



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
campus – SÃO GABRIEL

**MECANISMO DA ATIVIDADE ENTOMOTÓXICA INDUZIDA PELO
EXTRATO METANÓLICO DE *Araucaria angustifolia***

Autora: Patrícia Gomes da Silva
Orientador: Prof. Dr. Chariston André Dal Belo

São Gabriel-RS
2014

PATRÍCIA GOMES DA SILVA

**MECANISMO DA ATIVIDADE ENTOMOTÓXICA INDUZIDA PELO
EXTRATO METANÓLICO DE *Araucaria angustifolia***

Monografia apresentada à comissão de trabalho de conclusão do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa – Campus São Gabriel, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Chariston André Dal Belo

São Gabriel

2014

**MECANISMO DA ATIVIDADE ENTOMOTÓXICA INDUZIDA PELO
EXTRATO METANÓLICO DE *Araucaria angustifolia***

PATRÍCIA GOMES DA SILVA

Monografia submetida à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada por:

Presidente, Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

Prof. Dr. Margéli Pereira de Albuquerque

Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto

Suplente

São Gabriel, Março de 2014

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, em especial à minha mãe, e ao meu pai pela força e motivação.

Ao meu noivo César, que com sabedoria soube me aconselhar nos momentos mais difíceis.

Aos professores que colaboraram de forma direta e indireta no meu crescimento profissional e pessoal durante estes quatro anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Chariston André Dal Belo pela orientação, pelo apoio para realização deste trabalho e, especialmente, pela paciência.

Ao Ms Thiago Carrazoni de Freitas pela coorientação e auxílio nos experimentos.

A Ms Michele Statch por auxiliar na confecção dos extratos da planta *A. angustifolia*.

A UNIPAMPA por apoiar o desenvolvimento do projeto por meio da disponibilização de bolsas, apoio logístico e financeiro.

Aos colegas Letiane, Natália, Mayra, Eduardo por tudo o que passamos juntos.

Resumo

MECANISMO DA ATIVIDADE ENTOMOTÓXICA INDUZIDA PELO EXTRATO METANÓLICO DE *Araucaria angustifolia*

A *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. Kuntze (Araucariaceae), conhecida como “Pinheiro do Paraná”, é uma conífera endêmica do sul do Brasil, e tem sido utilizada tradicionalmente como inseticida natural em comunidades rurais do sul do Brasil. O objetivo desse estudo foi identificar a constituição química associada ao mecanismo inseticida do extrato metanólico de *A. angustifolia* (AAME) demonstrando o mecanismo de ação entomotóxico induzido pelo AAME em modelo experimental de baratas da espécie *Phoetalia pallida*. Os ensaios para a determinação da dose letal mínima (DLM) em baratas da espécie *P. pallida*, confirmaram a atividade inseticida do extrato em doses a partir de 800µg/g de animal. A mesma atividade foi demonstrada pela quercetina (80µg/g), porém, com maior potência comparada ao AAME. Os ensaios de atividade biológica demonstraram uma atividade neurotóxica do AAME e da quercetina, tanto em nível central quanto periférico do inseto. Dessa forma, o AAME (200µg/g) e a quercetina (40µg/g) induziram um aumento no tempo total de *grooming* realizado pelo inseto, (138.11±5s /30min; $p<0.05$ e 230±5s/30min; $p<0.05$), respectivamente. A administração de Atropina um inibidor colinérgico não-seletivo no receptor muscarínico (40µg/g), previamente à adição de quercetina (40µg/g) induziu um aumento significativo na atividade de *grooming* quando comparado à quercetina isoladamente (350±3s/30min; $p<0.05$). Quando o animal foi pré-tratado com Metoctramina (40µg/g), um inibidor seletivo de receptores colinérgicos M₂-M₃, observou-se o maior aumento no tempo de *grooming* induzido pela quercetina (40µg/g) (600±8s/30min; $p<0.01$ teste t). Por outro lado, o pré-tratamento com o SCH23390 (40µg/g), um inibidor seletivo de receptores DA-D₁, reduziu significativamente o *grooming* induzido pela quercetina (40µg/g) (90±6s/30min; $p<0.05$). A administração de Tiramina agonista dos receptores de tiramina (40µg/g) e hidroxilamina um inibidor da guanilato ciclase (40µg/g), aumentaram significativamente o tempo de *grooming* induzido pela quercetina (204±15s/30min; $p<0.05$) e (325±15s/30min; $p<0.01$),

respectivamente. Quando ensaiados em preparação músculo coxal-adutor metatorácico de *P. pallida*, tanto o AAME (200µg/g de animal) quanto a quercetina (40µg/g) induziram bloqueio neuromuscular irreversível em 120 min de registros (50±9%; $p<0.05$ e 100±7%; $p<0.05$), respectivamente. Este último resultado indica uma ação direta do extrato de *A. angustifolia* sobre o sistema nervoso periférico da barata. Neste trabalho nós demonstramos a atividade inseticida do AAME, utilizando como modelo experimental baratas da espécie *P. pallida* e nossos resultados confirmam os conhecimentos tradicionais de *A. angustifolia* como um inseticida natural. A atividade inseticida do AAME é principalmente relatada por sua atividade anti-colinesterásica em insetos, mas também por ação direta em junção neuromuscular. As atividades inibitórias do AAME e quercetina na junção neuromuscular dos insetos devem ser exploradas em uma futura investigação detalhada, mas é sugerida a inibição dos receptores NMDA.

Palavras-Chave: *Araucaria angustifolia*, inseticida natural, neurotoxicidade, quercetina, baratas.

Abstract

MECHANISM OF THE ENTOMOTOXIC ACTIVITY INDUCED BY *Araucaria angustifolia* METHANOLIC EXTRACT IN *PHOETALIA PALLIDA*

Araucaria angustifolia (BERT.) O. Kuntze (Araucariaceae) is a conifer endemic from southern Brazil called “Parana pine”. It has been used traditionally in communities of southern Brazil. We have demonstrated, for the first time, the insecticidal activity of *Araucaria angustifolia* methanolic extract (AAME) and one of its chemical secondary metabolites, quercetin against *Phoetalia pallida*. Quercetin was more effective than AAME whole extract being lethal at 80µg/g (animal weight). Both AAME (200µg/g of animal weight) and quercetin (40µg/g of animal weight) induced increase in the time of grooming activity (138.11±5s /30min; $p<0.05$) and (230±5s/30min; $p<0.05$), respectively. The injection of atropine (40µg/g) combined with quercetin (40µg/g of animal weight) significantly increased the grooming levels to over the control values of quercetin (350±3s/30min; $p<0.05$). When methoctramine (40µg/g), a selective inhibitor of M₂-M₃ cholinergic receptor was combined with quercetin (40µg/g of animal weight) there was the highest increase on the grooming pattern (600±8s/30min; $p<0.01$). When the SCH 23390 (40µg/g), a selective DA-D₁ receptor blocker was administrated 15min earlier the treatment with quercetin (40µg/g) there was a significative inhibition of the grooming levels (90±6s/30min; $p<0.05$). Treatments with Tyramine (40µg/g) and Hydroxylamine (40µg/g), a Guanylate Cyclase (GC) induced a significative increase in the quercetin-induced grooming activity (204±15s/30min; $p<0.05$) and (325±15s/30min; $p<0.01$), respectively. Both AAME and quercetin were able to complete inhibit cockroach neuromuscular transmission in 120 min recordings (50±9% n=6; $p<0.05$) and (100±7% n=10; $p<0.05$), respectively. The later result, point out to a direct action of the extract on insect peripheral nervous system. The results presented here validate the insecticide activity of *A. angustifolia* methanolic extract in *P. pallida*. Phenolic compounds presents in this extract era likely to be involved in the insecticide activity of AAME. The mechanism of insecticide activity is complex and involve both Central and Peripheral Nervous System. The activation of events that initiate with the

activation of Muscarinic Auto-receptors and/or cholinergic interneurons, could lead to an increase of cytosolic IP₃ and Ca²⁺ concentration which could induce a dopamine release in the insect Nervous System. Concerning to the neuromuscular blockage, a further pharmacological investigation would be necessary to clarify this effect. However, one cannot disregard a direct action of quercetin on insect NMDA receptors.

KeyWords: *Araucaria angustifolia*, natural insecticide, neurotoxicity, quercetin, cockroach

Lista de Abreviaturas

AAME - Extrato metanólico de *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. Kuntze

DA - Dopamina

SCH 23390 - Bloqueador de receptor D1 (DA-D1)

NO - Óxido Nítrico

AchE - Acetilcolinesterase

DAT - Transportador de Dopamina

AC- Adenilato Ciclase

mAChRs - Receptores Muscarínicos de Acetilcolina

IP3 - Trifosfato de inusitol

D(x) - Receptor dopaminérgico

M(x) - Receptor muscarínico

PI3 - Fosfatidilinositol 3-quinase

TyrRS - Receptores de Tiramina

sGC - Guanilato ciclase solúvel

GABA - Ácido gama-aminobutírico

NMDA - N-metil-d-aspartato

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. <i>Araucaria angustifolia</i> (BERT.) O. Kuntze..... | 15 |
| FIGURA 2. Barata <i>Phoetalia pallida</i> | 17 |
| FIGURA 3. Dose Letal Mínima (DL50) de AAME | 22 |
| FIGURA 4. Comportamento de grooming por diferentes doses de (AAME) | 23 |
| FIGURA 5. Modulação da atividade de grooming em baratas | 24 |
| FIGURA 6. Influência de moduladores dopaminérgicos no grooming | 26 |
| FIGURA 7. Bloqueio Neuromuscular induzido pelo AAME | 27 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | 5 |
| ABSTRACT | 7 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 9 |
| LISTA DE FIGURAS | 10 |
| SUMÁRIO | 11 |
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 Pesticidas | 13 |
| 1.2 Inseticidas | 13 |
| 1.3 Plantas com atividade inseticida | 14 |
| 1.4 <i>Araucaria angustifolia</i> | 15 |
| 1.5 Animais Experimentais | 16 |
| 2. OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 Objetivos gerais | 18 |
| 2.2 Objetivos específicos | 18 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 19 |
| 3.1 Animais experimentais | 19 |
| 3.2 Reagentes e soluções | 19 |
| 3.3 Material vegetal | 19 |
| 3.4 Preparação do Extrato Metanólico de <i>Araucaria angustifolia</i> (AANME) | 20 |
| 3.5 Ensaio para a atividade inseticida | 20 |

| | |
|---|----|
| 3.6 Ensaio comportamentais | 20 |
| 3.7 Preparação <i>in vivo</i> do músculo adutor metatorácico-coxal em baratas | 21 |
| 3.8 Análise estatística dos dados | 21 |
| 4. RESULTADOS | 22 |
| 4.1 Atividade Inseticida do AAME e Quercetina | 22 |
| 4.2 Efeito de doses subletais de AAME e Quercetina na atividade de grooming | 23 |
| 4.3 Efeito de moduladores colinérgicos em atividade de grooming induzida pela Quercetina | 24 |
| 4.4 Efeito de moduladores de dopamina, Hidroxina e Tiramina em atividade de grooming quercetina-induzido | 25 |
| 4.5 Bloqueio neuromuscular <i>in vivo</i> em baratas induzido pelo AAME e quercetina preparação nervo-músculo | 26 |
| 5. DISCUSSÃO | 28 |
| 6. CONCLUSÃO | 32 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 33 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pesticidas

Os pesticidas podem ser definidos como qualquer substância ou mistura de substâncias capazes de prevenir, destruir ou repelir pragas, podendo estas serem caracterizadas como: insetos, ervas daninhas, roedores ou ainda um conjunto de organismos indesejados (Ecobichon, 2001). Em uma situação ideal, os pesticidas devem atuar unicamente sobre o alvo desejado. No entanto, não é o que acontece na prática, pois a maioria dos pesticidas não é específico, exercendo sua ação tóxica sobre espécies não-alvo, incluindo humanos (Rattan, 2010).

A busca por novos pesticidas ocorreu principalmente no período da Segunda Guerra Mundial. O desenvolvimento de pesquisas para o controle de infestações de piolhos, tifo exantemático, malária e outras enfermidades transmitidas por insetos, bem como para o controle de espécies pragas de lavouras, levou a descoberta de novos inseticidas químicos, mais seguros para mamíferos, que podiam ser aplicados em roupas e no corpo e eram capazes de prevenir reinfestações.

Atualmente, existem várias classes de pesticidas, com diferentes propósitos e mecanismos de ação. De acordo com Costa (2008), a classificação mais comum dos inseticidas se dá por suas espécies-alvo, sendo essa dividida principalmente em quatro grandes grupos: inseticidas, herbicidas, fungicidas e rodenticidas.

1.2 Inseticidas

A estratégia mais antiga para o controle de populações de insetos, e ainda a mais utilizada, é baseada no uso de inseticidas, substâncias de origem natural ou sintética utilizadas para eliminar insetos em diferentes fases do seu ciclo de vida. Inseticidas, pesticidas ou praguicidas são quaisquer agentes químicos ou biológicos utilizados para impedir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga (Ritter, 1997).

No entanto, a história também mostra que o uso exagerado de inseticidas sintéticos leva a inúmeros problemas que não são previstos no momento da sua

aplicação como: intoxicação aguda e crônica de aplicadores, trabalhadores rurais, e mesmo os consumidores; mortandade de peixes, aves e outros animais; interrupção dos recursos naturais de controle biológico e polinização; extensa contaminação de águas subterrâneas, ameaçando potencialmente a saúde humana e ambiental, gerando inclusive a evolução da resistência a pesticidas nas populações de pragas (Forget 1993, Marco 1987, National Research Council 2000, Perry 1998).

Governos respondem a esses problemas através de ações regulatórias, proibições ou restrições severas de produtos considerados nocivos, além da criação de políticas para substituir produtos de maneira que os riscos para a saúde humana e o meio ambiente sejam diminuídos.

1.3 Plantas com Atividade Inseticida

A prática do uso de derivados de plantas ou inseticidas botânicos na agricultura remonta, pelo menos, dois mil anos na antiga China, Egito, Grécia e Índia (Thacker 2002, Ware 1883). Até mesmo na Europa e América do Norte, o uso de plantas já vinha sendo documentado há mais de 150 anos, antecipando as principais descobertas das classes de inseticidas químicos sintéticos (organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides), em meados de 1930 e 1950.

Posteriormente, foi observado que compostos de origem botânica, como o sulfato de nicotina, alcalóides da sabadilha, rotenona e piretrina, eram capazes de repelir ou matar insetos (Casida e Quistad, 1998), tornando muito comum o uso destas substâncias, principalmente nos países tropicais (Lagunes e Rodrigues, 1989). Ressalta-se que a vantagem no uso de compostos extraídos de plantas como inseticidas, dá-se por apresentarem maior complexidade estrutural, potência e seletividade no controle de pragas. Por outro lado, o uso destes compostos é limitado em função de sua disponibilidade e seu alto custo de obtenção (Casida e Quistad, 1998).

O ressurgimento do interesse pelos inseticidas de origem botânica se deu pela necessidade de buscar novos compostos para o controle de pragas e vetores de doenças, que fossem mais seletivos para o inseto alvo, sem efeito sobre predadores e outros organismos úteis, incluindo o homem, e que não ocasionassem alterações ambientais, tais como a contaminação de alimentos, solo e água. Outro fator determinante foi o aparecimento de resistência em diversas populações de insetos com a utilização dos

inseticidas químicos convencionais: organoclorados, carbamatos e organofosforados (Vendramine Castiglione, 2000).

No contexto do manejo de pragas agrícolas, os inseticidas derivados de plantas são mais adequados para se utilizar durante a produção de alimentos orgânicos em países industrializados, podendo, no entanto desempenhar um papel muito maior na produção e proteção pós-colheita de alimentos em países em desenvolvimento (Isman, 2006).

1.4 *Araucaria angustifolia*

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae) conhecida como “Pinheiro do Paraná” é uma conífera endêmica do sul do Brasil (Handro, 1986). Sua madeira tem importância econômica como matéria-prima para produção de papel e celulose (Lozenzi, 1992). Devido ao elevado conteúdo de compostos fenólicos, o seu nó em pó tem sido utilizado como um substituto parcial de resinas fenólicas (Anderegg, 1974 e Campelo, 1975). Estudos etnofarmacológicos anteriores desta planta, mostraram que as folhas da *A. angustifolia* (FIGURA 1) são tradicionalmente utilizadas como inseticidas naturais (Arcego, 2005) e acaricidas em comunidades rurais do sul do Brasil (Castro, 2009). No entanto, é provável que este estudo seja o primeiro a demonstrar a constituição química associada ao mecanismo inseticida do extrato da *A. angustifolia*.



Figura 1. *Araucaria angustifolia*

Fonte: (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leaf_of_araucaria_angustifolia.jpg)

1.4 Animais Experimentais

As baratas são insetos-praga primitivos nos quais a maioria dos sistemas fisiológicos é carente de especialização. Do ponto de vista da neurotoxicológico é considerado um importante instrumento na investigação do mecanismo de ação de compostos químicos com atividade tóxica sobre o sistema nervoso (FIGURA 2) (Stankiewicz et al., 2012). Atualmente, cerca de 200 neurotransmissores e seus respectivos receptores foram identificados no sistema nervoso de baratas, apresentam grande homologia em sua estrutura molecular aos de animais vertebrados, dentre eles os seres humanos.

A junção neuromuscular da barata ocorre a partir neurotransmissor glutamato, muito comum no sistema nervoso de mamíferos, para produzir contração muscular pela ativação dos receptores de N-Metil-D-Aspartato (NMDA). Por essa razão, as baratas são reconhecidas como modelos extremamente úteis em ensaios de neurobiologia (Huber et al., 1990). Uma grande vantagem do uso desses animais em experimentos, no campo da toxicologia, é a possibilidade de se investigar várias funções do sistema nervoso por meio de ensaios bioquímicos, como ensaios comportamentais como, atividade de *grooming* (ato de limpeza dos órgãos sensoriais) e ensaios eletrofisiológicos, como preparação nervo-muscular, podendo estes serem realizados em modelos naturais *in vivo*, *in situ* ou mesmo *in vitro*. Além disso, no caso dos bioinseticidas, muitos deles têm como alvo principal o sistema nervoso, o que facilita, de certa forma, a descrição do seu mecanismo de ação, bem como a evidênciação do grau de seletividade (Stankiewicz et al., 2012).



Figura 2. Barata *Phoetalia pallida*
(Fonte:<http://www.insect.cz/details.php?image>)

2. OBJETIVO

2.1 Objetivos Gerais

Identificar o mecanismo de ação entomotóxica induzido por extratos brutos de *Araucaria angustifolia* em modelo experimental de baratas da espécie *Phoetalia pallida*.

2.2 Objetivos Específicos

a - Investigar o potencial entomotóxico do extrato bruto de *A. angustifolia* em modelo de *P. pallida*;

b - Determinar o mecanismo de ação entomotóxico induzido pelo extrato de *A. angustifolia* sobre o sistema nervoso central de modelos comportamentais *in vivo* de *P. pallida*;

c - Determinar o mecanismo de ação entomotóxico do extrato de *A. angustifolia* sobre o sistema nervoso periférico, utilizando a preparação neuromuscular de *P. pallida in vivo*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Para estimar as doses reais a serem administradas *in vivo*, duzentas baratas da espécie *Phoetalia paliida* foram previamente pesadas, resultando em um peso final de 0.5 ± 0.03 g. Os animais foram mantidos no laboratório em temperatura ambiente controlada (22-25°C) em um ciclo de 12 h:12 h D:N. Todas as baratas foram mantidas com água e ração para cachorros *ad libitum*. Antes das análises os parâmetros neurofisiológicos. A dose letal mínima do extrato metanólico da *A. angustifolia* (AAME) e do metabólito secundário quercetina foram determinadas como descrito por Kagabu et al, 2012.

3.2 Reagentes e soluções

Todos reagentes utilizados eram de pureza elevada e foram obtidos a partir de Sigma-Aldrich, Merck, Roche, Life Technologies ou BioRad. As soluções testadas foram preparadas diariamente por diluição em solução salina antes de sua utilização. A solução salina constituiu-se de uma solução tamponada com carbonato preparada conforme descrito por Collins e Miller (Collins e Miller, 1977), com a seguinte composição em mM: NaCl 200.17, KCl 10.73, MgSO₄ 0.996, CaCl₂ 3.40, NaHCO₃ 2.14, NaH₂PO₄ 0.083 (pH 6.9 ajustado com NaOH 2N). Todas as drogas foram administradas no terceiro segmento abdominal, com volume total de 20µl, através de uma seringa Hamilton. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente controlada (22-25°C).

3.3 Material Vegetal

As os galhos com as folhas de *Araucaria angustifolia* foram coletadas em uma área rural da cidade de São Gabriel, no estado Rio Grande do Sul, Brasil (30°20'18.63"S - 54°19'16.83"W). Após a identificação realizada por um taxonomista, um Voucher foi criado (número de registro: *HBEI 085*) no Herbário Bruno Edgar Irgang (HBEI).

3.4 Preparação do Extrato Metanólico de *Araucaria angustifolia* (AAME)

Foram coletadas aproximadamente 2 kg de folhas da espécie *Araucaria angustifolia*. Utilizando uma balança analítica de precisão, foram pesadas 10 g de folhas de *A. angustifolia* previamente selecionadas e estas foram totalmente imersas em 100 mL de álcool metílico P. A. (metanol) que mostrou-se o solvente mais eficaz para remoção dos compostos ativos das folhas. O sistema folha/solvente foi deixado em descanso por 24h em câmara escura.

Após transcorrido o tempo determinado, o sistema foi filtrado utilizando uma bomba de filtração, funil de bückner com papel filtro e kitassato. As folhas que ficaram retidas no papel filtro foram descartadas segundo o Plano de Gerenciamento de Resíduos da Unipampa-Campus São Gabriel.

O filtrado foi reduzido em evaporador rotatório e seco em bomba de vácuo. Após um período de 12h em bomba de vácuo obteve-se o extrato metanólico da *Araucaria angustifolia* (AAME), puro e sem solvente.

3.5 Ensaio para a atividade inseticida

O ensaio de inseticida em baratas adultas *Phoetalia pallida* foi realizado essencialmente como descrito por Kagabu et al, 2007. Várias concentrações de AAME e quercetina (200, 400, 800 e 1600µg/g) foram dissolvidas em 20 µl de solução salina, e injetadas entre o terceiro e o quarto segmento abdominal de *P. pallida*. Todos os experimentos foram feitos triplicados. Cinco insetos foram utilizados para testar cada dose, e foram mantidos a 22-25°C por 24 h após a injeção. A dose mínima em que três ou mais insetos foram considerados mortos foi tomada como a dose letal mínima. Insetos paralisados foram contados como mortos.

3.6 Ensaios comportamentais

Para o estudo do comportamento geral, os animais foram colocados em uma arena de campo aberto demarcado com uma câmera de vídeo montada acima. O comportamento de grooming em baratas foi monitorado em uma vasilha de plástico opaco (29 cm x 18cm x 13 cm) com uma tampa de plástico transparente (Weisel-Eichler

et al., 1999) e foi gravado com uma câmera para posterior análise de duração dos movimentos. A duração de groomings contínuos foram medidos em segundos durante um período de 30 min imediatamente após o tratamento. Os animais nunca haviam estado no local de teste anteriormente, e, portanto, era um novo ambiente em todos os casos. A temperatura na sala de testes foi mantida em 25-30°C. As baratas controle foram injetadas com solução salina (Weisel-Eichler et al., 1999).

3.7 Preparação *in vivo* do músculo coxal-adutor metatorácico em baratas

Para analisar a neurotoxicidade periférica, foram utilizadas preparações *in vivo* do músculo coxal-adutor metatorácico em baratas (Full et al, 1998). Os animais foram imobilizados e preparados através de resfriamento. Com o lado ventral para cima, em suporte Lucite, coberto com um centímetro de borracha que contém o corpo, e proporciona uma plataforma para que o músculo coxal-adutor metatorácico possa ser firmemente fixado, através de alfinetes entomológicos. A perna esquerda foi então amarrada na articulação com uma linha ligada a um transdutor de força 1g (AVS Instrumentos, São Carlos, SP, Brasil). O transdutor foi montado em um manipulador que permitiu o ajuste do comprimento do músculo. O exoesqueleto foi removido de todo o gânglio torácico. O Nervo 5, o qual inclui o axônio motor para o músculo, foi exposto e inserido um eletrodo bipolar para fornecer estimulação elétrica. O nervo foi estimulado em 0.5Hz/5ms, com duas vezes o limiar durante 120min. O nervo foi coberto com óleo mineral para evitar que o local ressecasse. A tensão muscular foi gravada, digitalizada e restaurada utilizando o software AQCAD (AVS Instrumentos, São Carlos, SP, Brasil). Os dados foram ainda analisados pelo software ANCAD (AVS Instrumentos, São Carlos, SP, Brasil).

3.8 Análise estatística dos dados

Os resultados foram expressos como média \pm SEM e foram analisados através de análises de variância (Two-Way ANOVA), seguido pelo teste “t” Student como um *post hoc*. O valor de $p \leq 0.05$ indica significância. As estatísticas e gráficos foram feitos utilizando o Software OriginPro 8.6 (OriginLab Corporation, MA, USA).

4. Resultados

4.1 Atividade Inseticida do AAME e Quercetina

Para determinar a atividade inseticida da *A. angustifolia*, quatro doses de AAME foram testadas (200, 400, 800 e 1600 $\mu\text{g/g}$). Para tanto, cinco baratas foram injetadas na terceira porção abdominal, e observadas durante 24h. Após este período, a dose de (800 $\mu\text{g/g}$) foi considerada a dose letal mínima (FIGURA 3). A quercetina é um composto fenólico comum nas sementes e casca da *A. angustifolia* (Cordenunssi, 2004 e Seccon, 2010), também foram testadas as doses 40, 80, 160, e 320 $\mu\text{g/g}$, que mostrou-se letal à 80 $\mu\text{g/g}$ e doses maiores. Uma vez identificada às doses letais mínimas, todos os protocolos biológicos seguintes foram efetuados utilizando concentrações subletais.

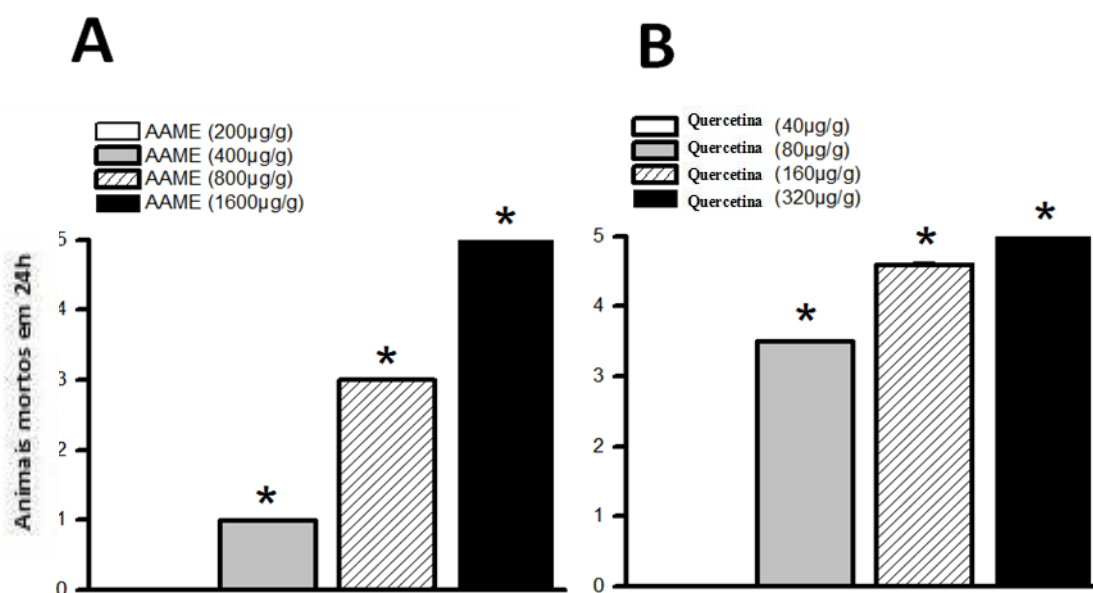


FIGURA 3. Dose Letal Mínima (DL50) do Extrato Metanólico da *Araucaria angustifolia* (A) e quercetina (B). Todos os tratamentos foram feitos triplicados (n=5) e a dose hábil para matar três ou mais insetos foram consideradas DL50. (**significância em $p < 0.01$ com Student “t” test).

4.2 Efeito de doses subletais de AAME e quercetina na atividade de grooming

Quando injetada solução salina em baratas, o tempo médio de grooming contínuo foi de 60 ± 8 s/30min (n=30). A manipulação e introdução da seringa, não interferiram significativamente no comportamento do animal (67.5 ± 12 s/30min; n=28; $p > 0.05$, Student “t” test).

Todos animais tratados com AAME mostraram um aumento na atividade de grooming dose-dependente. Assim, AAME ($200 \mu\text{g/g}$ de peso do animal) induziu um aumento significativo no aumento da atividade de grooming (138.11 ± 5 s/30min; n=28; $p < 0.05$, Student “t” test). Com a maior dose testada ($400 \mu\text{g/g}$ de peso do animal) houve um aumento nos parâmetros de grooming (185 ± 8 s/30min; n=30; $p < 0.05$ Student “t” test) (FIGURA 4). Quando a quercetina ($40 \mu\text{g/g}$) foi testada, também houve um aumento no tempo gasto com o grooming, que foi maior que todas as concentrações testadas de AAME (230 ± 5 s/30min; n=31; $p < 0.05$, Student “t” test) (FIGURA 4.).

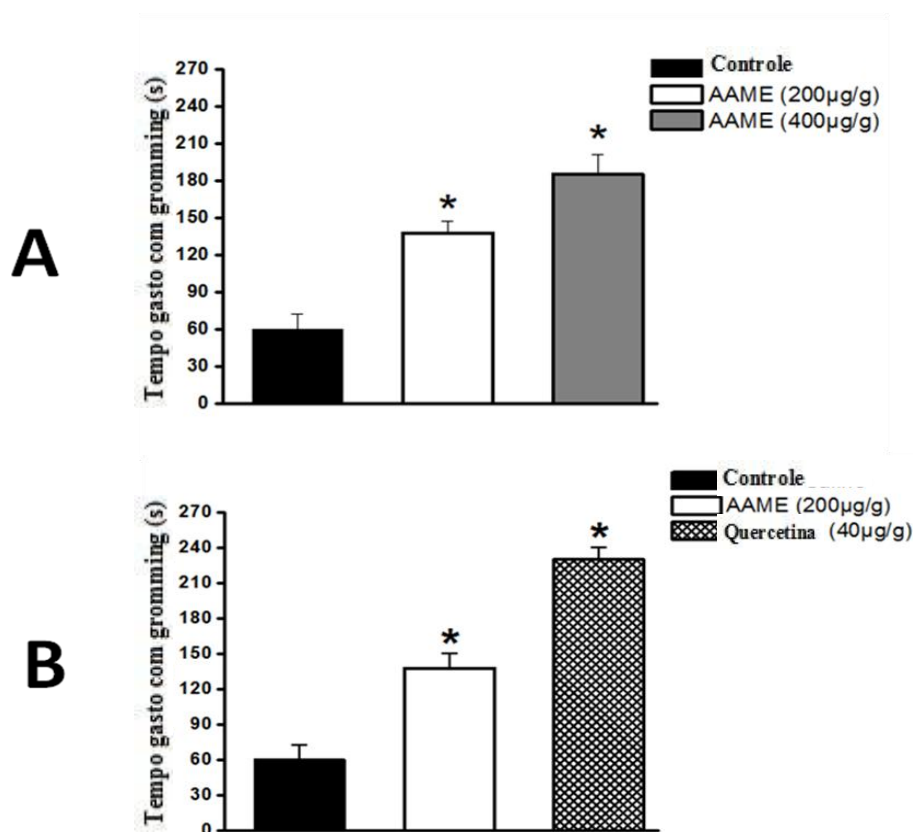


FIGURA 4. Aumento do comportamento de grooming por diferentes doses subletais de Extrato Metanólico de *Araucaria angustifolia* (AAME) (A) e quercetina (B). A

atividade de grooming foi gravada durante 30min e os resultados obtidos foram expressos como o tempo total de grooming em segundos (* $p < 0.05$ com Student “t” test).

4.3 Efeito de moduladores colinérgicos em atividade de grooming induzida pela quercetina

A injeção de atropina (40 $\mu\text{g/g}$) combinada com quercetina (40 $\mu\text{g/g}$) aumentou significativamente os níveis do controle de quercetina (350 \pm 3s/30min; n=30; $p < 0.05$, Student “t” test) (FIGURA 5.). Quando a metoctramina (40 $\mu\text{g/g}$), um inibidor colinérgico seletivo de M_2 - M_3 foi combinado com quercetina (40 $\mu\text{g/g}$) houve um aumento nas taxas de grooming (600 \pm 8s/30min; n=29; $p < 0.05$, Student “t” test) (FIGURA 5). No entanto, com pirenzepina (40 $\mu\text{g/g}$), um bloqueador colinérgico seletivo M_1 , adicionado 15min antes da quercetina (40 $\mu\text{g/g}$) não induziu nenhuma alteração significativa nos níveis de quercetina (230 \pm 5s/30min; n=30; $p > 0.05$, Student “t” test) (FIGURA 5).

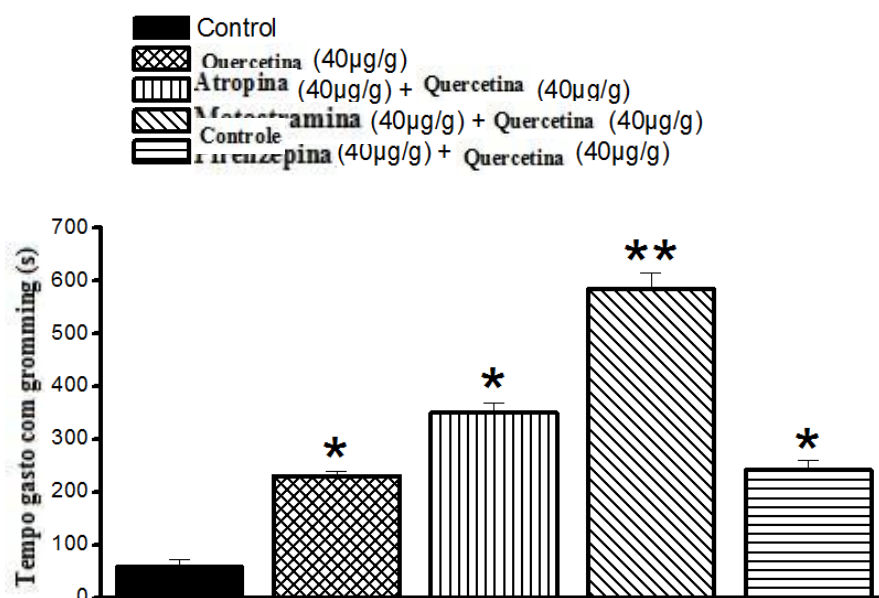


Figura 5. Modulação da atividade de grooming em baratas induzida por quercetina com o tratamento de diferentes moduladores colinérgicos. As drogas foram injetadas no terceiro segmento abdominal, 5 minutos antes da quercetina (40 $\mu\text{g/g}$). A atividade de

grooming foi gravada durante 30 minutos e os resultados são expressos como o tempo total de grooming em segundos. (* $p < 0.05$ com Student “t” test).

4.4 Efeito de moduladores de dopamina, Hidroxilamina e Tiramina na atividade de grooming induzido pela quercetina

A atividade dopaminérgica é mediada por receptores de dopamina (DA) em neurônios da membrana pré e pós-sináptica (e.g D_2 e D_1 família de receptores) de insetos. Os protocolos descritos a seguir tiveram como objetivo verificar a influência de moduladores dopaminérgicos sobre a atividade de grooming induzida pela quercetina. Portanto, a metoclopramida ($40\mu\text{g/g}$), um receptor antagonista DA- D_2 , injetada 15min antes da quercetina ($40\mu\text{g/g}$) inibiu significativamente a atividade de grooming induzida pela quercetina ($100 \pm 12\text{s}/30\text{min}$; $n=30$; $p < 0.05$, Student “t” test) (FIGURA 6). Quando a SCH 23390 ($40\mu\text{g/g}$), um bloqueador seletivo DA- D_1 foi administrado 15min antes da quercetina ($40\mu\text{g/g}$) também houve uma inibição significativa dos níveis de grooming, mesmo abaixo dos níveis de tratamento com metoclopramida ($90 \pm 6\text{s}/30\text{min}$; $n=30$; $p < 0.05$, Student “t” test) (FIGURA 6). A liberação de dopamina depende da entrada de cálcio nos nervos terminais a fim de induzir a exocitose (Rozov, 2001). Pensa-se que o óxido nítrico possa estar envolvido na liberação de dopamina, aumentando a probabilidade de abertura dos canais de cálcio L-type (Büyükuysal RL, 1997). Nós utilizamos o NO, doador de hidroxilamina, a fim de verificar a influência da cascata do óxido nítrico no aumento do grooming induzido pela quercetina. Portanto, a hidroxilamina sozinha ($40\mu\text{g/g}$), induziu um ligeiro aumento da atividade de grooming comparada aos valores do controle com solução salina ($75 \pm 8\text{s}/30\text{min}$). Quando a hidroxilamina ($40\mu\text{g/g}$) foi aplicada 15min antes da quercetina ($40\mu\text{g/g}$) houve um aumento significativo na atividade de grooming comparada com a quercetina sozinha ($325 \pm 15\text{s}/30\text{min}$; $n=30$; $p < 0.05$, Student “t” test) (FIGURA 5). A fim de verificar a influência das catecolaminas no aumento do grooming induzido pela quercetina, nós utilizamos a tiramina, um agonista dos receptores de tiramina nos nervos terminais de insetos. A tiramina sozinha ($40\mu\text{g/g}$) induziu um aumento na atividade de grooming comparada aos valores do controle com solução salina ($182 \pm 8\text{s}/30\text{min}$, $n=30$; $p < 0.05$, Student “t” test). Quando a tiramina ($40\mu\text{g/g}$) foi aplicada 15min antes da quercetina

(40 μ g/g) houve um aumento na atividade de grooming comparada a quercetina sozinha (204 \pm 15s/30min; n=30; p <0.05, Student “t” test) (FIGURA 6).

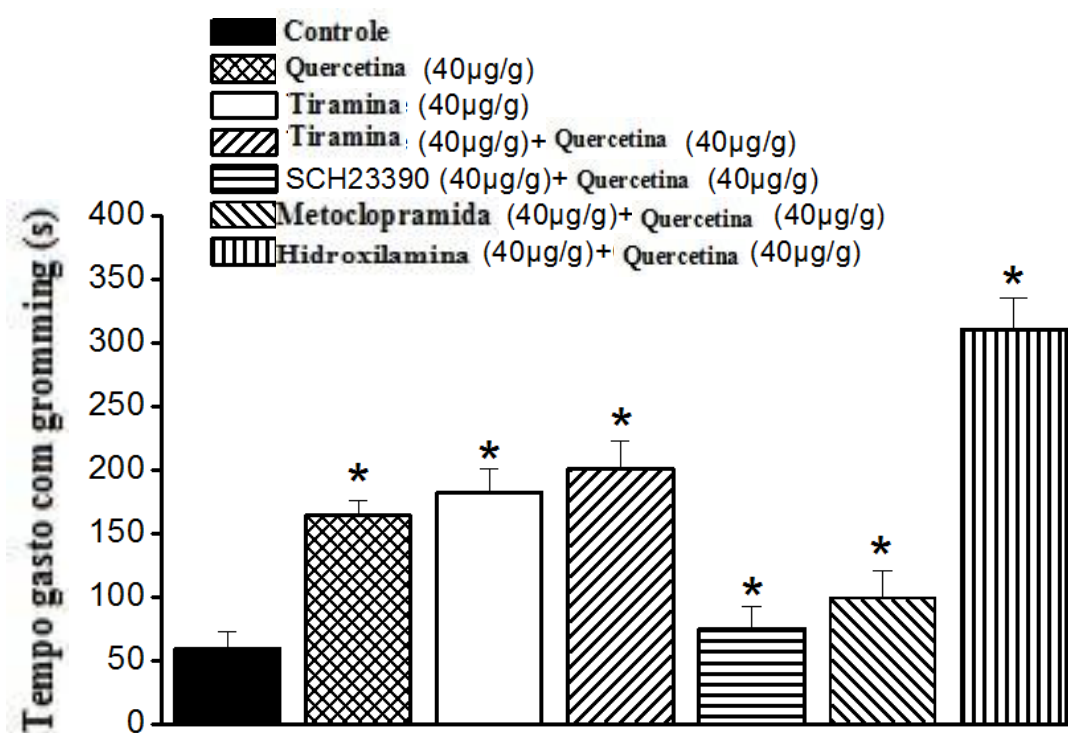


FIGURA 6. Influência de moduladores dopaminérgicos na atividade de grooming induzida pela quercetina. As drogas foram injetadas no terceiro segmento abdominal 5 minutos antes da quercetina (40 μ g/g). A atividade de grooming foi gravada durante 30 minutos e os resultados são expressos como o tempo total de grooming em segundos (* p <0.05 com Student “t” test).

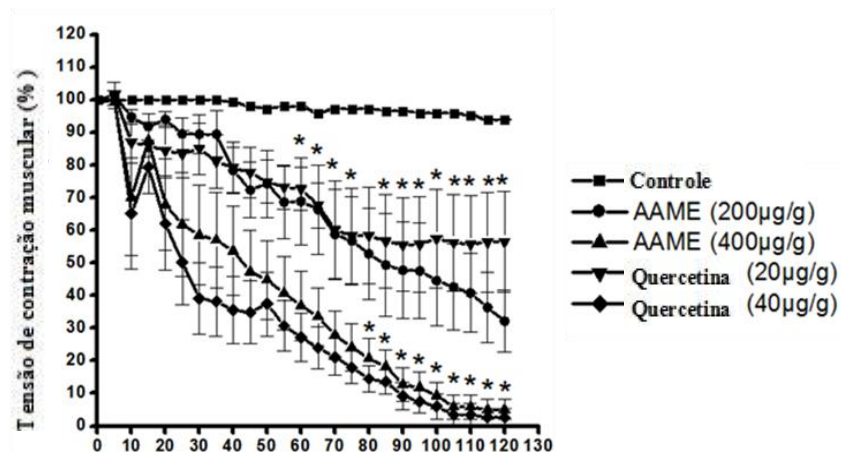
4.5 Bloqueio neuromuscular *in vivo* em baratas induzido pelo AAME e quercetina preparação nervo-músculo

Para analisar o efeito *in vivo* do AAME e quercetina no sistema nervoso periférico de baratas, foi utilizado a preparação músculo coxal-adutor metatorácico em baratas. A administração da solução salina no inseto não interferiu nas respostas neuromusculares durante as gravações de 120min (n=6) (FIGURA 7). A injeção do AAME (200 e 400 μ g/g peso do animal) induziu uma dose e tempo dependente de bloqueio neuromuscular em 120 min de gravação. Quando a dose mínima de AAME (200 μ g/g) foi testada, houve um bloqueio da tensão de contração muscular de 50 \pm 9% em 82min (n=6, p <0.05,

ANOVA) e $68 \pm 6\%$ em 120min de gravação (FIGURA 7). A injeção da concentração mais alta de AAME ($400 \mu\text{g/g}$) induziu um bloqueio de $50 \pm 5\%$ em 45min e $95 \pm 3\%$ inibição de contração muscular em 120min de gravações ($n=6$, $p<0.05$, ANOVA) (FIGURA 7).

Quando a quercetina foi testada ($10 \mu\text{g/g}$ and $40 \mu\text{g/g}$), a mesma dose e efeito tempo dependente foi observada em parâmetros neuromusculares. Assim, as menores concentrações testadas, apresentaram um bloqueio neuromuscular de apenas $45 \pm 15\%$ em 120min de gravação ($n=6$, $p<0.05$ comparada com o controle de solução salina) (FIGURA 7). Quando a concentração mais alta foi testada, houve $50 \pm 13\%$ de inibição de contração muscular em 25 minutos da força muscular em 120 min ($n=6$, $p<0.05$, ANOVA) (FIGURA 7). Em todas as preparações, o aumento da frequência de estimulação elétrica foi incapaz de recuperar a função neuromuscular.

A



B

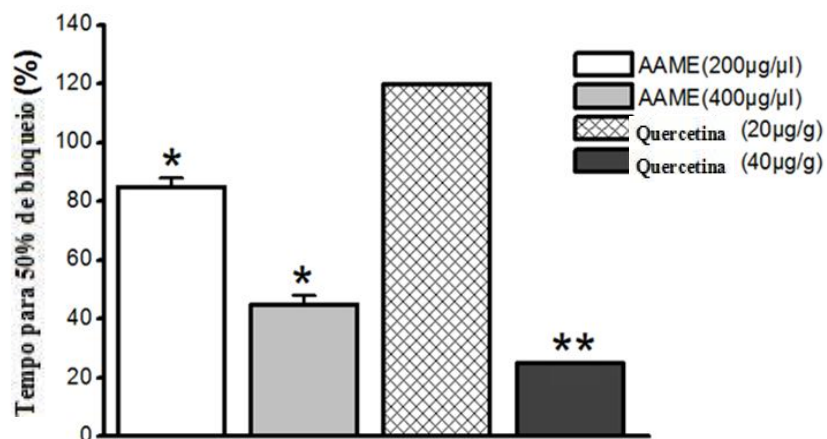


FIGURA 7. Bloqueio Neuromuscular induzido pelo Extrato Metanólico da *Araucaria angustifolia* (AAME) e quercetina em preparação músculo coxal-adutor metatorácico em baratas *in vivo*. O painel (A) **mostra o efeito dose-dependente induzido pelo AAME** (200 e 400µg/g peso do animal) e quercetina (40µg/g). Em (B), o gráfico de tempo requerido para 50% de bloqueio. Note a inibição dose-dependente na contração muscular das baratas (** $p < 0.05$ relacionado ao AAME).

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho nós demonstramos pela primeira vez a atividade inseticida do extrato das folhas da *Araucaria angustifolia* e de um dos seus constituintes, a quercetina. A este respeito, uma série de plantas têm sido atribuídas como tendo atividade inseticida, para atingir principalmente o sistema nervoso de insetos (Richards, 1945; Soderlund, 1995 e Bloomquist, 1996), mas poucos têm demonstrado uma correlação direta entre inibição da AChE do inseto e toxicidade (Hieu et al., 2012). Acetilcolinesterase desempenha um papel na transmissão colinérgica que é essencial para insetos e animais superiores (Fournier D, 1994). A inibição da AChE causa acumulação de acetilcolina na sinapse, de modo que a membrana pós-sináptica está num estado permanente de estimulação, o que resulta na ataxia i.e falta de coordenação geral do sistema neuromuscular, e eventual morte (Singh e Singh, 2000; Aygun et al., 2002). Também já foi reportado que os óleos essenciais agem por inibição competitiva reversível de enzimas da AChE isoladas de enguias elétrica, moscas domésticas, baratas, soro de cavalo e eritrócitos bovinos (Rattan RS, 2010). Nós também investigamos a composição de metabólitos secundários no AAME, e encontramos uma grande quantidade de compostos fenólicos, além da presença da quercetina. A presença do flavonoide quercetina foi identificada em todo o extrato em comparação com ao padrão de referência. Esta observação reforça a relevância da quercetina na atividade inseticida da *Araucaria angustifolia*. Portanto, para um melhor entendimento, foi a primeira vez que o flavonoide quercetina foi testado para a atividade inseticida em baratas. Estes resultados podem melhorar as aplicações biotecnológicas do AAME, especialmente porque a quercetina é um importante composto antioxidante presente na dieta dos seres humanos (Cartea et al., 2011).

O AAME mostrou-se letal em baratas em concentrações relativamente moderadas, confirmando o conhecimento tradicional (Arcego MSC, 2005). Um grande número de plantas tem demonstrado atividade inseticida (Rattan RS, 2010), seu modo de ação e local de efeito para atividades inseticidas têm sido estudada por muitos autores (Vandenborre et al., 2011; Hiort et al., 1999; Chairdir et al., 1999 e Michiels et al., 2010). Assim os inseticidas exercem uma vasta gama de efeitos sobre insetos e outros artrópodes, por exemplo, neuroexcitação resultando em hiperatividade, tremores e paralisia rígida devido ao esgotamento de energia e fadiga neuromuscular, enquanto neuroinibição resulta em imobilidade e paralisia por causa da possível privação de oxigênio e/ou redução da capacidade respiratória que acaba por conduzir a mortalidade (Scharf et al., 2003). É importante investigar o padrão comportamental em insetos para elucidar o modo de ação de novos inseticidas e convencionais, bem como a sua resposta no ambiente, minimizando seu contato com material tóxico (Von Keyserlingk et al., 1985).

Os efeitos induzidos pelo AAME e quercetina se mostraram similares na atividade de grooming que em insetos tem a função de limpar a superfície exterior assim como podem ter outras funções, como o comportamento de corte, a sinalização social, a atividade de deslocamento e de excitação (Spruijt et al., 1992). Em insetos, um centro neural envolvido no comportamento de grooming não está bem identificado, mas foi demonstrado que a dopamina (DA) pode atuar como o principal neurotransmissor associado a esta resposta (Weisel-Eichler et al., 1999). A sinalização por DA extracelular é regulada por diversos mecanismos como difusão a partir da sinapse, degradação enzimática e recaptação da DA pelo transportador de DA (DAT). Além disso, um mecanismo colinérgico muscarínico (M) subjacente à ativação do padrão gerador central em insetos, provavelmente por ativação de interneurônios serotoninérgico/dopaminérgicos (Buhl et al., 2008).

De fato, o tratamento prévio com atropina, um bloqueador inespecífico dos receptores muscarínicos, seguido de tratamento com quercetina, aumentou o comportamento de grooming induzido pela quercetina. Nossos dados estão de acordo com a literatura, já que a pirenzepina combate o aumento da atividade de grooming induzido pela quercetina. Em nervos terminais o fosfatidilinositol 3-quinase (PI₃) é envolvido pelo transportador de ativação de DA e degradação de trifosfato de inositol (IP₃) (Carvelli et al., 2002). A quercetina, provavelmente, inibe o fosfatidilinositol 3-

quinase (PI_3) (Nanua et al., 2006), reforçando que a modulação do AAME no comportamento do inseto é provavelmente por um aumento na sinalização do PI_3 , após a ativação do mAChRs. Nós também analisamos a influência da tiramina e hidroxilamina no aumento do comportamento de grooming induzido pela quercetina. A tiramina ativa os receptores (TyrRs) do sistema nervoso central do inseto, modulando o comportamento do animal através do aumento do Ca^{2+} citosólico pela sinalização do IP_3 (Farooqui, T, 2007). No entanto, em nossas condições experimentais, a tiramina foi incapaz de aumentar o comportamento de grooming induzido pela quercetina, sugerindo que a TyrRs provavelmente não esteja envolvido com este efeito.

O NO é um neurotransmissor atípico já que não é empacotado em vesículas sinápticas, mas se difunde a partir do seu local de produção e se move rapidamente através das membranas celulares. A principal função do NO parece estar relacionada à ativação da proteína heme heterodimérica guanilato ciclase solúvel (sGC). A ativação da guanilil ciclase em neurônios de insetos está relacionada ao processo excitatório da neurotransmissão modulada pelas reservas intracelulares de Ca^{2+} (Bicker G, 2001). Nós sugerimos que a hidroxilamina potencializa o comportamento de grooming, induzido pela quercetina em baratas, por um sinergismo em Ca^{2+} nas vias de sinalização dos terminais nervosos dopaminérgicos.

Além disso, nós buscamos avaliar se o efeito inseticida AAME ocorre através de uma ação direta no sistema nervoso periférico da barata, e confirmamos um bloqueio neuromuscular significativo de contração muscular pelo AAME e quercetina em preparações nervo-músculo de baratas *in vivo*. Em junções neuromusculares de insetos, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, e o $GABA_{(A,B)}$ é o principal inibitório (Osborne RH, 1996). O aumento do bloqueio neuromuscular induzido pelo AAME e quercetina, assemelham-se a drogas que agem diretamente sobre os canais iônicos dos receptores. Nas junções neuromusculares de insetos há principalmente dois tipos de receptores ionotrópicos. O primeiro é o NMDA, o qual é ativado pelo neurotransmissor excitatório glutamato, e o segundo é o receptor $GABA_A$ o qual é ativado pelo neurotransmissor inibitório ácido gama aminobutírico (Osborne RH, 1996). Nós não investigamos em qual receptor o AAME e a quercetina preferem se ligar, mas o bloqueio do NMDA e/ou ativação do receptor $GABA_A$ não pode ser desconsiderada.

Alguns compostos naturais de plantas são capazes de modular ambos, tanto os receptores NMDA (Karangwa et al., 2007) como os receptores GABA (Wang et al.,

2006). Em murinos, a quercetina e seus derivados podem induzir ações inibitórias seletivas sobre os receptores NMDA (Mehdizadeh et al., 2009).

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho nós demonstramos a atividade inseticida do extrato metanólico da *Araucaria angustifolia*, utilizando como modelo experimental baratas da espécie *P. pallida*. Estes resultados confirmam os conhecimentos tradicionais da *A. angustifolia*, como um inseticida natural. A atividade inseticida do AAME é principalmente relacionada às atividades inibitórias do AAME e quercetina sobre a junção neuromuscular dos insetos. Esses resultados deverão ser explorados em uma futura investigação detalhada, mas é sugerida a inibição dos receptores NMDA da placa motora da barata. A atividade de grooming sugere uma ação direta dos compostos presentes no AAME sobre os neurônios dopaminérgicos centrais da barata.

7. Referências Bibliográficas

- ANDEREGG, R.J., ROWE, J.W., 1974. **Lignans, the major component of resin from *Araucaria angustifolia* knots.** *Holzforschung* 28, 171-175.
- ARCEGO, M.S.C., 2005. **Plantas medicinais no controle de doenças no gado leiteiro.** EMATER-RS/ ASCAR.9.
- AYGUN, D., DOGANAY, Z., ALTINTOP, L., GUVEN, H., ONAR, M., DENIZ, T., SUNTER, T., 2002. **Serum acetylcholinesterase and prognosis of acute organophosphate poisoning.** *Journal of Toxicology Clinical Toxicology* 40, 903-910.
- BALLOU, L.M., SHIPPENBERG, T.S., JAVITCH, J.A., LIN, R.Z., GALLI, A., 2002. **PI 3-kinase regulation of dopamine uptake.** *Journal of Neurochemistry* 81, 859–869.
- BICKER, G., 2001. **Nitric Oxide: An Unconventional Messenger in the Nervous System of an Orthopteroid Insect.** *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48, 100-110
- BLOOMQUIST, J.R., 1996. **Ion channels as targets for insecticides.** *Annual Review of Entomology* 41, 163–190.
- BUHL, E., SCHILDBERGER, K., STEVENSON, P.A., 2008. **A muscarinic cholinergic mechanism underlies activation of the central pattern generator for locust flight.** *The Journal of Experimental Biology* 211, 2346-2357.
- BÜYÜKUYSAL, R.L., 1997. **Effect of nitric oxide donors on endogenous dopamine release from rat striatal slices. I: Requirement to antioxidants in the medium.** *Fundamental and Clinical Pharmacology* 11 (6), 519-27.
- CAMPELO, J., FONSECA, S.F., 1975. **Diterpenes from *Araucaria angustifolia*.** *Phytochemistry* 14, 2299-2300.
- CARTEA, M.E., FRANCISCO, M., SOENGAS, P., VELASCOS, P., 2011. **Phenolic Compounds in Brassica Vegetables.** *Molecules* 16, 251-280.

CARVELLI, L., MORÓN, J.A., KAHLIG, K.M., FERRER, J.V., SEN, N., LECHLEITER, J.D., LEEB-LUNDBERG, L.M.F., MERRILL, G., LAFER, E.M., CASIDA, J.E., QUISTAD, G.B. **Golden age of insecticide research: past, present, or future?** Annual Review of Entomology 43, 1-16. 1998.

CASTRO, K.N.C., 2009. **Evaluation in vitro of brazilian pine tree extract for cattle tick control.** Revista Brasileira de Agroecologia 4, 2575-2578.

COLLINS, C., MILLER, T., 1977. **Studies on the action of biogenic amines on cockroach heart.** The Journal of Experimental Biology 67, 1-15.

CHAIRDIR, H.J. NUGROHO, B.W., BOHNENSTENGEL, F.I., WRAY, V. WITTE, L., HUNG, P.D., KIET, L.C., SUMARYONO, W., PROKSCH. P., 1999. **New insecticidal rocaglamide derivatives from flowers of *Aglaia duperreana* (Meliaceae).** Phytochemistry 52, 837-842.

CORDENUNSSI, B.R., MENEZES, E.W., GENOVESE, M.I., COLLI, C., SOUZA, A.G., LAJOLO, F.M., 2004. **Chemical Composition and Glycemic Index of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Seeds.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 3412-3416.

COSTA, C.R.; OLIVI, P. **A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de Avaliação.** Química Nova , v. 31, n. 7, p. 1820- 1830, 2008.

ECOBICHON, D.J. (2001). **Pesticide use in developing countries.** Toxicology, 160, 27–33.

FAROOQUI T., 2007. **Octopamine-mediated neuromodulation of insect senses.** Neurochemical Research 32(9), 1511-1529.

FORGET G, GOODMAN T, de Villiers A, eds.1993. **Impact of Pesticide Use on Health in Developing Countries.** Ottawa: Int. Dev. Res. Centre. 335 pp.

FOURNIER, D., MUTERO, A., 1994. **Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides.** Comparative Biochemistry and Physiology 108C, 19-31.

FULL, R.J., STOKES D.R., AHN, A.N., JOSEPHSON, R.K., 1998. **Energy absorption during running by leg muscles in a cockroach.** The Journal of Experimental Biology 201, 997-1012.

HANDRO, W., 1986. *Araucaria (Araucaria spp.)*. In: Y.P.S. Bajaj, ed., Biotechnology in Agriculture and Forestry 1, 310-315.

HIORT, J., CHAIDIR, BOHNENSTENGEL, F. I., NUGROHO, B. W., SCHNEIDER, C., WRAY, V., WITTE, L., HUNG, P. D., KIET, L. C., PROKSCH, P., 1999. **New insecticidal rocaglamide derivatives from the roots of *Aglaia Duperreana*.** Journal of Natural Products 62, 1632-1635.

HONDA, H., TOMIZAWA, M., CASIDA, J.E., 2007. **Insect Muscarinic Acetylcholine Receptor: Pharmacological and Toxicological Profiles of Antagonists and Agonists.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 2276-2281.

HUBER, I., MASLER, E.P., RAO, B.R., Eds., **Cockroaches as Models for Neurobiology: Applications in Biomedical Research**, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 1990.

ISMAN MB, 2006. **Annual Review of entomology.** *British Columbia*. Annu. Rev. Entomol. 2006.51:45-66.

JUNG, M., PARK, M., 2007. **Acetylcholinesterase Inhibition by Flavonoids from *Agrimonia pilosa*.** *Molecules* 12, 2130-2139.

KAGABU, S., MURASE, Y., IMAI, R., Ito, N. NISHIMURA, K., 2007. **Effects of substituents at the 5-position of the pyridine ring imidacloprid on insecticidal activity against *Periplaneta americana*.** *Pest Management Science* 63 (1), 75-83.

KARANGWA, C., ESTERS, V., TITS, M. et al. 2007. **Characterization of the neurotoxicity induced by the extract of the *Mangnistipula butayei***

(Chrysobalanaceae) in rat: effects of a new natural convulsive agent. *Toxicon* 49 (8). 1019-1119.

LAGUNES, T.A.; RODRÍGUEZ, H.C., 1989. **Busqueda de tecnología apropiada para el combate de plagas del maíz almacenado en condiciones rústicas.** Chapingo: [s.n.], 150 p.

LORENZI, H., 1992. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Plantarum, 378.

MARCO G.J., HOLLINGWORTH R.M., DURHAM W., eds. 1987. **Silent Spring Revisited.** Washington, DC: Am. Chem. Soc. 214 pp.

MEHDIZADEH, M., TAGHI-JOGHATAEI, M., NOBAKHT, M., ARYANPOUR, R., 2009. **The beneficial effect of the flavonoid quercetin on behavioral changes in hemi- parkinsonian rats.** *Basic and Clinical Neuroscience* 1 (2), 30-32.

MICHIELS, K., VAN DAMME, E.J.M., SMAGGHE, G., 2010. **Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins?.** *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 73, 193–212.

MILLAR, N.S., BAYLIS, H.A., REAPER, C., BUNTING, R., MASON, W.T., SATTELLE, D.B., 1995. **Functional expression of a cloned *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor in a stable *Drosophila* cell line.** *Journal of Experimental Biology* 198, 1843–1850

MOREIRA M.F., MANSUR J.F., MANSUR J.F. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular.** INCT –EM- UFRJ, 2012.

NANUA, S., ZICK, S.M., ANDRADE, J.E., SAJJAN, U.S., BURGESS, J.R., LUKACS, N.W., HERSHENSON, M.B., 2006. **Quercetin blocks airway epithelial cell chemokine expression.** *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 35, 602-610.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2000. **The Future Role of Pesticides in US Agriculture**. Washington, DC: Natl. Acad. Press. 301 pp.

OSBORNE, R.H., 1996. Insect **Neurotransmission: Neurotransmitters and Their Receptors**. *Pharmacology and Therapeutics* 62 (2), 117-142.

PERRY AS, YAMAMOTO I, ISHAAYA I, PERRY RY. 1998. **Insecticides in Agriculture and Environment: Retrospects and Prospects**. Berlin: Springer-Verlag. 261 pp.

PONTUAL, E.V., NAPOLEÃO, T.H., ASSIS, C.R.D., BEZERRA, R.S., XAVIER, H.S., NAVARRO, D.M.A.F., COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G., 2012. **Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti***. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 79, 135-152.

RATTAN, R.S. (2010). **Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin**. *Crop Protection*, vol. 29, no. 9, p. 913-920.

RICHARDS, A.G., CUTKOMP, L.A., 1945. **Cholinesterase of insect nerves**. *Journal of Cellular Comparative Physiology* 26, 57-61.

RITTER, L., 1997. **Report of a panel on the relationship between public exposure to pesticides and cancer**. *Cancer* 80, 2019-33.

ROZOV, A., BURNASHEV N., SAKMANN, B., NEHER, E., 2001. **Transmitter release modulation by intracellular Ca²⁺ buffers in facilitating and depressing nerve terminals of pyramidal cells in layer 2/3 of the rat neocortex indicates a target cell-specific difference in presynaptic calcium dynamics**. *Journal of Physiology* 531.3, 807–826.

SCHARF, M.B., BAUMANN, M., BERKOWITZ, D.V., 2003. **The effects of sodium oxybate on clinical symptoms and sleep patterns in patients with fibromyalgia.** Journal of Rheumatology 30, 1070-1074.

SECCON, A., ROSA, D., FREITAS, R., BIAVATTI, M., CRECZYNSCKI-PASA, T., 2010. **Antioxidant activity and low cytotoxicity of extracts and isolated compounds from *Araucaria angustifolia* dead bark.** Redox Report 15, 234-242.

SINGH, K., SINGH, D.K., 2000. **Toxicity to the snail *Limnaea acuminata* of plant-derived molluscicides in combination with synergists.** Pest Management Science 56, 889-898.

SODERLUND, D.M., KNIPPLE, D.C., 1995. **Actions of insecticides on sodium channels: multiple target sites and site-specific resistance.** In: Clark, J.M. (Ed.), Molecular Action of Insecticides on Ion Channels. American Chemical Society, Washington, DC, 97-108.

SPRUIJT, B.M., VAN HOOFF, J.A., GISPEN, W.H., 1992. **Ethology and neurobiology of grooming behavior.** Physiology Reviews 72, 825-852.

STANKIEWICZ, M., DABROWSKI, M., LIMA, M. E. **Nervous System of *Periplaneta americana* Cockroach as a Model in Toxicological Studies: A Short Historical and Actual View.** Journal of Toxicology, 11, 2012.

THACKER, J.M.R., 2002. **An Introduction to Arthropod Pest Control.** Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press. 343 pp.

VANDENBORRE, G., SMAGGHE, G., VAN DAMME, E.J.M., 2011. **Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects.** Phytochemistry 72, 1538-1550.

VENDRAMIN, J.D., CASTIGLIONE, E., 2000. **Aleloquímicos, resistência e plantas inseticidas.** In: Guedes, J.C., Drester da Costa, I., Castiglione, E. Bases e Técnicas do Manejo de insetos. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, 8, 113-128.

VON KEYSERLINGK, D.G., NIEMANN, K., WASEL, J., REINOLD, J., POECK, K., 1985. **A new method in computer-assisted imaging in neuroanatomy.** Acta Anatomica 123 (4), 240-246.

WANG, Z., KAI, L., DAY, M. et al. 2006. **Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spine is mediated by cholinergic interneurons.** Neuron 50. 443-452.

WARE, G.W. 1883. **Pesticides. Theory and Application.** San Francisco: Freeman. 308 pp.

WEISEL-EICHLER, A., HASPEL, G., LIBERSAT, F., 1999. **Venom of a parasitoid wasp induces prolonged grooming in the cockroach.** The Journal of Experimental Biology 202, 957-964.

WENZEL, B., ELSNER, N., HEINRICH, R., 2002. **mAChRs in the Grasshopper Brain Mediate Excitation by Activation of the AC/PKA and the PLC Second-Messenger Pathways.** Journal of Neurophysiology 87, 876-888.