



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**CAMPUS – SÃO GABRIEL**

**ATIVIDADE INSETICIDA DO EXTRATO METANÓLICO DE *Araucaria*  
*angustifolia***

**Autor: Thiago Carrazoni de Freitas**  
**Orientador: Prof. Dr. Chariston André Dal Belo**

**São Gabriel-RS**  
**2010**

**THIAGO CARRAZONI DE FREITAS**

**ATIVIDADE INSETICIDA DO 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  
2010**

**ATIVIDADE INSETICIDA DO EXTRATO METANÓLICO DE *Araucaria angustifolia***

**THIAGO CARRAZONI DE FREITAS**

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. Frederico Costa Beber Vieira

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Thaís posser

---

Prof. Dr. Jeferson Franco  
Suplente

São Gabriel, Junho de 2010

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Ricardo Jose Gunski, pela disposição constante em auxiliar no desenvolvimento desse estudo permitindo a participação em congressos e eventos científicos.

Ao Prof. Dr. Jeferson Luis Franco, pela orientação e sessão de reagentes e materiais usados nesse projeto.

A Ms Michele Statch por auxiliar na confecção dos extratos e orientar nas técnicas de determinação do perfil fitoquímico da planta *A. angustifolia*.

Às acadêmicas do curso de Ciências Biológicas Ana Paula Bairro Lucho, pela ajuda na coleta do material e auxílio nos experimentos e Patrícia Gomes da Silva, pelo auxílio nos experimentos.

A FAPERGS por disponibilizar a bolsa que permitiu avançar no desenvolvimento desse projeto.

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

## Resumo

### ATIVIDADE INSETICIDA DO EXTRATO METANÓLICO DE *Araucaria angustifolia*

Os estudos de plantas com propriedades inseticidas foram retomados após a constatação de graves problemas de contaminação ambiental causados pela má utilização de produtos químicos, dentre eles os compostos organofosforados. O emprego de substâncias extraídas de plantas, na qualidade de inseticidas, tem inúmeras vantagens quando comparado ao emprego de produtos sintéticos: os inseticidas naturais são obtidos de recursos renováveis e são rapidamente degradáveis (ou seja, não persistem no ambiente); não deixam resíduos em alimentos, além de apresentarem baixo custo de produção. A espécie *Araucaria angustifolia* é nativa do Brasil e possui uma ampla área de distribuição na região Sul. No entanto, a sua exploração indiscriminada colocou-a na lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (Brasil, 1992). O objetivo deste trabalho é o de identificar o mecanismo de ação envolvido na atividade inseticida do extrato Metanólico de *Araucaria angustifolia*, por meio de ensaios como a determinação da dose letal mínima (DLM), dos efeitos sobre a preparação coração Semi-isolado de Barata (CSIB), sobre o sistema neurolocomotor e sistema nervoso central de baratas da espécie *Phoetalia pallida*. A cromatografia em camada delgada mostrou a presença do flavonóide quercetina no extrato metanólico de *A. angustifolia*. Na determinação da dose letal mínima, após um período de 24 horas de observação a dose de 10µg/µl do extrato de *A. angustifolia* foi eficiente em matar 60% dos animais, n=6 p<0,05. Em preparação CSIB, o extrato não induziu alterações significativas na frequência cardíaca do inseto, quando comparado com o grupo controle, n=6. Nos testes de atividade neurolocomotora e neurotoxicidade central “grooming”, n=6 p<0,05 o extrato metanólico de *A. angustifolia* também induziu variações significativas nos padrões comportamentais, quando comparados com os grupos controle (n=3, p<0,05). A transmissão de impulsos nervosos em insetos é mediada

por monoaminas biogênicas tais como Dopamina (DA), octopamina e serotonina (5-HT) (Libersat, 2003). Para Weisel-Eichler (1999) o comportamento de grooming em baratas é induzido por alterações no sistema dopaminérgico destes animais, enquanto que a frequência cardíaca é modulada principalmente por neurotransmissores colinérgicos. Em conclusão sugere-se, preliminarmente, que o extrato metanólico das folhas de *Araucaria angustifolia* desenvolva atividades inseticidas pela presença do flavonoide quercetina em sua composição. Esse agente estaria envolvido na letalidade produzida pelo extrato, induzindo principalmente alterações sobre o sistema nervoso de *Phoetalia pallida*.

## Abstract

### INSECTICIDAL ACTIVITY OF *Araucaria angustifolia* METHANOLIC EXTRACT

The studies of plants with insecticidal properties were reassumed after finding serious environmental pollution problems caused by misuse of chemicals, including organophosphate compounds. The use of plant substrates, as insecticides, has numerous advantages when compared with synthetic products: natural insecticides are made from renewable resources and are rapidly degraded (therefore, do not persist in the environment) and do not leave residues in foods, in addition to their low production cost. *Araucaria angustifolia* is a Brazilian tree specie and has a broad distribution in southern Brazil. However, the huge exploitation put it on the official list of Brazilian flora species threatened of extinction. The objective of this work was to identify the mechanism of action involved in the insecticidal activity of the methanolic extract of *Araucaria angustifolia* leaves and the secondary(ies) metabolite(s) involved in this action, by using assays of minimum lethal dose (MLD), cardiovascular, behavioral and neurolocomotor in *Phoetalia pallida*. The thin layer chromatography showed the presence of the flavonoid quercetin in the methanolic extract of *A. angustifolia*. The MLD, after a period of 24 hours, was the dose of 10µg/µL of *A. angustifolia* (n=6 p<0,05). In preparation (SIHC) the extract did not induced significant changes in heart rate of the insect, when compared to control group, n=6. To the tests of neurolocomotor activity and central neurotoxicity "grooming", the methanolic extract of *A. angustifolia* induced significant changes in behavioral patterns of the cockroach, when compared to control group (n=6 p<0.05) respectively. The transmission of nervous impulses in insects is mediated by biogenic monoamines such as dopamine (DA), octopamine and serotonin (5-HT) (Libersat, 2003). Since

quercetin is a natural insecticide, we suggest that the lethal effect of *A. angustifolia* is quercetin-induced. Nevertheless, the increase in grooming and neurolocomotor patterns and lack of cardiovascular effect, show that the insecticidal effect of *A. angustifolia* is associated with an effect in the nervous system rather than in the cardiocirculatory system.

## LISTA DE ABREVIATURAS

CSIB - coração semi-isolado de barata

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

W – Wash (lavagem)

DA – Dopamina

5-HT - Serotonina

EMtOHAA – extrato metanólico de *Araucaria angustifolia*

DL50 – dose letal mínima

TLC – cromatografia em camada delgada

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> <i>Araucaria angustifolia</i> .....	15
<b>FIGURA 2.</b> Mapa da distribuição de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	17
<b>FIGURA 3.</b> <i>Phoetalia pallida</i> .....	19
<b>FIGURA 4.</b> Folhas de <i>A. angustifolia</i> .....	22
<b>FIGURA 5.</b> Cromatografia em camada delgada.....	25
<b>FIGURA 6.</b> Dose Letal Mínima.....	27
<b>FIGURA 7.</b> Atividade neurolocomotora.....	29
<b>FIGURA 8.</b> Tempo Total de Grooming apos 30min.....	31
<b>FIGURA 9.</b> Tempo Total de Grooming após 24h.....	32
<b>FIGURA 10.</b> Atividade sobre CSIB.....	34

## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	7
LISTA DE ABREVIATURAS .....	9
LISTAS DE FIGURAS .....	10
SUMÁRIO .....	11
1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1. Plantas com atividade inseticida .....	13
1.2. <i>Araucaria angustifolia</i> .....	14
1.2.1. Constituintes químicos .....	15
1.2.1.1. Constituintes isolados do gênero <i>Araucaria</i> .....	15
1.2.1.2. Dados farmacológicos para os constituintes isolados do gênero <i>Araucaria</i> .....	17
1.3. Compostos polifenólicos .....	18
1.4. Insetos como modelo para ensaios biotecnológicos .....	18
2. OBJETIVO .....	20
2.1. Objetivos gerais .....	20
2.2. Objetivos específicos .....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
3.1. Animais .....	21
3.2. Reagentes .....	21
3.3. Preparação do extrato metanólico de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	21
3.4. Determinação do perfil fitoquímico por TLC .....	22
3.5. Determinação da dose letal mínima .....	22
3.6. Preparação coração semi-isolado .....	23
3.7. Teste de atividade neurolocomotora .....	23
3.8. Teste de neurotoxicidade central .....	24
4. RESULTADOS .....	24
4.1. Cromatografia em camada delgada .....	24
4.2. Dose letal mínima .....	26
4.3. Teste de atividade neurolocomotora .....	28
4.4. Teste de neurotoxicidade central .....	30

4.5. Preparação coração semi-isolado .....	33
5. DISCUSSÃO .....	35
6. CONCLUSÃO .....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37

## **1. Introdução**

### **1.1 Plantas com atividade Inseticida**

Extratos de plantas têm sido utilizados como inseticidas pelo homem, com diferentes propósitos, desde nossos ancestrais Romanos. Estima-se que atualmente mais de duas mil plantas exerçam atividade inseticida mas, por outro lado, apenas 10% destas já foram avaliadas cientificamente quanto a esse potencial.

Segundo Balandrin et al. (1985), muitas plantas acumulam substâncias orgânicas que podem ser extraídas em quantidade suficiente para serem economicamente utilizadas para as mais variadas aplicações científicas tecnológicas e comerciais. As substâncias utilizadas para o controle de insetos pragas vieram primeiramente de recursos naturais (inseticidas botânicos) e posteriormente de compostos inorgânicos (compostos de enxofre). Os inseticidas botânicos são de grande interesse, por serem inseticidas naturais, tóxicos derivados de plantas. Dessa forma têm sido desenvolvidas pesquisas voltadas para a utilização de medidas de controle que proporcionem um menor impacto ambiental, visando viabilizar o manejo integrado de pragas (Rodrigues et al. 2008). Acredita-se que as chances de descobertas de novas substâncias bioativas estejam diretamente relacionadas à riqueza da biodiversidade. Dentro desse contexto o Brasil, é reconhecidamente, o país detentor de uma das mais altas taxas em biodiversidade (Proktn, 1991). A frequência e a intensidade no uso de inseticidas tem aumentado nos últimos anos e fracassos no controle de certas pragas com inseticidas tradicionais (piretróides e organofosforados) têm sido periodicamente relatados (Diez-Rodrigues & Omoto, 2001).

Nesse sentido, as plantas com atividade inseticida aparecem como uma importante alternativa que pode ser usada no manejo de insetos-pragas, seja no campo em lavouras, seja em centros urbanos, eliminando insetos vetores de doenças como as baratas. Estas plantas podem ser utilizadas diretamente no controle de insetos, através de aplicações de pós, óleos ou extratos brutos obtidos a partir de suas estruturas vegetais (Rodrigues et al. 2008).

## 1.2. *Araucaria angustifolia*

A *Araucaria angustifolia* é uma gimnosperma de grande porte que ocorre na floresta ombrófila mista, um ecossistema único dentro do domínio Mata Atlântica, sendo a única espécie da família Araucariaceae natural da região Sul do Brasil (Almeida, 2003) (FIGURA 1). Esta gimnosperma é conhecida pelos nomes populares: Pinheiro, pinheiro-brasileiro, curi, curiúva, pinheiro-do-paraná, pinho, cori, pinho-brasileiro, pinheiro-são-josé, pinheiomacaco, pinheiro-caiová, pinheiro-das-missões ou araucária. Ela também é descrita em inglês como parana-pine (CARVALHO, 1994). A *Araucaria angustifolia* caracteriza-se morfológicamente como uma planta dióica de 20 a 50 m de altura, com tronco retilíneo de 90 a 180 cm de diâmetro, com ramificação característica umbeliforme no alto. Folhas (acículas) coreáceas, glabras, agudíssimo-pungentes, de 3 a 6 cm de comprimento, alternas, dispostas densamente (GEMTCHÚJNICOV, 1976; LORENZI, 1998). As flores são unissexuais diclinas, sendo o esporófilo reunido em forma de cone (SCHULTZ, 1990). Estróbilos masculinos alongados, cujo eixo comporta numerosos microsporófilos, cada um sustentando oito ou mais microsporângios. Microspóros (pólem) sem câmaras de ar. Os estróbilos femininos são grandes e arredondados, e são chamados de pinhas. Macrosporos numerosos, comportando cada um apenas um óvulo. Na parte superior do endosperma situam-se oito a 15 arquegônios. Semente grande (pinhão), de cor marrom, contendo grande quantidade de reservas nutritivas (GEMTCHÚJNICOV, 1976).

Espécie dominante de um habitat raro, no qual há outras plantas de interesse medicinal, a *Araucaria angustifolia* é de grande importância econômica para as populações locais, sendo coletadas cerca de 3.400 toneladas de sementes (pinhões) por ano no Brasil para consumo humano. Esta espécie está incluída na lista oficial de plantas ameaçadas de extinção no Brasil compilada pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) (FIGURA 2) porém ainda está sujeita à legislação pertinente às espécies madeireiras (GUERRA et al, 2000).

A busca de novos agentes farmacologicamente ativos através da triagem de fontes naturais, como extratos de plantas, tem levado à descoberta de muitas moléculas protótipo que desempenham importante função no tratamento de doenças

humanas, ou à descoberta de compostos com potencial biotecnológico, como atividade inseticida.

Nesse contexto, a literatura relata a presença de metabólitos secundários como flavonóides e ácidos fenólicos nas folhas de *A. angustifolia*. Tais compostos estão associados a efeitos inseticidas.



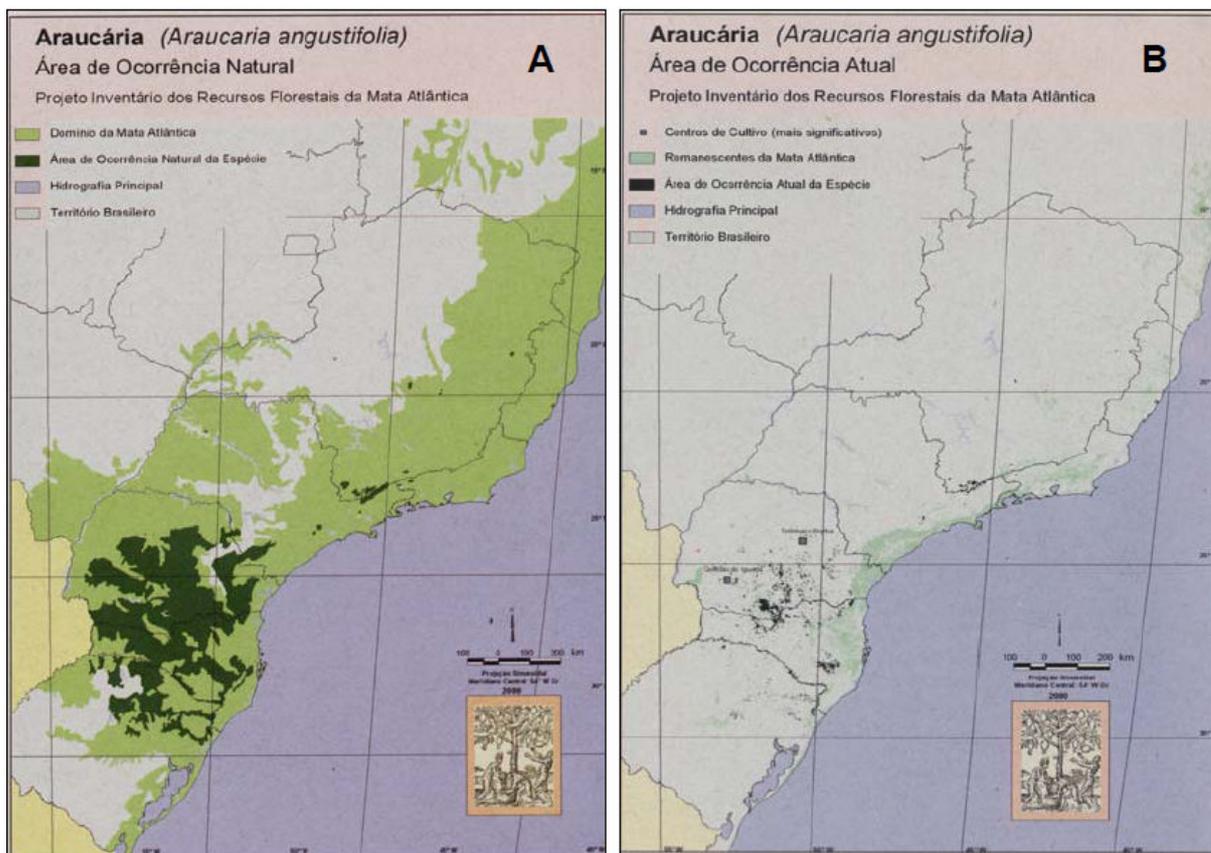
**Figura 1.** *Araucaria angustifolia* (Fonte: <http://www.panoramio.com/photo/1702512>)

### **1.3.1 Constituintes químicos**

#### **1.2.1.1 Constituintes isolados do gênero *Araucaria***

Para a espécie *Araucaria angustifolia* existem poucos estudos fitoquímicos e quase nenhum farmacológico. Entre os estudos químicos, foi descrita a presença de lignanas, ciclolignanas e norlignanas, tais como pinoresinol, isolariciresinol, secoisolariciresinol, criptoresinol e hinokiresinol, presentes na resina da árvore (FONSECA; NIELSEN; RUVEDA, 1979; OHASHI et al, 1992). Brophy e colaboradores (2000) descrevem a presença de vários terpenóides, denominados

araucaróides presentes no óleo volátil de folhas de Araucariaceae, sendo majoritários em *Araucaria angustifolia* germacreno-D e os diterpenos hibaeno e filocladeno. Nas sementes de *Araucaria angustifolia* foram identificadas lecitinas (DATTA; FIGUEROA; LAJOLO, 1993). Em um estudo realizado por Fonseca e colaboradores (2000) com culturas de células e tecidos de *Araucaria angustifolia* em diferentes estágios de diferenciação e desenvolvimento, foram identificados compostos flavonoídicos e derivados de fenilpropanóides, tais como: os isômeros E e Z do octadecil p-cumarato e do octadecil ferulato, ambos identificados em culturas de calos da planta; no talo da plântula foram encontradas três biflavonas do tipo amentoflavona (7,4',7''-tri-ometilamentoflavona, 7,4',4''-tri-o-metilamentoflavona, 4',4''-di-o-metilamento-flavona); das raízes da plântula foi isolado o diterpeno do ácido trans-cumênico, já descrito para outras espécies do gênero. Do lenho da planta adulta, foram isolados os compostos p-hidróxibenzaldeído, coniferaldeído, vanilina, as isoflavonas cabreuvina e irisolidona, e os lignóides pinoresinol, eudesmina e lariciresinol. Para outras espécies de *Araucaria*, como *Araucaria bidwillii*, *Araucaria excelsa*, *Araucaria cookii* e *Araucaria cunninghamii* foi descrita a presença de terpenóides e flavonóides, principalmente biflavonas dos tipos amentoflavona, robustaflavona, agathisflavona, hinokiflavona e cupressuflavona (KHAN et al, 1972; ILYAS et al, 1978; PARVEEN; TAUFEEQ; KHAN, 1987; GEISER & QUINN, 1988; HARADA et al, 1992; BROPHY et al, 2000).



**Figura 2.** Mapas de distribuição da *Araucaria angustifolia*. Áreas mais escura nos mapas: A, área de ocorrência natural; B, área de ocorrência atual. A área remanescente situa-se em torno de 2% da área original (**Fonte:** GUERRA, 2000).

### 1.2.1.2 Dados farmacológicos para os constituintes isolados do gênero *Araucaria*

Para as lignanas isoladas de *A. angustifolia* foram atribuídas atividades antiviral e antineoplásica (OHASHI et al, 1992; CASTRO et al, 1996; SAARINEN et al, 2002). Às lecitinas identificadas nos pinhões e descritas por Data e colaboradores (1993), foi atribuída atividade hemaglutinante. Para algumas biflavonas, estudos descrevem atividade anticâncer, por meio de ação inibidora de topoisomerases, particularmente para os tipos agathisflavona e amentoflavona. Foram também descritas atividades antimicrobianas, tais como antifúngica e antiviral, contra vírus da influenza, adenovírus, vírus herpéticos, citomegalovírus e vírus da hepatite (PARVEEN; TAUFEEQ; KHAN, 1987; LIN et al, 1999; GRYNBERG et al, 2002).

### **1.3 Compostos polifenólicos**

Aos polifenóis são atribuídas diversas atividades biológicas. A maioria das plantas utilizadas mundialmente para tratar ou prevenir distúrbios, que vão de diarreia ao câncer, são ricas em compostos polifenólicos. Entre os compostos polifenólicos, as duas classes mais importantes são a dos flavonóides e a dos taninos (ELISABETSKY, 2002). Os flavonóides são compostos polifenólicos derivados dos fenilpropanóides, e que são responsáveis por muitas ações nas plantas, como proteção contra a incidência de raios UV e visível, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atividades antioxidante, controladora da ação hormonal em vegetais e inibição de enzimas. Dentre estes destaca-se em *A. angustifolia* a presença de quercetina, que possui propriedades farmacológicas como ação antiinflamatória, anticarcinogênica, antiviral, anti-histamínica, cardiovascular e atividade inseticida (GAZZONI et al. 1997).

### **1.4 Insetos como modelo para ensaios biotecnológicos**

As baratas constituem um grupo de insetos muito utilizados em bioensaios para identificação de novas substâncias com atividade inseticida ou repelente, já que possuem uma fisiologia semelhante às dos outros insetos. Dessa forma, um produto que causa a morte de uma barata, possivelmente terá a mesma atividade se aplicado a outros insetos-praga como mosquitos (*Aedes aegypte*, *Cullex*) além de carrapatos, moscas do chifre dentre outros. As baratas possuem também papel importante em saúde pública, transportando diversos agentes patogênicos (CORNWELL, 1968), que ficam aderidos ao corpo, principalmente, em pêlos e cerdas das pernas, sendo transportados mecanicamente de uma área contaminada para a uma área limpa (SERRAFREIRE, 1999). A facilidade de criação associada ao baixo custo e ao elevado potencial reprodutivo contribuiu para o uso destes insetos na presente pesquisa. As baratas também constituem um modelo experimental bastante utilizado em pesquisas biomédicas, elas têm sido usadas em modelos comportamentais de memória, em doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer e outras doenças nas quais o neurotransmissor glutamato está envolvido. Nesses estudos, o interesse por esses animais se dá pelo fato do glutamato, envolvido nos processos de excitotoxicidade, ser o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso

periférico.

A *Phoetalia pallida* (FIGURA 3) apresenta coloração castanho-clara brilhosa; pronoto castanho com mancha centro-basal castanho-escuro, mais larga na base, estreitando-se para o ápice; cabeça com olhos, vértice, espaço interocular, fronte e base do clipeo castanho-escuros bem como as antenas, que são de coloração castanhas.



**FIGURA 3.** Barata *Phoetalia pallida*

(Fonte: [http://www.insect.cz/details.php?image\\_id=2226&sessionid=182df16fa46fd251f6ea2c7c1b8e346a&l=arabic](http://www.insect.cz/details.php?image_id=2226&sessionid=182df16fa46fd251f6ea2c7c1b8e346a&l=arabic))

A resistência a produtos químicos pelas baratas, os custos das atuais técnicas de desinsetização além da toxicidade para os animais e humanos dos produtos convencionalmente usados, estimulam as pesquisas no sentido de se descobrirem alternativas de baixo custo, inócuas para o homem e com eficiente ação inseticida. No sistema nervoso dos insetos existe um sofisticado conjunto de junções entre órgãos dos sentidos, os quais respondem a diversos estímulos externos ou internos levando a respostas de órgãos efetores como músculos e glândulas. A função do sistema nervoso, portanto é transmitir informações ao corpo por meio de impulsos elétricos, conseguidos através da liberação de neurotransmissores na membrana pré-sináptica. Os principais neurotransmissores envolvidos nesse processo em

insetos são a acetilcolina, o glutamato, a octopamina e o GABA. Dessa forma, compostos descobertos a partir de plantas, fungos, bactérias, vida marinha em geral e animais peçonhentos podem influenciar direta ou indiretamente esses sistemas fisiológicos altamente coordenados, traduzindo-se em agentes naturais com grande potencial inseticida.

Nesse projeto propomo-nos investigar a atividade farmacológica do extrato metanólico de *Araucaria angustifolia* avaliando os seus efeitos sobre o sistema nervoso central, periférico e cardiovascular de baratas da espécie *Phoetalia pallida*.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivos gerais**

Avaliar por meio de ensaios fitoquímicos e farmacológicos o potencial inseticida do extrato metanólico das folhas de *Araucaria angustifolia* (EMtOHAA).

### **2.2. Objetivos específicos**

- a-** Preparo do extrato metanólico de *A. angustifolia* (EmtOHAA) ;
- b-** Determinação da dose letal mínima (DL<sub>50</sub>);
- c-** Determinação da neurotoxicidade central por meio do teste de “Grooming”;
- d-** Determinação da neurotoxicidade periférica por meio da avaliação da atividade neurolocomotora;
- e-** Determinação da cardiotoxicidade por meio do registro da frequência cardíaca em preparação coração semi-isolado de barata (CSIB).

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Animais

Foram utilizadas baratas exóticas da espécie *Phoetalia pallida*. Os animais foram mantidos a  $25 \pm 2$  °C com livre acesso à água e ração *ad libitum*.

#### 3.2. Reagentes

Para realizar a extração dos compostos vegetais das folhas foi utilizado metanol. Para o teste cromatográfico foram utilizados quercetina, diclorometano, acetato de etila, álcool etílico, álcool metílico, hexano além do extrato de *A. angustifolia*. Para os testes em vivo utilizou-se diferentes concentrações de extrato metanólico e solução fisiológica.

#### 3.3. Preparo do extrato metanólico de *Araucaria angustifolia* (EMtOHAA)

Foram coletados cerca de 2 kg de folhas da espécie *Araucaria angustifolia* na região de São Gabriel – RS (FIGURA 4). Uma amostra foi herborizada e depositada no herbário da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, Campus São Gabriel. Utilizando-se uma balança analítica de precisão foram pesadas 10 g de folhas de *A. angustifolia* e estas foram totalmente imersas em 100mL de álcool metílico P. A. (metanol). Em estudo anterior o metanol mostrou-se o solvente mais eficaz para remoção dos componentes ativos das folhas. O sistema folha/solvente foi deixado em descanso por 24h em câmara escura.

Depois de transcorrido o tempo determinado, o sistema foi filtrado utilizando-se 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* (EmtOHAA), puro e sem solvente.



**Figura 4.** Folhas de *A. angustifolia*

(Fonte:[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leaf\\_of\\_araucaria\\_angustifolia.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leaf_of_araucaria_angustifolia.jpg))

### **3.4. Determinação do perfil fitoquímico por cromatografia em camada delgada.**

Para identificar a presença ou ausência de quercetina no extrato vegetal foi realizada uma cromatografia em camada delgada (TLC), na qual o padrão de quercetina e o extrato vegetal foram adicionados em uma placa cromatográfica. Esta, então, foi disposta em uma câmara com luz ultravioleta onde foi possível visualizar as bandas correspondentes aos diferentes compostos do extrato, incluindo quercetina.

### **3.5. Determinação da Dose Letal Mínima (DL50)**

Os ensaios para a determinação da Dose Letal Mínima (DLM) foram realizados essencialmente como descrito por Kagabu et al. (2007). Para tal, várias concentrações do extrato metanólico de *A. angustifolia* foram dissolvidas em solução fisiológica especial para insetos, preparada como descrito por Collins e Miller (1977), e um volume de 20 $\mu$ l foi injetado na terceira porção abdominal de cada animal. Além de um grupo controle injetado apenas com solução fisiológica e diferentes concentrações de extrato de *A. angustifolia* (1,5 $\mu$ g/ $\mu$ l; 2,5 $\mu$ g/ $\mu$ l; 5 $\mu$ g/ $\mu$ l; 10 $\mu$ g/ $\mu$ l) também foi utilizada quercetina (5 $\mu$ g/ $\mu$ l) como controle positivo de letalidade, devido

a sua já comprovada atividade inseticida (Gazzoni et al, 1997). Para cada protocolo seis animais foram usados (n=6) e, depois de injetados, com um volume final de 20µl/animal, foram acondicionadas em recipientes de plástico por 24 horas a temperatura de 24°C, com água e ração *ad libitum*. A dose mínima para que cada grupo de seis animais seja considerado morto, foi eleita como a DLM. A análise estatística foi feita usando-se o teste não paramétrico “t” de Student.

### **3.6. Preparação coração semi-isolado de barata (CSIB)**

A atividade biológica do extrato também foi observada em preparação coração semi-isolado de barata (CSIB) (Bauman e Gersch, 1982). Para realizar este procedimento as baratas (*Phoetalida pallida*) foram anestesiadas com éter etílico e imobilizadas por meio de alfinetes entomológicos. Após a remoção da cutícula abdominal com a ajuda de uma pinça, o coração foi exposto e banhado em solução salina para insetos 0.9% em temperatura ambiente. Após 5 min. iniciais para estabilização da frequência cardíaca, as diferentes concentrações de EMtOHAA foram adicionadas sobre o coração, em um volume final de 200 µl/animal. A frequência cardíaca foi monitorada durante 30 min. com a ajuda de um microscópio estereoscópico.

### **3.7. Teste de atividade Neurolocomotora**

O teste de atividade neurolocomotora foi realizado como descrito por Kagabu et al. (2007) adaptado para as nossas condições experimentais. Dessa forma, as baratas da espécie *P. pallida* foram colocadas em um recipiente preenchido com água (2L). A água consiste em um estímulo estressante para o animal fazendo com que o mesmo movimente as patas posteriores intermitentemente. Esse movimento foi observado durante dois minutos (Controle). O animal foi então injetado com diferentes concentrações de EMtOHAA e modificações no comportamento (hipocinesia) foram então anotadas.

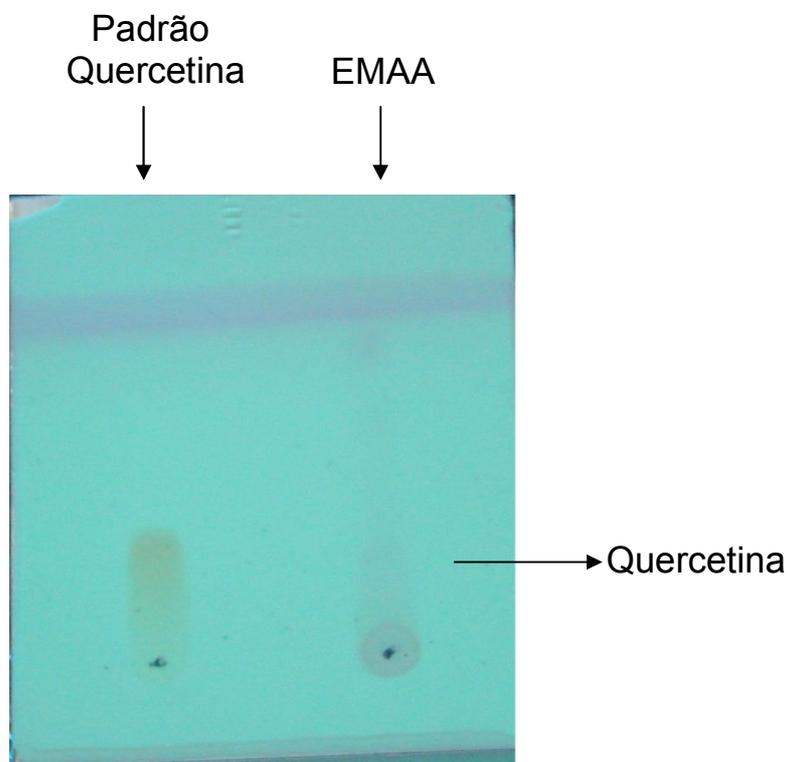
### **3.8. Teste de neurotoxicidade central “grooming”**

O comportamento de grooming é típico de insetos e se reflete no ato do animal limpar as antenas e/ou pernas dianteiras com o aparelho bucal várias vezes ao dia (Libersat, 2003). Esse hábito tem sido caracterizado como um reflexo da estimulação do sistema nervoso central pela liberação de neurotransmissores monoaminérgicos (Libersat e Pflueger, *Bioscience*, 54, 17-25, 2004). Dessa forma, os animais foram observados durante um período de 30 min e o número total de groomings anotado antes e após o tratamento com o EMtOHAA; quercetina e solução salina. Para tal, foi usada uma caixa circular de plástico (29 cm × 18 × 13 cm) com tampa transparente removível. Os animais não foram submetidos à caixa de teste anteriormente, e, portanto, esta constitui um ambiente novo em todos os casos. A temperatura na sala de ensaios foi mantida em 25-30 ° C e os teste foram realizados 2 – 8h após o início do ciclo de luz.

## **4. Resultados**

### **4.1. Cromatografia em camada delgada (TLC Plate)**

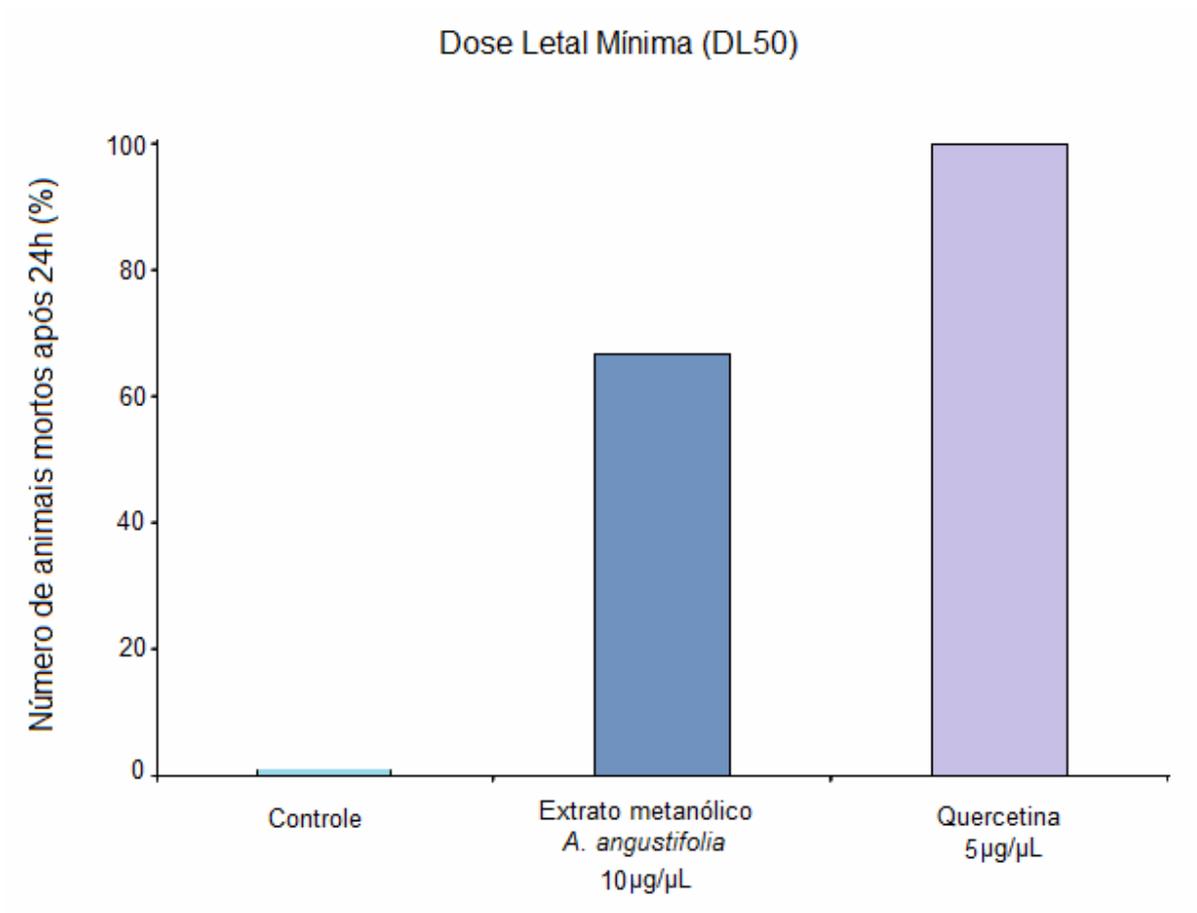
Na cromatografia em camada delgada utilizando o extrato metanólico de *Araucaria angustifolia* (FIGURA 5) observou-se a presença de quercetina neste extrato, tal afirmação pode ser comprovada após comparar a corrida do extrato com a corrida de quercetina, sendo que nas duas corridas obteve-se o mesmo padrão.



**Figura 5.** Cromatografia em camada delgada do extrato metanólico de *A. angustifolia* (direita) e quercetina (esquerda). Note a presença do flavonóide quercetina como constituinte do extrato. Este flavonóide possui atividade inseticida, descrita por Gazzoni (1997).

#### **4.2. Determinação da Dose Letal Mínima (DL50)**

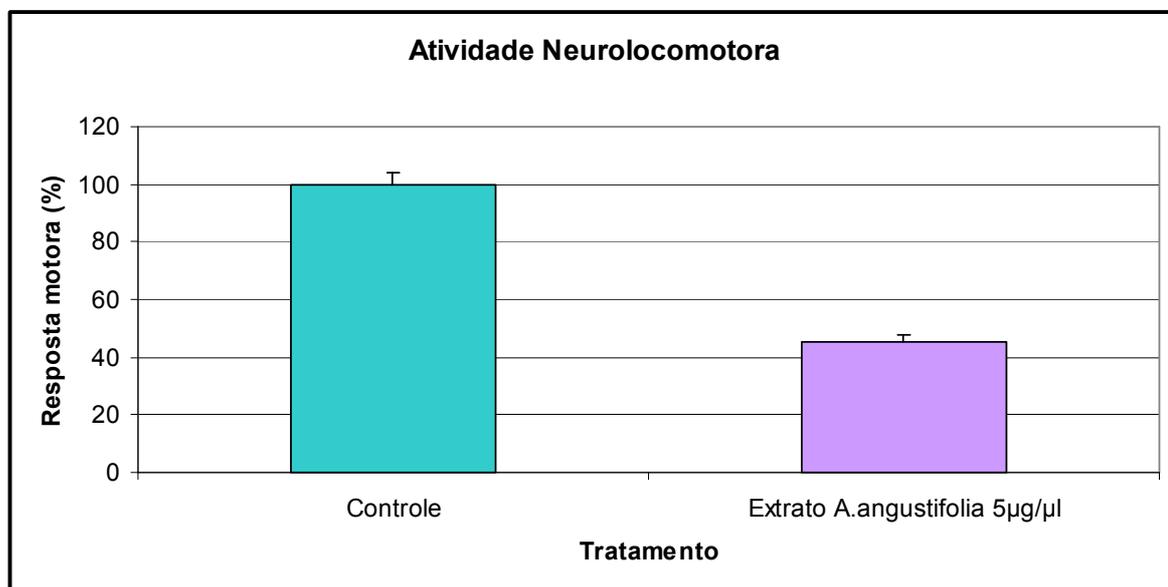
Na determinação da dose letal mínima foram utilizadas quatro diferentes concentrações de extrato metanólico de *A. angustifolia* (1,5µg/µL; 2,5µg/µL; 5µg/µL e 10µg/µL). As concentrações de 1,5µg/µL; 2,5µg/µL e 5µg/µL não foram eficientes em causar letalidade significativa em baratas da espécie *Phoetalia pallida*, sendo a dose de 10µg/µL a única dose eficiente em causar letalidade em 75% dos animais (n=6, p<0.05). Além das diferentes concentrações do extrato metanólico de *A. angustifolia* também foi utilizado quercetina como controle positivo de letalidade, esta mostrou-se eficiente em causar morte em 100% dos animais após um período de 24 horas.



**Figura 6.** Dose letal mínima (DL50). Solução salina, extrato metanólico de *A. angustifolia* (10µg/µL) e quercetina (5µg/µL) injetados em um volume de 20µL/animal na 3ª porção abdominal. A determinação da dose letal mínima foi determinada 24 horas após os compostos serem injetados.

### **4.3. Teste de atividade neurolocomotora**

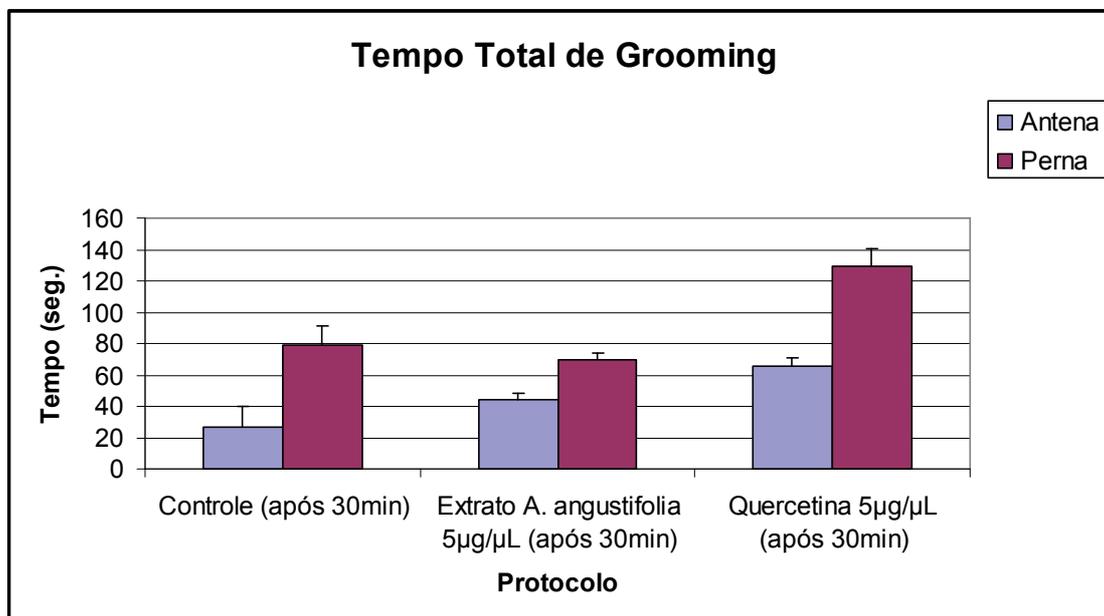
Em relação ao teste de atividade neurolocomotora para o grupo controle, tratado apenas com solução fisiológica, obteve-se uma atividade neurolocomotora de  $98 \pm 4$  segundos de movimentação das pernas em 3 minutos. Quando injetados com a maior dose ( $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), observou-se um significativo bloqueio neurolocomotor,  $45 \pm 2$  segundos de movimentação das pernas, este valor corresponde a  $50 \pm 2\%$  do valor total do grupo controle (FIGURA 7). As doses de  $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $2,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  não foram efetivas em realizar bloqueio neromuscular em baratas.



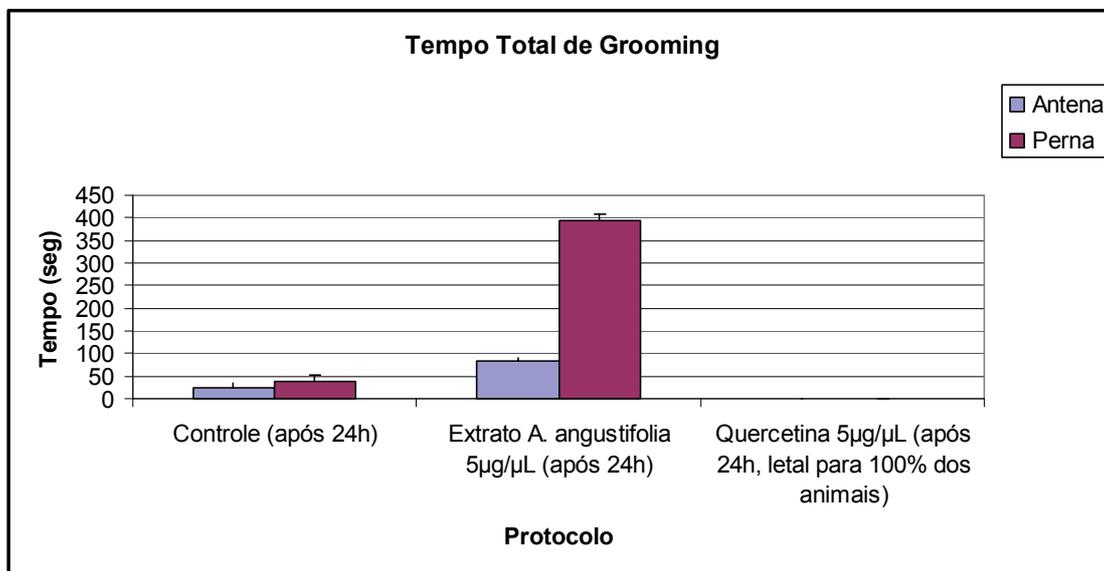
**FIGURA 7.** Atividade neurolocomotora de baratas da espécie *P. pallida*. Controle: solução salina. Extrato de *Araucaria angustifolia* e solução salina injetados em um volume de 20µL/animal na 3ª porção abdominal. Note o significativo bloqueio de 56% na atividade motora dos animais tratados com extrato *A. angustifolia* 5µg/µL.

#### **4.4. Neurotoxicidade central “grooming”**

Para determinar a toxicidade central do extrato metanólico de *A. angustifolia* foi realizado o teste de grooming, como descrito por Libersat (2003). Como resultado obteve-se um significativo aumento, dose e tempo dependente, no tempo total de grooming realizado pelos indivíduos injetados com a maior concentração do extrato de *A. angustifolia* ( $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ),  $396\pm 4\text{s}$  em 30 minutos de observação, 24 horas após o tratamento ( $p < 0,05$  “t” de student), quando comparados com indivíduos do grupo controle,  $60\pm 2\text{s}$  em 30 min  $p < 0,05$  “t” de student (FIGURA 9). Quercetina  $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  também foi utilizada e esta induziu um aumento no número total de groomings, 30 minutos após o início do tratamento, a quercetina mostrou-se letal para 100% dos animais.



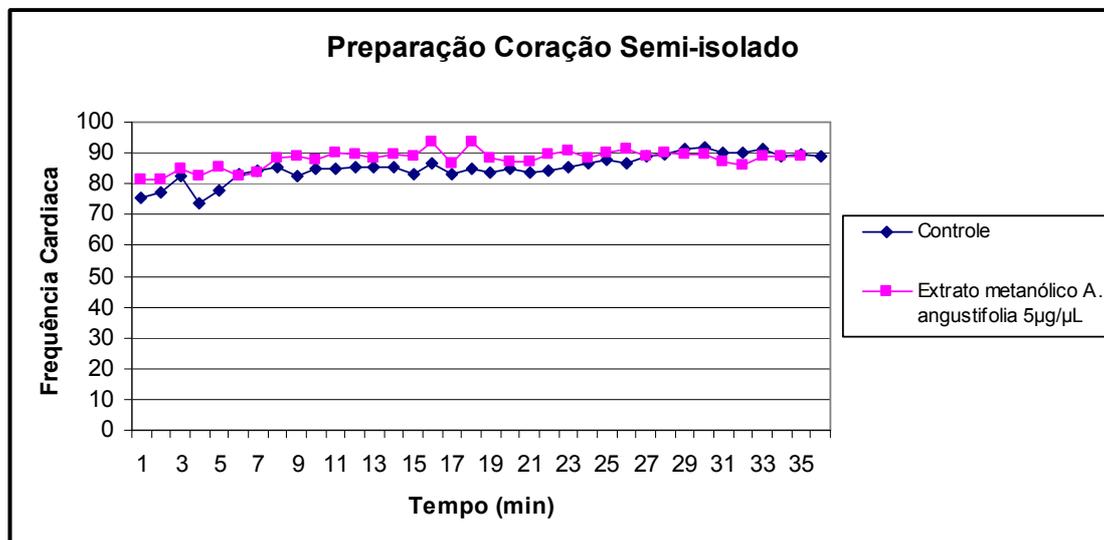
**FIGURA 8.** Tempo total de grooming realizado pelo inseto. Controle: solução salina. O tempo total de groomings realizado pelo animal foi contabilizado após a injeção de: solução salina; extrato *A. angustifolia* 5µg/µL; quercetina 5µg/µL e a observação teve duração de 30 minutos. Todos os compostos foram injetados em um volume de 20µL/animal.



**FIGURA 9.** Tempo total de grooming realizado pelo inseto. Controle: solução salina. A observação do tempo total de grooming, em um período de 30 minutos, teve início 24 hora após os animais serem injetados na 3ª porção abdominal com 20µL/animal de solução salina; extrato metanólico de *Araucaria angustifolia* 5µg/µL; quercetina 5µg/µL. Note que o número total de groomings induzido pelo extrato de *A. angustifolia* aumentou, significativamente, quando comparado ao número de groomings induzidos por este mesmo extrato 30 minutos após a injeção. Note também que quercetina causou letalidade em 100% dos animais após 24 horas.

#### **4.5. Preparação Coração Semi-isolado de Barata (CSIB)**

O sistema Cardiovascular de insetos, assim como o de mamíferos, tem o seu ritmo mediado pela liberação/recaptação de neurotransmissores como acetilcolina (Ach). Na preparação de coração semi-isolado em baratas utilizando-se solução fisiológica (controle) e extrato metanólico de *A. angustifolia* 5µg/µL, observou-se que os componentes do extrato metanólico não são eficientes em induzir alterações significantes na frequência cardíaca de insetos (FIGURA10), possivelmente, devido ao fato de os componentes do extrato não atuarem sobre os receptores de Ach no músculo cardíaco ou sobre a enzima acetilcolinesterase, encarregada de recaptar a acetilcolina na fenda sináptica.



**FIGURA 10.** Atividade do extrato metanólico de *A. angustifolia* sobre coração semi-isolado de barata *P. pallida*. Controle: solução salina. Extrato de *A. angustifolia* 5µg/µL e solução salina foram adicionados sobre o coração semi-isolado do inseto em um volume de 200µL/animal e o número de batimentos cardíacos foi contabilizado durante 30 minutos, com registro à cada minuto.

## 5. Discussão

Aminas biogênicas são responsáveis por induzir uma variedade de comportamentos motores rítmicos em insetos e outros invertebrados (Bicker & Menzel, 1989; Selverston, 1993). Grooming, em insetos, tem como função a limpeza da superfície do corpo, principalmente de antenas e pernas dianteiras, utilizando para isso o aparelho bucal (Libersat, 2003). Este comportamento está associado a liberação de monoaminas no sistema nervoso central de insetos, principalmente Dopamina (Weisel-Eichler, 1999). A reserpina, um composto vegetal obtido a partir das raízes de *Rauwolfia serpentina* é conhecida por causar uma massiva liberação de monoaminas no sistema nervoso central (Oates, 1996), tal atividade deve-se ao fato de que a reserpina é capaz de atravessar a barreira hemolínfa-cérebro e afetar os níveis de monoaminas no glânglio subesofágico de insetos (Sloley & Owen, 1982). Em invertebrados, certos moduladores, particularmente as monoaminas, possuem a capacidade de ativar circuitos neurais específicos e, com isso, induzir certos tipos de comportamentos, como morder, em sanguessugas (Lent et al., 1989), atividade gástrica em lagostas (Heinzel, 1988), comportamento agressivo em lagostas (Kravitz, 1988). Yellman et al. (1997), trabalhando com moscas decapitadas, observou que o comportamento de grooming pode ser induzido aplicando-se dopamina ou seus agonistas, D1 e D2 no cordão nervoso de moscas. Weisel-Eichler (1999) observou que a dopamina, quando injetada na hemocele de baratas, induz um tempo total de grooming maior do que quando comparado com outras monoaminas como octopamina e serotonina ou solução salina. A eficiência do extrato metanólico de *A. angustifolia* em induzir comportamento de grooming em baratas da espécie *P. pallida* pode estar associada a possibilidade de que o flavonóide quercetina, que está presente nas folhas de *A. angustifolia* e possui atividade inseticida comprovada (Gazzoni et al., 1999), esteja atuando sobre os receptores ou níveis de Dopamina (DA) no sistema nervoso central da barata e, assim, induzindo um elevado número de grooming no inseto. O teste com Coração-semi Isolado de Barata (CSIB) mostrou que não ocorreram significantes alterações no ritmo dos batimentos cardíacos em baratas, contribuindo para a hipótese de que o sítio ativo do extrato de *A. angustifolia* não está localizado nos receptores do coração, mas sim nos receptores do sistema nervoso central do inseto.

## 6. Conclusões

Os ensaios de cromatografia em camada delgada realizados com o extrato metanólico das folhas de *Araucaria angustifolia*, bem como os testes de dose letal mínima, atividade neurolocomotora, neurotoxicidade central e em preparação de coração semi-isolado de baratas permitem concluir que:

- 1- O extrato metanólico de *A. angustifolia* apresenta o flavonóide quercetina em sua composição.
- 2- Tanto a quercetina, quanto o extrato metanólico de *A. angustifolia* tiveram sua atividade inseticida comprovada através do teste de dose letal mínima.
- 3- O extrato de *A. angustifolia* não atua significativamente sobre a preparação de coração semi-isolado de baratas da espécie *Phoetalia pallida*, possivelmente por não atuar sobre os receptores colinérgicos localizados no coração do inseto ou sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE).
- 4- A capacidade do extrato de *A. angustifolia* em bloquear significativamente a atividade neurolocomotora e induzir um número total elevado de grooming em baratas, contribui para a hipótese deste extrato atuar sobre o sistema nervoso central do inseto, possivelmente sobre os receptores de dopamina (DA).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. T. R. **Isolamento e identificação de substâncias ativas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze com potencial atividade antiviral.** Florianópolis, 2003.

BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, G. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W.H. **Natural plant chemicals: source of industrial and medicinal materials.** Science 228, 1154-1160, 1985.

BAUMANN, H.; GERSCH, M. **Purification and identification of Neurohormone D, a heart accelerating peptide from the corpora cardiaca of the cockroach, *Periplaneta americana*.** Insect Biochem. 12, 7-14, 1982.

BICKER, G.; MENZEL, R. **Chemical codes for the control of behavior in arthropods.** Nature. 337, 33-39, 1989.

BROPHY, J. J.; GOLDSACK, R. J.; WU, M. Z.; FOOKES, C. J. R.; FORSTER, P. I. **The steam volatile oil of *Wollemia nobilis* and its comparison with other members of the Araucariaceae (*Agathis* and *Araucaria*),** Biochemical Systematics and Ecology, v. 28, n. 6, p. 563-578, 2000.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo – PR: EMBRAPA. 70-78, 1994.

CASTRO, M. A.; GORDALIZA, M.; DEL CORRAL, J. M. M.; FELICIANO, A. S. **The distribution of lignanoids in the Order Coniferae.** Phytochemistry, v. 41, n. 4, p. 995-1011, 1996.

CHARBOUSSOU, F. **Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos: a teoria da trofobiose.** Porto Alegre, L & PM, 1987.

COLLINS, C.; MILLER, T. **Studies on the action of biogenic amines on cockroach heart.** Exp. Biol. 67, 1-15, 1977.

CORNWELL, P.B. **The cockroach.** Hutchinson, 1968.

DATTA, P. K.; FIGUEROA, M.O.R.; LAJOLO, F. M. **Chemical Modification and Sugar Binding Properties of Two Major Lectins from Pinhão ( *Araucaria brasiliensis* ) Seeds**. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 41, 1851-1855, 1993.

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. **Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à lambda-cialotrina**. *Neotropical Entomology*. 30, 311-316, 2001.

ELISABETSKY, E. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas**. In: SIMÕES, C.M. O. et al (Org.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRS/UFSC, 2002.

FONSECA, S. F.; NIELSEN, L. T.; RUVEDA, E. A. **Lignans of *Araucaria angustifolia* and <sup>13</sup>C NMR Analysis of Some Phenyltetralin Lignans**. *Phytochemistry*. 18, 1703-1708, 1979.

GAZZONI, D.L.; HÜLSMEYER, A.; HOFFMANN-CAMPO, C.B. **Efeito de diferentes doses de rutina e de quercetina na biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lep., Noctuidae)**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.32, n.7, p.673-681, 1997.

GEISER, H.; QUINN, C. **Biflavonoids**. In: HARBONE, J. B.; MABRY, T. J. *The Flavonoids*. London: Chapman and Hall, 1988.

GEMTCHÚJNICOV, I. D. **Manual de Taxonomia Vegetal: Plantas de Interesse Econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976.  
LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998.

GRYNBERG, N. F.; CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, M. C.; MOREIRA, I. C.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. **DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.35, n. 7, p. 819-822, 2002.

GUERRA, M. P.; SILVEIRA, V.; REIS, M. S.; SCHNEIDER, L. **Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*)**. In: SIMÕES, L. L.; LINO, C.

**F. (Org.). Sustentável Mata Atlântica: A Exploração de Recursos Florestais.** São Paulo: SENAC, 2000.

HARADA, N.; ONO, H. **Atropisomerism in natural products. Absolute stereochemistry of biflavone, (-)-4',4''',7,7'''-tetra-O-methylcupressuflavone, as determined by the theoretical calculation of CD spectra.** Journal of American Chemical Society, v. 114, n. 20, p. 7687-7692, 1992.

HEINZEL, H. G. **Gastric mill activity in the lobster. II. Proctolin and octopamine initiate and modulate chewing.** J. Neurophysiol. 59, 551-565, 1988.

ILYAS, N. ILYAS, M.; RAHMAN, W.; OKIGAWA, M.; KAWANO, N. **Biflavones from the leaves of *Araucaria excelsa*.** Phytochemistry, v. 17, n. 5, p. 987-990, 1978.

KAGABU S.; ISHIHARA R.; HIEDA Y.; NISHIMURA K.; NARUSE Y. **Insecticidal and Neuroblocking Potencies of Variants of the Imidazolidine Moiety of Imidacloprid-Related Neonicotinoids and the Relationship to Partition Coefficient and Charge Density on the Pharmacophore.** J. Agric. Food Chem. 55, 812-818, 2007.

KHAN, N. U.; ILYAS, M.; RAHMAN, W.; MASHIMA, T.; OKIGAWA, M.; KAWANO, N. **Biflavones from the leaves of *Araucaria bidwillii* Hooker and *Agathis alba* Foxworthy (Araucariaceae).** Tetrahedron, v. 28, n. 3, p. 5689-5695, 1972.

KRAVITZ, E. A. **Hormonal control of behavior: amines and the biasing of behavioral output in lobster.** Science. 241, 1775-1781. 1988.

LENT, C. M.; DICKINSON, M. H.; MARSHALL, C. G. **Serotonin and leech feeding behavior: obligatory neuromodulation.** Am. Zool. 29, 1241-1254, 1989.

LIBERSAT, F. **Wasp uses venom cocktail to manipulate the behavior of its cockroach prey.** J. Comp Physiol. 189, 497-508, 2003.

LIBERSAT, F.; PFLUEGER, H. J. **Monoamines and the orchestration of behavior.** Bioscience. 54, 17-25, 2004.

LIN, Y.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; CHEN, F.; SIDWELL, R.; BARNARD, D. I.; HUFFMANN, J. H.; KERN, E. R. **Antiviral activities of biflavonoids.** Planta Medica. v. 65, n. 2, p.120-25, 1999.

OATES, J. A. **Antihypertensive agents and the drug therapy of hypertension in Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9<sup>th</sup> edn** (ed. J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon and A. G. Gilman), pp. 781-808. New York: McGraw-Hill. 1996.

OHASHI, H.; KAWAI, S.; SAKURAI, Y.; YASUE, M. **Norlignan from the knot resin of *Araucaria angustifolia***, *Phytochemistry*, v. 31, n. 4, p. 1371-1373, 1992

PARVEEN, N.; TAUFEEQ, H. M.; KHAN, N. U. **Biflavones from the leaves of *Araucaria araucana***. *Journal of Natural Products*, v. 50, n. 2, p. 332-333, 1987.

PLOTKIN, M. J. P. **Traditional knowledge of medicinal plants**. *Journal of Ethnopharmacology*. 34, 29-41, 1991.

RODRIGUES, S. R.; COUTINHO, G.V.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; ZANELLA, D. P. F. **Atividade inseticida de extratos etanólicos de plantas sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. *Agrarian*. 1, 133-144. 2008.

ROEL, A. R. **Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável**. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*. Vol. 1, N. 2, p. 43-50, Mar. 2001.

SAARINEN, N. M.; SMEDS, A.; MÄKELÄ, S. I.; ÄMMÄLÄ, J.; HAKALA, K.; PIHLAVA, J.; RYHÄNEN, E.; SJÖHOLM, R.; SANTTI, R. **Structural determinants of plant lignans for the formation of enterolactone in vivo**. *Journal of Chromatography B*, v.777, n. 1-2, p. 311-319, 2002.

SCHULTZ, A. **Introdução à Botânica Sistemática**. 6. ed, v. 2. Porto Alegre: Sagra, 1990.

SLOLEY, B. D.; OWEN, M. D. **The effects of reserpine on amine concentrations in the nervous system of the cockroach**. *Insect Biochem*. 12, 469-472, 1982.

WEIEEL-EICHLER, A.; HASPEL, G.; LIBERSAT, F. **Venom of a parasitoid wasp induces prolonged grooming in the cockroach**. *J. Exp. Biol*. 202, 957-964, 1999.

YELLMAN, C.; TAO, H.; HE, B.; HIRSH, J. **Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines on decapitated *Drosophila***. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 4131-4136, 1997.