

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**GIULIANNA ECHEVERRIA MACEDO**

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL BIOINSETICIDA DO  
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE *Croton campestris* A. St.-Hill EM  
MODELO DE *Drosophila melanogaster***

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

São Gabriel

2014

**GIULIANNA ECHEVERRIA MACEDO**

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL BIOINSETICIDA DO  
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE *Croton campestris* A. St.-Hill EM  
MODELO DE *Drosophila melanogaster***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à comissão avaliadora de graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa *campus* São Gabriel, RS, Brasil, para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Thaís Posser

Coorientador: Jeferson Luis Franco

**São Gabriel**

**2014**

**GIULIANNA ECHEVERRIA MACEDO**

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL BIOINSETICIDA DO  
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE *Croton campestris* A. St.-Hill EM  
MODELO DE *Drosophila melanogaster***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à comissão avaliadora de graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa *campus* São Gabriel, RS, Brasil, para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Área de concentração: Bioquímica

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 21 de Março do ano 2014.

Banca examinadora:



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thaís Posser

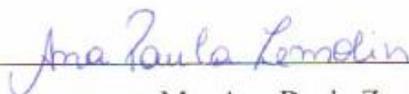
Orientadora

UNIPAMPA



Prof. Dr. Jeferson Luis Franco

UNIPAMPA



Me. Ana Paula Zemolin

UFSM

“Dedico este trabalho aos meus amados pais Zilmar e Cristina, por sempre estarem do meu lado e me apoiarem em todos os momentos.”

“Se não puder se destacar pelo talento,  
vença pelo esforço.”

Dave Weinbaum

## RESUMO

O Brasil possui um vasto território e um grande número de espécies vegetais. Apesar disso, há poucos estudos focados para o potencial biotecnológico da sua biodiversidade. Os vegetais possuem metabólitos secundários, substâncias com reconhecidas propriedades biológicas, que podem servir para a sua defesa, ou como atrativos para outros organismos. *Croton campestris*, pop. Velame do Campo é um arbusto encontrado nas regiões Nordeste e Sudeste do país, utilizado popularmente para diversos fins terapêuticos, porém pesquisas que descrevam a toxicidade *in vivo* desta planta são escassas. Portanto, o presente estudo teve por objetivo a investigação da toxicidade e da possível atividade bioinseticida do extrato hidroalcoólico de folhas de *C. campestris* em *Drosophila melanogaster*. *D. melanogaster*, conhecida como a mosca da fruta, é um modelo biológico ideal para biensaio, devido suas inúmeras vantagens em pesquisa. Para a realização dos experimentos, moscas adultas de ambos os sexos foram tratadas com chumaço de algodão embebido com soluções definidas como: controle (sacarose 1%), 0,1 1 10 e 50mg/mL do extrato diluído em sacarose 1% durante 07 dias (mortalidade) e 72h (atividade locomotora e demais ensaios bioquímicos). Para estimar a sobrevivência, as moscas mortas foram contadas diariamente até o término do tratamento. A atividade locomotora foi avaliada através do teste de Geotaxia Negativa, e os demais ensaios bioquímicos envolveram: a análise da viabilidade celular pelo ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) e da redução da fluorescência da Resazurina; análise do estresse oxidativo através da oxidação da 2'7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA); determinação de Tióis; atividade das enzimas antioxidantes catalase, glutathione S-transferase, superóxido dismutase e da enzima acetilcolinesterase; fosforilação das proteínas MAPK, ERK, JNK e p38; atividade antioxidante *in vitro* através dos ensaios de DPPH, FRAP e ABTS<sup>+</sup>; e posteriormente o efeito de *C. campestris* em associação ao herbicida Paraquat. Deste modo, nossos resultados demonstraram que após tratamento de 07 dias *C. campestris* causou significativa mortalidade das moscas, e após tratamento de 72 horas diminuiu a atividade locomotora, reduziu a viabilidade celular, também houve um aumento do índice geral de estresse oxidativo, e da atividade das enzimas antioxidantes, aumento da fosforilação de p38, e inibição da JNK2. Além disso, *C. campestris* potencializou o efeito de Paraquat, induzindo a mortalidade e causando déficit locomotor em *D. melanogaster*. Sendo assim, os

dados obtidos neste trabalho demonstram pela primeira vez, a toxicidade de *C. campestris* e o seu potencial bioinseticida e biotecnológico.

Palavras-chave: *Croton campestris*. *Drosophila melanogaster*. Bioinseticida. Viabilidade celular. Toxicidade.

## ABSTRACT

Brazil has a vast territory and a large number of plant species. Despite this, there are few studies focusing on biotechnological potential of its biodiversity. Plants have secondary metabolites, substances with known biological properties, which may serve as a defense, or as attractive to organisms. *Croton campestris*, pop. Velame do campo is a shrub found in the Northeast and Southeast regions of the country, popularly used for therapeutic purposes, but research describing the *in vivo* toxicity of this plant are scarce. Therefore, the present study was aimed to investigate the toxicity and possible bioinsecticide activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *C. campestris* in *Drosophila melanogaster*. *D. melanogaster*, known as the fruit fly, is an ideal biensaio because of its numerous advantages in biological research model. For the experiments, adult flies of both sexes were treated as follows: control (1% sucrose), 0.1 1 10 and 50mg/mL of extract diluted in 1% sucrose for 07 days (mortality) and 72h (locomotor activity and other biochemical assays). To estimate survival, dead flies were counted daily until the end of treatment. Locomotor activity was evaluated using the Negative Geotaxis assay and other biochemical tests involved: analysis of cell viability assay by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and fluorescence reduction of Resazurin; analysis of oxidative stress by oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA); determination of thiols; activity of antioxidant enzymes catalase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase, and enzyme acetylcholinesterase; phosphorylation of MAPK, ERK, JNK and p38 proteins, *in vitro* antioxidant activity through DPPH assays, FRAP and ABTS<sup>+</sup>, and subsequently the effect of *C. campestris* in combination with herbicide Paraquat. Thus, our results demonstrated that after 07 days of treatment *C. campestris* caused significant mortality of flies, and 72 hours after treatment decreased locomotor activity, reduced cell viability, there was also an increase in the general index of oxidative stress, and activity of antioxidant enzymes, increased phosphorylation of p38 and inhibition of JNK2. In addition, *C. campestris* potentiated the effect of Paraquat, inducing locomotor deficits and causing mortality in *Drosophila melanogaster*. Therefore, the data obtained from this study demonstrate for the first time, the toxicity of *C. campestris* and its potential biopesticide and biotechnology.

Keywords: *Croton campestris*. *Drosophila melanogaster*. Bioinsecticide. Cell viability. Toxicity.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>12</b> |
| <b>1.1 Biodiversidade brasileira</b> .....                                  | <b>12</b> |
| <b>1.2 Inseticidas/bioinseticidas e o meio ambiente</b> .....               | <b>13</b> |
| <b>1.3 Família Euphorbiaceae e o gênero <i>Croton</i></b> .....             | <b>14</b> |
| <b>1.4 Paraquat</b> .....   | <b>18</b> |
| <b>1.5 Estresse oxidativo</b> .....   | <b>18</b> |
| <b>1.6 Enzimas</b> .....  | <b>19</b> |
| <b>1.7 MAPK</b> .....   | <b>19</b> |
| <b>1.8 Modelo de estudo <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....            | <b>20</b> |
| <b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....  | <b>21</b> |
| <b>3 OBJETIVO GERAL</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....  | <b>22</b> |
| <b>4.1 <i>In vivo</i></b> .....   | <b>22</b> |
| <b>4.2 <i>In vitro</i></b> .....  | <b>22</b> |
| <b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | <b>23</b> |
| <b>5.1 Preparação do extrato</b> .....                                      | <b>23</b> |
| <b>5.2 Cultura e manutenção de <i>Drosophilas</i></b> .....                 | <b>23</b> |
| <b>5.3 Tratamento com <i>C.campestris</i> e exposição ao Paraquat</b> ..... | <b>24</b> |
| <b>5.4 Ensaio <i>in vivo</i></b> .....                                      | <b>24</b> |
| <b>5.4.1 Avaliação da atividade locomotora</b> .....                        | <b>24</b> |
| <b>5.5 Ensaio <i>ex vivo</i></b> .....                                      | <b>25</b> |
| <b>5.5.1 Preparação de amostras para ensaios enzimáticos</b> .....          | <b>25</b> |
| <b>5.5.2 Ensaio enzimático</b> .....  | <b>25</b> |
| <b>5.5.3 Viabilidade celular</b> .....                                      | <b>26</b> |
| <b>5.5.4 Oxidação DCF-DA</b> .....  | <b>27</b> |
| <b>5.5.5 Determinação de Tióis</b> .....                                    | <b>27</b> |
| <b>5.5.6 Fosforilação de proteína</b> .....                                 | <b>28</b> |
| <b>5.6 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i></b> .....        | <b>28</b> |

|   |    |
|---|----|
| 5.6.1 Avaliação da atividade antioxidante do EHFCC pelo método do sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) .....             | 28 |
| 5.6.2 Avaliação da atividade antioxidante do EHFCC pelo método da captura do radical (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) (ABTS) ..... | 29 |
| 5.6.3 Avaliação do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) do EHFCC.....  | 30 |
| 5.7 Análises estatísticas .....   | 30 |
| 6 RESULTADOS .....  | 30 |
| 6.1 <i>In vivo</i> .....  | 30 |
| 6.1.1 Tratamento com <i>C. campestris</i> e avaliação da atividade locomotora .....   | 30 |
| 6.1.2 Viabilidade celular e estresse oxidativo .....  | 31 |
| 6.2 <i>Ex vivo</i> .....  | 33 |
| 6.2.1 Ensaio enzimáticos .....  | 33 |
| 6.2.2 Determinação de Tióis.....  | 36 |
| 6.2.3 Fosforilação de proteína.....   | 37 |
| 6.2.4 Tratamento com <i>C.campestris</i> e Paraquat e avaliação da atividade locomotora ....  | 38 |
| 6.3 <i>In vitro</i> .....   | 39 |
| 6.3.1 Método do sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) ....  | 39 |
| 6.3.2 Método da captura do radical (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) (ABTS) .....   | 40 |
| 6.3.3 Método de redução do ferro (FRAP) do EHFCC .....  | 40 |
| 7 DISCUSSÃO .....   | 41 |
| 8 CONCLUSÃO.....  | 43 |
| 9 REFERÊNCIAS .....   | 44 |

## **1. Introdução**

### **1.1 Biodiversidade Brasileira**

O Brasil é um país detentor de uma gigantesca diversidade geográfica, climática e biológica, abrigando seis diferentes biomas, com um extenso território de 8,5 milhões km<sup>2</sup>. Grande parte das espécies presentes em seus biomas são endêmicas, conferindo-lhe o posto de país com maior megadiversidade do mundo (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE). A flora brasileira é a mais rica do planeta, nela estando dispersas as mais variadas espécies vegetais, dentre 15 a 25% do total mundial (JOLY, 2011). Entretanto apenas 5,8 % das patentes registradas sobre plantas nativas são registradas por brasileiros (PULPO; GALLO, 2007).

As plantas sintetizam uma gama de substâncias que colaboram para sua diversidade e que podem ser classificadas em dois grupos: metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são encontrados em todo o reino vegetal, e são essenciais para o metabolismo da planta, fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento. Entre eles estão os fitoesteróis, aminoácidos, nucleotídeos e ácidos orgânicos (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006). Os metabólitos secundários são específicos e possuem uma distribuição restrita, podendo estar presentes em uma espécie ou em um grupo de espécies relacionadas, (TAIZ; ZEIGER 2006) e serem divididos em três grupos principais: os flavonóides e compostos fenólicos e polifenólicos afins, terpenóides, e os alcalóides (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006). Estas substâncias específicas servem como mecanismos de defesa, garantindo a sobrevivência, atuando contra os mais variados patógenos das plantas (PINTO et al., 2002), como também na alelopatia, podendo interferir no desenvolvimento de outras espécies vegetais próximas (TAIZ; ZEIGER 2006), além de servirem como atrativos para outros organismos, como insetos e pássaros, que polinizam e disseminam sementes (SAITO, 2004).

A produção dos metabólitos secundários das plantas pode ser alterada por uma série de condições, como clima, temperatura, disposição de água e nutrientes, idade e desenvolvimento do vegetal, entre outros. Porém há alguns casos que mesmo em condições onde estes fatores são alterados, não interferem no metabolismo secundário das espécies vegetais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Apesar dessa grande biodiversidade brasileira, o mau uso dos recursos naturais e a degradação do meio ambiente podem levar a sua redução, gerando graves consequências no ecossistema, como a extinção de inúmeras espécies. Assim sendo, alternativas que visem um desenvolvimento sustentável do planeta, vêm sendo buscadas e adotadas. Este fato evidencia a necessidade de pesquisas focadas nas espécies vegetais, pois a sua diversidade tanto em termos de estrutura, atividade biológica, e de propriedades físico-químicas, (SIMÕES et al., 2000) pode possuir uma série de aplicações, que vão desde medicinais, cosméticas, alimentícias, inseticidas, repelentes, antimicrobianas, entre outras, fazendo das plantas uma importante fonte de estudos para produtos naturais biologicamente ativos (PINTO et al., 2002)

## **1.2 Inseticidas/bioinseticidas e o meio ambiente**

A agricultura brasileira cresceu muito nas últimas décadas, e a globalização trouxe um constante processo de expansão, o que proporcionou inúmeros benefícios, como o aumento na demanda e oferta de produtos agrícolas, e a adoção de tecnologias modernas visando uma produtividade em massa, de qualidade e geração de renda (BONELLI, 2001). Porém, estas novas tecnologias não trouxeram somente benefícios, o intenso uso da mecanização e dos produtos sintéticos e químicos possuem um custo elevado e podem acarretar uma série de danos (MENEZES, 2005). Os inseticidas químicos são o método mais eficiente e utilizado no combate de pragas, porém eles podem causar efeitos nocivos à natureza e ao homem. Entre esses efeitos estão à contaminação residual de alimentos, solo, água, animais, e mais gravemente acarretar em um desequilíbrio ambiental e uma redução da biodiversidade. Além disso, o seu uso errôneo pode levar a resistência de pragas, ou até mesmo ao surgimento de novas (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Esses problemas têm tornado o mercado consumidor mais exigente e a buscar alimentos cada vez mais saudáveis, sem resíduos de contaminação, fato que vem ao encontro com a necessidade de alternativas naturais na agricultura (BETTIOL, 2012). As propriedades de defesa dos vegetais são o foco para o desenvolvimento de praguicidas ecologicamente corretos, na forma de óleos essenciais, pós ou extratos vegetais. Porém os metabólitos secundários também podem servir de síntese para novos princípios ativos, que tem a

capacidade de serem específicos para determinado grupo de organismos, sem afetar outros (SAITO, 2004), ou até mesmo serem associados a outras práticas de controle de pragas, visando à redução de danos ao ambiente. Deste modo, a biotecnologia, aliada com a toxicidade de algumas plantas vem proporcionando o desenvolvimento de novos produtos à base de compostos naturais (ALTIERI, 2002).

### 1.3 Família Euphorbiaceae e o gênero *Croton*

A família Euphorbiaceae compreende cerca de 317 gêneros e 7500 espécies (SALATINO, 2007) incluindo árvores, arbustos, ervas e trepadeiras de ocorrência em regiões de climas Tropical e Subtropical (RANDAU et al., 2004). Um dos gêneros de maior importância é o *Croton*, o segundo maior da família (BRAGA, 1976), com cerca de 700 espécies distribuídas em regiões quentes do mundo (SALATINO, 2007), sendo que 350 espécies ocorrem no Brasil (BERRY, 2002). Este gênero se destaca devido a várias de suas espécies serem amplamente utilizadas pela população, incluindo o tratamento de câncer, constipação, diarreia e outros problemas digestivos, diabetes, feridas externas, febre, hipertensão, inflamação, vermes intestinais, malária, dor, úlceras e obesidade (SALATINO, 2007).

O gênero possui várias substâncias ativas (terpenóides, flavonóides e alcalóides), e óleos essenciais em seu conteúdo, que lhe conferem propriedades terapêuticas e importância econômica (HILL et al., 2001). Estudos em várias espécies do gênero *Croton* têm demonstrado atividade citotóxica de terpenóides de *Croton zambesicus* (BLOCK et al., 2004); efeitos antileishmania (ROSA et al., 2003), anticâncer (GRYNBERG et al., 1999), antibacterianos e antifúngicos de *Croton cajucara* (ALVIANO et al., 2005); antimicrobianos e antimaláricos de *Croton kongensis* (THONGTAN et al., 2003); anticancerígeno (KAWAI et al., 2005) e antibacteriano (MATSUMOTO et al., 1998) de *Croton sublyratus*; atividade antiviral (UBILLAS et al., 1994), antibacteriana (CHEN et al., 1994) e antileucêmica (ROSSI et al., 2003) de *Croton lechleri*; citotoxicidade de *Croton oblongifolius* (SOMMIT et al., 2003; ROENGSUMRAN et al., 2002); citotoxicidade de *Croton tonkinensis* (PHAN et al., 2005); atividade antifúngica de *Croton urucurana* (GURGEL et al., 2005); atividade larvicida contra o *Aedes Egypti* L. de *Croton nepetaefolius*, *Croton argyrophyloides*, *Croton*

*sonderianus* e *Croton zehntneri* (MORAIS et al., 2006), e atividade antibacteriana e moluscicida de *Croton campestris* (EL BABILI et al., 2006; EL BABILI et al., 2012; MATIAS et al., 2010; MATIAS et al., 2011; PEREIRA et al., 2011). As espécies desse gênero são uma interessante fonte para novos compostos naturais bioativos, devido ao seu largo emprego popular para variadas finalidades (BRITO JÚNIOR, 2010).

*Croton campestris* A. St.-Hil. (FIGURA 1) é uma espécie do gênero *Croton* que se destaca devido ao seu largo emprego medicinal, conhecida popularmente por Velame do campo, Velame verdadeiro ou Curraleira. Nativa do Brasil é um arbusto que chega de 1-2 metros de altura, e se encontra principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste (SANTOS; SCHRIPEMA; KUSTER, 2005).

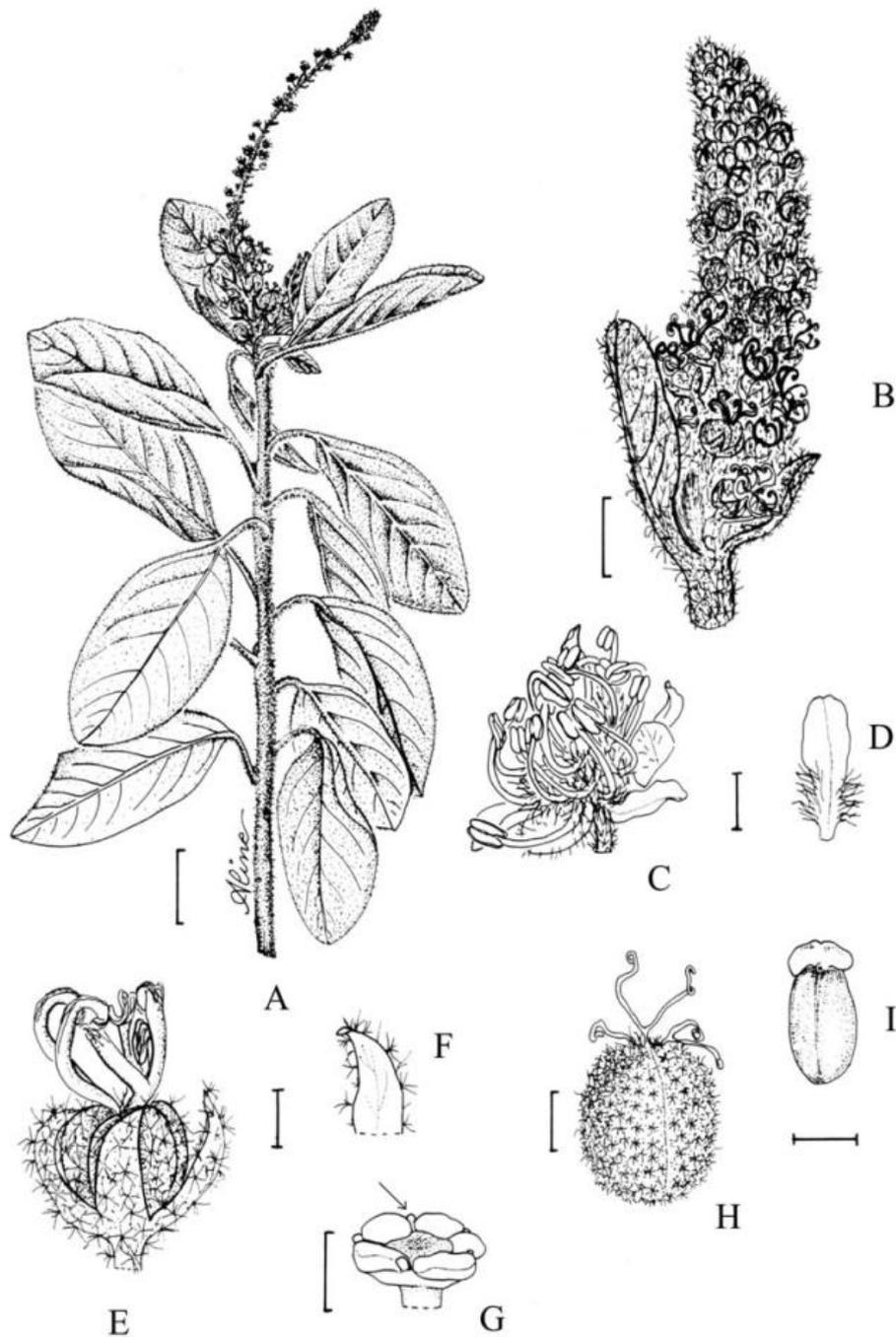
FIGURA 1 – Espécie adulta de *C. campestris* A.St.-Hill.



Porém *C. campestris* (FIGURA 2) varia morfológicamente de acordo com sua área de distribuição, diferindo quanto ao tamanho e forma das folhas e cor do indumento. No entanto, pode ser diferenciada das demais espécies, principalmente por apresentar as inflorescências mais vistosas, perfumadas, com estiletes mais longos, maior estatura, flores pistiladas com pétalas diminutas, globosas, glanduliformes, glabras e alvas, quase imperceptíveis, junto ao disco na base do ovário (MEDEIROS; VALLE; ALVES; 2008).

Suas raízes e folhas são utilizadas pela população para diversos fins terapêuticos, desde o tratamento de doenças parasitárias, inflamatórias (PRATA et al., 1993), venéreas, de pele, reumatismo, artrismo, tumores, impigens, úlcera do útero, diarreia, entre outros (CRUZ, 1982; SANTOS; SCHRIPSEMA; KUSTER, 2005). Tendo em vista a ampla utilização e o potencial biotecnológico que *Croton campestris* possui, pesquisas que descrevam a sua toxicidade *in vivo* são escassas.

FIGURA 2 – Morfologia de *C. campestris* A.St-Hil. (A) ramo; (B) inflorescência; (C) flor estaminada; (D) pétala (vista ventral); (E) flor pistilada; (F) sépala (vista ventral), (G) detalhe do disco com pétalas globosas reduzidas (seta) entre os segmentos; (H) fruto; (I) semente (vista ventral). Escalas: (A) 2cm, (B) 5mm, (C) 1mm, (D) 1mm, (E) 1mm, (F) 1mm, (G) 1mm, (H) 2mm, (I) 2mm.



## 1.4 Paraquat

O Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto) é um herbicida de largo espectro e não seletivo mundialmente utilizado no controle de ervas daninhas na lavoura, é prejudicial à saúde humana, e pode causar intoxicação e até mesmo levar a morte (HOSAMANI; MURALIDHARA, 2013). Em modelo de *Drosophila melanogaster* já é bem estabelecido como um gerador de radicais livres e indutor de estresse oxidativo, e *per se* já causa toxicidade e dano na atividade locomotora das moscas, além de induzir o Parkinsonismo (SAUR et al., 2009).

## 1.5 Estresse oxidativo

Estresse oxidativo é uma condição de desequilíbrio entre as defesas antioxidantes do organismo e os radicais livres. Radicais livres são moléculas oxidantes que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada, sendo altamente reativos e agindo como eletrofilos (GILLHAM et al., 1997). Podem ser classificados em espécie reativa de oxigênio (ERO), ou espécie reativa de nitrogênio (ERN). Dentre as principais EROs estão as hidroxilas, superóxido, oxigênio e peróxido de hidrogênio, e as ERNs principalmente o óxido nítrico (BARREIROS; DAVID, 2006).

Estes radicais livres podem atuar de forma benéfica no organismo quando estando em equilíbrio com os antioxidantes, agindo na defesa contra agentes infecciosos induzindo a apoptose (BIESALSKI, 2002). Porém, se em desequilíbrio, podem induzir a muitos efeitos prejudiciais, como a peroxidação lipídica, oxidação proteica e alterações nas atividades das enzimas antioxidantes (ALLEN, 1998), caracterizando um estado de estresse oxidativo.

Os antioxidantes são moléculas doadoras de elétrons, que podem inibir a oxidação de outras moléculas, sendo capazes de estabilizar os radicais livres no organismo. Podem ser ingeridos através de uma dieta saudável, como é o caso do  $\beta$ -caroteno, da vitamina E e vitamina C, e também de alguns metabólitos secundários de certas espécies vegetais (DAVID; DAVID, 2006).

## 1.6 Enzimas

Além dos antioxidantes ingeridos através da dieta, o organismo possui enzimas antioxidantes, que são a catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutatona S-transferase (GST) fazem parte de um sistema de defesa, que ajuda no combate das espécies reativas de oxigênio. A enzima catalase atua na dismutação do  $H_2O_2$  em  $O_2$  e  $H_2O$  (BARREIROS; DAVID, 2006), ela é a única envolvida nesta remoção em *D. melanogaster*, e quando superexpressa na mosca, ela induz efeitos protetores (ORR; SOHAL, 1992). A enzima SOD possui por função catalisar a neutralização do radical superóxido, é uma enzima imprescindível, pois é a principal defesa antioxidante contra o radical superóxido (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006). A enzima GST está envolvida nos processos de desintoxicação celular, diminuindo os efeitos maléficos de alguns xenobióticos, tornando-os mais solúveis e facilitando a sua excreção, como drogas, herbicidas, compostos químicos (COGO et al., 2009). Estudos têm demonstrado que esta enzima está envolvida no aumento da resistência dos insetos a inseticidas. Além disso, essas enzimas têm sido relacionadas por possuir interação com as MAPK (incluindo JNK1) servindo como uma reguladora e mantendo um equilíbrio entre a sobrevivência ou a morte celular (TOWNSEND et al., 2003). Acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina em acetato e colina, liberando um próton, evitando uma transmissão excessiva de acetilcolina nos neurônios colinérgicos, prevenindo o organismo da debilidade e do cansaço. Tem sido relatada como molécula-alvo na resistência de insetos a inseticidas organofosforados e carbamatos (MORTON; SINGH, 1982).

## 1.7 MAPK

As MAPKs (Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos) são um grupo de proteínas específicas de serina/treonina pertencente à família das proteínas quinases. As MAPKs são ativadas por fosforilação, e regulam diversos processos celulares, de proliferação, diferenciação, expressão gênica, e apoptose (COHEN, 1997). Há três principais grupos de MAPK, a Quinase Regulada por Sinais Extracelulares (ERK1/2), a c-Jun N-terminal quinase (JNK1/2) e a p38, estas vias são ativadas em situações de estresse (KYRIAKIS; AVRUCH,

2001). Porém a regulação preferencial de ERK seja de crescimento e diferenciação celular (HO et al., 2007), e a de p38 e JNK em processos de inflamação, diferenciação e morte celular (MATSUOKA E IGISU, 2002). Estudos têm demonstrado que em *D. melanogaster* as proteínas quinases ERK, JNK e p38 também estão envolvidas e são ativadas em respostas ao estresse (STRONACH; PERRIMON 1999).

### 1.8 Modelo de estudo *Drosophila melanogaster*

Conhecida popularmente como a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* (FIGURA 3) é um organismo multicelular complexo, pertencente à ordem Diptera e a família Drosophilidae. Suas inúmeras vantagens a tem feito um modelo biológico ideal para biensaio. Tem sido útil para análise da ação biológica de substâncias naturais (PAULA et al., 2012), na detecção de inseticidas por bioensaio (HIRATA et al., 2002), e cerca de 75% dos genes relacionados a doenças em humanos tem ortólogos funcionais em *Drosophila* (PANDEY; NICHOLS, 2011). Além disso, possui um ciclo de vida rápido, manutenção de baixo custo, tamanho reduzido, dimorfismo sexual, e principalmente por não existirem imposições éticas para o seu uso.

FIGURA 3 – Mosca da fruta *Drosophila melanogaster*.



Fonte: Why evolution is true, 2011

Frente a isso, estudos que valorizem as espécies nativas e a biodiversidade brasileira são muito importantes, e assim sendo este estudo teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de *C. campestris* sobre a mosca da fruta *Drosophila melanogaster*.

## **2. Justificativa**

Apesar da grande utilização e demanda de inseticidas químicos, e dos avanços significativos que estes proporcionaram a produção agrícola mundial, seu intenso uso levou ao acúmulo de malefícios sobre o meio ambiente, surgindo então à necessidade de novos métodos que atuem na eliminação de organismos-praga na agricultura, diminuindo os danos ao meio ambiente. Portanto, a síntese de bioprodutos, que utilizam as defesas bioquímicas das plantas, ou seja, os seus metabólitos secundários, vêm ganhando cada vez mais importância quando se tem em mente a qualidade ambiental e a satisfação de um mercado consumidor cada vez mais exigente e consciente.

Desta forma, o que justifica a realização deste trabalho é a necessidade de alternativas sustentáveis, que contribuam para a preservação do meio ambiente, valorizando as plantas nativas e a biodiversidade brasileira, tendo em vista a conservação dos recursos naturais, e a saúde da população mundial.

## **3. Objetivo geral**

Investigar a potencial toxicidade e efeito bioinseticida do extrato hidroalcoólico de folhas de *Croton campestris* no modelo de *Drosophila melanogaster* bem como descrever os mecanismos bioquímicos envolvidos na toxicidade deste extrato.

## 4. Objetivos específicos

### 4.1 *In vivo*

- Avaliação da viabilidade de *D. melanogaster* ao longo e após o tratamento com o extrato hidroalcoólico de folhas de *C. campestris*;
- Avaliação da atividade locomotora de *D. melanogaster* após tratamento com o extrato hidroalcoólico de folhas de *C. campestris* através do teste de Geotaxia Negativa;
- Avaliação da viabilidade celular de *D. melanogaster* após tratamento com extrato hidroalcoólico de folhas de *C. campestris* através dos ensaios de MTT e da redução da fluorescência da Resazurina;
- Determinar os níveis de estresse oxidativo pela oxidação do DCF-DA em *D. melanogaster* após tratamento com extrato hidroalcoólico de folhas de *C. campestris*;
- Determinação de Tióis proteicos e não proteicos em *D. melanogaster* após tratamento com extrato hidroalcoólico de folhas de *C. campestris*;
- Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes catalase, glutathione S-transferase, superóxido dismutase e da enzima acetilcolinesterase em *D. melanogaster* após o tratamento com extrato hidroalcoólico de folhas de *C. campestris*;
- Investigação da fosforilação de proteínas MAPK, ERK, JNK e p38 em *D. melanogaster* após tratamento com extrato hidroalcoólico de folhas de *C. campestris*;
- Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de folhas de *C. campestris* em associação ao herbicida Paraquat frente aos ensaios de viabilidade e Geotaxia Negativa.

### 4.2 *In vitro*

- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato hidroalcoólico de folhas de *C. campestris* através dos ensaios de DPPH, FRAP e ABTS<sup>+</sup>.

## 5. Materiais e métodos

### 5.1 Preparação do extrato

O extrato hidroalcoólico de folhas de *C. campestris* (EHFCC) foi obtido através da colaboração com o grupo de pesquisa do Professor Irwin Alencar Menezes, na Universidade Regional do Cariri (URCA), Ceará, Brasil. Para o extrato hidroalcoólico utilizaram-se folhas frescas das espécies vegetais de *C. campestris*, que foram coletadas no município de Crato no Ceará, Brasil, com auxílio de um GPS (7 ° 22 '2.8 "S, 39 ° 28' 42,4" W; altitude: 892 metros). Os procedimentos para a preparação de amostras seguiram as recomendações descritas por DI STASI (1996). O material foi depositado no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, e registrada sob o n ° 7095.

As folhas frescas de *C. campestris* (2.200 g) foram lavadas em água corrente, esmagadas e maceradas e submetidas à extração a frio com etanol 99,9% e água na proporção de 1:1 (6,5 L de solvente). O solvente foi removido utilizando um evaporador rotativo, sob pressão reduzida e temperatura de 40-50 ° C, e um rendimento de 190,8 g de extrato bruto foi obtido usando um liofilizador.

### 5.2 Cultura e manutenção de *Drosophilas*

Para a realização dos experimentos *D. melanogaster* (linhagem Harwich) foram obtidas a partir do National Species Stock Center, Bowling Green, Ohio, EUA. Em todos os experimentos utilizaram-se moscas de ambos os sexos, adultas, entre 01±05 dias de vida.

Para manutenção, as moscas foram criadas em tubos de vidro de 2,5x6,5 cm<sup>2</sup> contendo 5 mL de meio padrão (1% w/v de levedura de cerveja, 2% w/v de sacarose, 1% w/v de leite em pó, 1% w/v ágar; 0,08% w/v nepagin), mantidas em câmara incubadora B.O.D em temperatura de 1±25°C e umidade relativa de 60%, ciclo 12h claro/escuro (PAULA et al., 2012).

### **5.3 Tratamento com *C. campestris* e exposição ao Paraquat**

Grupos teste constituídos por 30 moscas adultas foram tratados ao longo de 07 dias (taxa de sobrevivência), e 72h (Geotaxia Negativa e ensaios bioquímicos) com EHFCC diluído em solução de sacarose 1% embebida em chumaço de algodão. Para avaliar a mortalidade, as moscas foram postas em tubos contendo soluções definidas como: controle (sacarose 1%), 0,1, 1, 10 e 50mg/mL do extrato diluído em sacarose 1%. Os tratamentos foram feitos em triplicata, com duração de 07 dias, e os tubos foram mantidos em câmara incubadora B.O.D a  $1\pm 25^{\circ}\text{C}$ , ciclo 12 horas claro/escuro. Para quantificar a taxa de sobrevivência das moscas fez-se a contagem diária do número de moscas mortas e vivas ao longo dos 07 dias. Os resultados foram analisados e curva de mortalidade foi construída.

Nos tratamentos com Paraquat, utilizaram-se 30 moscas adultas, e o tratamento foi dividido em diferentes grupos: sacarose 1% (controle positivo), Paraquat 5 mM diluído em sacarose 1% (controle negativo), 1 e 10mg/mL do extrato diluídos em sacarose 1%, e 1 e 10mg/mL do extrato diluídos em Paraquat 5mM. Tratamento foi feito em triplicata, com duração de 72 horas, e os tubos foram mantidos em câmara incubadora B.O.D a  $1\pm 25^{\circ}\text{C}$ , ciclo 12 horas claro/escuro. Após o tratamento foi definida a taxa de mortalidade, e as moscas sobreviventes foram submetidas ao ensaio de Geotaxia Negativa para avaliar a sua atividade locomotora.

### **5.4 Ensaio *in vivo***

#### **5.4.1 Avaliação da atividade locomotora**

A avaliação da atividade locomotora das moscas foi feita através do teste de Geotaxia Negativa de acordo com FEANY; BENDER, (2000). Dez moscas (ambos os sexos) de cada grupo de tratamento foram levemente anestesiadas em gelo, e depois transferidas para tubos cilíndricos de vidro (10 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro) com uma marca delimitada na altura de 05 cm. Após a recuperação da exposição ao gelo, os tubos foram delicadamente

batidos em uma mesa (para que as moscas fossem para o fundo), com um intervalo de 30 segundos para cada batida, e o procedimento foi gravado durante 06 segundos, com três repetições. Depois foi feita a contagem do número de moscas que ficaram acima dos 05 cm (topo) ou abaixo dos 05 cm (base) (SUDATI et al., 2013).

## **5.5 Ensaio *ex vivo***

### **5.5.1 Preparação de amostras para ensaios enzimáticos**

Grupos de 20 moscas de cada tratamento foram homogeneizadas em 1mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, e posteriormente centrifugadas a 1000 g durante 5 min a 4 ° C. Parte do sobrenadante (200 µL) foi aliquoteado para a determinação separada da enzima acetilcolinesterase (AChE) com base nos protocolos previamente descritos por FRANCO et al., (2009).

O sobrenadante restante foi centrifugado a 20.000 g durante 30 min a 4°C, e foi utilizado para determinação das enzimas antioxidantes glutathiona S-transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (FRANCO et al., 2009).

### **5.5.2 Ensaio enzimáticos**

A atividade da enzima glutathiona-S-transferase (GST; CE 2.5.1.18) foi ensaiada utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato (JAKOBY; HABIG 1981). O ensaio baseia-se na formação do complexo de conjugado de CDNB e GSH. A reação foi realizada por um mix composto de tampão fosfato (KPi) 0,25 M pH 7,0, EDTA 1 mM, H<sub>2</sub>O, GSH 1 mM, e CDNB 2,5 mM. Realizou-se a leitura da absorbância a 340 nm.

A atividade da enzima catalase (CAT; EC 1.11.1.6), foi ensaiada de acordo com AEBI, (1984). Para que a reação ocorra é necessário um mix contendo tampão de fosfato (KPi) 0,25 M pH 7,0, EDTA 0,5 mM, H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM, e Triton X-100 0,012%. Realizou-se a leitura da absorbância a 240 nm.

O ensaio para medir a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), seguiu os procedimentos de KOSTYUK; POTAPOVICH, (1989). Este consiste na inibição da oxidação da quercetina conduzida pela SOD. Para a reação é necessário um mix composto por tampão fosfato (KPi) 25 mM pH 10, EDTA 0,25 mM, TEMED 0,8 mM e quercetina 0,05  $\mu$ M. Realizou-se a leitura da absorbância a 406 nm.

Para a atividade da enzima acetilcolinesterase, seguiu-se o protocolo de ELLMAN et al., (1961), com tampão fosfato 100 mM pH 8,0, DTNB 0,5 mM, e acetilcolina 0,35 mM como iniciador da reação. A reação foi monitorizada durante 2 minutos a 412 nm. Todas as atividades enzimáticas foram realizadas à temperatura ambiente ( $1\pm 25^\circ\text{C}$ ) utilizando um espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 60S UV-Visível.

### 5.5.3 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada através da atividade da desidrogenase utilizando o 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) e da análise da redução da fluorescência da Resazurina (BABOT; CRISTOFOL; SUÑOL, 2005).

Quando as células estão viáveis, o MTT é reduzido pelas enzimas desidrogenases mitocondriais, formando o produto formazan, e passando de uma coloração amarela intensa para violeta, e sua absorbância pode ser medida a 540 e 630 nm. Para o ensaio de MTT, utilizaram-se 04 moscas de cada grupo, e a cabeça e o corpo de cada mosca foram previamente separados, e postos em poço em placa de 96 poços. Pipetaram-se 200 $\mu$ L de solução tampão (1mL de MTT e 4mL de HEPES 20 mM pH 7,0) em cada poço, e deixou-se em banho-maria a 37°C durante 30 minutos, após as moscas foram levadas para nova placa, com 200 $\mu$ L de DMSO em cada poço, onde ficaram mais 30 minutos em banho-maria a 37°C. Após, retiraram-se as moscas e fez-se a leitura da absorbância da placa com DMSO no leitor multimodo de microplacas EnSpire1 (Marca PerkinElmer, USA) à 540 nm e 630nm.

Resazurina é um corante azul, que é reduzido intracelularmente a resorufina, de coloração rosa fluorescente, a intensidade da cor produzida é proporcional ao número de células vivas (BRIEN et al., 2000). Para a análise da Resazurina, 20 moscas de cada grupo foram homogeneizadas em 1mL de tampão Tris 20 mM pH 7,0 por 10 minutos a 1000 rpm e a 4°C.

Os valores da relação foram padronizados por conteúdo de proteínas e expresso em porcentagem em relação ao controle (SUDATI et al., 2013).

#### **5.5.4 Oxidação DCF-DA**

A oxidação da 2', 7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) serve como um índice geral de estresse oxidativo (PEREZ-SEVERIANO et al., 2004). A DCF-DA atravessa a membrana da célula sofrendo clivagem do grupo ester pelas enzimas esterases, sendo oxidada a DCF pelos radicais livres ( $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $ONOO^{\cdot}$ ), muitos deles gerados na mitocôndria pelo processo de respiração celular, e nesta etapa DCF emite fluorescência., que será proporcional ao nível de estresse oxidativo. Para o ensaio da DCF-DA, 20 moscas de cada grupo de tratamento foram homogeneizadas em 1mL de tampão Tris 20 mM, pH 7,0, centrifugadas durante 10 minutos a 1000 rpm a 4°C, e pipetados em diferentes poços em placa de Elisa: 20  $\mu$ L do sobrenadante de cada amostra, 274 $\mu$ L de solução tampão e 6 $\mu$ L de DCF-DA (10 mM). A emissão de fluorescência de DCF resultante da oxidação DCF-DA foi monitorizada em intervalos regulares a uma absorbância de 525nm em um leitor de placas Enspire® multimodo (PerkinElmer, EUA), nos tempos 0, 20, 40 e 60 minutos. A quantidade de DCF formada foi calculada com base numa curva de calibração construída utilizando um padrão comercial de DCF. A taxa de formação de DCF foi calculada como uma porcentagem da formação de DCF em relação ao grupo de controle tratado com sacarose (PAULA et al., 2012).

#### **5.5.5 Determinação de Tióis**

Tióis proteicos e tióis não proteicos foram estimados com base no método espectrofotométrico utilizando o reagente de Ellman, DTNB (ácido 5,5' -ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (ELLMAN, 1959). Para estimar alteração no conteúdo de tióis não proteicos (NPSH), precipitou-se o homogenato de moscas com TCA a 10%, centrifugou-se a 3000 g durante 3 minutos a 4°C, e o sobrenadante das amostras foi medido no leitor de placas Enspire® multimodo (PerkinElmer, EUA) a 412nm. Para avaliar os tióis proteicos (PSH)

homogeneizou-se o pellet em tampão Tris HCl 20 mM, pH 7,4, e a leitura foi realizada a 412nm.

### **5.5.6 Fosforilação de proteína**

Para quantificação da fosforilação de MAPK utilizou-se Western blotting de acordo com POSSER et al., (2009) com pequenas modificações. O homogenato foi centrifugado a 1000g por 10 min a 4°C, e o sobrenadante foi recolhido. A dosagem de proteínas foi realizada segundo o protocolo de BRADFORD, (1976). Os controles de conteúdo de proteína foram feitos por análise de proteínas totais (MAPKs total) e  $\beta$ -actina, utilizando anticorpos específicos.

## **5.6 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro***

### **5.6.1 Avaliação da atividade antioxidante do EHFCC pelo método do sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH)**

DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical estável deficiente em elétrons, de coloração púrpura, que tem a função de agir como um agente oxidante, sequestrando um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula estável. Quando na presença de um antioxidante, o DPPH rouba um átomo de hidrogênio, é reduzido a  $\alpha,\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrylhydrazine (DPPH: H), e muda sua coloração de púrpura para amarela (HUNSAKER; SCHENK, 1983). Na forma de radical, o DPPH tem uma absorção a 515nm.

A capacidade de eliminar radicais livres do EHFCC foi avaliada pelo método da capacidade sequestrante do radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), de acordo com os procedimentos de BALTRUŠAITYTĖ et al., (2007) com modificações.

### 5.6.2 Avaliação da atividade antioxidante do EHFCC pelo método da captura do radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) (ABTS)

O ensaio do cátion radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)), é um método espectrofotométrico, que pode ser gerado através de uma reação química, enzimática ou eletroquímica, e ser aplicado tanto para o estudo de compostos antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, como de extratos alimentares (KUSKOSKI et al., 2005).

O radical pode ser gerado através de uma reação, na qual o ABTS junto com o persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ) produz um cromóforo  $ABTS^{\bullet+}$  de coloração azul/verde com uma absorção característica a 734 nm. Na presença de um composto com ação antioxidante, o  $ABTS^{\bullet+}$  fica reduzido, e a cor desaparece então a descoloração do meio é um sinal da presença de antioxidante no composto em questão (RE et al., 1999).

O ensaio do cátion radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)), seguiu o protocolo de RE et al., (1999) com algumas modificações.

### 5.6.3 Avaliação do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) do EHFCC

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) caracteriza-se pela redução do ferro, e pode ser aplicada para avaliação da atividade antioxidante de alimentos, bebidas, e substâncias puras (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000). A reação ocorre na presença de um composto com ação antioxidante, e o ferro presente na forma de  $Fe^{3+}$  forma um complexo com TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) chamado de ferritripiridiltriazina que possui uma coloração amarela, e então é reduzido a  $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{3+}$  complexo chamado de ferroso tripiridiltriazina, de coloração azul intensa (MONARETTO, 2013). A reação ocorre em meio ácido com pH de 3,6 e com uma absorção a 595nm (HUANG; OR; PRIOR, 2005).

A técnica de FRAP seguiu os procedimentos do método descrito por BENZIE; STRAIN (1996).

## 5.7 Análises estatísticas

Para análise dos dados utilizou-se o programa GraphPad Prisma 5.0. Para análise estatística dos resultados utilizou-se o teste de ANOVA de uma ou duas vias seguido do teste *post hoc* Tukey's. Considerou-se diferença significativa entre os grupos quando  $p < 0,05$ .

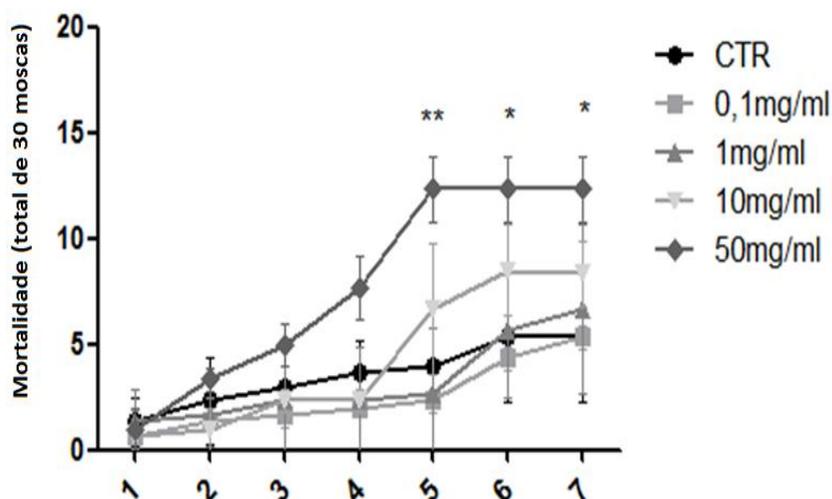
## 6. Resultados

### 6.1 *In vivo*

#### 6.1.1 Tratamento com *C. campestris* e avaliação da atividade locomotora

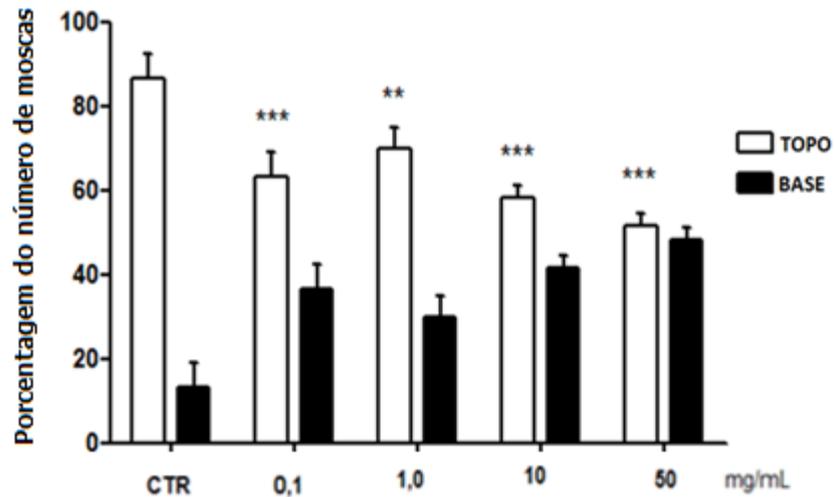
Observou-se que ao longo da exposição *in vivo* de 07 dias com o EHFCC (FIGURA 4), houve um aumento da mortalidade das moscas, e a partir do quinto dia, o número de mortes na concentração de 50mg/mL passou a ser significativo. Em paralelo, no tratamento de 72 horas, o EHFCC causou dano na atividade locomotora das moscas em todas as concentrações testadas (FIGURA 5).

FIGURA 4 - Curva da viabilidade de *D. melanogaster* submetidas à exposição *in vivo* com EHFCC, ao longo de um período de 07 dias. \*  $p < 0,05$



Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

FIGURA 5 - Análise da atividade locomotora realizada através do teste de Geotaxia Negativa após 72h de exposição *in vivo* de *D. melanogaster* ao EHFCC. \* $p < 0,05$

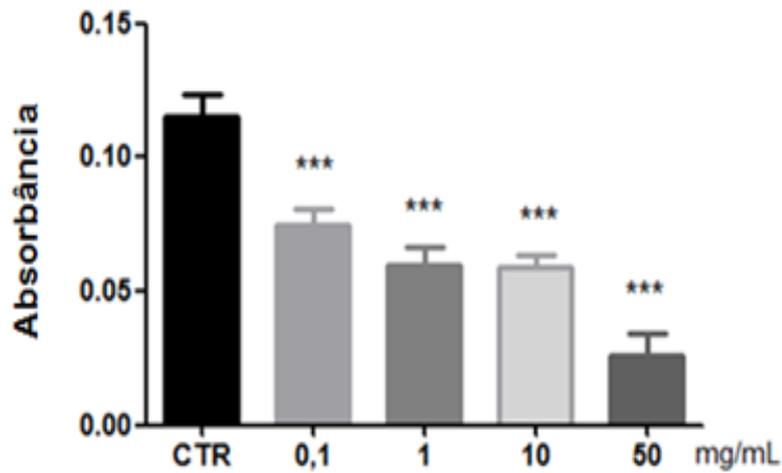


Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados.

### 6.1.2 Viabilidade celular e estresse oxidativo

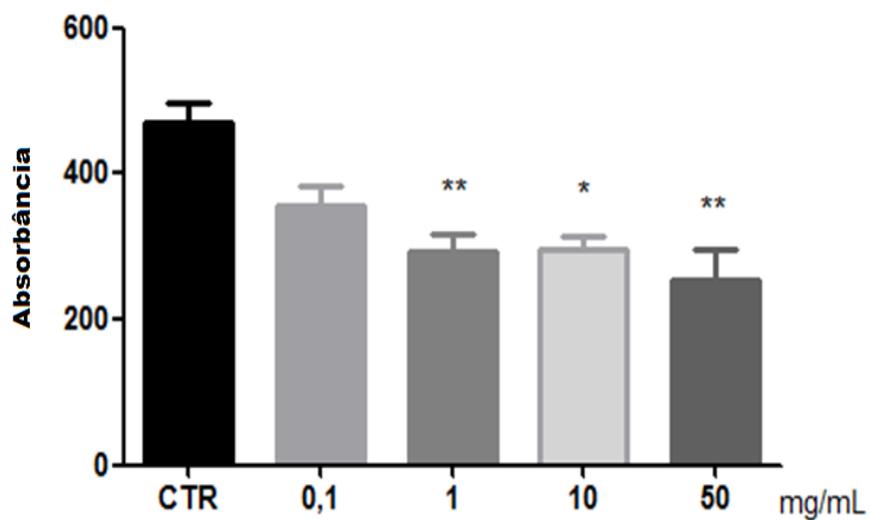
Após 72 horas de tratamento com EHFCC houve redução da viabilidade celular de *D. melanogaster* como pode ser visto através do ensaio de MTT e da análise da redução da fluorescência da Resazurina. Com o ensaio de MTT, observou-se significativa citotoxicidade causada pelo extrato, em todas as concentrações testadas (FIGURA 6), e com a análise da Resazurina foi possível observar significativa citotoxicidade a partir da concentração de 1mg/mL do extrato (FIGURA 7). Além disso, o extrato aumentou o nível de estresse oxidativo nas células da mosca da fruta, em todas as concentrações testadas (FIGURA 8), efeito observado através do ensaio da DCF-DA.

FIGURA 6 - Análise da viabilidade celular de *D. melanogaster* realizada através do ensaio de MTT após 72h de exposição *in vivo* com EHFCC. \* $p < 0,05$



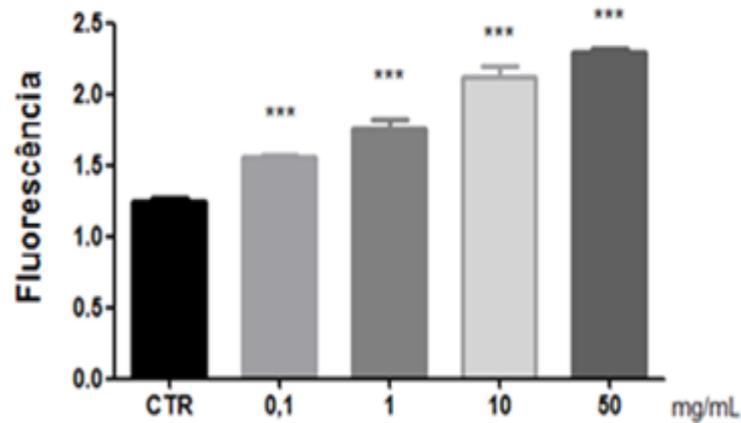
Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

FIGURA 7- Análise da viabilidade celular de *D. melanogaster* realizada através do ensaio de Resazurina após 72h de exposição *in vivo* com EHFCC. \* $p < 0,05$



Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

FIGURA 8 - Avaliação da fluorescência da DCF-DA em *D. melanogaster* após 72 h de exposição *in vivo* ao EHFCC. \* $p < 0,05$



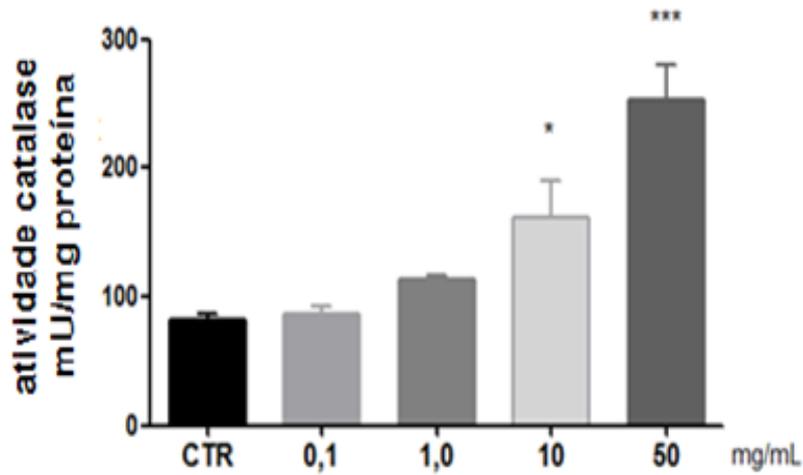
Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

## 6.2 *Ex vivo*

### 6.2.1 Ensaio enzimático

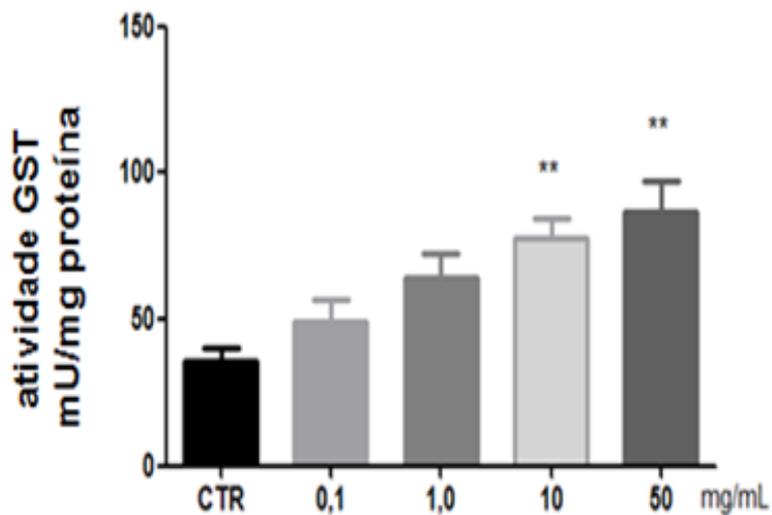
Após as 72 horas de tratamento com o EHFCC, pode-se observar um aumento da defesa antioxidante nas células das moscas. Houve aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes catalase (FIGURA 9), glutathione S-transferase (GST) (FIGURA 10) e superóxido dismutase (SOD) (FIGURA 11) a partir da concentração de 10mg/mL. A atividade da enzima acetilcolinesterase não foi alterada após tratamento com *C. campestris* (FIGURA 12).

FIGURA 9 - Avaliação da atividade da enzima antioxidante catalase em *D. melanogaster* após exposição *in vivo* ao EHFCC durante 72h. \* $p < 0,05$



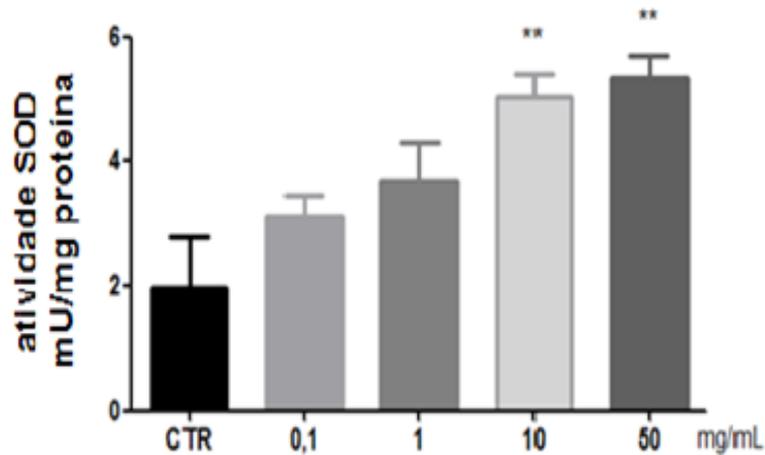
Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

FIGURA 10 - Avaliação da atividade da enzima antioxidante glutathione S-transferase (GST) em *D. melanogaster* após exposição *in vivo* ao EHFCC durante 72h. \* $p < 0,05$



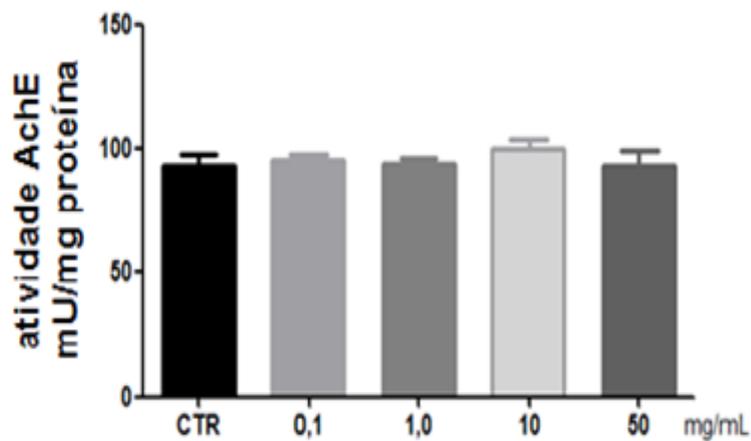
Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

FIGURA 11 - Avaliação da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em *D. melanogaster* após exposição *in vivo* ao EHFCC durante 72h. \* $p < 0,05$ .



Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

FIGURA 12 – Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase em *D. melanogaster* após exposição *in vivo* ao EHFCC durante 72h. \* $p < 0,05$

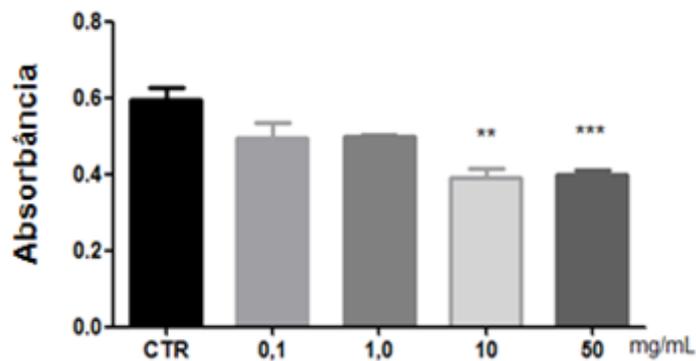


Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

### 6.2.2 Determinação de Tióis

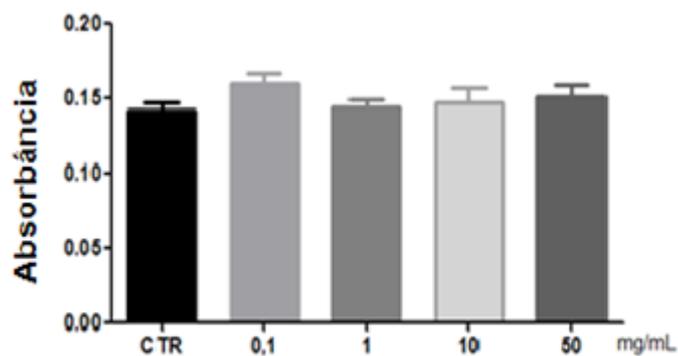
Tratamento de 72 h com *C. campestris* reduziu significativamente o conteúdo de PSH a partir da concentração de 10mg/mL (FIGURA 13), sem alterar os níveis de NPSH em *D. melanogaster* (FIGURA 14).

FIGURA 13 – Determinação de PSH em *D. melanogaster* após 72h de exposição *in vivo* ao EHFCC. \*p<0,05



Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados.

FIGURA 14 - Determinação de NPSH em *D. melanogaster* após 72h de exposição *in vivo* ao EHFCC. \*p<0,05

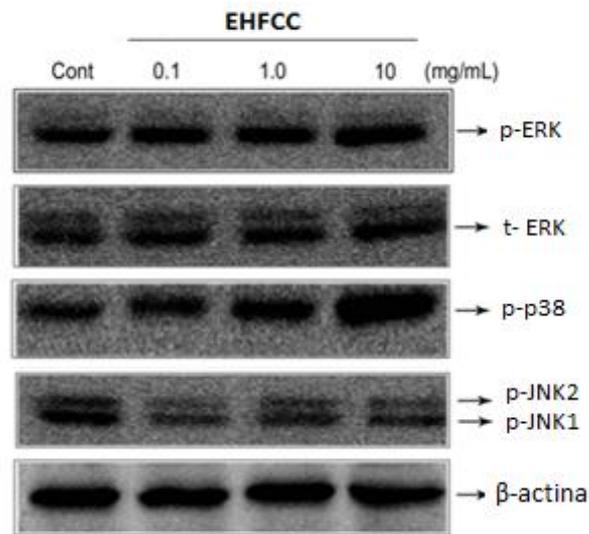


Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

### 6.2.3 Fosforilação de proteína

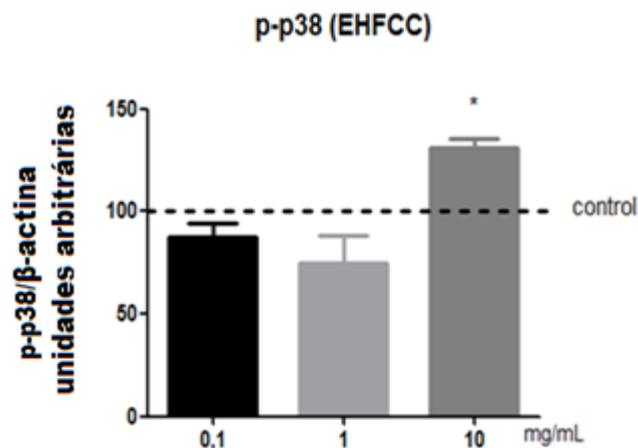
Através da análise da modulação de proteínas MAPK (FIGURA 15), pode-se observar que após o tratamento de 72h, o EHFCC induziu o aumento da fosforilação da MAPK p38 (FIGURA 16), a inibição da JNK2 (FIGURA 17), e não alterou a fosforilação da ERK.

FIGURA 15 - Western blotting da fosforilação de proteínas MAPK em *D. melanogaster* após exposição *in vivo* ao EHFCC durante 72h.  $\beta$ -actina foi usada como controle. \* $p < 0,05$



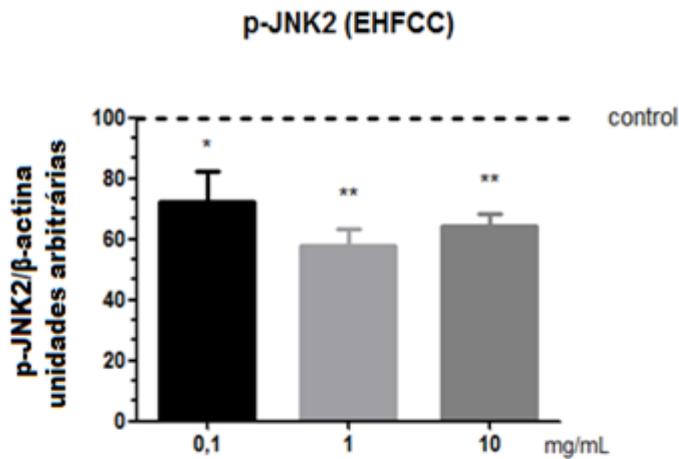
Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

FIGURA 16 - Quantificação da proteína p38 em *D. melanogaster* após exposição *in vivo* ao EHFCC durante 72h. \* $p < 0,05$



Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

FIGURA 17 - Quantificação da proteína JNK2 em *D. melanogaster* após exposição *in vivo* ao EHFCC durante 72h. \* $p < 0,05$ .

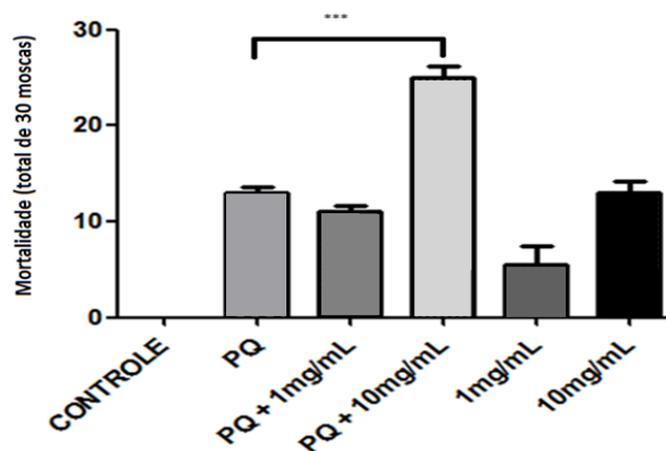


Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

#### 6.2.4 Tratamento com *C. campestris* e Paraquat e avaliação da atividade locomotora

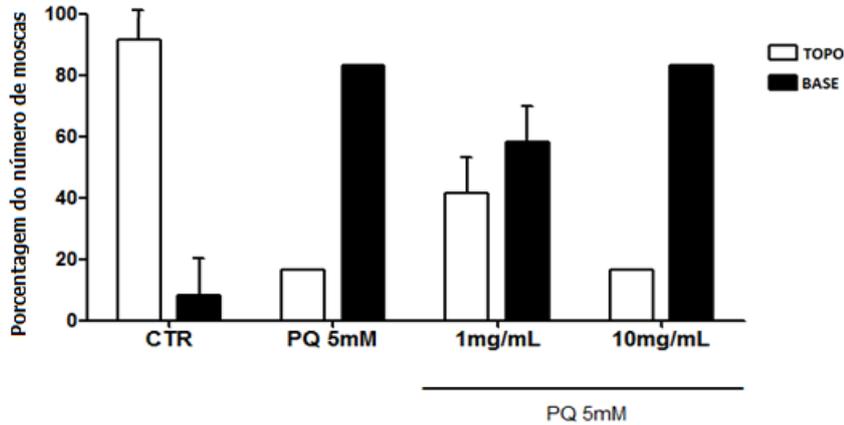
Após 72 horas de exposição *in vivo*, 10mg/mL do EHFCC associado ao herbicida Paraquat 5mM potencializou a mortalidade das moscas (FIGURA 18), além de causar dano na atividade locomotora das mesmas (FIGURA 19).

FIGURA 18 – Taxa de sobrevivência de *D. melanogaster* submetidas à exposição *in vivo* com EHFCC e PQ 5mM , ao longo de um período de 72h. \*  $p < 0,05$ .



Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

FIGURA 19 – Análise da atividade locomotora através do teste de Geotaxia Negativa após 72h de exposição *in vivo* de *D. melanogaster* ao EHFCC e PQ 5mM. \* $p < 0,05$



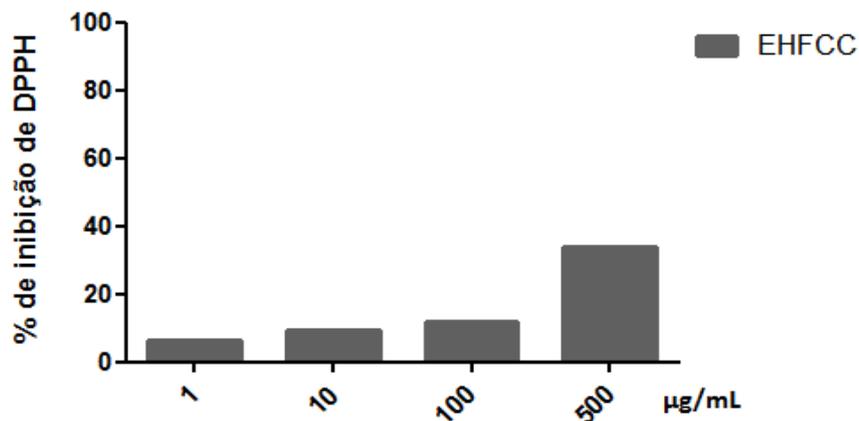
Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

### 6.3 *In vitro*

#### 6.3.1 Método do sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH)

Avaliou-se a atividade antioxidante *in vitro* do EHFCC pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), nas concentrações de 1, 10, 100 e 500  $\mu\text{g/mL}$  e a inibição do radical foi respectivamente: 6,16; 9,38; 11,61 e 33,78% (FIGURA 20).

FIGURA 20- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do EHFCC pelo método de DPPH. \* $p < 0,05$ .

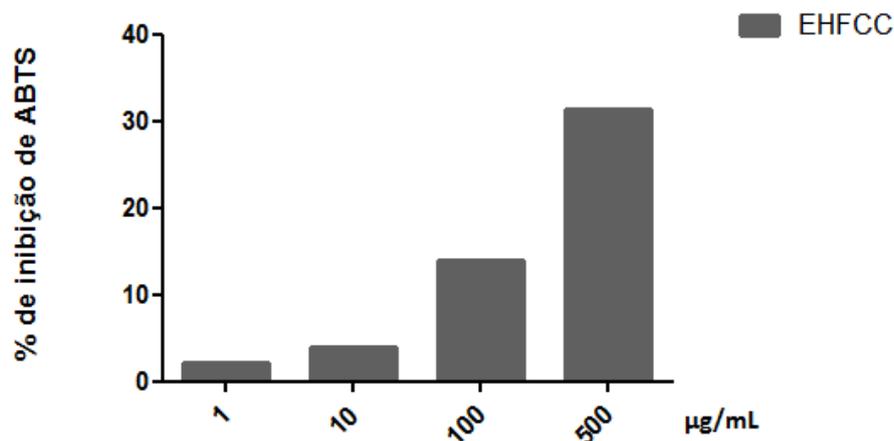


Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

### 6.3.2 Método da captura do radical (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) ABTS

Avaliou-se a atividade antioxidante *in vitro* do EHFCC pelo método de ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) nas concentrações de 1, 10, 100 e 500 µg/mL e a inibição do radical foi respectivamente: 2,11; 3,87; 14,02 e 31,37% (FIGURA 21).

FIGURA 21- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do EHFCC pelo método de ABTS  
\*p<0,05.

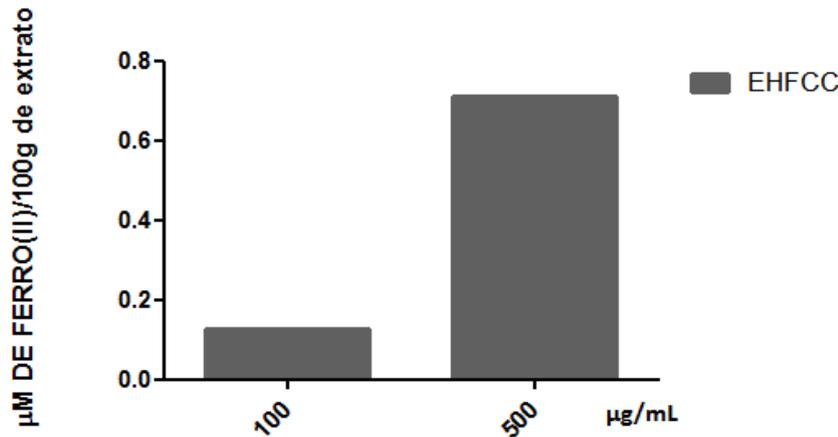


Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

### 6.3.3 Método de redução do ferro (FRAP)

Avaliou-se a atividade antioxidante *in vitro* do EHFCC pelo método de FRAP nas concentrações de 100 e 500 µg/mL. O poder de redução do ferro foi respectivamente de 0,12 e 0,71 (µM Fe [II]/100g de extrato) (FIGURA 22).

FIGURA 22- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do EHFCC pelo método de FRAP (expressa em  $\mu\text{M Fe [II]}/100\text{g}$  de extrato). \* $p < 0,05$ .



Fonte: Do autor. Dados ainda não publicados

## 7. Discussão

As plantas evoluíram desenvolvendo sistemas de defesa contra os mais diferentes patógenos, dentre estes mecanismos de proteção, estão os metabólitos secundários. A espécie *Croton campestris* possui uma variedade destes compostos, e pesquisas vêm demonstrando seus potenciais fitoquímico e farmacológico. Uma prospecção fitoquímica do EHFCC demonstrou a presença de flavonas, flavonóides, flavanonas, alcalóides, terpenóides e xantonas (BRITO JÚNIOR et al., 2013). Os metabólitos vegetais são bem descritos na literatura, devido à infinita gama de propriedades que possuem, aqueles com atividade inseticida normalmente estão distribuídos pelas raízes, folhas e sementes das plantas, como é o caso dos terpenóides, piretróides, alcalóides, e rotenóides, que podem interferir severamente no metabolismo e desenvolvimento de outros organismos (VASCONCELOS, GONDIM JÚNIOR, BARROS, 2006). Em insetos essas substâncias podem causar efeitos de repelência, inibição de oviposição, alterações no sistema hormonal (ROEL, 2001), interferir no crescimento, inanição ou intoxicação direta, danos na maturação, capacidade reprodutiva, levar a morte nas demais fases de desenvolvimento (VIEGAS JÚNIOR, 2003), ou até mesmo estimular a alimentação do inseto, ou aumentar a resistência da planta (TAGLIARI; KNAAK; FIUZA, 2004).

Os dados obtidos neste trabalho demonstram a toxicidade que o EHFCC apresentou nas diferentes concentrações e tratamentos, podendo-se atribuir esta toxicidade à presença de seus metabólitos secundários, como os alcalóides e terpenóides.

Os resultados dos ensaios bioquímicos *in vivo* após 72 horas de tratamento com EHFCC foram significativos demonstrando uma diminuição da viabilidade celular, e o estresse oxidativo foi confirmado pelo aumento da fluorescência da DCF-DA, indução das enzimas antioxidantes CAT, GST e SOD, e diminuição dos tióis proteicos. Tióis são compostos que contém um grupo sulfidrilo (-SH) ligado a um átomo de carbono, e que possuem ação antioxidante e estão amplamente distribuídos pelas células (COSTA; SANTOS; LIMA, 2006). Além disso, após o tratamento houve um aumento da fosforilação da MAPK p38 que é um indicador de estresse celular. Estes resultados podem relacionar-se com a queda na viabilidade e da atividade locomotora das moscas, demonstrando uma resposta de tentativa de defesa de *D. melanogaster* contra a toxicidade que *Croton campestris* apresentou.

A atividade locomotora das moscas pode ser afetada por condições de estresse oxidativo, devido sua escalada necessitar de alto nível de energia dos músculos de voo, que por sua vez são ricos em mitocôndrias (HOSAMANI; MURALIDHARA, 2009). Algumas espécies reativas de oxigênio podem causar danos ao DNA, RNA, e proteínas no núcleo e nas mitocôndrias das células (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006). A geração de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria é um processo que ocorre normalmente em condições fisiológicas, pois elas necessitam de oxigênio para manter o suporte energético das células, mas quando há um aumento da sua taxa metabólica, aumenta o nível de espécies reativas de oxigênio (BIESALSKI, 2002).

Os ensaios de atividade antioxidante *in vitro* demonstraram uma capacidade antioxidante do EHFCC, de forma proporcional em relação a sua concentração. Porém esses ensaios demonstram apenas uma propriedade antioxidante do extrato e a sua reatividade química com os reagentes, não podendo ser classificada como uma atividade antioxidante total, pois existe uma variedade muito grande de radicais livres, nem todos possuindo o mesmo padrão de reação para os antioxidantes, além de existirem muitos aspectos envolvidos na capacidade antioxidante total de uma amostra, como por exemplo, suas capacidades de quelar metais e de limpeza das EROs (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

A associação de dois agentes oxidantes, do EHFCC com o Paraquat, pode estar relacionada com a toxicidade e alta taxa de mortalidade que foi observada no tratamento de 72

horas. O Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto) é um herbicida de largo espectro e não seletivo mundialmente utilizado no controle de ervas daninhas na lavoura, é prejudicial à saúde humana, e pode causar intoxicação e até mesmo levar a morte (HOSAMANI; MURALIDHARA, 2013). Práticas agrícolas menos agressivas ao meio ambiente vêm sendo cada vez mais buscadas, dentre elas os vegetais se destacam por serem detentores de um grande potencial fitoquímico, seletivos no combate a pragas (MOREIRA et al., 2012), e poderem ser utilizados como princípio ativo para novos compostos naturais. O uso de compostos vegetais em associação a agrotóxicos surge como uma maneira de diminuir o impacto ambiental, sendo uma alternativa mais segura e eficaz para a natureza. Assim sendo, os resultados obtidos no tratamento do EHFCC em conjunto com o Paraquat revelam o poder de atividade tóxica de *C. campestris* no modelo de *D. melanogaster* e seu potencial como uma possível prática de controle.

## 8. Conclusão

Com base nestes resultados, verificou-se o efeito bioinseticida do extrato hidroalcoólico de folhas de *Croton campestris* no modelo de *Drosophila melanogaster*. Os dados deste trabalho atentam para a importância em se conhecer as propriedades que as plantas utilizadas na medicina popular e o potencial biotecnológico que as mesmas podem apresentar sendo este potencial atribuído à presença de seus metabólitos vegetais.

O uso de compostos vegetais na produção de bioinseticidas representa uma alternativa segura, econômica, e facilmente biodegradável, em comparação com os inseticidas químicos, podendo atuar na eliminação de pragas na agricultura, além de contribuir para a preservação do meio ambiente, e para a saúde da população mundial. Entretanto, mais estudos são necessários com vista a identificar os possíveis metabólitos desta planta aos quais possam ser atribuídos o potencial bioinseticida e possivelmente isolados.

## 9. Referências

- AEBI, Hugo. **Catalase *in vitro***. Methods in Enzymology, v. 105, p. 121–6, 1984.
- ALLEN, Robert. **Oxidative stress and superoxide dismutase in development, aging and gene regulation**. Age (Omaha), v. 21, n. 2, p. 47–76, 1998.
- ALTIERI, Miguel. **Biotechnologia agrícola: Mitos, Riscos ambientais e alternativas**. Porto Alegre: Ascar-Emater, 2002.
- ALVIANO, Souza, et al. **Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms**. Oral Microbiology and Immunology, v.20, n. 2, p. 101-5, 2005.
- BABOT, Zoila; CRISTOFOL, Rosa; SUÑOL, Cristina. **Excitotoxic death induced by released glutamate in depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABAA receptors and niflumic acid-sensitive chloride channels**. European Journal of Neuroscience, v. 21, n. 1, p. 103–12, 2005.
- BALTRUŠAITYTĖ, Vilma; VENSKUTONIS, Petras; CEKSTERYT, Violeta. **Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts**. Food Chemistry, v. 101, n. 2, p. 502-14, 2007.
- BARREIROS, André; DAVID, Jorge. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo**. Química Nova, v. 29, n.1, p.113-23, 2006.
- BENZIE, Iris; STRAIN, John. **The ferric reducing ability of Plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP assay**. Analytical Biochemistry, v. 239, n. 1, p. 70-6, 1996.
- BERRY, Paul. **Croton Research Network**. 2002. Disponível em: <<http://www.cria.org.br/eventos/tdbi/flora/presentations/PaulBerry/crotonFB/world.html>> Acesso em: 28 nov. 2013, 19:21:10.
- BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1 ed. Jaguariúna-SP: Embrapa meio ambiente, 2009.
- BETTIOL, Wagner. **Produtos biocompatíveis para o controle de doenças de plantas**. Workshop Insumos para uma Agricultura Sustentável. Jaguariúna-SP. 2012. Disponível em:

< <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/77801/1/2012AA91.pdf> > Acesso em: 16 dez. 15:48:13.

BIESALSKI, Hans. **Free radical theory of aging**. *Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 5, n. 1, p. 5-10, 2002.

BLOCK, Sebastian, et al. **Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus***. *Phytochemistry*, v. 65, n. 8, p. 1165-71, 2004.

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. Disponível em: <[http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/TDs/td\\_0838.pdf](http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/TDs/td_0838.pdf)> Acesso em: 02 dez. 2013, 21:34:23.

BRADFORD, Melinda. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-54, 1976.

BRAGA, Renato. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Escola Superior de Agricultura de Mossoró. 3. ed. Fortaleza: Ed. Universitária UFRN, 1976.

BRIEN, John, et al. **Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity**. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, n. 17, p. 5421-26, 2000.

BRITO JÚNIOR, Francisco. **Bioprospecção farmacológica de plantas medicinais do Nordeste brasileiro: avaliação da atividade gastroprotetora e antimicrobiana do *Croton campestris* A.St.-Hill. (velame do campo)**. 132 f. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará, 2010.

BRITO JÚNIOR, Francisco, et al. **Antiulcerogenic Activity of the Hydroalcoholic Extract of Leaves of *Croton campestris* A. St.-Hill in Rodents**. Hindawi Publishing Corporation, v. 2013, p. 1-10, 2013.

CHEN, Zen-Ping; CAI, Ya; PHILLIPSON, David. **Studies on the Anti-Tumor, Anti-Bacterial, and Wound-Healing Properties of Dragon's Blood**. *Planta Medica Journal*, v. 60, n. 6, p. 541-5, 1994.

COGO, Antonio, et al. **Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadores de impactos ambientais.** *Natureza on line*, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009.

COHEN, Philip. **The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells.** *Trends in Biochemical Sciences*, v. 7, n. 9, p. 353–361, 1997.

COSTA, Carolina; SANTOS, Rita; LIMA, Emerson. **A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 42, n. 5, p. 345-50, 2006.

CROZIER, Alan; CLIFFORD, Michael; ASHIHARA, Hiroshi. **Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.** 1 ed. Ucrânia: Blackwell Publishing, 2006.

CRUZ, Gilberto. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil.** 2. ed. Rio de Janeiro: Edel, 1982.

DAVID, André; DAVID, Juceni. **Estresse oxidativo: relação entre as espécies reativas e defesa do organismo.** *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-23, 2006.

DI STASI, Luiz. **Plantas medicinais: arte e ciência.** Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed. UNESP. 1996

EL BABILI, Fatiha, et al. **Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*.** *Fitoterapia*, v. 77, n. 5, p. 384-7, 2006.

EL BABILI, Fatiha, et al. **Velamo do campo: its volatile constituents, secretory elements, and biological activity.** *Journal of Medicinal Food*, v. 15, n. 7, p. 671-6, 2012.

ELLMAN, George. **Tissue sulfhydryl groups.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 82, n. 1, p. 70–7, 1959.

ELLMAN, George, et al. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochemical Pharmacology Journal*, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

FEANY, Mel; BENDER, Welcome. **A *Drosophila* model of Parkinson's disease.** *Nature*, v. 404, p. 394-8, 2000.

FINAUD, Julien; LAC, Gérard; FILAIRE, Edith. **Oxidative Stress: Relationship with Exercise and Training.** *Sports Medicine*, v.36, n.4, p. 327-58, 2006.

FRANCO, Jeferson, et al. **Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase.** *Free Radical Biology & Medicine*, v. 47, n. 4, p. 449–57, 2009.

GILLHAM, Brian; PAPACHRISTODOULOU, Despo; THOMAS, Hywel. **Wills':** biochemical basis of medicine. 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional, 1997.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-81, 2007.

GRYNBERG, Noema, et al. **Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*.** *Planta Medica Journal*, v. 65, n. 8, p. 687-9, 1999.

GURGEL, Luilma, et al. ***In vitro* antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 28, n. 2, p. 409-12, 2005.

HILL, Armando, et al. **Tamizaje fitoquímico preliminar de espécies del género *Croton* L.** *Revista Cubana de Farmácia*, v. 35, n. 3, p.203-6, 2001.

HIRATA, Ronaldo, et al. **Detecção de inseticidas por bioensaio com *Drosophila melanogaster*.** *Arquivos do Instituto Biológico*, v.69, n.3, p.97-102, 2002.

HO, Yeung, et al. **Different mechanisms account for extracellular-signal regulated kinase activation in distinct brain regions following global ischemia and reperfusion.** *Neuroscience*, v. 145, n. 1, p. 248-55, 2007.

HOSAMANI, Ravikumar; MURALIDHARA. **Neuroprotective efficacy of *Bacopa monnieri* against rotenone induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*.** *Neurotoxicology*, v. 30, n. 6, p. 977-85, 2009.

HUANG, Dejian; OU, Boxin; PRIOR, Ronald. **The chemistry behind antioxidant capacity assays.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n. 6, p.1841-56, 2005.

HUNSAKER, Donald; SCHENK, George. **The determination of thiols with diphenylpicrylhydrazyl as a spectrophotometric reagent.** *Talanta Journal*, v. 30, n. 7, p. 475-80, 1983.

JACOBSON, Martin. **Botanical Pesticides.Past, Present, and Future.** Insecticides of Plant Origin, v. 387. p. 1-10, 1989.

JAKOBY, William; HABIG, William. **Glutathione S-transferases (rat and human).** Methods Enzymology, v. 77, p. 218–31, 1981.

JOLY, Carlos, et al. **Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil.** Revista USP, n. 89, p. 114-33, 2011.

KAWAI, Kazushige, et al. **Anti-angiogenic properties of plaunotol.** Anticancer Drugs, v. 16, n. 4, p. 401-7, 2005.

KOSTYUK, Vladimir; POTAPOVICH, Alla. **Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase.** International Journal of Biochemistry, v.19, n. 5, p. 1117–24, 1989.

KUSKOSKI, Marta, et al. **Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante e pulpa de frutos.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 25, n. 4, p. 726-32, 2005.

KYRIAKIS, John; AVRUCH, Joseph. **Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.** Physiological Reviews, v. 81, n. 2, p. 807-69, 2001.

MATIAS, Edinardo, et al. **Light-enhanced antibiotic activity of Brazilian medical plants (*Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. and *Cordia verbenaceae* D.C).** Asian Biomed, v. 4, p. 183–6, 2010.

MATIAS, Edinardo, et al. **Phytochemical prospection and modulation of aminoglycoside antibiotic activity by *Croton campestris* A.** Chemotherapy, v. 57, p. 305-9, 2011.

MATSUMOTO, Yasuyoshi, et al. **The antibacterial activity of plaunotol against *Staphylococcus aureus* isolated from the skin of patients with atopic dermatitis.** Microbios, v. 96, n. 385, p. 149-55, 1998.

MATSUOKA, Masato; IGISU, Hideki. **Effects of heavy metals on mitogen-activated protein kinase pathways.** Environmental Health and Preventive Medicine, v. 6, n. 4, p. 210-17, 2002.

MEDEIROS, Debora; VALLE, Luci; ALVES, Ruy. **Euphorbiaceae nativas de cerrado e campo rupestre da serra de São José, Minas Gerais, Brasil.** Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro, v. 66, n. 2, p. 323-49, 2008.

MENEZES, Elen. **Inseticidas Botânicos: Seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola.** 1 ed. Seropédica – RJ: [s.n], 2005.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade Brasileira.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 25 nov. 2013, 15:57:35.

MONARETTO, Tatiana. **Avaliação do potencial antioxidante, extração e quantificação de compostos fenólicos em sucos de uva produzidos no sudoeste do Paraná.** 48f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, 2013.

MORAIS, Selene, et al. **Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L.** Journal of the American Mosquito Control Association, v. 22, n. 1, p. 161-4. 2006.

MORTON, Richard; SINGH, Rama. **The association between malathion resistance and acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster*.** Biochemical Genetics, vol. 20, n. 1, p. 179-98, 1982.

ORR, William; SOHAL, Rajindar. **The effects of catalase gene overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 297, n. 1, p. 35-41, 1992.

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, Mari, et al. **Effects of Hg(II) Exposure on MAPK Phosphorylation and Antioxidant System in *D. melanogaster*.** Environmental Toxicology, 2012.

PEREIRA, Elizete, et al. ***In vitro* antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry.** Planta Medica Journal, v. 77, n. 4, p. 401-4, 2011.

PEREZ-SEVERIANO, Francisca, et al. **S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats.** *Neurochemistry International*, v. 45, n. 8, p. 1175–83, 2004.

PHAN, Minh, et al. **Cytotoxic diterpenoids from Vietnamese medicinal plant *Croton tonkinensis* GAGNEP.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 53, n. 3, p. 296-300, 2005.

PINTO, Angelo, et al. **Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas.** *Química Nova*, v. 25, n. 1, p. 45- 61, 2002.

POSSER, Thaís, et al. **Manganese induces sustained Ser40 phosphorylation and activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells.** *Journal of Neurochemistry*, v. 110, n. 3, p. 848–56, 2009.

PRATA, Edna, et al. **Isolamento do princípio ativo de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae).** *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 74, n. 2, p.36-41, 1993.

PULIDO, Raquel; BRAVO, Laur.; SAURA-CALIXTO, Fulgencio. **Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing / antioxidant power assay.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, n. 8, p.3396-3402, 2000.

PULPO, Mônica; GALLO, Margareth. **Biologia Química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais.** São Paulo: *Química Nova*, v. 30, n. 6, p. 1446-55, 2007.

RANDAU, et al. **Estudo farmacológico de *Croton rhamnifolius* H.B.K e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm (Euphorbiaceae).** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.14, n. 2, p. 89-96, 2004.

RE, Roberta, et al. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, n. 9-10, p. 1231–7, 1999.

ROEL, Antonia. **Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável.** *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*. v. 1, n. 2, p. 43-50, 2001.

\_\_\_\_\_. **A agricultura orgânica ou ecológica e a sustentabilidade da agricultura.** *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*, v. 3, n. 4, p. 57-62, 2002.

ROENGSUMRAN, Sophon, et al. **Croblongifolin, a new anticancer clerodane from *Croton oblongifolius***. *Planta Medica Journal*, v. 68, n. 3, p. 274-77, 2002.

ROSA, MARIA, et al. **Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara***. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 6, p.1895-901, 2003.

ROSSI, Damiano, et al. **Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex**. *Phytomedicine* v. 10, n. 2-3, p. 139-44, 2003.

SAITO, Maria. **As plantas praguicidas: alternativa para o controle de pragas da agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. Disponível em <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Saito\\_plantasID-xWZZuffPN5.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Saito_plantasID-xWZZuffPN5.pdf)> Acesso em: 03 dez. 2013, 16:45:17.

SALATINO, Antônio; SALATINO, Maria; NEGRI, Giuseppina. **Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* espécies (Euphorbiaceae)**. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.18, n. 1, p.11-33, 2007.

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

SAUR, Lisiane, et al. Efeitos do envelhecimento na atividade locomotora de *Drosophila melanogaster* como modelo de Parkinsonismo. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA-PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE DO RIO GRANDE DO SUL, 10, 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: EDIPUCRS, 2009. p. 283-5.

SIMÕES, Claudia, et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/UFSC, 2000.

SOMMIT, Damrong, et al. **Cytotoxic activity of natural labdanes and their semi-synthetic modified derivatives from *Croton oblongifolius***. *Planta Medica Journal*, v. 69, n. 2, p. 167-170, 2003.

STRONACH, Beth; PERRIMON, Norbert. **Stress signaling in *Drosophila***. *Oncogene*. v. 18, n. 45, p. 6172-82, 1999.

SUDATI, Jéssie, et al. ***Valeriana officinalis* attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster***. *NeuroToxicology*, v. 37, p.118–26, 2013.

TAGLIARI, Marinez; KNAAK, Neiva; FIUZA, Lidia. **Plantas inseticidas: interações e compostos**. Pesquisa Agropecuária Gaúcha, v.10. n.1-2, p.101-11, 2004.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. São Paulo: Artmed, 2006.

THONGTAN, Jirabhorn, et al. **New antimycobacterial and antimalarial 8,9-secokaurane diterpenes from *Croton kongensis***. Journal of Natural Products, v. 66, n. 6, p. 868-70, 2003.

TOWNSEND, Danyelle; TEW, Kenneth; TAPIERO, Haim. **The importance of glutathione in human disease**. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 57, n. 3-4, p. 145-55, 2003.

UBILLAS, Rose, et al. **SP-303, an antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (Sangre de Drago)**. Phytomedicine, v. 1, n. 2, p. 77-106, 1994.

VASCONCELOS, Geraldo; GONDIM JÚNIOR, Manoel; BARROS, Reginaldo. **Extratos aquosos de *Leucaena leucocephala* e *Sterculia foetida* no controle de *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae)**. Revista Ciência Rural, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1353-9, 2006.

VIEGAS JÚNIOR, Cláudio. **Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos**. Química Nova, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

WHY EVOLUTION IS TRUE. **Who's related to fruit flies**. Disponível em:  
< <http://whyevolutionistrue.wordpress.com/2011/03/20/whos-related-to-fruit-flies/>> Acesso em: 28 jan. 2014, 21:23:12.