonista (1225± 204 eventos) (Fig. 3E). Estes resultados reforçam a hipótese de que extrato bruto de *M. rufula* possui uma ação modulatória sobre o sistema nervoso dos animais fentolamina-like.

Tendo em vista que extratos brutos de plantas são formados por uma mistura complexa de compostos e que muitas vezes, estes compostos podem apresentar diferentes efeitos quando testados isoladamente, frações aquosa (FAMR) e metanólica (FMMR) obtidas

a partir do fracionamento do extrato bruto de *M. rufula* foram testadas nos PAES. Ambas as frações aumentaram significativamente a amplitude máxima dos picos nas doses de 10 e 40 µg/g de animal (Fig. 4A e B). Além disso, a FAMR, na dose de 40 µg/g de animal, induziu um aumento na duração dos PAES (1,26±0,02 ms) em comparação ao controle (0,96±0,04 ms) (Fig. 4C). Por outro lado, a FMMR não apresentou efeito significativo sobre esse parâmetro (Fig. 4D). Esse aumento na duração dos PAES induzido por FAMR foi bastante semelhante ao observado por EBMR (50 µg/g de animal) (Fig. 3C), considerando a ausência de significância nos efeitos apresentados pela FMMR, é possível sugerir que a FAMR seja a principal responsável pelos efeitos do EBMR.

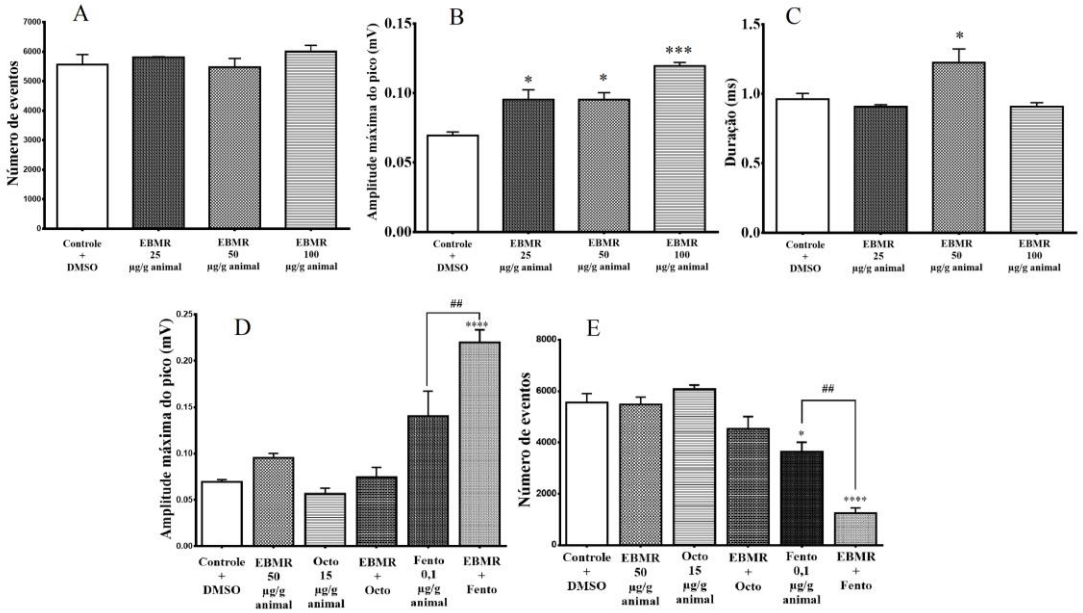


Figura 3: Efeito do EBMR, octopamina e fentolamina sobre os registros eletrofisiológicos dos potenciais de ação espontâneos sensoriais de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. Dados expressos como média ± E.P.M. One-way Anova seguido de teste Dunnett (**p*<0,05, ***p*< 0,01, ****p*< 0,001, ****p<0,0001) e Tukey para comparações entre os tratamentos (#*p*<0,05, ##*p*<0,01). A autora (2018).

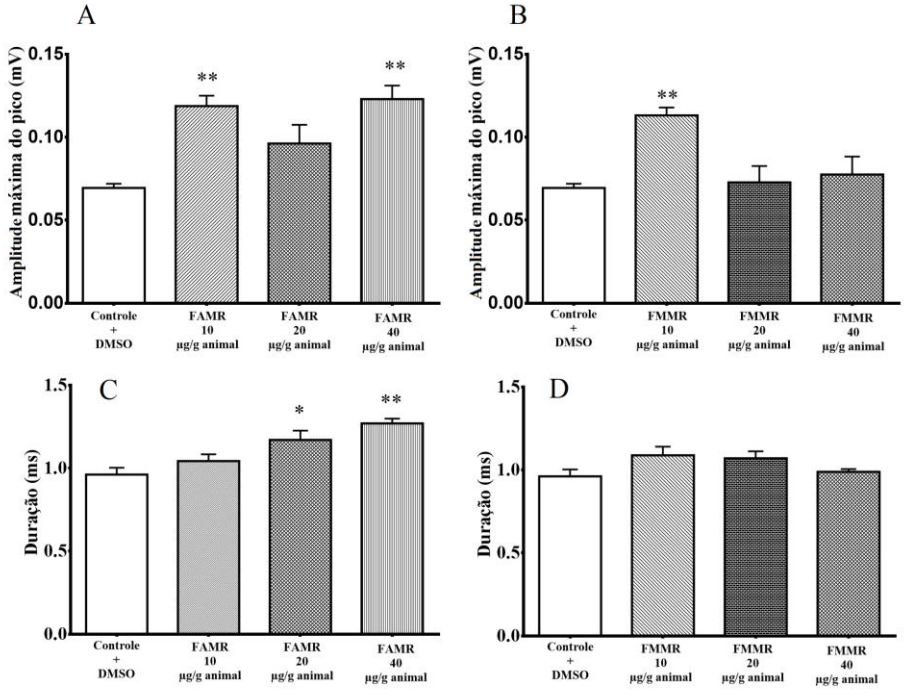


Figura 4: Efeito da FAMR e FMMR sobre os registros eletrofisiológicos dos potenciais de ação espontâneos sensoriais de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. Dados expressos como média ± E.P.M. One-way Anova seguido de teste Dunnett (*p<0,05, **p< 0,01). A autora (2018).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstrados no presente estudo indicam que ambos extrato e frações de *M. rufula* exercem uma atividade entomotóxica em baratas da espécie *N. cinerea* e que a FAMR aparenta ser determinante para esse efeito. Além disso, sugere-se que a via octopaminérgica tenha um papel importante nessa modulação. A entomotoxicidade pode ser comprovada pela indução de letargia durante os testes de locomoção, diminuição do comportamento de *grooming* e alterações eletrofisiológicas dos potenciais de ação espontâneos das sensilas da pata do animal. Em conjunto, essas modulações representam uma perda significativa do padrão comportamental e fisiológico do inseto, indicando que os compostos encontrados em *M. rufula* apresentam um potencial como bioinseticida.

REFERÊNCIAS

DE BRUM VIEIRA, P., SILVA, N. L. F., MENEZES, C. B., DA SILVA, M. V., SILVA, D. B., LOPES, N. P., DA SILVA A.G., DA SILVA M.G., BASTIDA J., MACEDO A.J., TASCA T. Trichomonicidal and parasite membrane damaging activity of bidesmosic saponins from *Manilkara rufula*. **PloS one**, v. 12, n. 11. 2017.

GOMES, E.C.B.; VILAR, J.; PEREZ, F.C.; VILAR, J.; FREIRE, R.; DE LIMA, J.A.; DIAS, T. Plantas da caatinga de uso terapêutico: levantamento etnobotânico. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia.** v. 5. n.2. 2008.

LEAL, A.P., OLIVEIRA, R.S., PERIN, A.P.A., BORGES, B.T., DE BRUM VIEIRA, P., DOS SANTOS, T.G., VINADÉ, L., VALSECCHI C., DAL BELO, C.A. Entomotoxic activity of *Rhinella icterica* (Spix, 1824) toad skin secretion in *Nauphoeta cinerea* cockroaches: An octopamine-like modulation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2018.

MARDER E, BUCHER D. Central pattern generators and the control of rhythmic movements. **Current Biology.** 2001.

MEDEIROS, M.F.T. Historical Ethnobotany: an approach through historical documents and their implications nowadays. In: Albuquerque, U.P & Hanazaki, N. **Recent Developments and Case Studies in Ethnobotany**. Recife: NUPEA, n. 287, p. 127-142. 2010.

STÜRMER, G.D., DE FREITAS, T.C., DE AVILA HEBERLE, M., DE ASSIS, D.R., VINADÉ, L., PEREIRA, A.B., FRANCO, J.L. AND DAL BELO, C.A. Modulation of dopaminergic neurotransmission induced by sublethal doses of the organophosphate trichlorfon in cockroaches. **Ecotoxicology Environmental Safety.** n. 109, p. 56-62. 2014.