

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

*CAMPUS SÃO GABRIEL*

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GRAZIELA HOLKEM LORENSI

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E NEUROFARMACOLÓGICA DE  
COMPOSTOS INSETICIDAS ISOLADOS DE *Prasiola crisper* (Lightfoot) Kützing (1843)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SÃO GABRIEL, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

2015

GRAZIELA HOLKEM LORENSI

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E NEUROFARMACOLÓGICA DE  
COMPOSTOS INSETICIDAS ISOLADOS DE *Prasiola crispa* (Lightfoot) Kützting (1843)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto

SÃO GABRIEL

2015

LORENSI, Graziela Holkem

Caracterização fitoquímica e neurofarmacológica de compostos inseticidas isolados de *Prasiola crispa* (Lightfoot) Kützinger (1843)./Graziela Holkem Lorensi.

98 folhas;

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Pampa, 2015.

Orientação: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo.

1. Qualidade Ambiental. 2. Neurofarmacologia. 3. Toxicologia.

I. Dal Belo, Cháriston André. II. Doutor

**GRAZIELA HOLKEM LORENSI**

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E NEUROFARMACOLÓGICA DE  
COMPOSTOS INSETICIDAS ISOLADOS DE *Prasiola crispa* (Lightfoot) Kützing (1843)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Ciências Biológicas

Linha de Pesquisa: Qualidade Ambiental

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez  
UFRGS – Porto Alegre

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Vinadé  
UNIPAMPA – São Gabriel

---

Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo  
UNIPAMPA – São Gabriel

“Não é o mais forte que sobrevive,  
nem o mais inteligente,  
mas o que melhor se adapta às mudanças”

**Charles Darwin**

## AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e coragem que me deu nos momentos difíceis e, ainda, por ter me cercado de pessoas maravilhosas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

Agradeço aos meus pais, José e Gislaine pela compreensão, incentivo e amor incondicional. Ao meu irmão Augusto e vó Dorlinda pelo apoio. Muito obrigada! Ao Marcio, Júlia e Luiza amo vocês.

Aos amigos do LANETOX. Muito obrigada!

Ao meu orientador. Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo meu exemplo de profissionalismo agradeço pela infinita paciência por contribuir com o meu crescimento profissional e pessoal por estar sempre pronto para me ajudar. Gostaria de expressar o meu muito obrigado por tudo. Tens meu eterno reconhecimento.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto pelos ensinamentos ao longo deste trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Vinadé agradeço pela amizade, paciência, carinho e ensinamentos. São incontáveis as lições importantes que aprendi, e levarei para vida toda.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Laneuville Teixeira da UFF, pela análise Fitoquímica.

Ao programa Antártico Brasileiro (Processo n.574018/2008), FAPERJ (Processo n. E-26/170.023/2008), do Ministério de Ciência e Tecnologia-MCT, Ministério do Meio Ambiente-MMA e CAPES Edital 063/2010 Toxinologia, pelo financiamento.

A UNIPAMPA e ao PPGCB pela possibilidade de realização deste curso e a FAPERGS pela bolsa de mestrado.

## RESUMO

Organismos adaptados a ambientes extremos como a Antártica tendem a apresentar uma constituição única em termos de metabólitos secundários. Desta forma, estudos que visem à elucidação de efeitos biológicos de organismos vegetais oriundos destas regiões são relevantes do ponto de vista biotecnológico. Este trabalho investigou o mecanismo envolvido na atividade inseticida do extrato bruto da *Prasiola crispa* uma alga oriunda de áreas de degelo da Antártica, em modelos neurofisiológicos de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. Também foi investigado o mecanismo de ação dos compostos bioativos oriundos do material vegetal, relacionado a essa atividade. A alga foi coletada, próxima à região da estação Polonesa Arctowski, na Baía do Almirantado. O mecanismo de toxicidade do extrato hexânico da alga *Prasiola crispa* foi demonstrado inicialmente através de avaliações toxicológicas em ensaios de letalidade para a determinação da DL<sub>50</sub>. Foram realizados ensaios bioquímicos para determinação da atividade da enzima AChE sobre o homogeneizado de cérebro de baratas. Também foram usados modelos biológicos *in situ* e *in vivo* com o intuito de se verificar a atividade do extrato sobre diferentes sistemas fisiológicos desses animais como o sistema cardiovascular, sistema nervoso periférico e o sistema nervoso central. Nesse sentido, usando à técnica do coração semi-isolado de baratas *in situ*, a de músculo coxal abductor-metatorácico *in vivo* e a técnica para a medida da atividade de *grooming in vivo*. O extrato hexânico de *Prasiola crispa* (HPC) foi preparado de acordo com a técnica fitoquímica convencional. A análise fitoquímica preliminar foi feita usando-se a cromatografia de camada delgada (CCD). Assim, os ensaios para a determinação da dose letal mínima (DL<sub>50</sub>) nas concentrações 100, 200, 400 e 800µg/g de animal, demonstraram que a dose de 400µg/g ocasionou a morte de 50% dos animais, sendo esta considerada a DL<sub>50</sub> para *Nauphoeta cinerea*, 24h após a administração do composto (n=10 em triplicata \*p≤0,05). Os ensaios para a medida da atividade da AChE, demonstraram que o HPC 100, 200, 400 e 800µg/g de animal, não inibe significativamente essa enzima (p≥0,05, n=5 em triplicata). A avaliação dos efeitos do extrato 100, 200, 400 e 800µg/g de animal, sobre a frequência cardíaca da barata, demonstrou uma atividade cardiotoxica que foi tempo-dependente. Quando a dose do HPC 100µg/g foi ensaiada houve um efeito cronotrópico positivo não significativo. Os ensaios com as doses sucessivas induziram um efeito cronotrópico negativo, que foi máximo para a dose de (800µg/g) o efeito foi de 35±3bat./min (n=6, \*p≤0,05). A obtenção dos registros da força de contração muscular em animais tratados com o HPC 100, 200, 400 e 800µg/g de animal, resultou em um bloqueio neuromuscular progressivo dose e tempo-dependente. Em todos os registros ficou evidente o aparecimento de contrações espontâneas após 15-30min do tratamento com HPC. Nessa série de ensaios a dose de 800µg/g do HPC induziu o maior nível de inibição da força de contração muscular, que foi de 100% em 120min de registros (n=6, \*p≤0,05). O pré-tratamento dos animais com cloral hidratado 10µg/g de animal, um bloqueador do receptor de N-metil-d-aspartato (NMDA), aumentou o tempo para o bloqueio das contrações musculares em 50%, e inibiu o aparecimento de contrações espontâneas. O pré-tratamento com a bicuculina 2,5µg/g de animal, um bloqueador dos receptores GABA, inibiu parcialmente o efeito bloqueador neuromuscular induzido pelo HPC 800µg/g (n=6, \*p≤0,05). A análise do comportamento de *grooming*, que é caracterizado pela limpeza das pernas e antenas pelo animal, demonstrou também um efeito tempo-dependente. Nesses ensaios os valores para o *grooming* com solução salina foram de 153±8s/30min para pernas 75±5s/30min para antenas. Quando o DMSO 10% foi ensaiado não houve alteração das respostas, em relação ao controle salina, para o *grooming* de antenas e uma leve diminuição não significativa do *grooming* de pernas. A administração do HPC nas concentrações de 100, 200, 400 e 800µg/g de animal, induziu um aumento significativo na taxa de *grooming* de antenas e pernas para a menor dose que foi de 390±5s/30min para as antenas e 395±5s/30min

para as pernas, respectivamente ( $*p \leq 0.05$ ). Quando as maiores doses foram ensaiadas houve uma diminuição nas respostas de *grooming* que foi máxima para o de antenas e pernas, culminando com a extinção da atividade com a dose de  $800 \mu\text{g/g}$  ( $n=30$ ,  $*p \leq 0.05$ ). Na determinação dos compostos químicos do HPC feita por ensaios de Ressonância Magnética Nuclear foram identificados três cristais com alto grau de pureza caracterizado como fitoesteróis:  $\beta$ -sitosterol (24 $\alpha$ -etil-colest-5-enol) (m/z 414,71), Campesterol (24 $\alpha$ -metil-colest-5-enol) (m/z 400,68) e Stigmasterol (24 $\alpha$ -etil-colest-5,22-dienol) (m/z 412,69). Dos três compostos identificados, o  $\beta$ -sitosterol foi o mais ativo em induzir neurotoxicidade sobre o sistema nervoso periférico. Em conjunto os resultados apresentados nesse trabalho, demonstram que o extrato hexânico de *Prasiola crispa* induz atividade entomotóxica em modelo de *Nauphoeta cinerea*. Esse efeito tóxico seria prevalente sobre o sistema nervoso periférico. A indução de alterações sobre a taxa de *grooming* demonstra que os compostos bioativos presentes no extrato atingem o sistema nervoso central do inseto produzindo alterações complexas nessa área. O efeito cardiotoxico contribui para o desenvolvimento do efeito letal induzido pelo extrato em baratas. A determinação de compostos fitosteróis reforçam que esses compostos devam estar associados aos efeitos tóxicos observados no extrato. Ensaios fitoquímicos futuros para a determinação de novos compostos presentes no extrato poderão contribuir para a elucidação da atividade entomotóxica.

**Palavras-chave:** Alga, *Nauphoeta cinerea*, atividade entomotóxica, neurotoxicidade, sistema nervoso.



## ABSTRAT

Organisms adapted to extreme environments such as Antarctica, tend to present a unique constitution in terms of secondary metabolites. Thus, studies aiming the elucidation of biological activity of vegetal organisms from these regions are relevant in terms of biotechnology. The aim of this work was to investigate the mechanism underlying the entomotoxic activity of *Prasiola crispa* seaweed from Antarctica mealting iced areas whole extract in neurophysiological models of *Nauphoeta cinerea* cockroaches. The mechanisms of the vegetal extract isolated bioactive compounds that was related to the entomotoxic activity were also studied. The seaweed was collected next to the Polish station Arctowski, at Almirantado bay. The toxic mechanism of the hexanic extract of *Prasiola crispa*, was initially demonstrated through toxicological assessments of lethality assays of LD<sub>50</sub>. Biochemical assays were also performed to determine the acetylcholinesterase (AChE) enzyme activity on the cockroaches' brain homogenate. It was also used *in vivo* and *in situ* biological models of cockroaches, in order to assess the extract's activity on the different insect physiological systems, such as the cardiovascular system, the peripheral nervous system and the central nervous system. To accomplish this, we have used the cockroach *in situ* semi-isolated heart technique, the the coxal methatoraxic-abductor nerve-muscle preparation *in vivo* and the measurement of *grooming* activity *in vivo*. The hexanic extract of *Prasiola crispa* (HPC) was prepared according to the conventional phytochemical technique. The phytochemical preliminar analysis was performed through thin layer chromatography (TLC). Thus, the assays to determine the minimum lethal dose (LD<sub>50</sub>) at 100, 200, 400 and 800 µg/g of animal weight, demonstrated that the dose of 400 µg/g induced 50% lethality, that was considered the LD<sub>50</sub> for *Nauphoeta cinerea*, 24h after the adminstration of the compound (n= 10 in triplicate \*p≤0,05). The assays for AChE activity showed that the HPC 100, 200, 400 and 800µg/g of animal weight, does not inhibit significantly this enzyme (p≥0.05, n=5 in triplicate). The biological activity of HPC 100, 200, 400 e 800 µg/g of animal weight on cockroach heart rate, showed a time-dependent cardiotoxic activity. When the HPC 100 µg/g was assayed, a non-significative positive chronotropic effect was observed. With the higher doses there were a progressive negative chronotropic effect that was maximum at 800 µg/g 35±3 beat./min; (n=6,\*p≤0,05). The recordings of cockroach neuromuscular twich-tension with HPC 100, 200, 400 e 800 µg/g animal, showed a progressive dose and time-dependent neuromuscular blockade. Spontaneous twiches were detected 15-30min after HPC treatment in all experiments. In this assayes, HPC 800 µg/g induced the highest level of neuromuscular blockade 100% within 120min recordings (n=6, \*p≤ 0,05). On these preparations the previous treatment with chloral hydrate 10µg/g animal, an N-methyl-d-aspartate blocker, increased the time for 50% neuromuscular blockade, and also inhibited the appearance of spontaneous twiches. The pretreatment with bicuculine 2.5 µg/g of animal weight a GABA receptor blocker, partially inhibited the neuromuscular blockade activity induced by HPC 800µg/g (n=6, p≤0,05). The animal *grooming* behavior analysis which is the leg and antennae cleaning behavior, also showed a time-dependent effect. In these assays the values for *grooming* in saline-treated animals was 153±8s/30min for the legs 75±5s/30min for the antennas, respectively. When DMSO 10% was assayed, no changes in the responses was observed in

the antenna *grooming*, and a slight but not significant decrease in the leg *grooming* was detected. HPC 100, 200, 400 and 800  $\mu\text{g/g}$  of animal weight treatment induced a significant increase in the legs and antennas *grooming*, of  $390 \pm 5\text{s}/30\text{min}$  for antennas and  $395 \pm 5\text{s}/30\text{min}$  for legs, on the smallest tested dose ( $*p \leq 0,05$ ). When higher HPC doses were assayed, there was a progressive decrease on *grooming* responses, that was maximum for antennas and legs and resulted in the extinction of *grooming* activity at  $800\mu\text{g/g}$  dose ( $n=30$ ,  $*p \leq 0.05$ ). The determination of HPC chemical compounds by Nuclear Magnetic Resonance (RMN), showed three crystals with high purity that were characterized as phytosterols:  $\beta$ -sitosterol (24 $\alpha$ -etil-colest-5-enol) (m/z 414,71), campesterol (24 $\alpha$ -metil-colest-5-enol) (m/z 400,68) e stigmasterol (24 $\alpha$ -etil-colest- 5,22-dienol) (m/z 412,69).  $\beta$ -sitosterol was the most active compound in inducing neurotoxicity at the peripheral nervous system. Together, the results presented at this work demonstrated that *Prasiola crispa* hexanic extract induces entomotoxic activity at *Nauphoeta cinerea* model. This toxic effect would be prevalent on the peripheral nervous system. The changes induced on insect grooming activity demonstrate that the extract bioactive compounds are able to reach the insect central nervous system, inducing complex behavioral changes. The cardiotoxic activity was significant, and may contribute to the development of entomotoxic activity. The presence of phytosterols compounds in the extract composition may be related to the algae toxic activity. Future phytochemical assays for the determination of novel compounds in the extract may help in the elucidation of the extract entomotoxic activity.

**Key words:** Alga, *Nauphoeta cinerea*, entomotoxic activity, neurotoxicity, nervous system.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Acetilcolina – ACh

Acetilcolinesterase – AChE

Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-metil-4-isoxazolepropriônico – AMPA

Ácido  $\gamma$ -aminobutírico – GABA

Ácido 2-carboxi-4-(1-metiletetil)-3-pirrolidinacético – KA

Cálcio – Ca

Cloro – Cl

Dopamina – DA

Dose Letal Mínima – DL<sub>50</sub>

Erro padrão da média – E.P.M.

Extrato hexânico *Prasiola crispera* – HPC

Glutamato – GLU

[Hidroximetil] amino-metano – Tris

Micrograma –  $\mu$ g

Microlitro s– $\mu$ L

Micromolar –  $\mu$ M

Milimolar – mM

Minutos – min

N-metil-d-aspartato – NMDA

Sistema Nervoso Central – SNC

Sistema Nervoso Periférico – SNP

Sódio – Na

Sulfóxido de dimetilo – DMSO

Quinoxalinadionas 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-diona – DNQX

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa do continente Antártico .....	20
Figura 2 -	<i>Prasiola crispa</i> .....	23
Figura 3 -	Representação da estereoquímica dos principais fitoesteróides.....	31
Figura 4 -	Sistema nervoso de baratas .....	33
Figura 5 -	Cordão nervoso ventral de uma barata.....	34
Figura 6 -	Estrutura geral de uma barata.....	37
Figura 7 -	Barata <i>Nauphoeta cinérea</i> .....	37
Figura 8 -	Instalação para registros da atividade neuromuscular de barata <i>in vivo</i> .....	44
Figura 9 -	Teste do campo aberto (Open field).....	45
Figura 10 -	Determinação da DL <sub>50</sub> em baratas .....	48
Figura 11 -	Gráfico da inibição da acetilcolinesterase (AChE) em homogeinizato de cérebro de baratas.....	49
Figura 12 -	Imagem representativa da preparação coração semi-isolado de baratas .....	50
Figura 13 -	Frequência cardíaca de baratas da espécie <i>Nauphoeta cinerea</i> em preparação coração semi-isolado na presença do HPC .....	51
Figura 14 -	Atividade de diferentes concentrações do HPC em junção neuromuscular de baratas.....	53
Figura 15 -	Atividade dose-resposta do HPC a diferentes tratamentos farmacológicos em junção neuromuscular de baratas .....	55
Figura 16 -	Atividade dose-resposta do HPC a diferentes tratamentos farmacológicos em junção neuromuscular de baratas .....	56
Figura 17 -	Atividade dose-resposta do HPC a diferentes tratamentos farmacológicos em junção neuromuscular de baratas .....	57
Figura 18 -	Atividade dose-resposta do DNQX e Fentolanina ao HPC em junção neuromuscular de baratas .....	58
Figura 19 -	Atividade dose-resposta do $\beta$ -sitosterol, Campesterol, Stigmasterol em junção neuromuscular de baratas .....	60
Figura 20 -	Registro representativo da contração muscular na ausência e presença do $\beta$ -sitosterol .....	61
Figura 21 -	Imagens representativas de barata <i>Nauphoeta cinerea</i> em atividade de <i>Grooming</i> .....	62
Figura 22 -	Atividade de <i>Grooming</i> das antenas.....	63

Figura 23 - Atividade de <i>Grooming</i> de pernas.....	63
Figura 24 - Cromatografia de camada delgada (CCD) com HPC.....	65
Figura 25 - Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) com a identificação dos compostos $\beta$ -Sitosterol, Campesterole e Stigmasterol .....	66

## **LISTAS DE TABELAS**

Tabela 1 - Plantas com propriedades inseticidas, princípios ativos e classes químicas ...30

## SUMÁRIO

LISTAS DE ABREVEATURAS

LISTAS DE FIGURAS

LISTAS DE TABELAS

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1. Continente Antártico .....	18
1.1.1. Comunidades vegetais de áreas de degelo da Antártica .....	20
1.1.2. A alga <i>Prasiola crista</i> .....	22
1.2. Agrotóxico .....	23
1.2.1. Atividade inseticida de compostos vegetais .....	25
1.2.2. Interações químicas com macroalgas .....	28
1.2.3. Fitoesteróides em extratos vegetais .....	30
1.3. O sistema nervoso de insetos .....	32
1.3.1. Baratas como modelo para bioensaios de toxicologia .....	34
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	38
2.1. Objetivo Geral .....	38
2.2. Objetivos Específicos .....	38
<b>3. MATERIAL E METODOS</b> .....	40
3.1. Animais .....	40

3.2. Reagentes.....	40
3.2.1. Drogas usadas .....	40
3.2.2. Solução salina .....	40
3.3. Coleta do material vegetal .....	40
3.4. Preparação do extrato .....	41
3.5. Dissolução do extrato hexânico de <i>Prasiola crispa</i> .....	41
3.6. Determinação da DL <sub>50</sub> .....	41
3.7. Análise Bioquímica .....	42
3.7.1. Determinação da atividade da enzima colinesterase.....	42
3.8. Ensaio Biológicos .....	42
3.8.1. Preparação coração semi-isolado.....	42
3.8.2. Ensaio eletromiográfico.....	43
3.8.2.1. Preparação <i>in vivo</i> do músculo coxal-abdutor metatorácico de barata.....	43
3.8.3. Atividade de <i>Grooming</i> .....	45
3.9. Análise Fitoquímica do extrato hexânico de <i>Prasiola crispa</i> .....	46
3.10. Análise estatística .....	47
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
4.1. Determinação da DL <sub>50</sub> do HPC em ensaios com <i>Nauphoeta cinérea</i> .....	48



4.2. Efeito de diferentes doses do HPC sobre a atividade da AChE em homogenizado de cérebro de baratas .....	49
4.3. Efeito do extrato hexânico de <i>Prasiola crispera</i> sobre a frequência cardíaca de <i>N. cinérea</i> .....	50
4.4. Preparação <i>in vivo</i> do músculo coxal-abdutor metatorácico de barata .....	51
4.4.1. Atividades dose-resposta do extrato hexânico de <i>Prasiola crispera</i> em junção neuromuscular de barata .....	51
4.4.2. Efeito de diferentes tratamentos farmacológicos frente ao bloqueio neuromuscular induzido pelo extrato hexânico de <i>Prasiola crispera</i> .....	54
4.4.3. Ensaio da atividade neuromuscular com os compostos fitoesteróis identificados no extrato hexânico de <i>Prasiola crispera</i> .....	59
4.5. Efeito do extrato hexânico de <i>Prasiola crispera</i> na atividade de <i>grooming</i> .....	61
4.6. Análise fitoquímica .....	64
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>67</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>72</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>74</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBIOGRAFICAS</b> .....	<b>75</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Continente Antártico

A Antártica (Fig. 01) compreende todas as terras localizadas abaixo do paralelo 60°. A Ilha Rei George (61o 50'S, 62o 15'W) está localizada no Arquipélago Shetlands do Sul (Antártica Marítima). No interior da ilha localiza-se a Baía do Almirantado, uma região abrigada com microclima muito distinto do encontrado em outras partes da ilha, especialmente com relação aos ventos (PEREIRA e PUTZKE, 1994).

A constituição litorânea é formada, principalmente, por rochas e sedimento vulcânico, é caracterizado por altas radiações, salinidade, baixa precipitação e temperaturas extremamente baixas. O clima da região sofre influência das correntes oceânicas e ventos provenientes do oeste. O verão é curto e frio, com temperatura máxima em torno de zero grau centígrados, ocorrendo, durante este período, incessantes chuvas e precipitação acentuada de neve. A luminosidade é limitada principalmente pela nebulosidade. Por essas condições climáticas extremas, a Antártica é uma das regiões geográficas mais sensíveis às mudanças climáticas, principalmente às causadas pelo aumento da concentração de gases do efeito estufa os quais têm contribuído para a fragmentação de grandes porções de gelo, e para o aumento gradativo da área de regiões de degelo (FERRON, *et al.*, 2001).

No verão a Baía do Almirantado é habitada por inúmeras espécies de animais, como focas, pinguins e outras aves marinhas. Os ecossistemas das áreas livres de gelo são mantidos pela grande aporte de nutrientes dos efeitos dos animais marinhos, fornecendo condições favoráveis para a diversidade vegetal nas zonas marginais das pinguineiras (TATUR *et al.*, 1997). Juntamente com a estabilidade do terreno, a radiação solar tem grande importância para o estabelecimento das comunidades vegetais nas áreas livres de gelo, com estreita relação com diversos fatores ambientais, constitui um indicador eficiente das condições locais

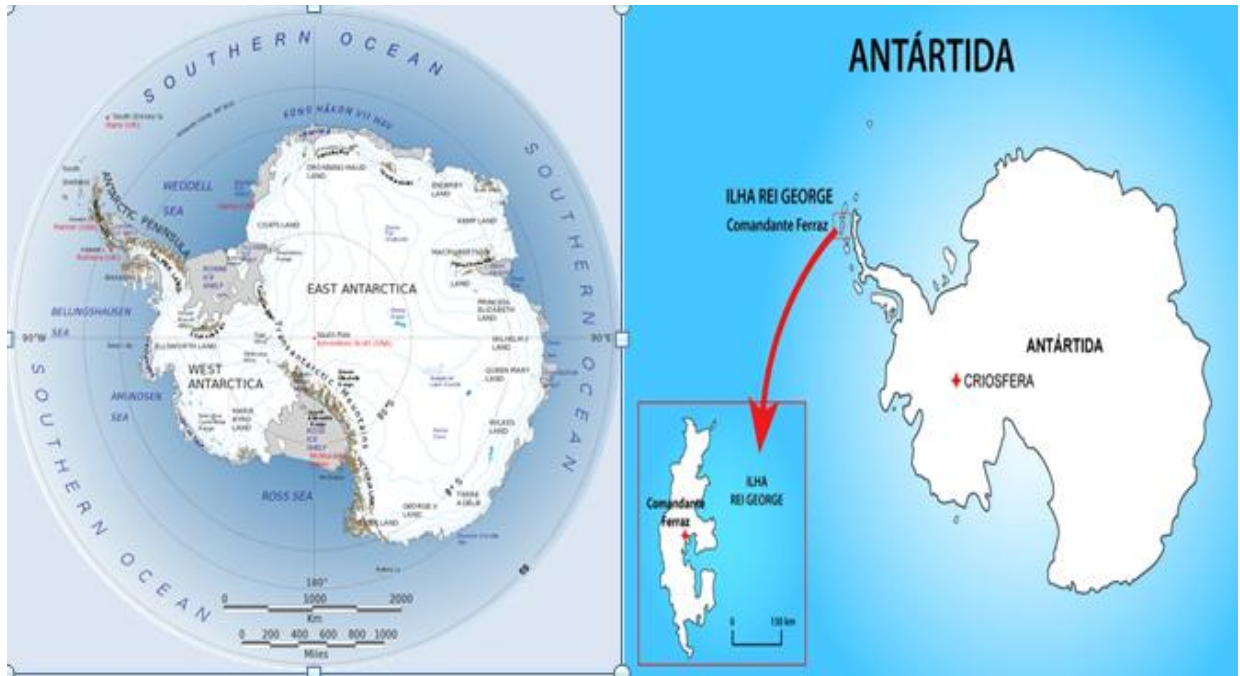
em termos pedológico, geomorfológico e hidrológico (SANTANA, 2006; FRANCELINO *et al.*, 2007).

Apesar de a Antártida ter sido descoberta em 1599, de acordo com PUTZKE e PEREIRA (2001), os primeiros estudos botânicos foram realizados durante uma expedição científica conduzida por J. Torrey em 1823, ele é considerado o primeiro botânico que coletou e descreveu uma espécie da Antártida o líquen *Usnea fasciata Torrey*. Entre 1829-1830 J. Eights foi o primeiro a coletar briófitas, algas marinhas e gramíneas na Antártica Marítima. Em 1843, J. D. Hooker realizou coletas na recém-descoberta Ilha Cockburn próximo à Península Trinity, enquanto participava da Expedição Antártica de Ross, tendo sido publicados os resultados em HOOKER e WILSON (1844).

Foi o último continente a ser descoberto pelo homem e, por isso, o conhecimento dos recursos naturais e biológicos está ainda em fase inicial de exploração. Ao mesmo tempo representa a possibilidade de que erros cometidos durante a exploração de outros continentes sejam evitados, permitindo que o ambiente natural seja preservado com o mínimo de perturbações. Por esta razão, nos termos do Tratado Antártico, a Antártica é definida como o “continente para ciência” (ATCPS, 1996). Em consideração a intensa atividade humana, foi criada nesta região a “Área Antártica Especialmente Gerenciada” (Antarctic Special Managed Area-ASMA) da Baía do Almirantado objetivando minimizar o impacto sobre a biota da região (SIMÕES *et al.*, 2001).

Pelo fato da Antártica ser a região mais preservada do planeta, é uma das mais vulneráveis às mudanças ambientais globais. Por esta razão, as alterações no meio ambiente Antártico, provocada pelo homem ou naturalmente, tem o potencial de provocar impactos biológicos, ambientais e socioeconômicos, que podem afetar o sistema terrestre como um todo. Porque é uma parte essencial do sistema ambiental global, a região da Antártida não só

envia sinais climáticos que afetam o clima global, mas também absorve sinais climáticos globais.



**Figura 01** - Mapa do continente Antártico.

Fonte: ([http://pt.wikipedia.org/wiki/Ant%C3%A1rtida#mediaviewer/File: Antarctica.svg](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ant%C3%A1rtida#mediaviewer/File:Antarctica.svg)). Acesso em 03 de dezembro de 2014.

### 1.1.1. Comunidades vegetais de áreas de degelo da Antártica

Segundo OCHYRA (1998), a Antártica é a única região do mundo que possui biota terrestre compreendendo quase que unicamente de organismos de nível organizacional menos complexo. Sendo que a distribuição das comunidades vegetais, conforme PUTZKE e PEREIRA, (1995), dependem principalmente da luz, uma vez que se tem um período de verão com aproximadamente 20 horas luz por dia e um período de inverno com apenas 2 horas de luz dia. Segundo ALLISON e LEWIS-SMITH (1973); LONGTON (1982), a duração da cobertura de neve, temperatura, a curta espessura do solo, baixa precipitação, brisa marinha e colônias de aves, são condições que associadas a fatores locais, tais como a estabilidade da superfície, tipo de rocha e erosão eólica, são críticos para sua ocorrência, estabelecendo nítida definição nos limites de sobrevivência, fazendo com que certas espécies sejam altamente

especializadas e os seus nichos, às vezes, são restritos que podem ser bons indicadores das mudanças ambientais.

No continente Antártico as comunidades vegetais desenvolvem-se no verão, após a neve do inverno anterior desaparecer (PUTZKE e PEREIRA, 1995). Em termos quantitativos, as coberturas vegetais na península ocupam pouco mais de 3% da área total (entorno de 16 hectares), concentrando-se principalmente próximo da linha costeira. As comunidades vegetais nas áreas de degelo da Antártica são constituídas predominantemente por briófitas; *Sanionia uncinata* (Hedw.) Schwaegr. Ocorrem mais de 50 espécies de musgos nesta baía, sendo o *Polytrichum* o gênero mais comum na área (OCHYRA, 1985). As cianobactérias ocorrem em superfícies cobertas por sedimentação fina e em pequenos depósitos de água de degelo. As algas macroscópicas ambas pertencentes ao filo *Chlorophyta* (alga verde), especialmente *Prasiola crispa*, crescem associadas às colônias ou ninhos de aves, representantes de *Prasiola cladophylla* são raramente encontradas e ocorrem principalmente em linhas de drenagem com água de degelo. Os líquens (fungos liquenizados) estão representados em praticamente todos os ambientes, constituindo-se no grupo com a maior biodiversidade da região, com mais de sessenta espécies identificadas até o momento. As plantas com flores *Colobanthus quitensis* e *Deschampsia antarctica*, pertencentes às famílias *Gramineae-Poaceae* e *Caryophyllaceae*, respectivamente, ocorrem somente nas áreas mais quentes do continente (LEWIS-SMITH, 1972) e crescem associadas a musgos ou líquens, sendo mais frequentes em áreas onde ocorrem colônias de aves.

Estudos com comunidades vegetais na Antártica possuem uma história muito recente quando comparadas com os estudos em regiões tropicais e temperadas. Entretanto, existem áreas com excelentes descrições de sua vegetação, como por exemplo, as Ilhas Shetlands do Sul (LINDSAY, 1971; FURMANCZY e OCHYRA, 1982; HU, 1998), Ilhas Signy (LEWIS-SMITH, 1972), Ilha Nelson (PUTZKE *et al.*, 1995), Ilha Elephante (ALLISON e LEWIS-

SMITH, 1973; PEREIRA e PUTZKE, 1994), entre outras. Em geral estes autores descreveram as unidades de vegetação em suas fisionomias, agregando os dados de estudos florísticos e, às vezes, ecológicos como em (PEREIRA e PUTZKE, 1994; HU, 1998).

### **1.1.2. A alga *Prasiola crispa***

A vegetação de macroalga de habitat terrestre na zona polar tem atraído um interesse considerável nas últimas décadas. Dada a sua tolerância às condições extremas típicas destas regiões, as macroalgas polares são um assunto ideal para estudar adaptações a condições extremas polares. As algas verdes do gênero *Prasiola* estão entre os mais comuns em regiões polares e de frio temperado. Os membros deste gênero são encontrados em uma ampla gama de habitats, incluindo solo úmido, rochas naturais, fluxo de funcionamento rápido, água de derretimento do gelo e rochas em costas marítimas. *Prasiola crispa* é relatada como a espécie mais comum de *Prasiola* nas regiões polares, onde é normalmente associada à habitats ricos em nitrogênio orgânico (particularmente em locais de hospedagem de colônias de pingüins na Antártida). A *Prasiola crispa* (Fig. 02) é uma alga terrestre eucariótica verde encontrada em áreas de degelo do continente Antártico (KOVÁCIK e PEREIRA, 2001). Apesar de serem escassos os estudos envolvendo a análise das interações biológicas dessa alga, características interessantes como propriedades adesivas tem sido descritas por plantas do gênero *Prasiola* sp. (MOSTAERT *et al.*, 2006), reforçando o conhecimento do seu papel no ecossistema Antártico bem como o seu potencial biotecnológico. Além disso, estudos realizados com outras três espécies *Deschampsia antarctica* Desv., *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. e *Polytrichum juniperinum* Hedw, demonstraram baixo poder de toxicidade em células de mamíferos e de invertebrados (PEREIRA *et al.*, 2009).



**Figura 02** - *Prasiola crispa* alga do continente Antártico. Fonte: Prof. Frederico B. Vieira.

## 1.2. Agrotóxico.

No Brasil de acordo com a lei n.º 7.802, de 12 de julho de 1989 (BRASIL, 1989) e o decreto n.º 4.074 de 04 de janeiro de 2002 que regulamenta esta lei (BRASIL, 2002) agrotóxicos são os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas, também de ambientes urbanos, hídricos e industriais cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

Os inseticidas naturais foram utilizados mundialmente até a década de 40, quando os produtos sintéticos passaram a ganhar espaço a partir da II Guerra Mundial, devido à necessidade de aumento da produção de alimentos com baixo custo (VIEGAS JR, 2003). Por outro lado, se no início a ideia do uso de inseticidas químicos parecia interessante do ponto de vista econômico, a sua ampla toxicidade tornou-se um problema. Devido à baixa seletividade

desses compostos, insetos não pragas estão suscetíveis aos seus efeitos além de um aumento do acúmulo de xenobióticos em ecossistemas. Um procedimento racional é o controle seletivo, que deve ter como alvo uma particularidade fisiológica do inseto alvo, de preferência não encontrada em plantas e mamíferos hospedeiros. Os componentes bioquímicos ou vias bioquímicas que são únicos em insetos são considerados bons alvos para isso.

A grande maioria dos inseticidas afeta de alguma forma um dos cinco sistemas biológicos em insetos. Sendo estes o sistema endócrino, produção de energia, sistema nervoso, a reciclagem de cutícula e o regulação hídrica (VALLES e KOEHLER, 2011). O sistema nervoso é sem dúvida o mais importante, podendo levar a alterações do comportamento, tais como padrões de alimentação (NICOLAUS e LEE, 1999), forrageamento (GUEZ *et al.*, 2005), reprodução (DELPUECH *et al.*, 2005), migração e termorregulação (GRUE *et al.*, 1997), entre outros. Dessa forma, as moléculas alvos mais comuns dos inseticidas neurotóxicos são os canais de sódio, os receptores GABA, as enzimas colinesterases, os receptores nicotínicos de acetilcolina, os receptores de glutamato e os receptores de octopamina (RAYMOND-DELPECH *et al.*, 2005).

Os inseticidas são considerados extremamente relevantes no modelo de desenvolvimento da agricultura no País. Desde 2008 o Brasil é o país que mais consome inseticidas no mundo e só em 2010, utilizou mais de 800 milhões de litros em suas lavouras. Nesse sentido, o Brasil tem se destacado como o maior mercado de agrotóxicos no mundo, ultrapassando os Estados Unidos com um total aproximado de R\$ 17 bilhões de reais comercializados, somente em 2011 (SINDAG, 2011). Em oito anos, a quantidade utilizada por área plantada no Brasil é mais do que o dobrou, passando de 70 kg por hectare em 1992 para mais de 150 kg por hectare em 2010, segundo o relatório de Indicadores do Desenvolvimento Sustentável (BRASIL, 2012), do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012). O Mato Grosso, estado que mais consome sozinho, utilizou 113



milhões de litros. Em outubro de 2013, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançou o resultado do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (Para). O levantamento mostrou que 36% das amostras de alimentos analisadas em 2011 e 29% das realizadas em 2012 tiveram presença elevada de agrotóxico. Além disso, 30% apresentaram índices abaixo do permitido, mas que também pode ser nocivo à saúde.

### **1.2.1. Atividade inseticida de compostos vegetais**

As propriedades inseticidas de um número de plantas têm sido investigadas há milhares de anos e algumas plantas podem substituir muitos meios sintéticos de controle biológico. A este respeito, é importante ressaltar que os agentes naturais são ambientalmente menos nocivos do que os pesticidas sintéticos. Além disso, eles podem atuar em muitos insetos de diferentes maneiras (SUJATHA, 2010).

Inseticidas e repelentes comerciais com menor toxicidade em mamíferos e menos agressivo ao meio ambiente são desejáveis e novas pesquisas estão em busca de novos biopesticidas. Cerca de 2000 espécies de plantas representando mais de 170 famílias são referidas como tendo propriedades inseticidas (KAMARAJ *et al.*, 2008). Tem sido relatado que compostos derivados de plantas podem representar toxicidade para uma vasta gama de insetos (RAVI *et al.*, 2007). De acordo com MIYAZAWA *et al.*, (1994), substâncias extraídas de plantas pode interferir diretamente com todas as etapas de desenvolvimento dos insetos. Flavonóides, saponinas, terpenos, alcalóides e esteróides são importantes quando se considera a atividade inseticida de extratos vegetais (BÉLO *et al.*, 2009). Neste contexto, o conhecimento prévio sobre os efeitos de agentes químicos presentes na *Prasiola crispera* ajudaram a melhorar a avaliação dos impactos ambientais causados por inseticidas e repelentes (BERRY *et al.*, 2008).

Do ponto de vista biológico, a coevolução entre as plantas e os insetos é reconhecida (RYAN E BYRN, 1988) e pode explicar a seleção de um amplo espectro de metabólitos secundários usados como defesa (BOWN *et al.*, 2006). Atualmente, a maior motivação para se promover estudos para a determinação da atividade inseticida de compostos botânicos é o baixo impacto ao meio ambiente associado a um custo ecológico mínimo e certamente, a demanda crescente por produtos saudáveis e atóxicos para os humanos e animais. Até o momento, podem-se citar vários exemplos de sucesso na literatura, de compostos vegetais que efetivamente demonstram atividade inseticida. Por exemplo, ADLER *et al.*, (1987) utilizaram uma formulação a base de extratos de sementes de “nim”, verificando a sua atividade repelente, inseticida e inibidora do crescimento contra *Blattella germânica* e *Periplaneta americana*, duas espécies de baratas comuns em ambientes urbanos. EL-NAGGAR *et al.*; (1989), investigaram os efeitos de extratos de *Citrullus colocynthis* sobre diversos insetos praga incluindo as espécies de baratas *Blattella germânica* e *Periplaneta americana*, verificando o seu potencial inseticida. GUARDIOLA *et al.*; (1990) estudaram os efeitos de compostos isolados de *Schinus mole*, identificando o “timol” como o composto com maior eficiência na atividade repelente e inseticida. Outras plantas como *Citrus sinensis*, *Laurus nobilis*, *Lonicera tatarica*, *Sorbus aucuparia*, *Lantana camara*, *Pteridieum aquilinum*, *Cestrum aurantiacum*, *Fagus sylvatica*, *Dryopteris filixmas*, *Quercus petrea* dentre outras, também já foram investigadas com essa finalidade e tiveram seus efeitos comprovados.

GALLO *et al.*, (1996); PRABHAKARAM e KAMBLE (1996), avaliaram a toxicidade da azadiractina para o controle de populações resistentes de *B. germânica* a inseticidas, comprovando a sua eficácia. Glicosinolatos foram isolados de *Crambe abyssinica* e demonstram a sua eficácia no controle de *Musca domestica*, *Aedes aegypti*, *Tribolium castaneum*, *Oryzeaphylum surinamensis*, *Diabrotica virgifera* e *B. germânica* (TSAO *et al.*, 1998). Se por um lado observa-se um grande número de trabalhos associados ao estudo da

atividade inseticida de compostos vegetais, por outro não se identifica nos mesmos resultados a elucidação do mecanismo de ação responsável pela atividade inseticida.

Atualmente, vários estudos têm sido conduzidos na busca por novos compostos naturais para aplicação biotecnológica. Partes destas pesquisas buscam atuar na cura e prevenção de uma série de doenças assim como encontrar compostos com atividades citotóxicas. (PEREIRA *et al.*, 2009; SUDATTI *et al.*, 2009; BASTIANETTO e QUIRION, 2002; ÁVILA *et al.*, 2008; WAGNER *et al.*, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2007).

Do ponto de vista biotecnológico, a demonstração do efeito neurotóxico associado ao extrato de *Prasiola crista* em baratas, colocará em evidência a sua aplicabilidade e dos seus compostos químicos isolados, como agentes inseticidas naturais. Esse aspecto vem ao encontro das demandas atuais globais por compostos de baixo impacto ecológico e poder residual. Também, devido às similaridades entre os componentes celulares e neuroquímicos dos insetos comparados aos outros animais vertebrados, permitirá vislumbrar o desenvolvimento futuro de moléculas protótipo para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

A elucidação do mecanismo celular e bioquímico envolvido na atividade inseticida induzida por extratos vegetais, bem como a identificação química dos compostos inseticidas, vai ainda ao encontro da Portaria 318 de 27 de Dezembro de 2006 do Ministério da Defesa que estimula a investigação de assuntos relacionados ao Continente Antártico. Nesse aspecto, atende ainda a portaria 1.116 de 07 de julho de 2005, que institui a Política Nacional de Atenção ao Portador de Doença Neurológica, que estimula estudos como o que tem sido proposto, para a investigação de compostos com notória atividade sobre o sistema nervoso

com potencial para o desenvolvimento de moléculas para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Inseticidas químicos utilizados para o controle de insetos são especialmente perigosos em áreas urbanas uma vez que estes produtos podem afetar o homem e outros animais, poluir o ar, água e até mesmo entrar na cadeia alimentar. Então, juntamente com o aparecimento de insetos resistentes e outros efeitos colaterais negativos, a busca de formas alternativas de controle tornou-se importante (MENDONÇA *et al.*, 2011).

### **1.2.2. Interações químicas com macroalgas**

Organismos adaptados a ambientes extremos como a Antártica tendem a apresentar uma constituição única em termos de metabólitos secundários. Neste contexto, plantas oriundas desses ambientes, são fontes exclusivas de compostos com potencial biotecnológico (BRAVO *et al.*, 2001).

Plantas evoluíram e se adaptaram a diferentes condições ambientais e seus metabólitos secundários parecem desempenhar papel essencial nesse processo (MATTOS, 1988) (Tabela 1). Os organismos que vivem em regiões polares são expostos às condições ambientais mais extremas do planeta, este fato levou ao desenvolvimento de estratégias naturais que os permitem sobreviver nas condições mais adversas da terra (PEREIRA *et al.*, 2009). Dentre estas estratégias de adaptação estão à produção de fotoprotetores, como micosporinas, aminoácidos, citoneminas secretada por cianobactérias e flavonóides secretados pelas plantas (PEREIRA *et al.*, 2009; MOSTAERT *et al.*, 2006). Este fato demonstra a relevância de um estudo mais profundo sobre os efeitos biológicos desta alga, que pode apresentar em sua constituição uma combinação de compostos químicos que, normalmente, não são encontrados em nenhum outro organismo.

O papel dos metabólicos secundários ou produtos naturais é abordado em diversas revisões (HAY, 1996; PEREIRA, 1993; PAUL e PUGLISI, 2004) em capítulos de livros (HAY, 1991; HAY e STEINBERG, 1992; PEREIRA, 2004) ou mesmo em livros inteiros dedicados a este tema (PAUL e VAN ALSTYNE, 1992; MC CLINTOK e BAKER, 2001). Apesar da atuação de metabólicos de macroalgas ser frequentemente associada à defesa química frente a consumidores, são escassos os estudos objetivando a análise da composição química e do mecanismo de ação relacionado à atividade repelente/inseticida. Por exemplo, em espécies de macroalgas verdes (*Chlorophyta*), metabólicos como sesquiterpenos e diterpenos estão fortemente representados, principalmente em espécies tropicais. Nesses metabólicos, possivelmente o enol-acetato e o aldeído são os grupos funcionais bioativos mais comuns (PAUL e FENICAL, 1987; HAY e FENICAL, 1988). Tais metabolitos têm ação tóxica ou defensiva contra fungos, bactérias, ouriços-do-mar (larvas, ovos fertilizados e esperma), peixes herbívoros e juvenis do gastrópode *Strombus costatus* (PAUL, 1997; PAUL e FENICAL, 1986, 1987). Os gêneros *Caulerpa* (PAUL e FENICAL, 1987) e *Halimeda* (PAUL e VAN ALSTYNE, 1992) são os mais estudados até o momento, destacando-se quanto à produção de metabólicos que atuam como defesas químicas contra diversos herbívoros. O halimedatrial, um sesquiterpeno comumente encontrado em espécies de *Halimeda*, constitui uma defesa química efetiva contra herbívoros e se sobressai aos demais devido a sua alta concentração que pode representar 5% do peso seco de macroalgas deste gênero (PAUL e VAN ALSTYNE, 1992).

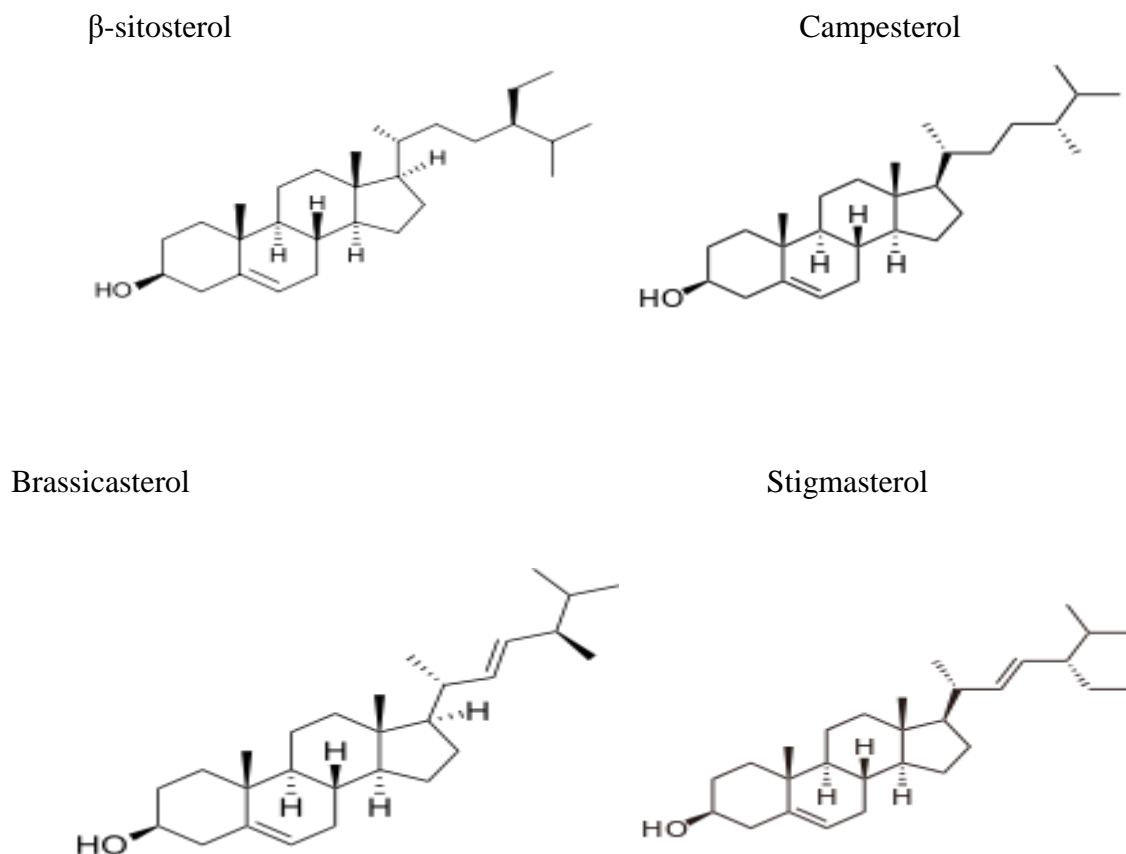
**TABELA 1. Plantas com propriedades inseticidas, princípios ativos e classes químicas.**

<b>PLANTAS</b>	<b>PRINCÍPIOS ATIVOS</b>	<b>CLASSE QUÍMICA</b>	<b>AUTORES</b>
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nicotina Normonicotina	Alcalóides nicotínicos	(WIESBROOK, 2004)
<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>	Piretrina I - II	Piretróides	(VIJVERBERG e BERKEN, 1990)
<i>Derris spp.</i>	Rotenona	Rotenóides	(LIMA, 1987)
<i>Quassia amara</i>	Quassina	Quassinóides	(RODRÍGUEZ e VENDRAMIM, 1995)
<i>Stemona japonica</i>	Estemofolina	Alcalóides	(ISLAM <i>et al.</i> , 2010)
<i>Azadirachta indica</i>	Azadirachtina	Limonóides	(ROEL <i>et al.</i> , 2000)
<i>Cymbopogon nardus</i>	Citronelal	Terpenóides	(SHASANY <i>et al.</i> , 2000)

### 1.2.3. Fitoesteróides em extratos vegetais

Os fitoesteróides tem uma ocorrência abundante em vegetais inclusive nas espécies marinhas (CLIFTON, 2002), compreendendo uma grande classe de compostos encontrados em diversas partes das plantas sendo, no reino vegetal, o equivalente ao colesterol entre os mamíferos. A semelhança destes não se deve somente aos seus aspectos estruturais, mas também ao fato destes compostos químicos exercerm nas plantas funções básicas similares às desempenhadas pelo colesterol em células animais. Podendo ser encontrados em alimentos ricos em lipídios como nozes, amendoim, frutas e grãos (BRUFAUL *et al.*, 2008). O óleo de soja contém 327mg de fitoesteróis em 100 gramas de óleo. Os fitoesteróides correspondem a 30-60% da matéria insaponificável desse óleo, sendo o  $\beta$ -sitosterol, o composto presente em maior abundância representando 50-80% do conteúdo do óleo (ITO, 2007).

HICKS (2002) cita que, atualmente, há mais de 200 tipos de esteróides identificados. Por serem comumente encontrados nas frações menos polares de extratos vegetais, nos últimos anos, dos artigos publicados na revista Química Nova que abordavam constituintes químicos em plantas, 59,5% relatou a presença de esteróides em seus extratos dos quais 40,5% identificaram o  $\beta$ -sitosterol e 26,6% identificaram uma mistura binária comum de  $\beta$ -sitosterol e stigmasterol, enquanto que 22,8% também relataram a presença de esteróides na forma glicosilada. Os fitoesteróis mais encontrados em compostos vegetais são:  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, campesterol e brassicasterol (Fig. 03) (LAW, 2000). Apesar de serem comuns e abundantes nas plantas não são menos importantes.



**Figura 03** - Representação da estereoquímica dos principais fitoesteróides.

Fonte: <http://translate.google.com.br/translate?hl=ptBR&sl=en&u=http://en.wikipedia.org/wiki/Phytosterol&prev=search>. Acesso em 04 de dezembro de 2014.

### 1.3. O sistema nervoso de insetos.

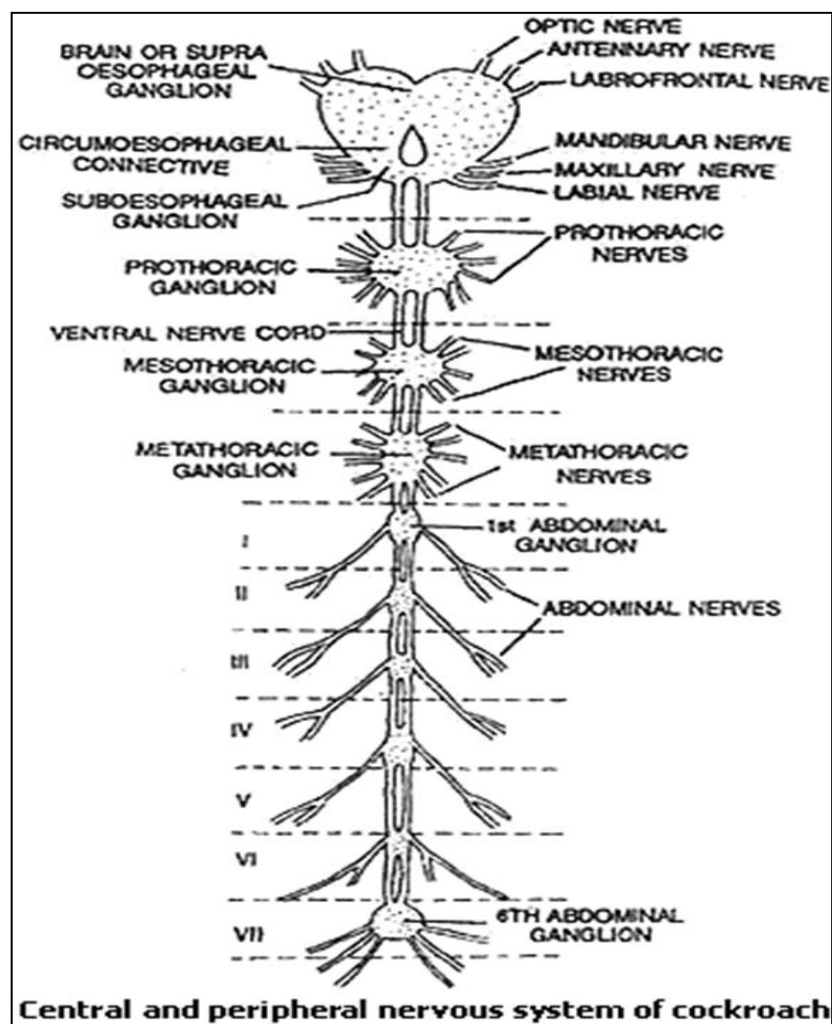
A perfeita sintonia da ação dos insetos com o ambiente em que vivem é fundamental para sua sobrevivência. Para que responda e reajam de maneira eficiente, o sistema nervoso deve integrar tanto os estímulos externos como os internos. Para isso, células especializadas (neurônios) realizam essa função através da condução dos estímulos (GALLO, 2002). Assim como ocorrem com outros animais, o neurônio dos insetos transmite os estímulos recebidos através de impulsos físicos e químicos. Para que isso ocorra a membrana de seu axônio, quando em repouso, possui uma polaridade, ao receber um estímulo, ocorre uma inversão dessa polaridade graças ao potencial de ação, que percorre toda a extremidade do axônio até chegar aos dendritos. Nessa região, há uma lacuna em relação ao neurônio seguinte, a região sináptica, o que obriga a transformação desse estímulo físico em químico, via neurotransmissor. Essa substância química percorre o espaço entre o neurônio e ao chegar à célula nervosa seguinte, desencadeia um novo estímulo físico.

Os corpos celulares dos interneurônios e neurônios motores são agregados com as fibras que interligam todos os tipos de células nervosas formando centros nervosos chamados gânglios (Fig. 5) (GULLAN e CRANSTON, 2005). Tipicamente, cada segmento do corpo dos insetos possui um par de gânglios ligados por comissuras e unidos aos gânglios dos segmentos adjacentes por conectivos (Fig. 4) (RANDALL *et al.*, 2000; GALLO *et al.*, 2002). Os gânglios de todos os segmentos da cabeça são fundidos formando dois centros ganglionares, o cérebro ou gânglio supraesofágico e o gânglio subesofágico (Fig. 4) (GULLAN e CRANSTON, 2005). Nenhum dos gânglios contém um centro absolutamente vital, razão pela qual um inseto decapitado ainda pode caminhar (OSBOURE, 1996). Evidências experimentais demonstram que a acetilcolina, a dopamina, a octopamina, a 5-hidroxitriptamina e a histamina são os principais neurotransmissores do sistema nervoso



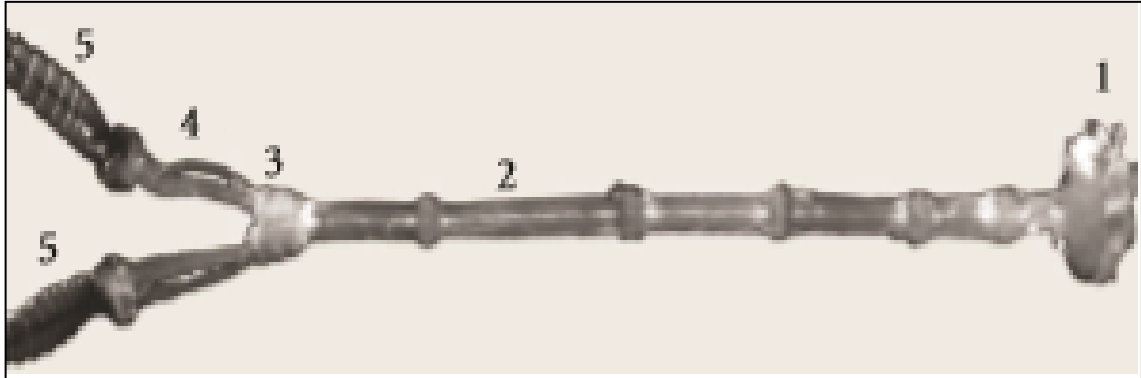
ganglionar e central dos insetos. Por outro lado, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório da junção neuromuscular de insetos, e o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) o neurotransmissor inibitório nessa sinapse periférica (TAYLOR *et al.*, 1979; OSBOURE, 1996).

O sistema nervoso periférico é composto por todos os axônios dos neurônios motores que irradiam para os músculos dos gânglios do SNC e sistema nervoso estomodeal mais os neurônios sensoriais das estruturas sensitivas cuticulares (os órgãos dos sentidos) que recebem estímulos mecânicos, químicos, térmicos e visuais do ambiente (GULLAN e CRANSTON, 2005).



**Figura 04** - Sistema nervoso de baratas. Arranjo de gânglios formando o cordão nervoso ventral composto, em baratas, pelo gânglio supraesofágico, o gânglio subesofágico, três gânglios torácicos e

seisabdominais. **Fonte:** [http://www.2classnotes.com/digital\\_notes.asp?p=Excretion\\_in\\_Cockroach\\_and\\_Nervous\\_System\\_of\\_Cockroach](http://www.2classnotes.com/digital_notes.asp?p=Excretion_in_Cockroach_and_Nervous_System_of_Cockroach). Acesso em 14 de janeiro 2015.



**Figura 05** - Cordão nervoso ventral de uma barata. O Sistema Nervoso de insetos é formado por um cordão nervoso ventral organizado em gânglios (Fonte: Journal of Toxicology Volume 2012, Article ID 143740, 11 pages doi:10.1155/2012/143740)

### 1.3.1. Baratas como modelo para bioensaios de toxicologia

Baratas, como insetos em geral, são mais ou menos alongadas e possuem formato cilíndrico sendo bilateralmente simétrico. O corpo é dividido numa série de segmentos, os metâmeros, e estes são agrupados em três regiões distintas: cabeça, tórax e abdome (Fig. 06). A cavidade corporal, também chamada de hemocele, é preenchida pelo fluido hemolinfa, e é revestida pela endoderme e ectoderme. Os órgãos e tecidos são compostos de camadas únicas de células separadas da hemolinfa por membranas finas de tecido conjuntivo (GULLAN e CRANSTON, 2005).

As baratas *Nauphoeta cinerea* (Fig. 07) são insetos-praga primitivos nos quais a maioria dos sistemas fisiológicos é carente de especialização. Se por um lado, a falta de especialização pode ser um entrave para a comparação com alguns sistemas biológicos animais, do ponto de vista da neurotoxicologia torna-se um importante instrumento na

investigação do mecanismo de ação de compostos químicos com atividade tóxica sobre o sistema nervoso (STANKIEWICZ *et al.*, 2012).

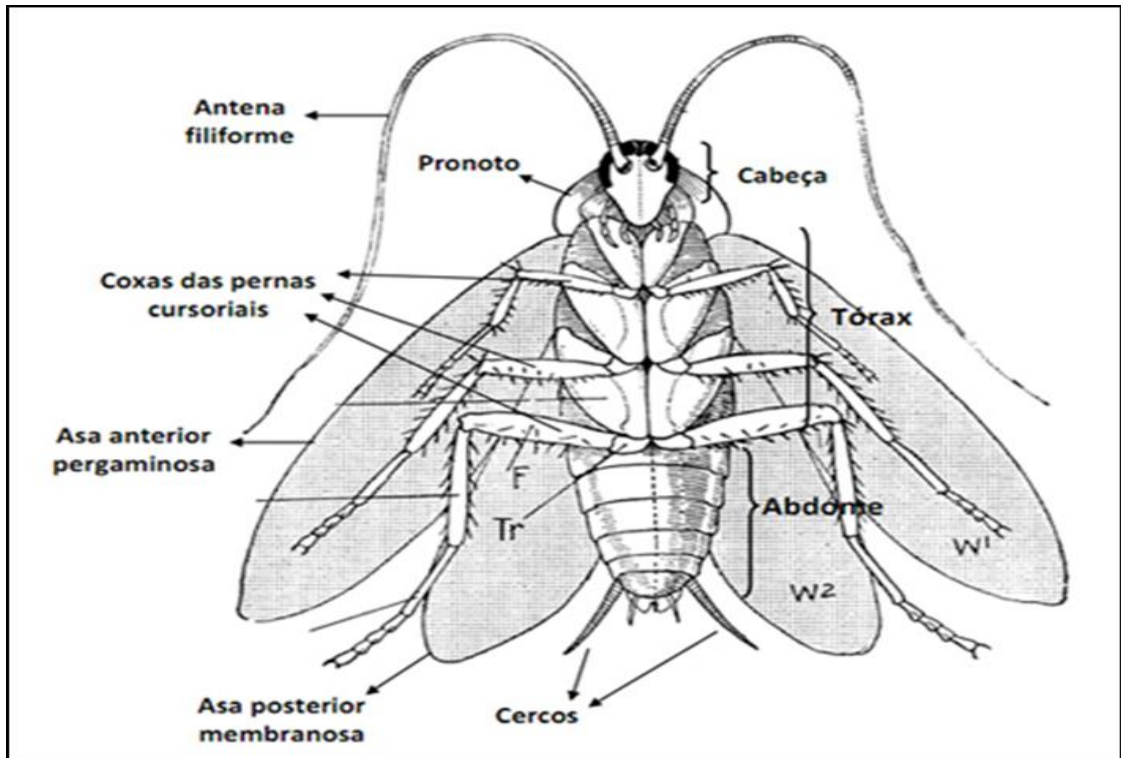
Por exemplo, já foram identificados mais de 200 neurotransmissores e seus respectivos receptores no sistema nervoso de baratas, que são idênticos aos de outros insetos superiores, e apresentam grande homologia em sua estrutura molecular, aos de animais vertebrados, dentre eles os seres humanos. Nesse aspecto, a junção neuromuscular da barata se vale do neurotransmissor glutamato, muito comum no sistema nervoso de mamíferos, por produzir contração muscular pela ativação dos receptores de n-metil-d-aspartato (NMDA).

Além do glutamato, a junção neuromuscular de insetos se vale do neurotransmissor ácido-gama aminobutírico (GABA), do qual receptores não estão confinados apenas na região da junção neuromuscular, mas parecem estar espalhados por toda a fibra muscular (CULL-CANDY e MILEDI, 1981). O papel fisiológico dos receptores de GABA em insetos envolve a abertura de canais de cloreto. Tanto na junção neuromuscular quanto no sistema nervoso central, os receptores de GABA parecem estar envolvidos na sincronização de respostas excitatórias. 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 do estudo de várias partes do sistema nervoso de baratas, muitas delas sendo investigadas em modelos naturais *in vivo*, *in situ* ou mesmo *in vitro*. Além disso, no caso dos bioinsetidas, 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 evidenciação do grau de seletividade (STANKIEWICZ *et al.*, 2012).

Como exemplos, podemos citar os piretróides naturais e sintéticos, que atuam por causar uma ativação persistente dos canais de sódio na junção neuromuscular, induzindo uma despolarização persistente das membranas, letal para o inseto (SODERLUND, 2012). As toxinas de venenos animais preferem a ligação ao sistema nervoso central do inseto, levando a um aumento na liberação do neurotransmissor dopamina, induzindo efeitos como letargia e diminuição da locomoção (WEISEL-EICHLER *et al.*, 1999). Além desses mecanismos celulares, também tem sido descritos aspectos bioquímicos, na intoxicação induzida por agentes inseticidas naturais (BULLANGPOTI *et al.*, 2006). Dentre os alvos biológicos inerentes a essa atividade, destacam-se as enzimas colinesterases que em baratas, perfazem mais de oito subtipos (HAUBRUDGE *et al.*, 2002). Essas enzimas são os principais alvos dos compostos organofosforados sintéticos. Por fim e em paralelo às interações com a(s) enzima(s) colinesterase(s) também tem sido descritos outros aspectos bioquímicos relacionados a um aumento do estresse oxidativo, associados à atividade letal de compostos inseticidas em insetos (JAMES *et al.*, 2012).

Confirmando dados da literatura que a barata é reconhecida como um modelo muito útil em estudos neurobiológico (HUBER *et al.*, 1990). O campo de toxínologia deve muito ao uso de várias preparações nervosas obtidas a partir de baratas que representam um excelente modelo aplicado em métodos farmacológicos, especialmente em eletrofisiologia, que desempenha um papel vital na maior parte da atividade de pesquisa em toxínologia. Uma ampla gama de funções nervosas foi descritos com base em estudos em diversas partes do sistema nervoso barata e as experiências podem ser realizadas em modelos naturais. Princípios biofísicos da função do sistema nervoso em insetos são da mesma forma como nos mamíferos. Em ambos os grupos de animais neurotransmissores semelhantes podem ser encontrados, embora a sua distribuição varie. Assim, as observações feitas em baratas podem ser aplicadas quase que nos vertebrados.



**Figura 06** - Estrutura geral de uma barata. (Fonte: <http://biology.stackexchange.com/questions/19766/how-many-abdominal-sclerites-would-be-there-in-a-cockroach>. Acesso 14 de janeiro 2015.



**Figura 07** - Barata *Nauphoeta cinerea*. Fonte: (<http://g1.globo.com/natureza/noticia/2012/11/pesquisadores-brasileiros-estudam-enzimas-de-baratas-para-obter-etanol.html>). Acesso em 01 de dezembro de 2014.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O trabalho “Caracterização fitoquímica e neurofarmacológica de compostos inseticidas isolados de *Prasiola crispera*” teve como objetivo investigar os mecanismos envolvidos na atividade inseticida do extrato bruto da alga *Prasiola crispera* em modelo de barata da espécie *Nauphoeta cinerea* bem como identificar os compostos bioativos relacionados a essa atividade.

### 2.2. Objetivos Específicos

- ❖ Verificar se o extrato bruto de *Prasiola crispera* induz atividade entomotóxica em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*;
- ❖ Verificar se o extrato bruto de *Prasiola crispera* induz atividade sobre a enzima colinesterase de homogenizado de cérebro de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*;
- ❖ Investigar a atividade do extrato bruto de *Prasiola crispera* sobre o sistema cardiovascular de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*;
- ❖ Investigar a atividade do extrato bruto de *Prasiola crispera* sobre o sistema nervoso periférico de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* usando a preparação nervo-músculo coxal abductor metatorácico *in vivo*;
- ❖ Investigar a atividade do extrato bruto de *Prasiola crispera* sobre o sistema nervoso central de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* por meio da técnica para medida do tempo de *grooming*;

- ❖ Identificar por meio de protocolos fitoquímicos e de análise bioguiada os compostos bioativos associados à atividade entomotóxica.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Baratas de ambos os sexos da espécie *Nauphoeta cinerea*. Os animais foram criados e mantidos em insetário no Campus São Gabriel da UNIPAMPA, em temperatura controlada (22-25°C) com oferta de água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente controlada (22-25°C).

#### **3.2. Reagentes**

Todos os reagentes foram obtidos de empresas certificadas como: Sigma Aldrich, Biorad, Alomone, Tocris dentre outras e foram de alto grau de pureza.

##### **3.2.1. Drogas usadas**

Bicuculina, Cloral hidratado, Glutamato, DNQX, Fentolamina e DMSO (Sigma Aldrich, Biorad, Alomone e Tocris).

##### **3.2.2. Solução salina**

Composição: NaCl (150mM), CaCl<sub>2</sub> (2mM), KCl (10mM), Tris-HCL (10mM). O pH da solução salina foi ajustado para 6,8 com NaOH. As soluções teste foram preparadas imediatamente antes do início de cada experimento.

#### **3.3. Coleta do material vegetal**

A alga verde *Prasiola crispa* foi coletada em áreas de degelo, próximas da região da estação Arctowski Polonesa, Baía do Almirantado, Ilha Rei George (61° 50' - 62°15' S e 57°30' - 59° 00'W), na Antártida pelo Dr. Antônio Batista Pereira da Universidade Federal do



Pampa-UNIPAMPA. O material vegetal foi seco em câmara escura com circulação de ar a 40°C, e armazenadas em sacos plásticos escuros em freezer a -20°C.

### **3.4. Preparação do Extrato**

Adicionou-se 1litro de solvente n-hexano ao material vegetal seco e em pó cerca de 100 gramas de *Prasiola crispa* (proporção pó/solvente = 1:10). O material vegetal moído foi submetido ao processo de maceração por 48h em 1L de solvente, após a amostra foi filtrada através de papel de filtro Whatman número 1. Em seguida o solvente foi evaporado em evaporador rotatório a 40-50°C e o extrato foi submetido a vácuo para a retirada do excesso de solvente e após armazenado em tubo de ensaio com tampa de rosca para os ensaios de atividade biológica.

### **3.5. Dissolução do extrato hexânico da alga *Prasiola crispa***

A *Prasiola crispa* foi dissolvida em Sulfóxido de dimetilo DMSO 10% sendo preparado diariamente e previamente aos ensaios de atividade biológica.

### **3.6. Determinação da DL<sub>50</sub>**

O ensaio inseticida sobre *Nauphoeta cinerea*, foi realizado essencialmente como descrito por KAGABU *et al.*, (2007). Várias concentrações do extrato hexânico de *Prasiola crispa* 100, 200, 400, 800µg/g de animal e DMSO 10µg/g de animal, foram injetadas entre o terceiro e o quarto segmento abdominal de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. Todos os experimentos foram feitos em triplicata (n=10). Trinta baratas ao todo foram utilizadas para testar cada dose. Os insetos foram mantidos a temperatura controlada entre 22-25°C durante 24 horas após o tratamento. A dose mínima em que 50% de baratas consideradas mortas foi tomada como sendo a dose letal - DL<sub>50</sub>, baratas paralisadas também foram contabilizadas como mortas.

### **3.7. Análise Bioquímica**

#### **3.7.1. Determinação da atividade da enzima colinesterase**

A inibição *in vitro* da AChE foi avaliada essencialmente de acordo com os ensaios descritos por STURMER *et al.*, (2014). Toda a quantidade de proteína foi medida de acordo com BRADFORD (1976). Em resumo, cinco baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* foram injetadas com o Controle DMSO 10µg/g de animal e o extrato hexânico de *Prasiola crispa* (100, 200, 400, 800µg/g de animal seis horas antes da análise da acetilcolinesterase. Os animais foram anestesiados por resfriamento a -5°C e os seus cérebros recolhidos após a remoção da cutícula. O material foi misturado com 750µl de Kpi tampão de pH 7,0 (500rpm/5min/4°C) onde 400µl do sobrenadante foi recolhido. Utilizou-se o sobrenadante desta amostra 50µl onde foi adicionado a 50µl de DTNB (5mM), 500µl Kpi 0,1mM (pH 8,0) e 25µl acetiltiocolina. A reação foi medida após 60 segundos a 412nm usando um espectrofotômetro UV-Visível (modelo de evolução 60S, Thermoscientific, New Hampshire, EUA) e analisada pelo software Lite Visão (Thermoscientific).

### **3.8. Ensaio Biológicos**

#### **3.8.1. Preparação coração semi-isolado**

A preparação coração semi-isolado de baratas (BAUMANN *et al.*, 1982) foi utilizada para avaliar os efeitos farmacológicos induzidos pelo HPC no sistema cardiovascular de baratas. As baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* foram anestesiadas por congelamento a -5°C durante 5-10min e imobilizadas em placas de dissecação recoberta com isopor por meio de alfinetes entomológicos com o lado ventral voltado para cima. As laterais do abdômen foram cortadas com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e uma pinça, removendo a cutícula abdominal, expondo assim as vísceras que foram cuidadosamente afastadas para que o

coração fosse exposto. O coração foi banhado com solução salina (NaCl 150mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, KCl 10mM e Tris 10mM, pH 6,8 ajustado com NaOH) em temperatura ambiente. Após os 5min iniciais para a estabilização da frequência cardíaca, as diferentes concentrações do HPC 100, 200, 400, 800µg/g de animal foram adicionadas sobre o coração, em um volume de 150µl/animal. A frequência cardíaca foi monitorada durante 30min com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus, Damstat, Alemanha). Após esse período, a preparação foi lavada com solução salina e monitorada por mais 5min para verificar se houve recuperação da frequência cardíaca. A temperatura na sala do teste foi mantida a 22-25°C. Para cada dose testada do controle DMSO e do HPC foram usados seis animais (n=6).

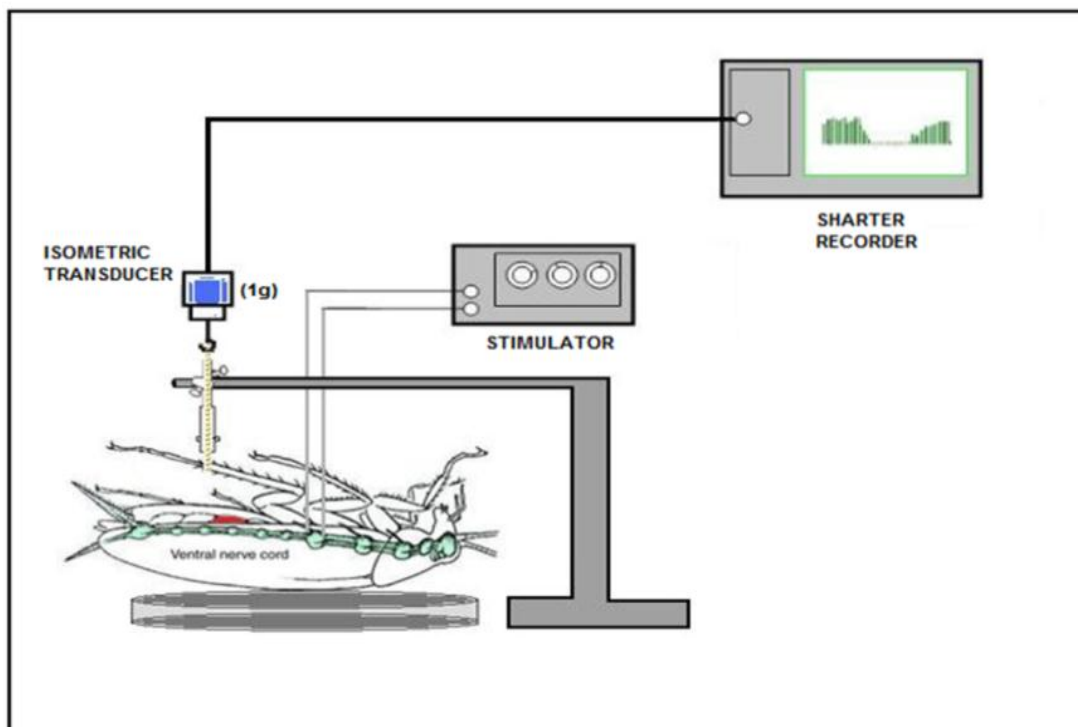
### **3.8.2. Ensaio eletromiográfico**

#### **3.8.2.1. Preparação *in vivo* músculo coxal-abdutor metatorácico de barata**

Para os ensaios de atividade biológica foi usado a preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* de acordo com O'GARA *et al.*, (1990), adaptado para condições experimentais (LUCHO *et al.*, 2010) (Fig. 08). Os animais de ambos os sexos foram anestesiados por congelamento a -5°C durante 5-10min. Após a anestesia, os indivíduos foram acomodados em decúbito dorsal, em uma placa de dissecação recoberta com isopor. Após a afiação do animal por meio de alfinetes entomológicos, foi feita a dissecação da quitina da região metatorácica que compreende o último par de pernas, para a exposição do nervo 05.

Nessa região foi inserido um par de eletrodos de Ag/AgCl em forma de alfinetes, pelos quais foram aplicados os estímulos elétricos. Foi usado um estimulador elétrico da marca AVS (AVS Projetos, São Carlos-SP), que transmitiu estímulos de baixa frequência 0.5Hz, 0.2ms. A perna do animal foi amarrada com linha de sutura odontológica, sendo conectada a um transdutor isométrico de alta sensibilidade 0.5g da marca AVS. O transdutor foi conectado

a um amplificador de sinal (AVS) que por sua vez está acoplado a uma placa A/D de interface com o computador (Dell Vostro, São Paulo-SP). Os registros da força de contração muscular em resposta aos estímulos elétricos foram feitos pelo software de aquisição de dados AQCAD (AVS), que também permitiu o armazenamento dos dados para posterior análise. Os registros neuromusculares foram feitos durante 15min para a verificação da integridade da preparação e após esse período, foram injetados os tratamentos por meio de uma seringa de Hamilton em um volume máximo de 40µl, na terceira porção abdominal da *N. cinerea*. Os registros foram adquiridos durante 120min, para a verificação fidedigna da cinética de ação dos compostos ensaiados. Após o término dos experimentos, os dados foram analisados usando-se o software ANCAD (AVS), que permitiu a análise de parâmetros como a amplitude da força de contração neuromuscular, o tempo para bloqueio neuromuscular e o tempo de decaimento constante de cada contração da barata. Os dados foram plotados como média  $\pm$  erro padrão de no mínimo seis experimentos (n=6).



**Figura 08** - Instalação para registros da atividade neuromuscular da barata *in vivo*. Modifica do Dempster (1985).

### 3.8.3. Atividade de *Grooming*

A atividade de *grooming* foi avaliada essencialmente como descrita por LIBERSAT (2003). Para isso, a barata *Nauphoeta cinerea* foi injetada na terceira porção abdominal, utilizando-se uma seringa Hamilton no volume máximo de 20 $\mu$ L, com a droga testada e acondicionada em uma arena comportamental o Open Field - caixa circular de 20cm de raio e 30cm de altura (Fig. 09). O comportamento de limpeza das baratas foi monitorado após 10min de tratamento e o tempo contínuo em segundos de *grooming* foi medido durante um período de 30min. Os animais nunca haviam estado no Open Field anteriormente e, portanto, era um ambiente novo em todos os casos. Os animais foram injetados com DMSO 10 $\mu$ g/g de animal e com diferentes concentrações do HPC 100, 200, 400, 800 $\mu$ g/g de animal. Para cada dose testada foi usado 20 animais (n=20). A temperatura na sala do teste foi mantida a 22-25°C.



**Figura 09** - Teste do campo aberto (Open Field) metodologia utilizada para a avaliação de drogas sobre o sistema nervoso central. Técnica de *Grooming*. Fonte: <http://www.neplame.univasf.edu.br/sistema-nervoso-central.html>. Acesso em 01 de dezembro de 2014.

### 3.9. Análise fitoquímica do extrato hexânico de *Prasiola crispa*

Para o preparo de colunas cromatográficas clássicas que foram feitas em cromatoplasmas de gel de sílica 60F234 Merck. Os solventes empregados nas análises cromatográficas foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. A reutilização desses solventes, quando em mistura e para a mesma coluna, foi realizada após correção das proporções das misturas usando refratômetro modelo Biobrix. A revelação das cromatoplasmas foi feita através de inspeção a luz ultravioleta, nos comprimentos de onda em 254 e 365nm e através do borrifamento com solução de sulfato cérico a 2% e ácido sulfúrico, com subsequente aquecimento em placa aquecedora. Após a evaporação do solvente, uma amostra do extrato bruto 10mg foi enviada ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense, para a análise de RMN de Hidrogênio (<sup>1</sup>H) por meio do equipamento Varian-Unity Plus 300, operando a uma frequência de 300 MHz para análises de Hidrogênio, tendo tetrametilsilano como referenciador interno e o clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) como diluente da amostra do extrato bruto. Os valores de deslocamento químico, que representa a escala de pares por milhão (ppm). As áreas relativas dos sinais, nos espectros de RMN <sup>1</sup>H, foram obtidas por integração eletrônica.

A purificação dos compostos bioativos de *Prasiola crispa* foi feita em coluna cromatográfica em gel de sílica utilizando-se vários adsorventes. Foram coletas diferentes frações, que foram ensaiadas quanto à atividade biológica em modelo de preparação neuromuscular de baratas. Após a identificação da atividade biológica, o(s) pico(s) de interesse foi ressubmetido à análise por RMN para comprovação de sua pureza.

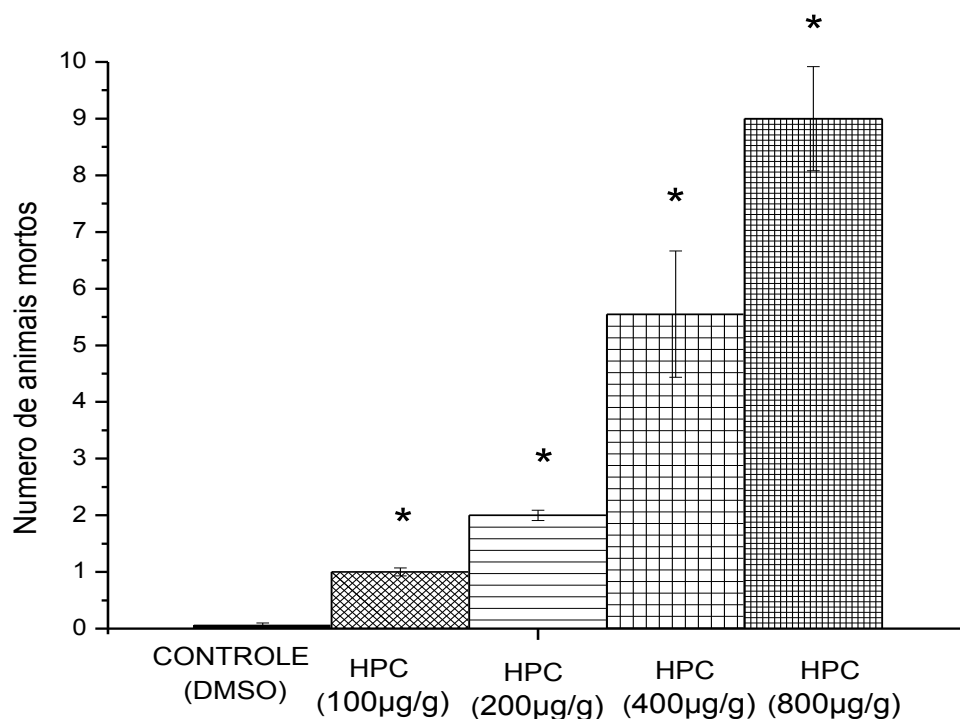
### **3.10. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  SEM e foram analisados pela análise de variância Two-Way ANOVA, seguido pelo teste "t" de Student. Um valor de  $p \leq 0,05$  indicou significância. As análises estatísticas e gráficas foram feitas usando o Software Origin Pro 8,6 (Origin Lab Corporation, MA, EUA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Determinação da $DL_{50}$ da *Prasiola crispa* em ensaios com *Nauphoeta cinerea*

Os ensaios de letalidade demonstraram que o extrato hexânico de *Prasiola crispa* (HPC) induz atividade entomotóxica. Nesse sentido, a dose do HPC que foi letal para 50% dos indivíduos foi considerada a dose letal mínima ( $DL_{50}$ ) em modelo de *Nauphoeta cinerea*, em 24 horas (Fig. 10). A administração do controle com DMSO 10 $\mu$ g/g de animal induziu mortalidade de apenas um animal. Na concentração do HPC 100 $\mu$ g/g de animal houve mortalidade de  $1\pm 0,06$  animais. Com a dose de 200 $\mu$ g/g de animal houve a mortalidade  $1\pm 0,09$  animais, e  $6\pm 1$  com a dose de 400 $\mu$ g/g de animal. Quando a maior dose foi administrada nos animais houve letalidade de  $9\pm 0,9$  animais em 24 horas. A dose de 400  $\mu$ g/g de animal foi considerada a  $DL_{50}$ .

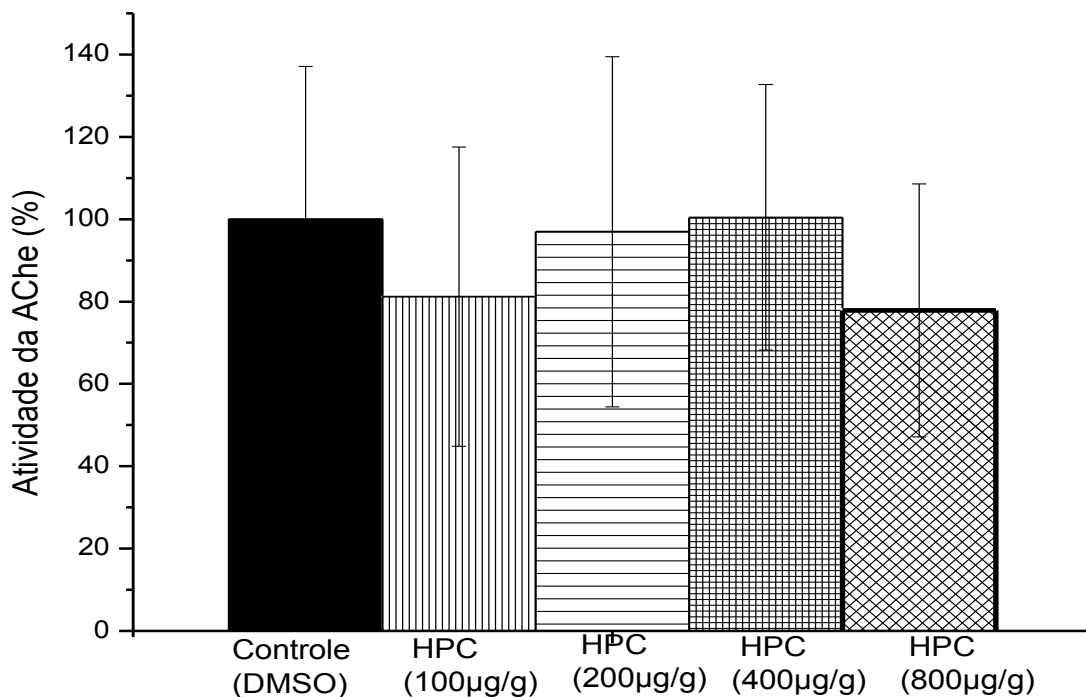


**Figura 10** - Determinação da  $DL_{50}$  em baratas (*Nauphoeta cinerea*) administradas com diferentes concentrações do HPC após 24 horas. Observe que a dose de HPC (400 $\mu$ g/g) induziu a morte de ~ 50% dos indivíduos em 24 horas, sendo essa considerada a Dose Letal Mínima ( $DL_{50}$ ). \* significância para (\*  $p \leq 0,05$ ).



#### 4.2. Efeito de diferentes doses do HPC sobre a atividade da AChE em homogenizado de cérebro de baratas

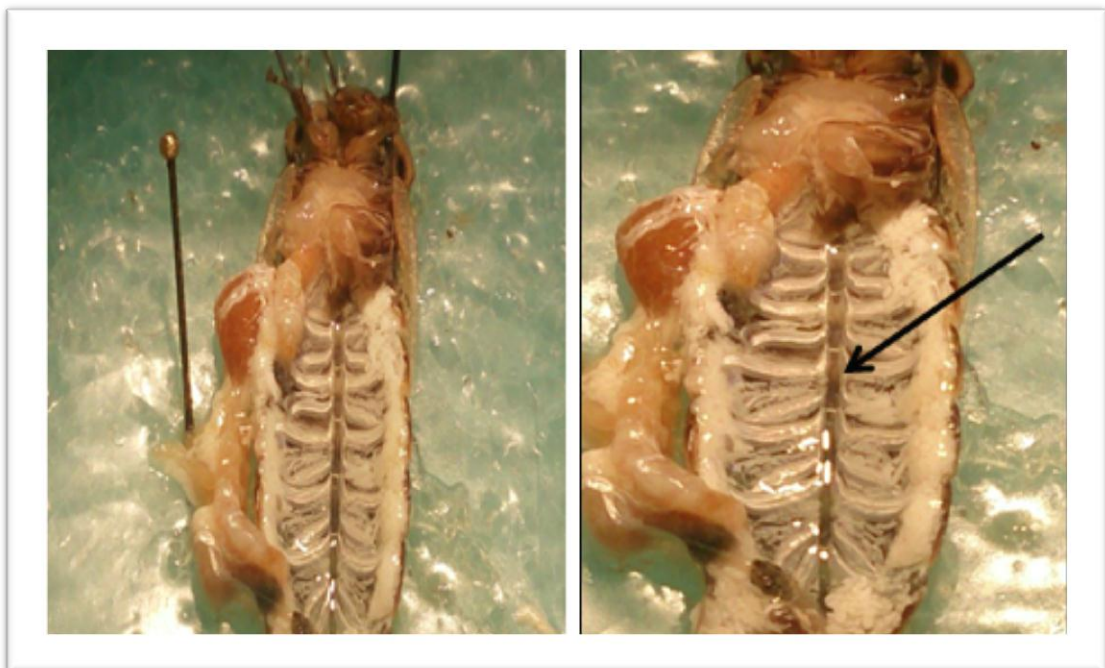
A análise da atividade da AChE em homogenizado de cérebro de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* (Fig. 11) com a aplicação de diferentes concentrações de *Prasiola crispa* 100, 200, 400 e 800  $\mu\text{g/g}$  de animal, não inibiu significativamente a enzima ( $p \geq 0.05$ ). Assim, a análise do grupo tratado com HPC 100 $\mu\text{g/g}$ , demonstrou uma pequena inibição na atividade da enzima com um valor de  $81 \pm 36\%$ . Quando a concentração do HPC 200 $\mu\text{g/g}$  foi ensaiada, o valor da atividade da AChE foi de  $96 \pm 35\%$  em relação ao controle DMSO. Com o aumento da concentração do HPC 400 $\mu\text{g/g}$ , não houve alteração na atividade da AChE  $100 \pm 32\%$ . Na maior dose do HPC 800 $\mu\text{g/g}$  houve uma inibição não significativa da atividade da AChE  $77 \pm 28\%$ , em comparação ao controle com DMSO. Para cada dose ensaiada foram usados cinco animais em triplicata ( $n=5$ ).



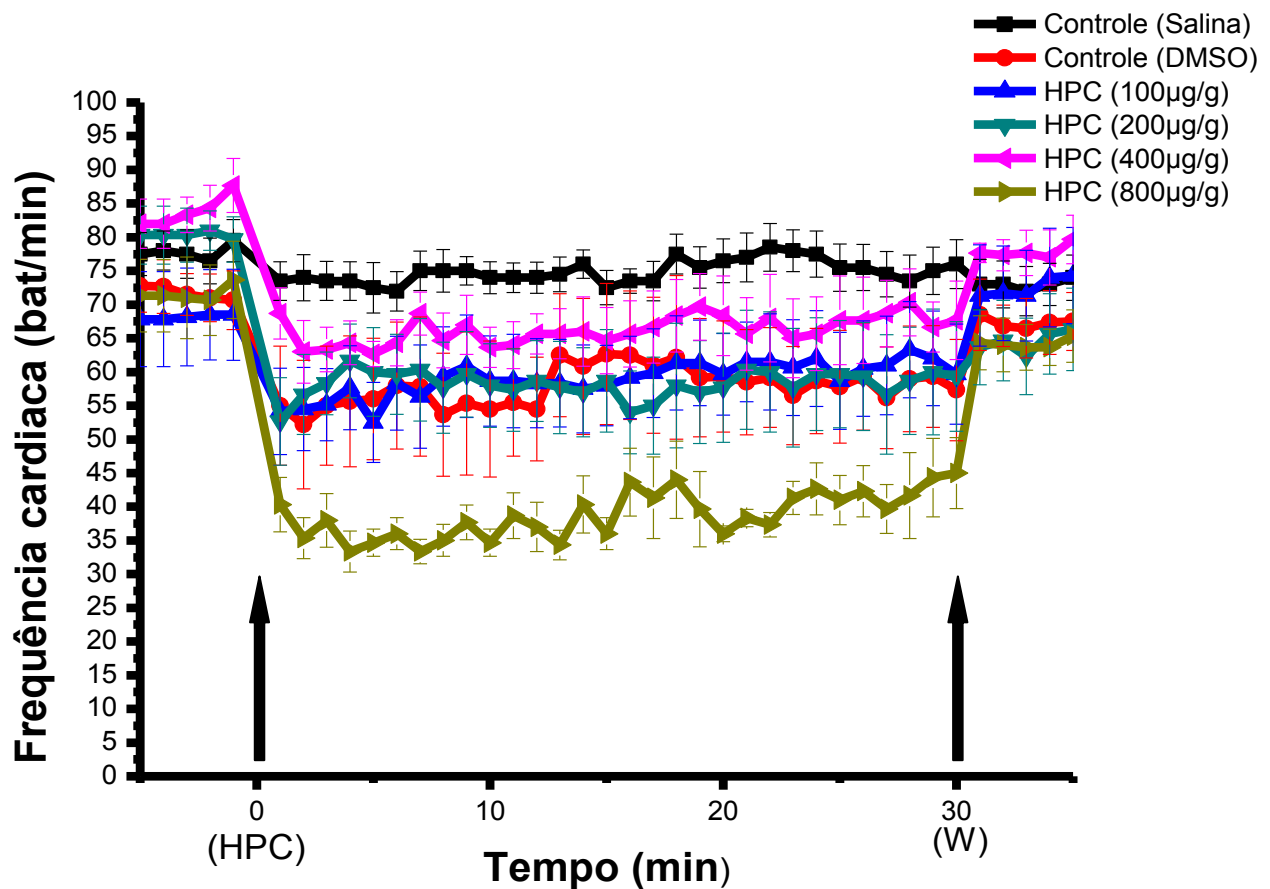
**Figura 11** - Efeito de diferentes concentrações do HPC 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g/g}$  de animal sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em homogenizado de cérebro de *Nauphoeta cinerea*. No gráfico, cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de inibição da acetilcolinesterase em relação ao controle DMSO 10 $\mu\text{g/g}$ . Foi usado o homogenizado de cérebro de *N. cinerea* ( $n=5$ ) após seis horas do tratamento com o HPC (\*  $p \geq 0.05$ ) em comparação ao controle (DMSO).

### 4.3. Efeito do extrato hexânico de *Prasiola crispa* sobre a frequência cardíaca de *Nauphoeta cinérea*

A administração do HPC em preparação coração semi-isolado de baratas (Fig. 12), induziu uma ação cardiotoxica que foi dependente da concentração do extrato vegetal. Assim, nas preparações controle com DMSO 10µg/g a resposta cronotrópica foi de 70±5bat./min. Quando o HPC 100µg/g e 400µg/g foi ensaiado houve a indução de um efeito cronotrópico positivo, caracterizado pelo aumento da frequência cardíaca 78±5 bat./min e 82±4 bat./min, respectivamente em 30min de registros. Por outro lado, quando as doses de 200 µg/g e 800 µg/g foram ensaiadas houve uma diminuição na frequência cardíaca, 64±3 bat./min e 65±4 bat./min respectivamente em 30min de registros comparado ao controle DMSO. Após a lavagem da preparação com solução salina, houve reversão dos efeitos cronotrópicos positivos e negativos (Fig. 13). Para cada dose testada foram usados seis animais (n=6 p≤0,05).



**Figura 12** - Imagens representativas da preparação coração semi-isolado de baratas *Nauphoeta cinerea*. Note. O coração é um tubo alongado, localizado na parte ventral, formado por válvulas com aberturas laterais (ostíolos), onde o meio circulante é a hemolinfa. Fonte: Autoria própria.



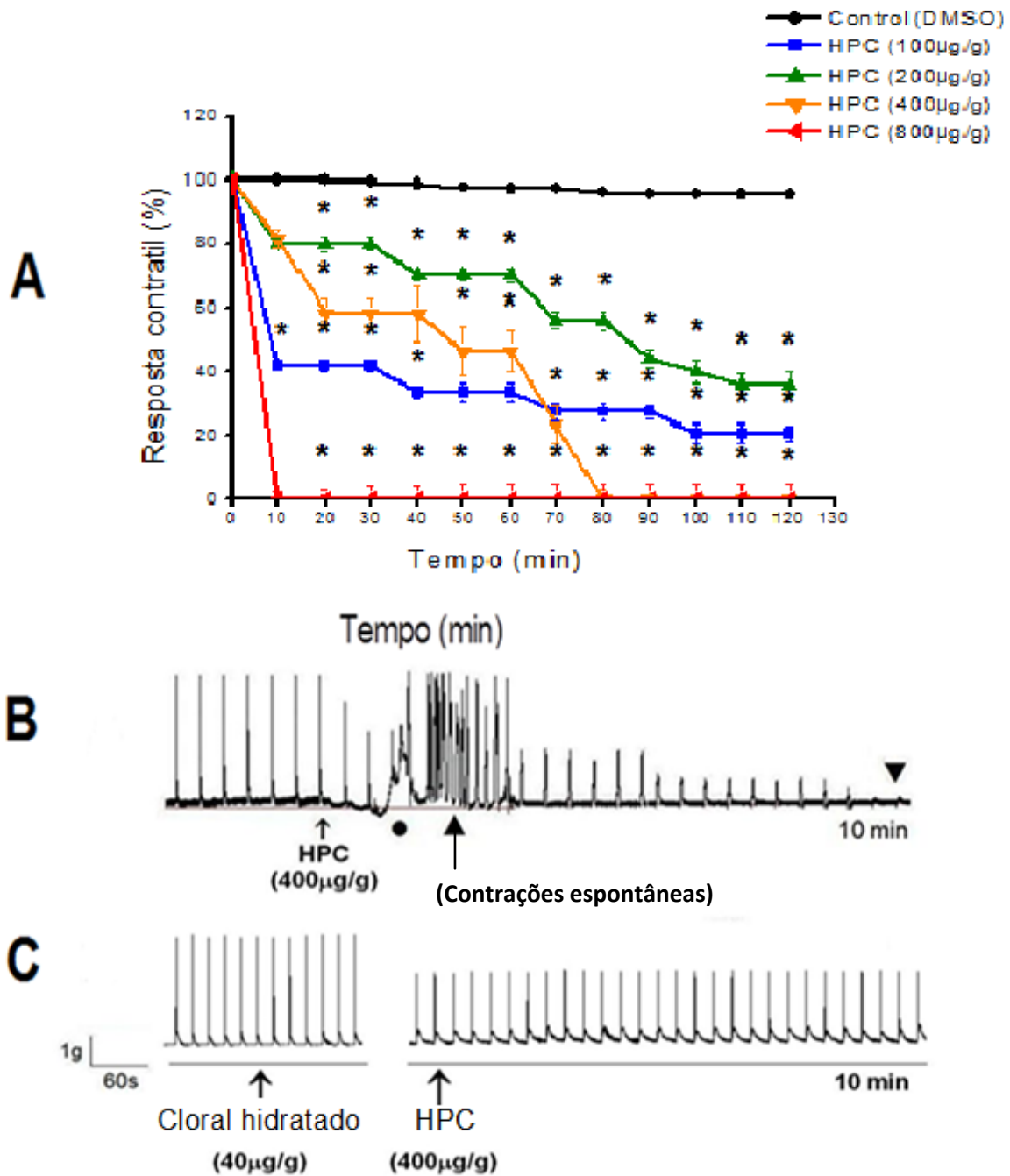
**Figura 13** - Frequência cardíaca de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* em preparação coração semi-isolado na presença do HPC. No gráfico cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M (n=6). Note a diminuição da frequência cardíaca nas concentrações de HPC 200, 800µg/g de animal em 30min de registros. (w) Wash (HPC) Extrato hexânico de *Prasiola crispa* (\*  $p \leq 0.05$ ).

#### 4.4. Preparação *in vivo* do músculo coxal-abdutor metatorácico de barata

##### 4.4.1. Atividades dose-resposta do extrato hexânico de *Prasiola crispa* em junção neuromuscular de barata

Para investigar os efeitos induzidos pelo HPC sobre o Sistema Nervoso Periférico de barata, foi usada a preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico. A administração do DMSO isoladamente não interferiu com a força de contração muscular, durante 120min de registros (n = 6). A administração de HPC 100, 200, 400 e 800µg/g de animal na região da terceira porção abdominal induziu um efeito bloqueador neuromuscular

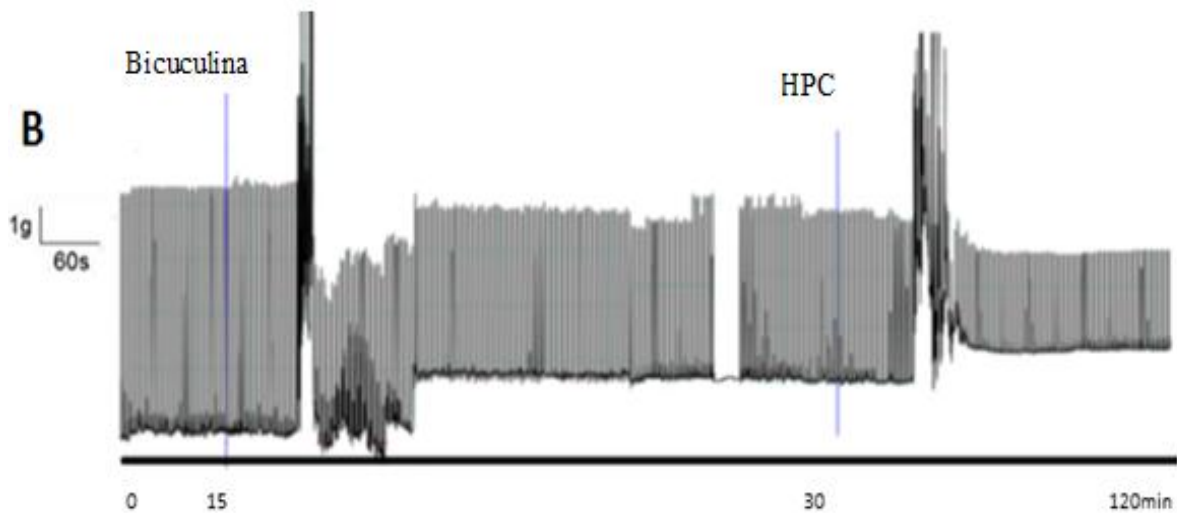
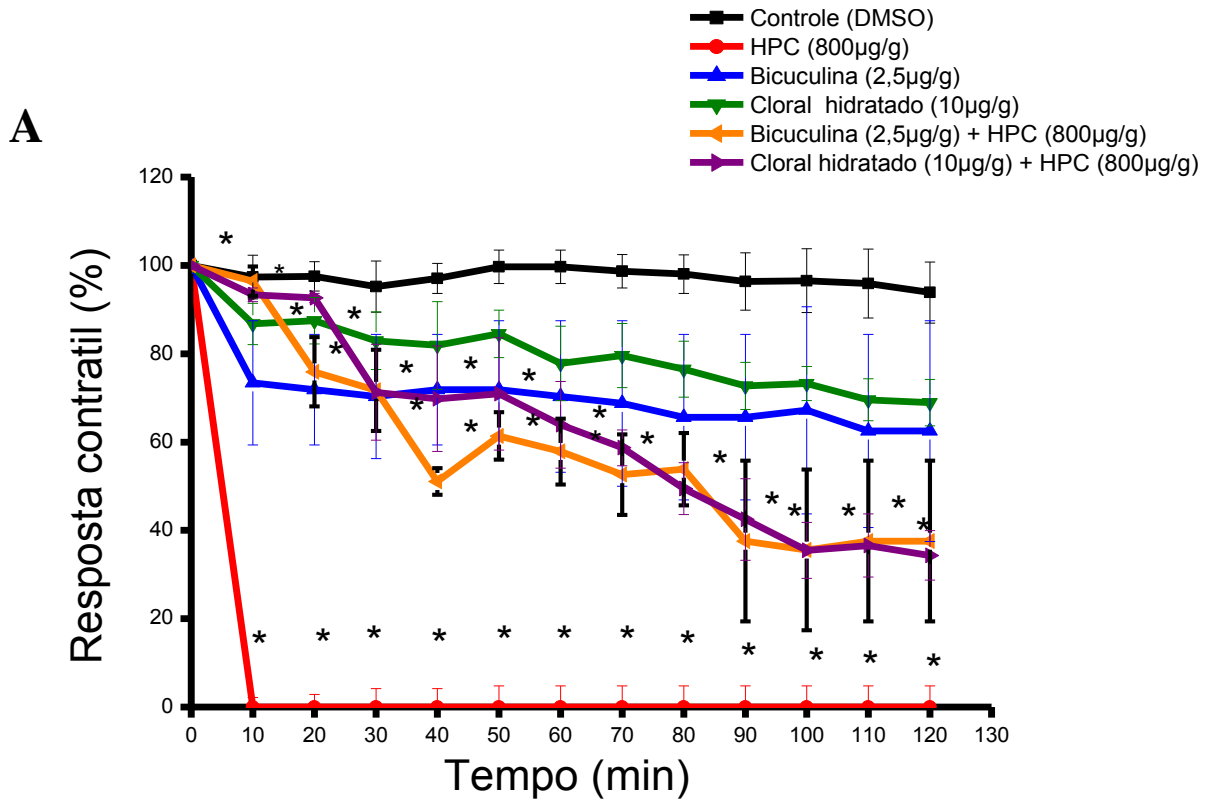
dose e tempo-dependente em 120min de registros (n=6) (Fig. 14). Quando a dose mínima de 100 µg/g foi ensaiada produziu uma inibição  $80 \pm 5\%$  na força de contração muscular (n = 6,  $p \leq 0,05$ ). A administração da maior dose de HPC 800 µg/g induziu 100% de bloqueio da força de contração em 10min (n = 6,  $p \leq 0,05$ ). Na concentração de 200µg/g e 400µg/g houve um bloqueio de  $60 \pm 4\%$  e de 100% respectivamente em 120min de registros (n=6,  $p \leq 0,05$ ). Em todas as doses ensaiadas, antes do início do efeito bloqueador do extrato, houve um aumento do tônus muscular seguido pelo bloqueio irreversível das contrações (Fig. 14b). O aparecimento de contrações espontâneas, na vigência do efeito do extrato também foi observado. A adição do cloral hidrato 40µg/g, 15min antes do HPC 800µg/g, aumentou o tempo necessário para 50% de bloqueio das contrações (n = 6,  $p \leq 0,05$ ) (Fig 14C).



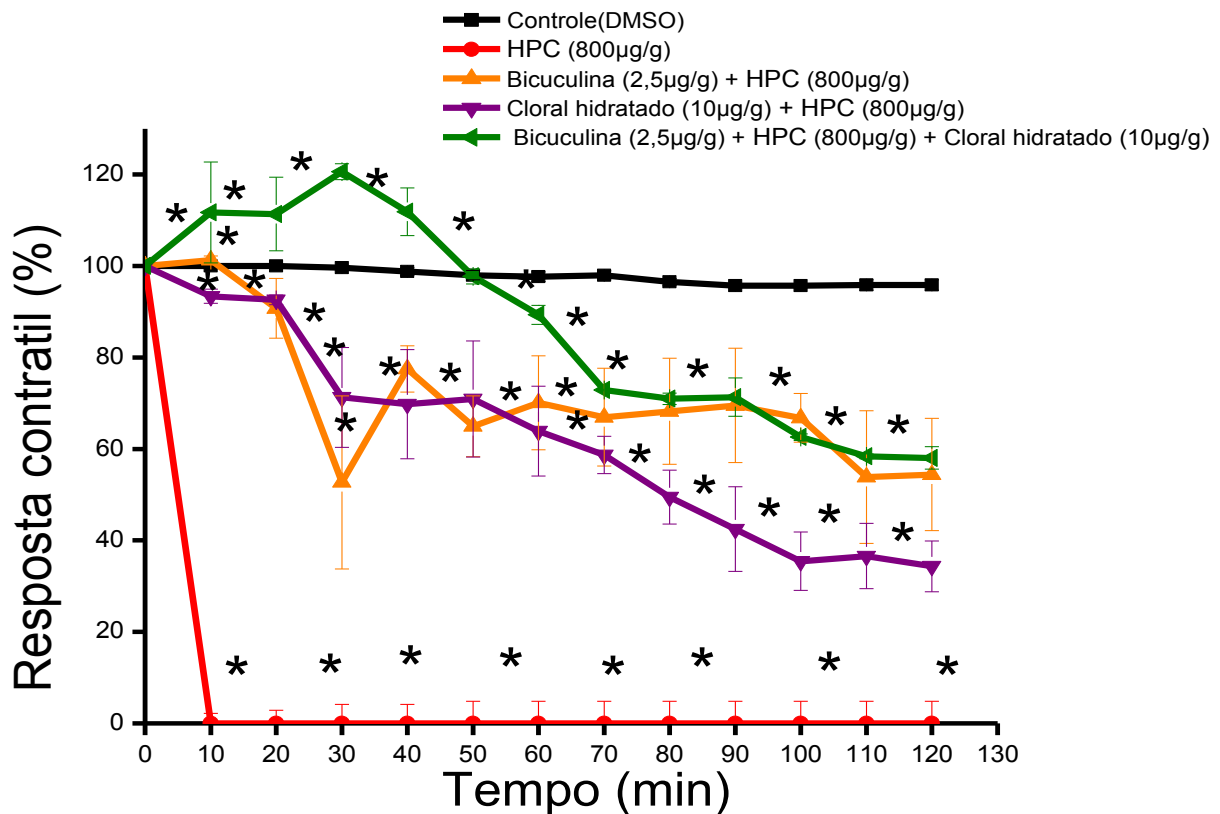
**Figura 14** - (A) Atividade de diferentes concentrações do HPC sobre a resposta contrátil em preparação nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. (B-C) Inibição das contrações musculares espontâneas induzidas pela administração prévia do cloral hidratado 40µg/g em preparações tratadas com HPC 800µg/g. (B) Registro representativo do ensaio com HPC 800 µg/g. (C) Tratamento prévio com cloral hidratado 40 µg/g. ● aumento do tônus muscular; ▲ contrações musculares espontâneas; ▼ completo bloqueio neuromuscular. \*significância para  $p \leq 0.05$

#### **4.4.2. Efeito de diferentes tratamentos farmacológicos frente ao bloqueio neuromuscular induzido pelo extrato hexânico de *Prasiola crispa***

A administração de DMSO 10µg/g isoladamente nos animais, não induziu alterações da força de contração muscular em 120min de registros (Fig. 15, 16, 17, 18) (n = 6, p≤0,05). Quando o HPC 800µg/g foi injetado nos animais houve a indução de bloqueio neuromuscular completo em 10min de registros (n = 6, p ≤0,05) (Fig. 15, 16, 17, 18). A administração dos animais com bicuculina 2,5µg/g, isoladamente induziu um bloqueio da força de contração muscular de 40±6min em 120min de registros (Fig. 15) (n = 6, p≤0,05). O tratamento prévio dos animais com bicuculina 2,5µg/g de 15min, seguido da administração do HPC 800µg/g, previniu parcialmente o bloqueio neuromuscular característico do HPC 60±6min, em 120min de registros (Fig. 15, 16) (n = 6, p≤0,05). A adição de cloral hidratado (10µg/g) isoladamente induziu um leve bloqueio das contrações em 30%±6min em 120min de registros (Fig. 15) (n = 6, p≤0,05). Quando o HPC 800µg/g foi administrado após um pré-tratamento com cloral hidratado 10µg/g, houve também uma atenuação da resposta bloqueadora neuromuscular do extrato que ficou em 64%±9min em 120min de registros (Fig. 15, 16) (n = 6, p≤0,05). Quando os animais foram pré-tratados com a bicuculina 2,5µg/g seguida do HPC 800µg/g e posteriormente com a adição do cloral hidratado 10µg/g houve uma redução ainda maior no nível de bloqueio neuromuscular que foi de 40%±5min (Fig. 16) (n = 6, p≤0,05).



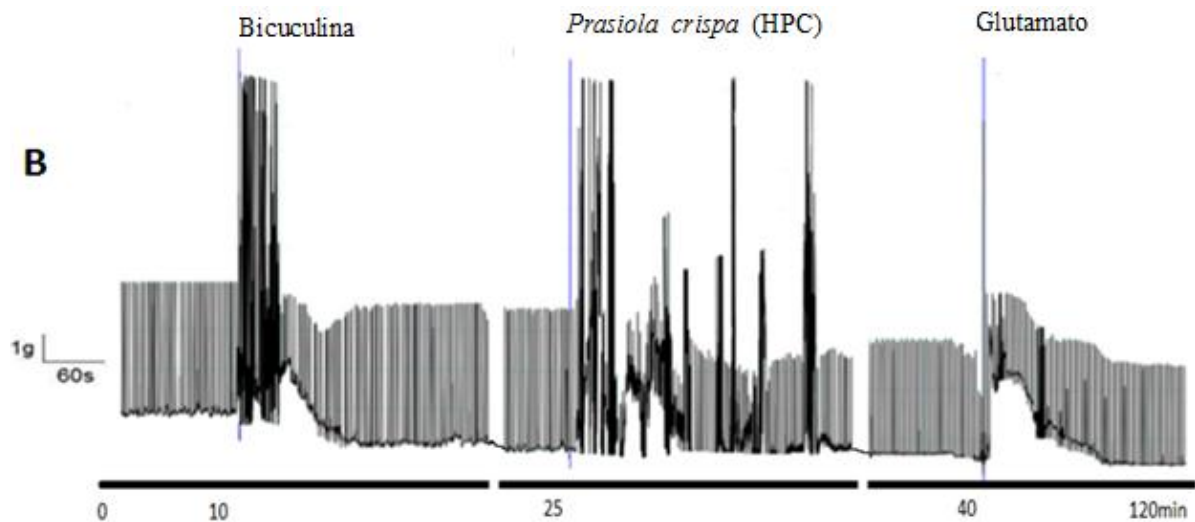
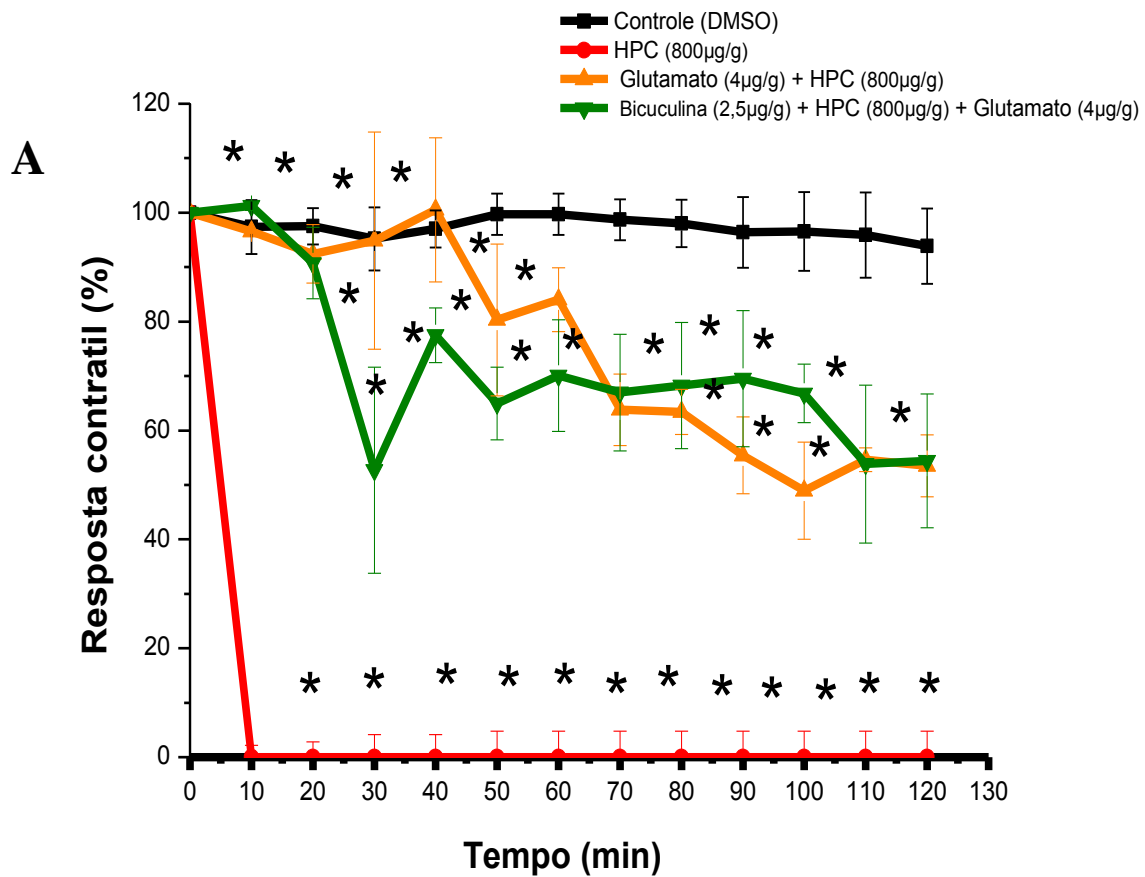
**Figura 15** – Inibição parcial do bloqueio neuromuscular induzido pelo HPC 800µg/g pelo tratamento prévio com Bicuculina 2,5µg/g de animal e Cloral hidratado 10µg/g de animal em preparações *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatoráxico de *Nauphoeta cinerea*. Em **A**, no gráfico, cada ponto corresponde à média ± erro-padrão da porcentagem da resposta contrátil. Note que a bicuculina e o cloral hidratado inibiram a resposta bloqueadora neuromuscular induzida pelo HPC 800µg/g. Em **B** registro representativo da contração muscular na presença da bicuculina 2,5µg/g de animal e HPC 800µg/g de animal (n=6 \*p≤0.05).



**Figura 16** – Efeito do tratamento prévio com bicuculina 2,5µg/g de animal e cloral hidratado 10µg/g de animal ao extrato HPC 800µg/g sobre a resposta contrátil em preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico da *Nauphoeta cinerea*. No gráfico, cada ponto corresponde à média  $\pm$  erro-padrão da porcentagem da resposta contrátil. Note o ensaio realizado com a adição de bicuculina 15min antes do HPC 800 µg/g e 15min após a adição do cloral hidratado onde houve uma inibição de 40%±5 min do bloqueio neuromuscular (n = 6, p  $\leq$ 0,05).

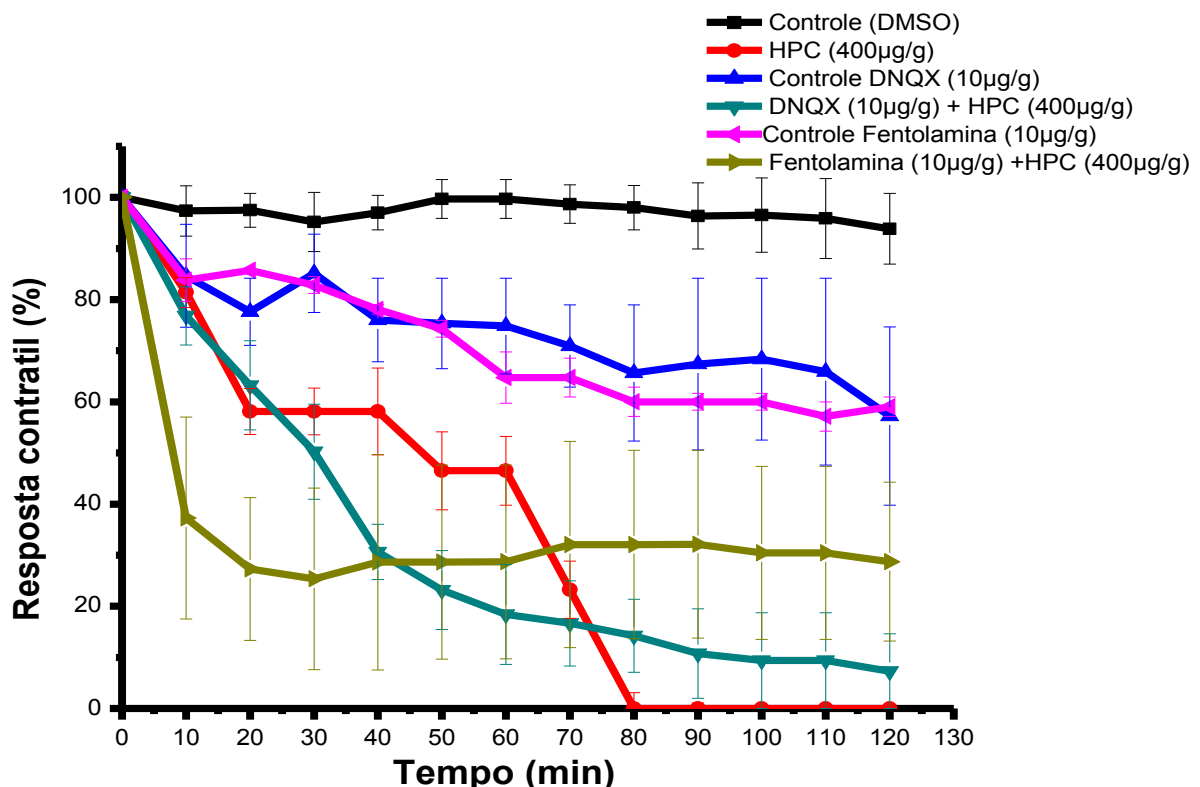
Com a adição do Glutamato 4µg/g, 15min antes do HPC 800µg/g houve a prevenção do bloqueio das contrações em 55±5% em 120min de registros (n = 6, p  $\leq$ 0,05). No pré-tratamento com bicuculina 2,5µg/g, 15min antes do HPC 800 µg/g e após 15min a adição do Glutamato 4µg/g, houve o mesmo nível de prevenção do bloqueio das contrações 55±6% durante 120min de registros (Fig. 17) (n = 6, p  $\leq$ 0,05).





**Figura 17** - Efeito prévio da Bicuculina 2,5µg/g de animal e do Glutamato 4µg/g de animal sobre o bloqueio neuromuscular induzido pelo extrato hexânico de *Prasiola crispa* (HPC) 800µg/g em preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de *Nauphoeta cinerea*. **A**, no gráfico, cada ponto corresponde à média  $\pm$  erro-padrão da porcentagem da resposta contrátil (n=6). Note que a bicuculina e o GLU inibiram a resposta bloqueadora induzida pelo HPC 800µg/g em 120min de registros. ( $p < 0.05$ ). **B**, Registro representativo da contração muscular na presença da bicuculina 2,5µg/g de animal, HPC 800µg/g de animal e GLU 4µg/g de animal em 120min de registros.

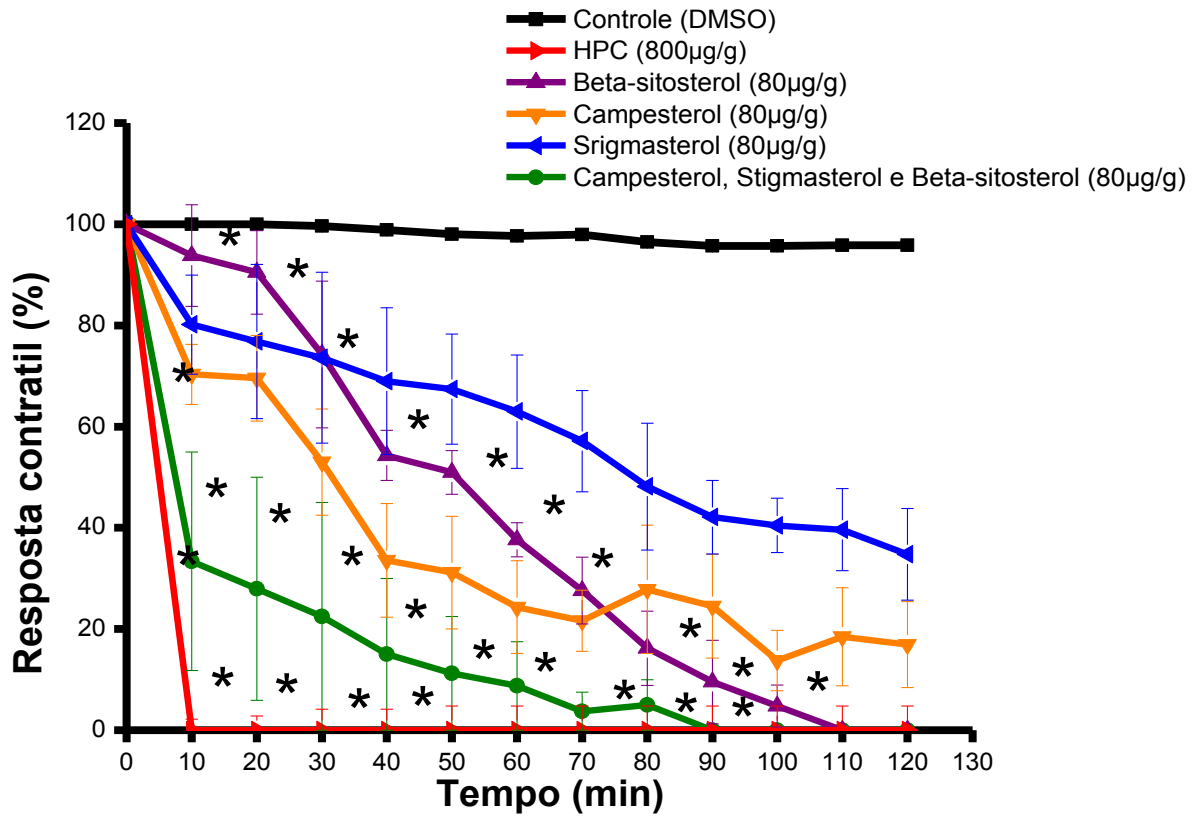
Quando o DNQX 10 $\mu$ g/g de animal foi ensaiado isoladamente causou o bloqueio de 40 $\pm$ 8% da força de contração em 120min de registros (n = 6, p $\leq$ 0,05). A administração do DNQX 15min antes do HPC 400 $\mu$ g/g de animal não alterou significativamente a resposta do HPC induzindo ainda um nível de bloqueio de 90 $\pm$ 10% das contrações em 120min de registros (n = 6, p $\leq$ 0,05). A fentolamina, usada isoladamente na dose 10 $\mu$ g/g de animal causou um bloqueio de 40 $\pm$ 8% de contrações em 120min de registros (n = 6, p $\leq$ 0,05). Quando a fentolamina 10 $\mu$ g/g foi previamente administrada 15min antes do HPC 400 $\mu$ g/g, induziu um bloqueio de 70 $\pm$ 6% na resposta contrátil em 120min de registros (Figura 18) (n = 6, p $\leq$ 0,05). A administração do DMSO 10% ensaiado isoladamente na barata não interferiu com as respostas neuromusculares, em 120min de registros (Fig. 18) (n = 6, p $\leq$ 0,05).



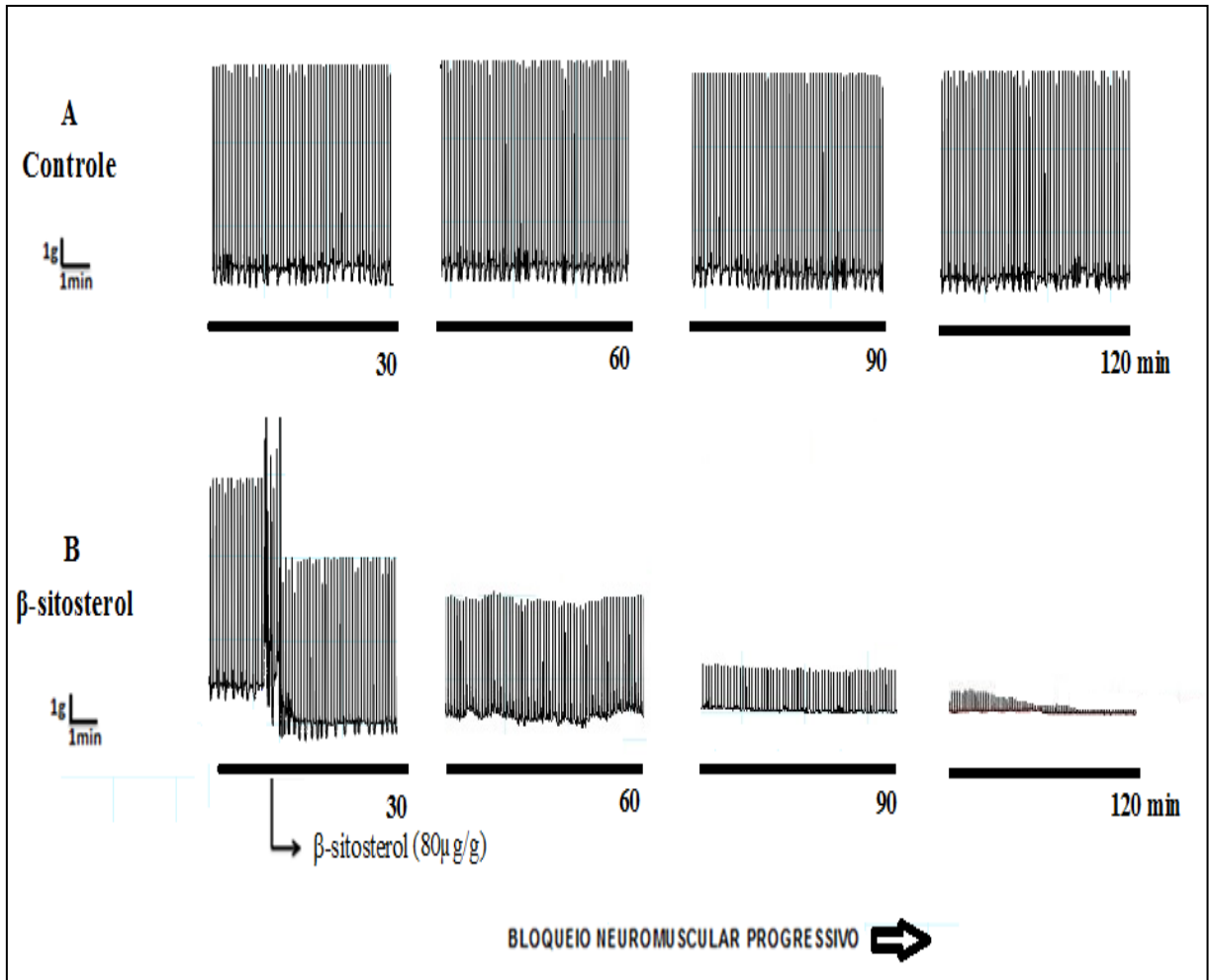
**Figura 18** - Inibição parcial do bloqueio neuromuscular induzido pelo HPC 400 $\mu$ g/g pelo tratamento prévio com DNQX 10 $\mu$ g/g de animal e Fentolamina 10 $\mu$ g/g de animal em preparações *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de *Nauphoeta cinerea*. No gráfico, cada ponto corresponde à média  $\pm$  erro-padrão da porcentagem da resposta contrátil. Note que a administração do DNQX 15min antes do HPC 400 $\mu$ g/g de animal não alterou significativamente a resposta do HPC (N=6 \*p $\leq$ 0.05).

#### **4.4.3. Ensaios da atividade neuromuscular com os compostos fitoesteróis identificados no extrato hexânico de *Prasiola crispa***

A análise por ressonância magnética nuclear do HPC resultou no isolamento e identificação dos seguintes compostos: Campesterol (1), Stigmasterol (2) e  $\beta$ -sitosterol (3). A administração do  $\beta$ -sitosterol 80 $\mu$ g/g de animal isoladamente induziu 100% de bloqueio da força de contração muscular em 120min de registros (Fig. 20) (n = 6,  $p \leq 0,05$ ). Quando o Campesterol 80 $\mu$ g/g de animal foi ensaiado, induziu 80 $\pm$ 4% de bloqueio da resposta contrátil em 120min de registros (n = 6,  $p \leq 0,05$ ). A análise da atividade do Stigmasterol 80 $\mu$ g/g de animal resultou em uma resposta de 60 $\pm$ 6% da força de contração muscular durante 120min de registros (n = 6,  $p \leq 0,05$ ). Quando os três compostos químicos foram aplicados simultaneamente 26,66% de cada composto químico compondo a dose de 80 $\mu$ g/g de animal, induziu 100% de bloqueio da força de contrações em 90min de registros (Fig. 19) (n = 6,  $p \leq 0,05$ ).



**Figura 19** - Efeito do Campesterol 80µg/g de animal, Stigmasterol 80µg/g de animal e β-sitosterol 80µg/g de animal sobre a resposta contrátil em preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de *Nauphoeta cinerea*. No gráfico, cada ponto corresponde à média ± erro-padrão da porcentagem da resposta contrátil. Note que o β-sitosterol 80µg/g de animal foi à substância capaz de inibir a resposta contrátil similarmente ao extrato bruto de *Prasiola crispera* 800µg/g (n=6 \* P≤0.05).



**Figura 20** - Em **A**, registro representativo da força de contração muscular na ausência do  $\beta$ -sitosterol em preparação tratada com o controle DMSO  $10\mu\text{g/g}$  de animal. Em **B**, registro representativo da contração muscular na presença do  $\beta$ -sitosterol  $80\mu\text{g/g}$  de animal.

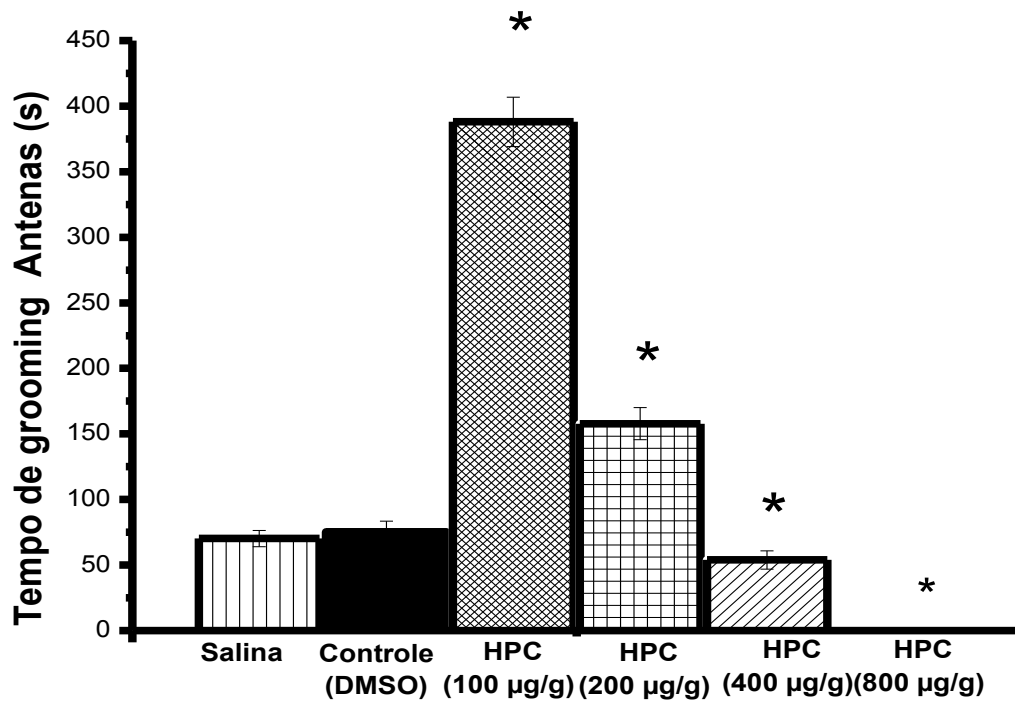
#### 4.5. Efeito do extrato hexânico de *Prasiola crispa* na atividade de *grooming*

A análise do comportamento de *grooming* (Fig. 20) realizada na câmara de campo aberto durante 30min demonstrou um aumento dependente do tempo, frente à administração do HPC. Em experimentos controle DMSO, onde as baratas foram tratadas somente com solução salina para insetos ( $n=30$ ) os valores de *grooming* de pernas e de antenas foram respectivamente  $153\pm 8\text{s}/30\text{min}$  e  $70\pm 6\text{s}/30\text{min}$ . O controle feito com DMSO 10% não induziu alterações na taxa de *grooming* quando comparado à solução salina. Quando o HPC  $100\mu\text{g/g}$  de animal foi administrado nas baratas houve um aumento da taxa de *grooming* de antenas e

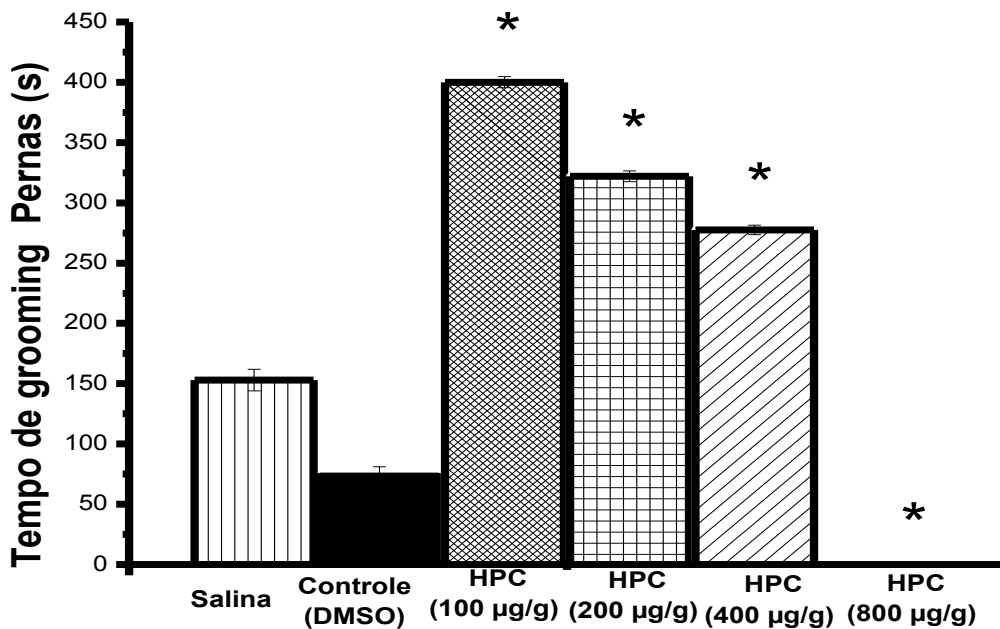
pernas  $390 \pm 5s/30min$  e  $400 \pm 5s/30min$  respectivamente ( $n=30$ ,  $p \leq 0.05$ ). Para a dose de  $200 \mu g/g$  o aumento de *grooming* de antenas foi de  $160 \pm 4s/30min$  e de  $320 \pm 5s/30min$ , no de pernas ( $n=30$ ,  $p \leq 0.05$ ). A dose de  $400 \mu g/g$  teve como resultado o aumento de *grooming* de antenas para  $50 \pm 5s/30min$  e de  $275 \pm 5s/30min$ , no de pernas ( $n=30$ ,  $p \leq 0.05$ ). Na maior dose  $800 \mu g/g$  houve a sessão do *grooming* de antenas e de pernas (Fig. 22,23) ( $n=30$ ,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 21** - Imagens representativas de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* realizando atividade de *grooming*. Observe a atividade de limpeza de antenas e pernas. Fonte das fotos: Autória própria.



**Figura 22** - Efeito do extrato hexânico de *Prasiola crispa* sobre o comportamento de *grooming* de antenas em modelo de *Nauphoeta cinerea*. No gráfico cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 30 experimentos. Note o aumento da taxa de *grooming* com a dose de 100µg/g de animal e subjacente diminuição com as doses maiores (\*  $p \leq 0,05$ ) comparada com o controle DMSO.

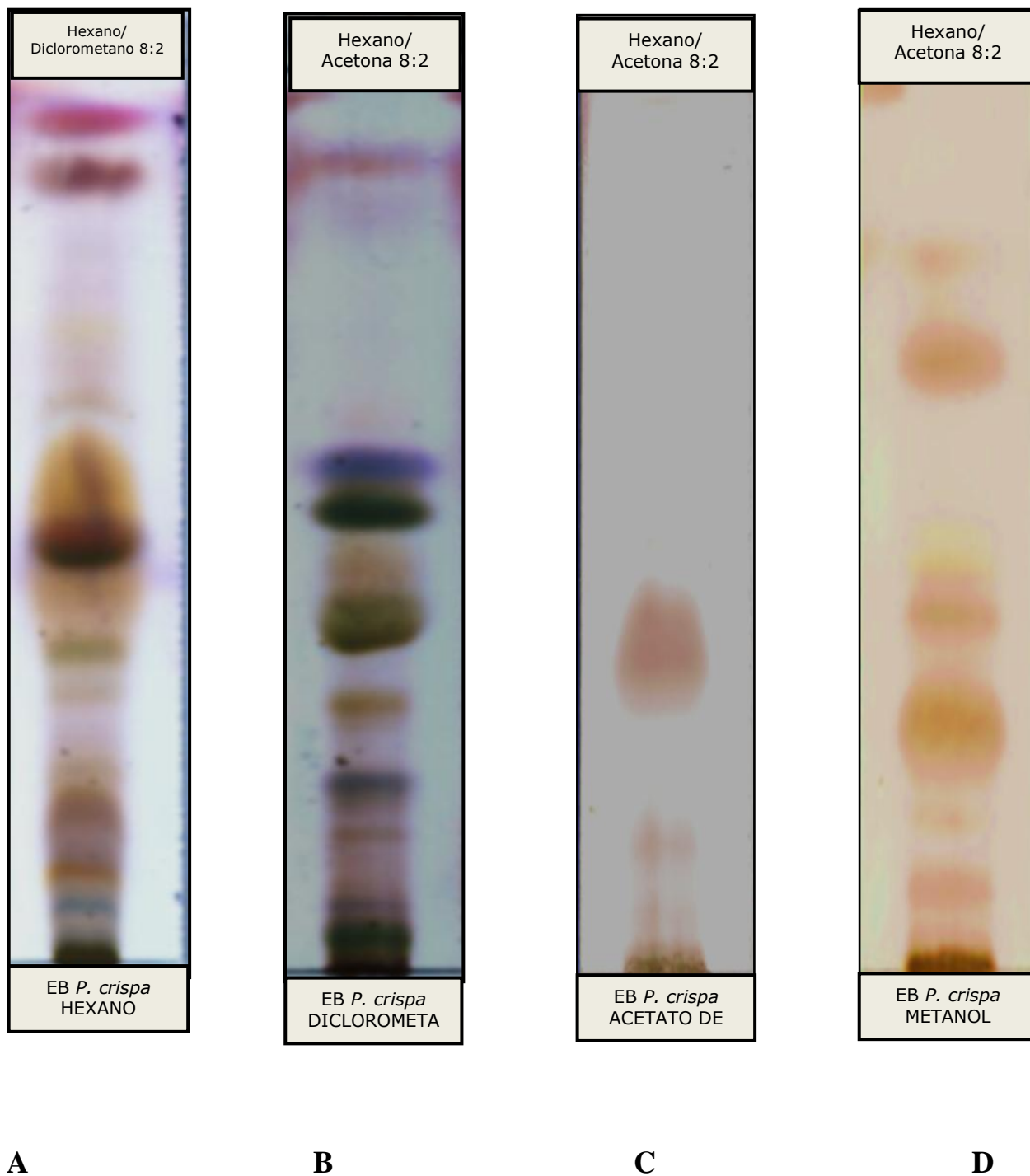


**Figura 23** - Efeito do extrato hexânico de *Prasiola crispa* sobre o comportamento de *grooming* de pernas em modelo de *Nauphoeta cinerea*. No gráfico cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 30 experimentos. Note o aumento da taxa de *grooming* com a dose de 100µg/g de animal e diminuição com as doses de concentrações maiores (\*  $p \leq 0,05$ ) comparada com o controle DMSO.

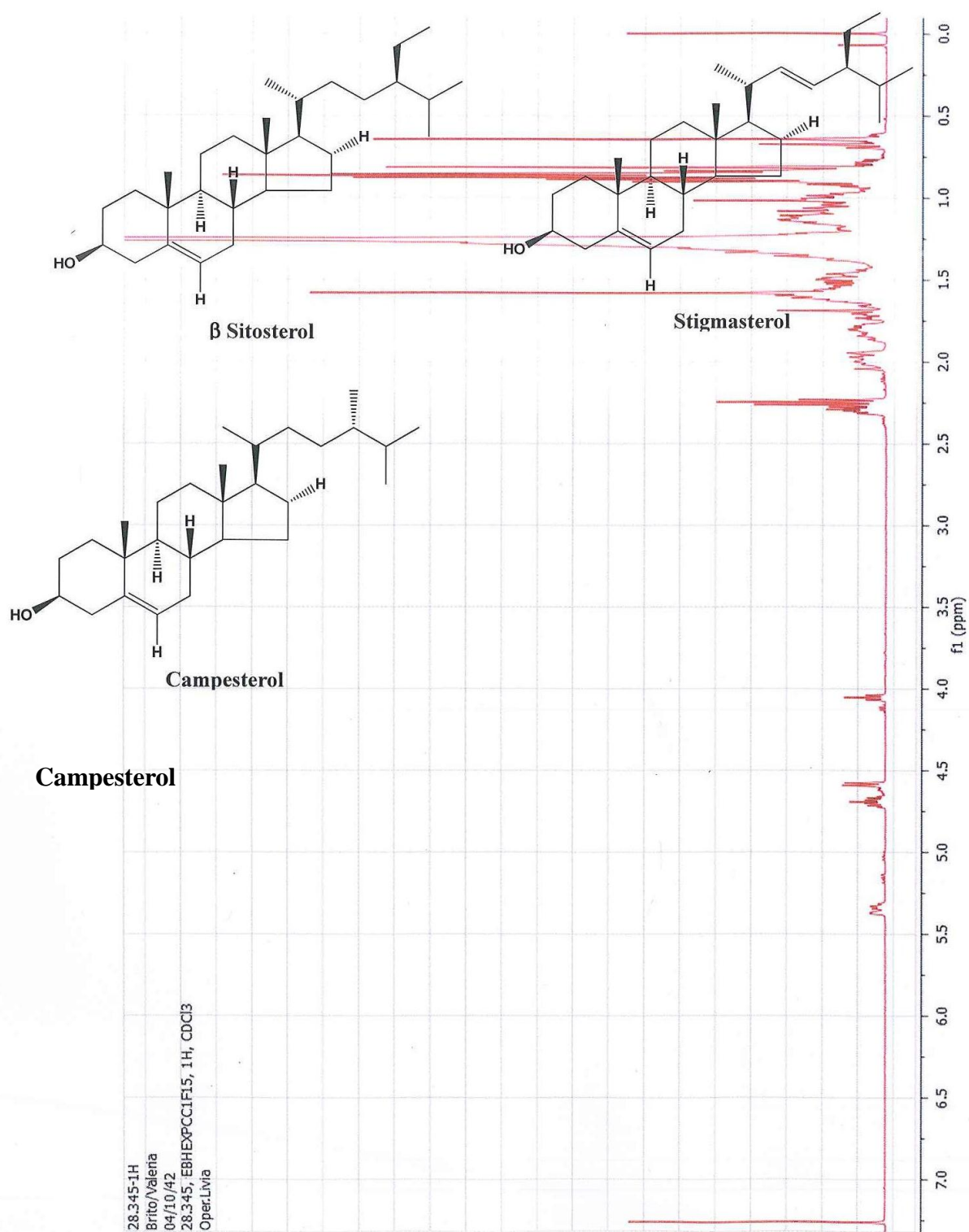
#### 4.6. Análise fitoquímica

Uma alíquota do extrato foi dissolvida em diferentes solventes (8:2v/v, Hexano/Diclorometano, Hexano/Metanol, Hexano/Acetato de Etila) e procedeu-se a cromatografia em camada delgada (CCD), que demonstrou a presença de diferentes compostos químicos no HPC, com melhor separação dos compostos para a mistura Hexano/Diclorometano Fig. 23. O fracionamento, através de cromatografia em coluna de gel de sílica, da fase (Hexano/Diclorometano) da partição do extrato hexânico da alga *Prasiola crispera* resultou no isolamento e identificação como sendo, fitoesteróis (esteróis de plantas), através das informações fornecidas por seus espectros de RMN o; Campesterol (24 $\alpha$ -metil-colest-5-enol) peso molecular (400.68), Stigmasterol (24 $\alpha$ -etil-colest- 5,22-dienol) peso molecular (412.69) e  $\beta$ -sitosterol (24 $\alpha$ -etil-colest-5-enol) peso molecular (414.71) (Fig. 24), descoberta inéditas na espécie. A identificação individual de cada substância foi realizada levando-se em conta o padrão de hidrogênção de cada átomo de carbono, os deslocamentos químicos dos átomos de carbono, principalmente dos carbonos de ligação dupla, e ainda o número de metilas e multiplicidade destas, observadas nos espectros de RMN<sup>1</sup>H.





**Figura 24** - Cromatografia de camada delgada (CCD) do extrato bruto (EB) de *Prasiola crispera*. Os eluentes utilizados foram (A) hexano; (B) diclorometano; (C) acetato de etila; (D) metanol, em gradiente crescente de polaridade, resultando em quatro frações.



**Figura 25** - Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) da fração hexânica com a identificação dos compostos  $\beta$ -Sitosterol, Stigmasterol e Campesterol.

## 5. DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi demonstrada a atividade neurobiológica do extrato bruto de *Prasiola crispa*. Também procedeu-se a identificação por RMN de três compostos envolvidos na atividade neurotóxica do extrato em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. Serão discutidos abaixo os aspectos relacionados aos mecanismos envolvidos na atividade biológica de *Prasiola crispa* sobre os diferentes sistemas neurofisiológicos de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*.

Os ensaios para a determinação da atividade entomotóxica do extrato bruto de *Prasiola crispa* demonstraram que esse composto possui atividade letal para as baratas, reforçando o seu potencial como inseticida natural. De fato nossos dados corroboram os de ZEMOLIN *et al.*, (2012), que demonstrou que o extrato metanólico de *Prasiola crispa* também é letal para a mosca das frutas *Drosophila melanogaster*.

Nesse sentido foi demonstrado no extrato hexânico a presença de fitoesteróis relacionados à atividade tóxica da *Prasiola crispa*. De fato, a literatura demonstra a relação entre a atividade inseticida de extratos vegetais e a presença de fitoesteróis (ZOLOTAR, *et al.*, 2002). TABATA *et al* (2008) demonstraram que em cultura de células de camundongos a incubação do  $\beta$ -sistosterol induziu neurotoxicidade sobre os neurônios. MIKOLAJCZAK *et al.*, (1987), demonstraram que os extratos de *Trichilia pallida*, *T. connoroides*, *T. prieureana*, *T. roka* e *T. triphyllaria* induziram mortalidade igual ou superior a 80% em *S. frugiperda*. A investigação fitoquímica desses extratos levou à identificação de compostos como as cumarinas, escoporona, escopoletina, umbeliferona, o limonóide 11- $\beta$ -acetoxiobacunona, e a mistura dos esteróides stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e campesterol.

Além disso, os ensaios para a medida da atividade da enzima colinesterase de homogenizado de cérebro de *Nauphoeta cinerea*, demonstraram que o HPC não inibe

significativamente essa enzima. Esse dado reforça o fato de que o efeito entomotóxico do HPC não deve estar associado a essa atividade, como foi também previamente demonstrado por ZEMOLIN *et al.*, (2012). Dessa forma é improvável que pelo menos em parte a atividade entomotóxica do extrato esteja associada a uma atividade inibidora da colinesterase.

Em nossas condições experimentais quando o HPC foi ensaiado sobre o sistema cardiovascular de *Nauphoeta cinerea*, demonstrou-se uma alteração significativa da frequência cardíaca. A adição de anticolinesterásicos na preparação do coração semi-isolado de baratas induz um aumento ou decréscimo da frequência cardíaca, dependendo da concentração ensaiada (POLSINELLI *et al.*, 2010). Considerando-se que em nosso estudo o HPC não teve qualquer efeito sobre a atividade da acetilcolinesterase, este mecanismo parece não estar envolvido no efeito cardiotoxico observado. Dessa forma os nossos dados sugerem que o HPC está atuando como um despolarizante dos nervos adjacentes ao coração, o que poderia aumentar a liberação do neurotransmissor acetilcolina ou octopamina, induzindo alterações da frequência cardíaca. Tal hipótese parece comprovar-se pela demonstração na literatura de compostos vegetais, como o de *Parthenium hysterophorus*, que induz efeitos despolarizantes em modelos de insetos (KUSHWAHA e MAURYA, 2012).

Os ensaios com o HPC em preparações neuromusculares de *N. cinerea* demonstraram um efeito bloqueador neuromuscular progressivo que levou a cessação completa das respostas contráteis. Além disso, foram observadas contrações espontâneas que indicam uma despolarização persistente da placa motora desses insetos (DOUGLAS e PATON, 1954). De fato, o efeito induzido pelo HPC sobre a neurotransmissão periférica de *Nauphoeta cinerea* assemelha-se ao dos piretróides. Em relação a esses últimos, desenvolvem a sua atividade entomotóxica por ativarem persistentemente canais iônicos de sódio na musculatura dos insetos, fazendo com que haja uma despolarização persistente da membrana muscular, aumentando o número de potenciais de ação, causando a morte dos animais por paralisia

motora (DAVIES *et al.*, 2007). Apesar de em nossas condições experimentais o DNQX, um inibidor seletivo dos receptores Ampa e Kainato (NAKANISHI, 1992), não ter prevenido o bloqueio neuromuscular induzido pelo HPC, o mesmo foi obtido pelo tratamento prévio das preparações com hidrato de cloral. Em insetos a neurotransmissão periférica é modulada tanto pelo neurotransmissor GLU (glutamato), excitatório, quanto pelo GABA (ácido-gama-aminobutírico), que é inibitório (MAYER e WESTBROOK, 1987). Esses dois neurotransmissores parecem complementar-se no sentido de orquestrarem os fenômenos de contração e relaxamento da musculatura esquelética das pernas dos insetos, organizando a locomoção (HUBER, 1990). Em invertebrados os receptores de glutamato são do tipo AMPA que, quando ativados, induzem um rápido influxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^+$  e um posterior efluxo de  $\text{K}^+$  (BHATT e COOPER, 2005). Os receptores ionotrópicos de glutamato que são canais iônicos integrais do tipo ligante-ativados são subdivididos em três subtipos, baseados na sua sensibilidade: Kainato (KA) (Ácido 2-carboxi-4-(1-metiletetil)-3-pirrolidinacético), AMPA (alfa amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato) e NMDA (N-metil-D-aspartato). Os receptores AMPA e os KA medeiam a neurotransmissão excitatória rápida, enquanto os receptores NMDA evocam correntes com cinéticas de ativação mais lentas (WASHIO, 2002). Nesse sentido os receptores NMDA localizam-se na membrana pós-sináptica das sinapses excitatórias e exibem maior permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  do que os receptores AMPA e KA, característica que lhe confere um papel mais ativo em mecanismos neurotóxicos. Por sua vez, os receptores de glutamato metabotrópicos são acoplados a proteína G e participam dos mecanismos de resposta intracelular através da ativação de segundos mensageiros. Por esse motivo, são responsáveis pela geração de respostas pós-sinápticas mais lentas (KUBO, 2004). De fato a prevenção parcial do bloqueio neuromuscular pelo prévio tratamento das preparações com o hidrato de cloral, sugere que os compostos bioativos do extrato esteja ativando receptores ionotrópicos do tipo NMDA e AMPA (KORNHUBER e WELLER,

1997) Além disso, o prévio tratamento dos animais com bicuculina, um inibidor seletivo dos receptores GABA ionotrópicos, também previniu o bloqueio neuromuscular induzido pelo HPC. Esse último resultado sugere que a despolarização da placa motora dos insetos pelo HPC estaria em última análise aumentando a liberação do neurotransmissor GABA, produzindo um aumento do recrutamento da musculatura inibitória (HUBER *et al.*, 1990). Vários compostos inseticidas vegetais possuem atividade permeabilizante de membranas biológicas (STANIÇUASKI e CARLINI, 2012). Nesse sentido, a neurotransmissão ganglionar em baratas envolve a liberação do neurotransmissor octopamina (HUBER *et al.*, 1990). O tratamento prévio das preparações neuromusculares com fentolamina retardou o desenvolvimento do bloqueio neuromuscular em *Nauphoeta cinerea*. Esses dados sugerem que os compostos bioativos do extrato estejam despolarizando a região do terceiro gânglio metatorácico, na qual já foi descrita a presença de receptores AMPA e NMDA (I. HUBER *et al.*, 1990).

Em nossas condições experimentais, o ensaio do HPC *in vivo* também induziu alterações comportamentais importantes, caracterizadas pelo aumento na frequência do comportamento de grooming. Inicialmente esse dado, demonstra que os compostos químicos presentes no HPC induzem alterações sobre o sistema nervoso central do inseto. O *grooming* em insetos caracteriza-se pelo movimento de limpeza das pernas e das antenas, tendo função de comportamento de corte, sinalização social, atividade de deslocamento, excitação e limpeza (GAL e LIBERSAT, 2009). Apesar do centro neural envolvido no comportamento de *grooming* ainda ser desconhecido, foi demonstrado que o principal neurotransmissor associado com esta resposta é a dopamina nas antenas (LIBERSAT *et al.*, 1999) e a octopamina nas pernas (GAL e LIBERSAT, 2010). Dessa forma, a modulação do *grooming* de pernas e de antenas sugere que os compostos bioativos presentes no HPC, estejam ativando

por meio de despolarização ou não, as regiões do gânglio subsofágico e supraesofágico responsáveis pela modulação do grooming em insetos (GAL e LIBERSAT, 2010).

Nossos resultados confirmam o potencial biotecnológico da alga Antártica *Prasiola crispera* como um agente inseticida natural. O mecanismo da atividade entomotóxica é complexo e envolve alterações no sistema cardiovascular, bem como sobre o sistema nervoso central e periférico do inseto. As alterações sobre o sistema nervoso central refletem-se em uma modulação complexa do comportamento do animal. As alterações sobre o sistema nervoso periférico parecem ser mais intensas, levando a uma paralisia motora progressiva e irreversível, o que provavelmente estaria associada à morte dos indivíduos por neurotoxicidade. A presença de compostos químicos esteróis no extrato e a determinação da atividade bloqueadora neuromuscular desses substratos, sugere o envolvimento dessa classe de compostos no efeito entomotóxico induzido pela *Prasiola crispera*. Nesse sentido, análises fitoquímicas futuras associadas a ensaios biológicos poderão identificar novos compostos presentes na alga, associados à atividade entomotóxica.

## 6. CONCLUSÕES

Os dados apresentados nesse trabalho e as discussões geradas apartir dos mesmos permitem elencar as seguintes conclusões:

- ❖ O extrato hexânico da alga *Prasiola crispera* exerce atividade entomotóxica em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*;
- ❖ A atividade da enzima colinesterase não foi alterada significativamente em homogenizado de cérebro de barata da espécie *Nauphoeta cinerea*;
- ❖ O extrato hexânico de *Prasiola crispera* induz efeito cardiotoxíco em coração de *Nauphoeta cinerea*;
- ❖ O extrato hexânico de *Prasiola crispera* induz um bloqueio neuromuscular completo em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* sugerindo que a atividade sobre o sistema nervoso periférico seja o principal efeito tóxico desencadeado pela alga em insetos;
- ❖ O extrato hexânico de *Prasiola crispera* também induziu alterações comportamentais importantes demonstrando atuar também sobre o sistema nervoso central modulando o comportamento de *grooming*;
- ❖ A avaliação fitoquímica associada à análise bioguiada do extrato hexânico de *Prasiola crispera* identificou três compostos com atividade biológica semelhante a do extrato bruto: Campesterol,  $\beta$ -sitosterol e stigmasterol;



- ❖ Dos três compostos químicos identificados o  $\beta$ -sitosterol foi o mais proeminente em induzir atividade neurotóxica;
- ❖ Os dados reforçam o potencial biotecnológico da alga *Prasiola crista* contribuindo para validar o esforço do governo Brasileiro na manutenção do Programa de Pesquisa do continente Antártico.

## 7. PERSPECTIVAS

- ❖ Identificar outros compostos bioativos presentes no extrato;
- ❖ Avançar no estudo da neurotoxicidade dos insetos por meio de ensaios eletrofisiológicos;
- ❖ Avançar no estudo da neurotoxicidade induzida pelo extrato hexânico de *Prasiola crispa* por meio de ensaios de Biologia Molecular e de interação droga-receptor;
- ❖ Experimentos com mamíferos.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADLER, V. E.; UEBEL, E. C.; SCHMUTTERER, H.; ARCHES, K. R. S. Effects of Margosan-O on six species of cockroaches (Orthoptera: Blaberidae, Blattidae) and Blattellidae. In: SCHMUTTERER, H & ARCHES, K.R.S. (Eds.). Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A.). Another tropical plants. Proceedings Intern. Neem Conference, p. 387-392, 1986.

ALLISON, J. S.; LEWIS-SMITH, R. I. The vegetation of Elephant Island, South Shetland Islands. British Antarctic Survey Bulletin 33/34: 185 – 212, 1973.

ATCPS. A proposal prepared by Brazil and Poland, in co-ordination with Ecuador and Peru, that Admiralty Bay, King George Island (South Shetland Island) is designated as an Antarctic Specially Managed Area (ASMA). Twentieth Antarctic Treaty Consultative Meeting, Utrecht, 29 April – 10 May, 1996.

ÁVILA, D. S.; GUBERT, P.; PALMA, A.; COLLE, D.; ALVES, D.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T.; SOARES, F. A. A. An organotellurium compound with antioxidant activity against excitotoxic agents without neurotoxic effects in brain of rats. *Brain Res Bull.* v.76, p.114–123, 2008.

BASTIANETTO, S.; QUIRION, R. Natural Extracts as Possible Protective Agents of Brain Aging. *Neurobiol Aging*, v.23, p. 891–897, 2002.

BAUMANN, E.; GERSCH, M. Purification and identification of neurohormone D, a heart accelerating peptide from the corpora cardiaca of the cockroach *Periplaneta americana*; *Insect Biochemistry*, p. 7-14. 1982.

BELO, M.; BARBOSA, J. C.; BRAGANHOLI, D.; PEREIRA P. S.; BERTONI, B. W.; ZINGARETTI, S.; BELEBONI, R. O. Avaliação do efeito bioinseticida dos extratos de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Apocynaceae) e *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) sobre a mosca *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) (Gupta, 1970); *Revista Brasileira de Biociências*, p. 235-239, 2009.

BERRY, J.; GANTAR, M.; PEREZ, M, BERRY, G.; NORIEGA, F. Cyanobacterial Toxins as Allelochemicals with Potential Applications as Algacides, Herbicides and Insecticides; *Marine Drugs*, p. 117-146, 2008.

BHATT, D.; COOPER, R. L. The pharmacological and physiological profile of glutamate receptors at the *Drosophila* larval neuromuscular junction, *Physiological Entomology*, v.30, Issue 2, pages 205–210, 2005.

BOWN, A. W.; MACGREGOR, K. E., SHELP, B. J. Gamma- aminobutyrate:defense against invertebrate pest? *Trends in Plant Science*, 11(9): 42- 427, 2006.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.

BRASIL. Decreto n.º 4.074 de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802/89 (lei federal dos agrotóxicos). Brasília, Diário Oficial da União de 08/01/2002.

BRASIL. Lei n.º 7.802 de 12 de julho de 1989. “Lei federal dos agrotóxicos”. Brasília, Diário Oficial da União de 12/07/1989.

BRASIL. Ministério da Cultura, Pecuária e Abastecimento. Anuário Estatístico da Agroenergia 2012. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Desenvolvimento\\_Sustentavel/Agroenergia/anuario\\_agroenergia\\_web\\_2012.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/anuario_agroenergia_web_2012.pdf). Acesso em 04 outubro 2014.

BRAVO, L. A; ULLOA, N.; ZÚNIGA, G. E; CASANOVA, A.; CORCUERA, L. J; ALBERDI, M. Cold resistance in Antarctic angiosperms. *Physiologia Plantarum*, v. 111, p. 55–65, 2001.

BRUFAUL, G.; CANELA, A. M.; RAFECAS, M. Physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*, New York. v. 28, n. 4, p. 217-225, 2008.

BULLANGPOTI, V., VISETSON, S., MILNE, M., MILNE, J., PORNBANLUALAP, S., SUDTHONGKONGS, C., YAYAPAT, S. The novel botanical insecticide for the control brown plant hopper. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 71: 475–481. 2006.

CLIFTON, P. Plant sterol and stanols – comparison and contrasts. Steroids versus stanols in cholesterol-lowering: is there a difference? *Atherosclerosis supplements*. Amsterdam, v.3, n.3, p. 5-9, 2002.

CULL-CANDY, S. G.; MILEDI, R. Junctional and extra junction al membrane channels activated by GABA in locust muscle fibres. *Proc.R. Soc. Lond.* 211: p. 527-535, 1981.

DAVIES, T. G. E.; FIELD, L. M.; USHERWOOD, P. N. R.; WILLIAMSON, M. S. DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels., *IUBMB Life.*, v. 59(3): 151–162, 2007.

DELPUECH, J.; BARDON, C.; BOULÉTREAU, M. Increase of the behavioral response to kairomones by the parasitoid wasp *Leptopilina heterotoma* surviving insecticides. *Archives Environmental Contamination Toxicology* 49:186-191,2005.

DOUGLAS, W. W.; PATON, W. D. M. The mechanisms of motor endplate depolarization due to a cholinesterase-inhibitory drug. *J. Phy8iol.* 124, 325-344, 1954.

EL-NAGAR, M. E. A.; ABDEL-SATTAR, M. M.; MOSALLAM, S. S. Toxicity of colocynthin and hydrated colocynthin from alcoholic extracts of *Citrullus colocynthis* pulp. *J. Egypt Soc. Parasitol.*, v.19, n.1, p.179-185, 1989.

FRANCELINO, M. R.; PEREIRA, A. B.; FIRME, M. M.; SPIELMANN, A. A.; BREMER, U. F.; TONIN, A.; SCHAEFER, C. E. G. R. Influência da radiação solar na distribuição das comunidades vegetais nas áreas livres de gelo da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica. In: *Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, 13. (SBSR), 2007, Florianópolis. Anais. São José dos Campos: INPE, 2007. p. 2637-2642. CDROM; On-line. ISBN 978-85-17-00031-7. 2007. Disponível em: <<http://marte.dpi.inpe.br/col/dpi.inpe.br/sbsr@80/2006/11.16.02.07/doc/2637-2642>> Acesso em: 08 nov. 2014.

FERRON, F. A.; SIMÕES, J. C.; AQUINO, F. E. Série Temporal de Temperatura atmosférica para a Ilha Rei George, Antártica. *Revista do Departamento de Geografia* 14: 25-32. 2001.

FURMANCZM, K.; OCHYRA, R. Plant communities of the Admiralty Bay (King George Island, South Shetland Islands, Antarctic) I. Jasnorszewski Gardens. *Pol. Polar Res.* 3(1-2): 25-39, 1982.

GAL, R.; LIBERSAT, F. A. Wasp manipulates neuronal activity in the sub-esophageal ganglion to decrease the drive for walking in its cockroach prey. *Curr Biol* 18(12):877–882, 2010.

GALLO, L. G.; ALLEE, L. L.; GIBSON, D. M. Insecticidal effectiveness of *Mammea americana* (Guttiferae) extracts on larvae of *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) and *Tricloplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Econ. Bot.*, v.50, n.2, p.236-242, 1996.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.; DE BAPTISTA, G.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.; ZUCCHI, R.; ALVES, S.; VENDRAMIM, J.; MARCHINI, L.; LOPES, J.; OMOTO, C. *Entomologia agrícola*. FEALQ. Piracicaba- SP. 10: 920. 2002.

GRUE, C.; GIBERT, P.; SEELEY, M. Neurophysiological and behavioral changes in non-target wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticides: Thermoregulation, food consumption and reproduction. *Amer Zool* 37: 369-388, 1997.

GUARDIOLA, V. G.; MIGUEL, P. DE; PRIMO, E. Repellent activity against *Blattella germanica* of components of *Schinus molle*. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, v.30, n.3, p.341-346, 1990.

GUEZ, D.; ZHANG, S.; SRINIVASAN, M. Methyl parathion modifies foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera*). *Ecotoxicology* 14:431-437. 2005.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. *The insects: an outline of entomology*. Blackweel Publishing Ltd. Estados Unidos. 3rd Ed, 2005.

HAUBRUDGE, E.; AMICHOT, M.; CUANY, A.; BERGE, J. B.; ARNAUD, L. Purification and characterization of a carboxylesterase involved in malathion-specific resistance from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1181-1190. 2002.

HAY, M. E. Fish-seaweed interactions on coral reefs: effects of herbivorous fishes and adaptations of their prey. In: Sale P. F. (Ed.). *The ecology of fishes on coral reefs*. Academic Press, San Diego, California, p. 96-119, 1991.

HAY, M. E. Marine chemical ecology: what's know and what's next? *Journal of Experimental Marine biology and ecology*, 200: 103-134, 1996.

HAY, M. E.; FENICAL, W. Marine plant-herbivore interactions: the ecology of chemical defense. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 19: 111-145, 1988.

HAY, M. E.; STEINBERG, P. D., The chemical ecology of plant-herbivore interactions in marine versus terrestrial communities, *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*, 2 ed, p. 371-413, 1992.

HICKS, K. B.; MOREAU, R. A. Phytosterols and phytostanols: functional food cholesterol busters. *Food Technology*, 55(1), 63–67, 2001.

HOOKER, J. D.; WILSON, W. Musci Antarcticici, being characters wit brief descriptions of the new species of mosses discovered during the voyage of H. M. Discovery Ships, Erebus and Terror, in the southern circumpolar regions, together with those of Tasmania and New Zealand Lond. *Journal of Botany* 3: 533-556, 1844.

HU, S. S. Moss communities' types and species diversity of Southern Fields Peninsula (King George Island, South Shetland Islands) Antarctica. *J. Hattori Bot. Lab.* 84: 187-198, 1998.

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

IBGE. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável – Brasil 2012. Disponível em <[ftp://geoftp.ibge.gov.br/documentos/recursos\\_naturais/indicadores\\_desenvolvimento\\_sustentavel/2012/ids2012.pdf](ftp://geoftp.ibge.gov.br/documentos/recursos_naturais/indicadores_desenvolvimento_sustentavel/2012/ids2012.pdf)> Acesso em 04 out. 2014.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, v.19, p.603-8, 2000.

ITO, V. M. Concentração de Tocoferóis e Fitoesteróis apartir do destilado desodorizado de óleos vegetais através do processo de destilação molecular; Tese de Doutorado em Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

JAMES, R. R.; XU, J. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *J. Invertbr. Pathol.* 109(2), 175-82; 2012.

KAGABU S.; ISHIHARA S.; HIEDA Y.; NISHIMURAK, A.; 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.

- KAMARAJ, C.; RAHUMAN, A. A.; BAGAVAN, A. Screening for antifeedant and larvicidal activity of plant extracts against *Helicoverpa armigera* (Hubner), *Sylepta derogata* (F.) and *Anopheles stephensi* (Liston); *Parasitology Research* 103. 1361-8, 2008.
- KORNHUBER, J.; WELLER, M. Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. *Biol Psychiatry*, v.41, n.2, Jan 15, p.135-44, 1997.
- KOVACIK, L.; PEREIRA, A. B. Green alga *Prasiola crispa* and its lichenized form *Mastodia tessellata* in Antarctic environment: general aspects. *Nova Hedwigia. Beiheft* 123: 465-478. 2001.
- KUBO, Y. Dual signaling is differentially activated by different active states of the metabotropic glutamate receptor 1 $\alpha$ . University of California School of Medicine, San Francisco, CA, vol. 103 no. 4. 1124–1128, doi: 10.1073/pnas.0505925103, 2005.
- KUSHWAHA V. B.; MAURYA, S. Biological utilities of *Parthenium hysterophorus*. *Journal of Applied and Natural Science* 4(1), 137–143, 2012.
- LAW, M. Plant sterol and stanol margarines and health. *Br. Med. J.*, 30, 861-864, 2000.
- LEWIS-SMITH, R. I. Vegetation of the South Orkney Island with particular references to Signy Island. *British Antarctic Survey Scientific Reports* 68: 1-124, 1972.
- LIBERSAT, F. Wasp uses venom cocktail to manipulate the behavior of its cockroach prey. *J. Comp. Physiol.* 189: 497-508, 2003.
- LIBERSAT, F.; WEISEL-EICHLERA, H. G. Venom of a parasitoid wasp induces prolonged grooming in the cockroach. *The Journal of Experimental Biology*. 202: 957-964, 1999.
- LIMA, R. R. Informações sobre duas espécies de timbó *Derris urucu* (Killip et Smith) MacBride e *Derris nicou* (Killip et Smith) MacBride, como plantas inseticidas. Belém, EMBRAPA-CPATU, Documentos, 42, 23 p. 1987.
- LINDSAY, D. C. Vegetation of the South Shetland Island. *Brit. Antarc. Surv. Bull.* 25: 59-83, 1971.
- LONGTON, R. E. Bryophyte Vegetation in Polar Regions. In: A. J. E. Smith (ed.) *Bryophyte Ecology*. Chapman and Hall, London, p. 122-165, 1982.



LUCHO, A. P. B.; FREITAS, T. C.; PERDOMO JR., J. D.; STURMER, G.; HEBERLE, M. H.; CORREA, M. S.; DAL BELO, C. A. Avaliação da atividade bloqueadora neuromuscular do extrato etanólico de *Araucaria angustifolia*. In: II SIEPE Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2010, Uruguaiana. Livro de Resumos.

MATTOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza: Edições UFC, 128p, 1988.

MAYER, M. L.; G. L. WESTBROOK. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol*, v.28, n.3, p.197-276, 1987.

MC CLINTOCK J. M.; BAKER, B. J. (Eds.). *Marine chemical ecology*. CRC Press, p. 610, 2001.

MENDONÇA, P. M.; LIMA, M. G.; ALBUQUERQUE, L. R.; CARVALHO, M. G.; QUEIROZ, M. M. Effects of latex from "*Amapazeiro*" *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) on blowfly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) post-embryonic development; *Veterinary Parasitology* 178 379-82, 2011.

MIKOLAJCZAK, K. L.; REED, D. K.; J. CHEM. Extractives of seeds of the Meliaceae: Effects on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Acalymma vittatum* (F.), and *Artemia salina* Leach. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v.13, p.99-111, 1987.

MIYAZAWA, M.; ISHIKAWA, Y.; KASAHARA, H.; YAMANAKA, J.; KAMEOKA, H.; An insect growth inhibitory lignan from flower buds of *Magnolia fargesii*; *Phytochemistry* 35 611-613, 1994.

MOSTAERT, A. S.; HIGGINS, M. J.; FUKUMA, T.; RINDI, F.; JARVIS, S. P. Nanoscale mechanical characterisation of amyloid fibrils discovered in a natural adhesive. *J Biol Phys* [S.I.], v. 32, p. 393-401, 2006.

NAKANISHI, S. Molecular diversity of the glutamate receptors. *Clin Neuropharmacol*, v.15 Suppl 1 Pt A, p.4A-5A, 1992.

NICOLAUS, I.; LEE, H. Low acute exposure to organophosphate produces long-term changes in bird feeding behavior. *Ecol Appl* 9: 1039-1049, 1999.

OCHYRA, R. On the Antarctic species of the family Orthotrichaceae. *Lindbergia* 11: 141–146, 1985.

OCHYRA, R. The moss flora of King George Island Antarctica. Polish Academy of Sciences. Cracow, 1998.

O`GARA, B. A.; DREWES, C. D. Modulation of tension production by octopamine in the methatoraxic dorsal longitudinal muscle of the cricket *Teleogryllus oceanus*. *J. Exp. Biol.*, 149, 161-176, 1990.

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

PATEL, R.; GARG, R.; ERANDE, S.; MARU, G. B. Chemopreventive herbal antioxidants: current status and future perspectives. *J Clin Biochem Nutr.* v. 40, p. 82–91, 2007.

PAUL, V. J. Feeding deterrent effects of algal natural products *Bull mar Sci. Toxic acetyl.* 41. 514-522, 1987.

PAUL. V. J.; FENICAL, W. Chemical defense in tropical green algae, order Caulerpales. *Mar Ecol. Prog. Ser.* 34: 157-169, 1986.

PAUL, V. J.; FENICAL, W. New bioactive terpenoids from tropical Pacific marine algae of the family Udoteaceae (Chlorophyta). *Phytochem.* 24: 2239-2243, 1987.

PAUL, V. J.; PUGLISI, M. P. Chemical mediation of interactions among marine organisms. *Natural Products Report*, 21: 189-209, 2004.

PAUL, V. J.; VAN ALSTYNE, K. L. Activation of Chemical Defenses In Tropical Green Algae *Halimeda* spp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 160: 191 -203, 1992.

PEREIRA, R. C. A química defensiva como potencial invasor de espécies marinhas. In: Silva J. S. V.; R. C. C. L. Souza (Eds.), *Água de lastro e bioinvasão*. Interciência, Rio de Janeiro, p. 173-184, 2004.

PEREIRA, R. C. O arsenal químico das algas. *Ciência Hoje*, 16: 37-43, 1993.

PEREIRA, R. P.; FACHINETTO, R.; PRESTES, A.S.; PUNTEL, R.L.; SILVA, G. N. S.; HEINZMANN B. M.; BOSCHETTI, T. K.; ATHAYDE, M. L.; BURGER, M. E.; MOREL, A. F.; MORSH, V.M.; ROCHA, J. B. T. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citrates*. *Neurochem Res.* v. 34, p. 973– 983, 2009.

PEREIRA, A. B.; PUTZKE, J. Floristic composition of Stinker Point, Elephant Island, Antarctica. *Kor. J. Polar Res.* 5(2): 37-47, 1994.

PEREIRA, B. K.; ROSA., R.M.; DA SILVA; J.; GUECHEVA, T. N.; OLIVEIRA, I. M.; IANISTCKI, M.; BENVEGNU, V. C.; FURTADO, G. V.; FERRAZ, A.; RICHTER, M. F.; SCHRODER, N.; PEREIRA, A. B.; HENRIQUES, J. A. Protective effects of three extracts from antarctic plants against ultraviolet radiation in several biological models. *J Photochem Photobiol B [S.I.]*, v. 96, p. 117-129, 2009.

POLSINELLI, G. A, SINGH, S. K.; MISHRA R. K.; SURANYI, R, RAGSDALE, D. W. Pang Y P and Brimijoin S 2010 Insect-specific irreversible inhibitors of acetylcholinesterase in pests including the bed bug, the eastern yellowjacket, German and American cockroaches, and the confused flour beetle; *Chemico-Biological Interactions* 187 142-7, 2010.

PRABHAKARAN, S.K.; KAMBLE, S.T. Effects of azadirachtin on different strains of german cockroach (Dictyoptera: Blattelliae). *Environ. Entomol.*, v.25, n.1, p.130134, 1996.

PUTZKE, J.; PEREIRA, A. B. Mosses of King George Island. *Pesquisa Antártica. Brasileira* 2(1): 17-71, 1995.

PUTZKE, J.; PEREIRA, A. B. The Antarctic Mosses with special reference to the South Shetland Islands. Canoas, Rio Grande do Sul: EDULBRA, 186p, 2001.

PUTZKE, L. M. T.; PEREIRA, A. B. Mosses communities of Rip Point in Northern Nelson Island, Antarctica. *Pesquisa Antártica Brasileira* 3(1). 104- 115, 1995.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. *Fisiologia Animal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RAVI, K.; SITA, D.; JANANRTHANAN, R. Bioactivity of essential oils and sesquiterpenes of *Chloroxylon swietenia* against the *Helicoverpa armigera* of essential oils and

sequiterpenes of choloroxylon switerion dc against the helicoverpa armigera; Curr Sci 93 544-548, 2007.

RAYMOND-DELPECH, V.; MATSUDA, K.; SATTELLE, B.; RAUJ, J.; SATTELLE, D. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invertebrate Neuroscience* 5:1, 2005.

RYAN, M. F.; BYRN, O. Plant insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J. Chem. Ecol.*, 14(10): 1965-75. 1988.

RODRÍGUEZ, H. C.; VENDRAMIM, J. D. Toxicidad de extractos acuosos de meliáceas en larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797). *Avances en La Investigacion*, [S.l.], v. 1, p. 61-63, 1995.

ROEL, A. R.; VENDRAMIM, J. D.; FRIGHETTO, R. M.; FRIGHETTO, N. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* (Swartz) (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Londrina*, v. 29, p. 799-808, 2000.

SANTANA, R, M. Mapeamento de geounidades do meio físico e biótico em área da Antártica Marítim (Doutorado em Engenharia Civil) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

SINDAG. Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. Vendas de defensivos agrícolas são recordes e vão a US\$ 8,5 bi em 2011. Disponível em: [http://www.sindag.com.br/noticia.php?News\\_ID=2256](http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2256), acessado em 24 de setembro de 2014.

SIMÕES, J. C.; FERRON F. A.; BRAUN M. J.; ARIGONY-NETO F. E.; AQUINO, A. For the Antarctic Specially Managed Area (ASMA) of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Geo-Spatial Inf. Sc.Quar.* 2: 8-14, 2001.

SODERLUND, M. D.; Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of Toxicology*, 86:165-81, 2012.

SUDATI, J. H.; FACHINETTO, R.; PEREIRA, R. P.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; SOARES, F. A.; BARBOSA, N. B. V.; ROCHA, J. B. T. In vitro Antioxidant Activity of *Valeriana officinalis* Against Different Neurotoxic Agents. *Neurochem Res* doi: 10.1007/s11064-009-9917-8, 2009.

- SUJATHA, S. Essential oil and its insecticidal activity of medicinal aromatic plant *Vetiveria zizanioides* (L.) against the red flour beetle *Tribolium castaneum* (herbst). *Asian Journal of Agricultural Sciences* 2. 84-88, 2010.
- SHASANY, A.K. et al. Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon Winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v.47, n.5, p.553-559, 2000.
- STANISCUASKI, F.; CARLINI, C. R. Plant ureases and related peptides: understanding their entomotoxic properties. *Toxins (Basel)*. 4: 55-67, 2012.
- 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.
- STÜRMER, G. D. Avaliação dos efeitos induzidos por doses subletais do organofosforado Triclorfon sobre o sistema nervoso de baratas da espécie *Phoetalia pallida*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, São Gabriel, RS, 2012.
- STÜRMER, G. D.; FREITAS, T.C.; HEBERLE, M. A.; ASSIS, D. R.; Vinadé, L.; PEREIRA, A. P.; FRANCO, J. L.; DAL BELO, C. A. Modulation of dopaminergic neurotransmission induced by sublethal Doses of the organophosphate trichlorfon in cockroaches. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Elsevier. p.56-62. 2014.
- TABATA R. C.; WILSON, J. M.; LY, P. Chronic Exposure to Dietary Sterol Glucosides is Neurotoxic to Motor Neurons and Induces an ALS-PDC Phenotype. *Neuromolecular Med*; 10(1): 24-39, 2008.
- TATUR, A; MYRCHA, A; NIEGODZIZ, J. Formation of abandoned penguin rookery ecosystems in the maritime antarctic. *Polar Biol* 17:405-417, 1997.
- TAYLOR, D.; NEWBURGH, R. The synthesis and content of neurotransmitters and their effect on cyclic nucleotide accumulation in the central nervous system of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry*. 9:265-272, 1979.

- TSAO, R.; R EUBER, M.; JOHNSON , L.; COATS, J. R. Insecticidal toxicities of glucosinolate-containing extracts from cramble seeds. *J. Agric. Entomol.*, v.13, n.2, p.109-120, 1996.
- VALLES, S.; KOEHLER, P. Insecticides Used in the Urban Environment: Mode of Action. University of Florida. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN07700.pdf>, 2011.
- VIEGAS JUNIOR, C. Torpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova* 26:390-400, 2003.
- VIJVERBERG, H.P.M and BERKEN, W.N. 1990 Neurotoxic effects and the mode of action of pyrethroids insecticides. *Toxicology*, Amsterdam, 21:105-125.
- WAGNER, C.; FACHINETTO, R.; DALLA CORTE, C. L.; BRITO, V. B.; SEVERO, D.; DIAS, G. O. C.; MOREL, A. F.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. *Brain Res* 1107:192– 198, 2006.
- WASHIO, H. Glutamate receptors on the somata of dorsal unpaired median neurons in cockroach, *Periplaneta americana*, thoracic ganglia. *Zool Sci* 19: 153–162, 2002.
- WEISEL-EICHLER, A.; HASPEL, G.; LIBERSAT, F. Venom of a parasitoid wasp induces prolonged grooming in the cockroach. *The Journal of Experimental Biology*, 202: 957-64, 1999.
- WIESBROOK, M.L. Natural indeed: are natural insecticides safer and better than conventional insecticides? *Illinois Pesticide Review*, Urbana, v.17, n.3, p.1-3, 2004.
- WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* v.36, p.838–849, 2004.
- ZEMOLIN, A. P. P. Papel de selenoproteínas na neurotoxicidade induzida por metilmercúrio, em camundongos, e potencial bioinseticida de uma alga da Antártica (*Prasiola crispa*) em modelo de *Drosophila melanogaster*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, São Gabriel, RS, 2012.

ZOLOTAR, R. M.; BYKHOVETS, A.I.; KASHKAN, Z. N.; CHERNOV, Y.G.; KOVGANKO, N.V. Structure-activity relationship of insecticidal steroids. VII. C-7-oxidized  $\beta$ -sitosterol and stigmasterols. Chem. Nat. Comp., 38: 171-174, 2002.

## 9. ANEXOS



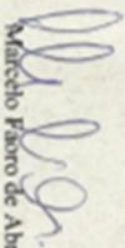
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

## CERTIFICADO

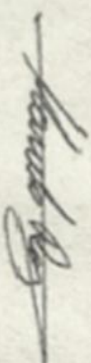
GRAZIELA HOLKEM LORENZI, RAQUEL SOARES OLIVEIRA, MICHELE  
STACH CORREA, CARLOS BRITO, VALÉRIA LANEUVILLE TEIXEIRA e  
CHARISTON ANDRÉ DAL BELO

apresentaram o trabalho *CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E NEUROFARMACOLÓGICA DE COMPOSTOS  
INSETICIDAS ISOLADOS DE PRASIOLA CRISPA* no IV Workshop sobre Produtos Naturais, promovido(a) pelo(a)  
Instituto de Biotecnologia, pelo(a) Centro de Ciências Agrárias e Biológicas e pela Pró-Reitoria Acadêmica da  
Universidade de Caxias do Sul, realizado no período de 7 a 9 de maio de 2014.

Caxias do Sul, 9 de maio de 2014.



Marcelo Fagoro de Abreu  
Coordenador-geral de Extensão



Marcelo Rossato  
Pró-Reitor Acadêmico

# 46<sup>o</sup> BRAZILIAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS

# CERTIFICATE

We certify that the work NEUROPHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION OF HEXANIC EXTRACT ISOLATED FROM *Prasiola crispera* ANTARCTIC ALGAE, authorship of Lorenzi GH1, Oliveira RS1, Almeida CGM1, Correa MS1, Pereira AB1, Ramos BC12, Teixeira VL2, Dal Belo CA1 - IUNIPAMPA - Lanetox, ZALGAMAR - UFF, was presented as poster at the 46th Brazilian Congress on Pharmacology and Experimental Therapeutics held in Fortaleza, CE, from October 21 to 24 - 2014.

*Mauro M. Teixeira*

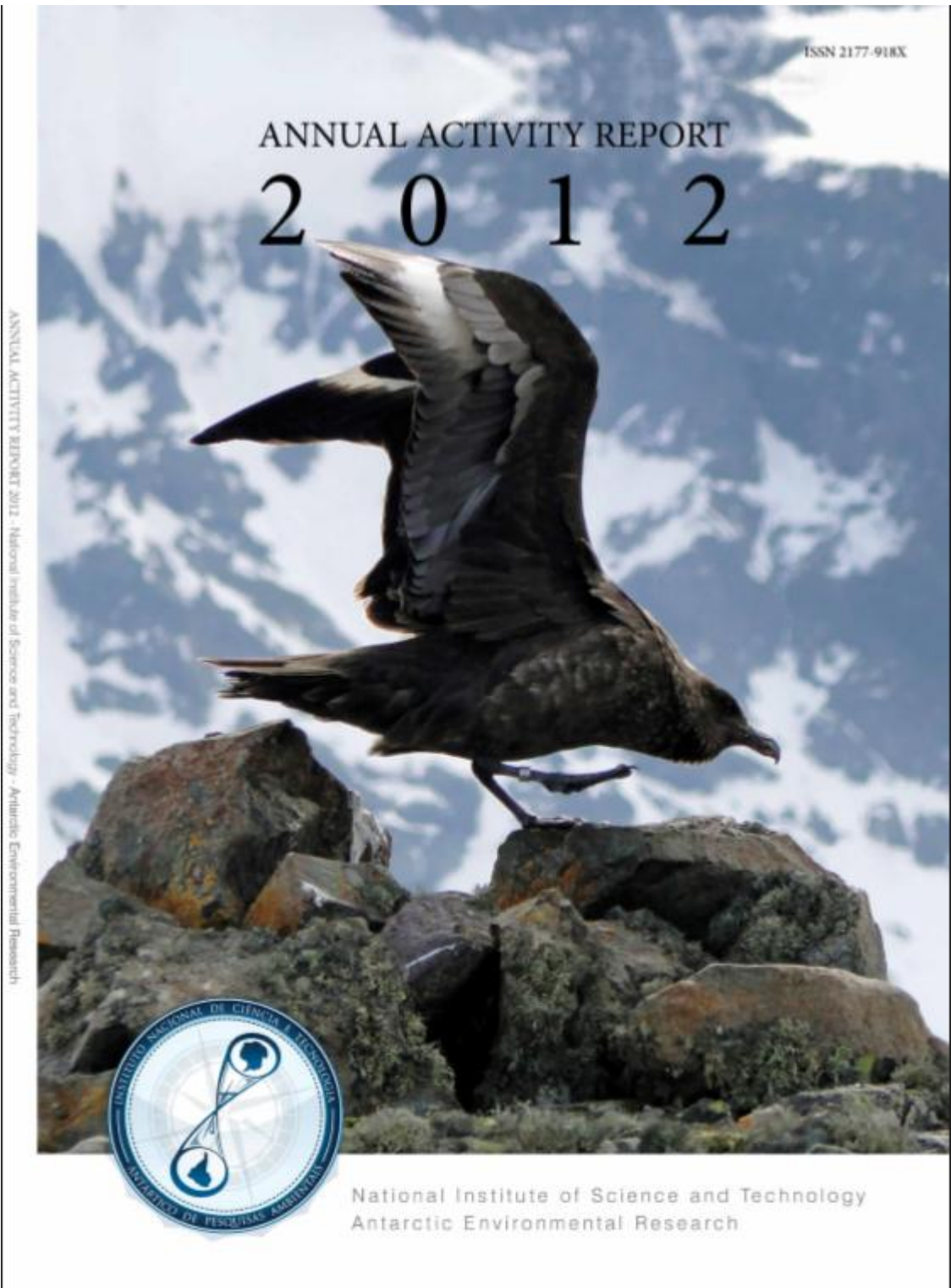
MAURO M. TEIXEIRA  
PRESIDENT SBFTE



21-24 OCTOBER 2014

From Cell Biology to Therapeutics

Fortaleza - CE - Brazil



ISSN 2177-918X

ANNUAL ACTIVITY REPORT

2 0 1 2

ANNUAL ACTIVITY REPORT 2012 - National Institute of Science and Technology - Antarctic Environmental Research



National Institute of Science and Technology  
Antarctic Environmental Research



## Annual Activity Report 2012

### Expedient

<b>Editors</b>	Yocle Yonashigue Valentin – IQ/UFRJ Adriana Galindo Daito – IQ/UFRJ Helena Passari Lavrado – IQ/UFRJ
<b>Production</b>	Edilene Cubo
<b>Proofreader</b>	Yocle Yonashigue Valentin – IQ/UFRJ Adriana Galindo Daito – IQ/UFRJ Eduardo de Almeida Xavier – IQ/UFRJ
<b>Collaboration</b>	Daniela Rezende Rapinha Fernandes – IQ/UFRJ Rafael Bendayan de Moura – UFRG Tais Maria de Souza Campos – IQ/UFRJ
<b>Photograph Courtesy</b>	Adriana Galindo Daito (Backgrounds: Presentation, Introduction, Thematic Area 2, Thematic Area 3, Facts and Figures) Andre Monnerat Lanna (Backgrounds: Publications, Emails) Jagueline Shummelhaus (Backgrounds: Science Highlights, Education and Outreach Activities) Luz Fernando Würdig Roach (Backgrounds: Summary, Thematic Area 4) Roberta da Cruz Pluta (Background: cover) Fernanda Caminha Leal Valls (Backgrounds: Expedient, Thematic Area 1)

The editors express their gratitude to the INCT-APA colleagues that contribute to this edition. This document was prepared as an account of work done by INCT-APA users and staff. Whilst the document is believed to contain correct information, neither INCT-APA nor any of its employees make any warranty, expresses, implies or assumes any legal responsibility for the accuracy, completeness, or usefulness of any information, apparatus, product, or process disclosed within. As well, the use of this material does not infringe any privately owned copyrights.

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia  
Antártico de Pesquisas Ambientais (INCT-AIPA)



**INCT-AIPA Headquarters** Instituto de Biologia, Centro de Ciências de Saúde (CCS)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)  
Av. Carlos Chagas Filho, 373 - Sala A1-94 - Bloco A  
Ilha do Fundão, Cidade Universitária - CEP: 21941-902  
Rio de Janeiro - RJ, Brazil

**Telephonal Fax** +55 21 2562-6332 / +55 21 2562-6302

**E-mail** yocle@biologia.ufrj.br; inctapa@gmail.com

**Home Page** www.biologia.ufrj.br/inct-antartico

#### Management Committee

**General Coordinator**  
Yocle Yonashigue Valentin – IQ/UFRJ

**Vice-coordinator**  
Rosilaine Carmela Monteiro – IQ/USP

**Thematic Area 1 (Antarctic Atmosphere)**  
Naiara Maria Pass Lima – IQ/USP (Team Leader)  
Emilia Cordeiro – Mecklenburg/USP (Vice-team Leader)

**Thematic Area 2 (Antarctic Terrestrial Environment)**  
Antonio Batista Pereira – UNIPAMPA (Team Leader)  
Mara Virginia Patry – UNISIVOS (Vice-team Leader)

**Thematic Area 3 (Antarctic Marine Environment)**  
Helena Passari Lavrado – IQ/UFRJ (Team Leader)  
Edson Rodrigues – UNITAU (Vice-team Leader)

**Thematic Area 4 (Environmental Management)**  
Cristina Engel de Alencar – UFES (Team Leader)  
Alexandre de Avila Lertijo – UNIVALI (Vice-team Leader)

**Education and Outreach Activities – Team Leader**  
Célia Maria Ferreira – IQ/UFRJ

**International Scientific Assessor**  
Eduardo Rezende Secchi – FURG

**Project Manager Assessor**  
Adriana Galindo Daito – IQ/UFRJ

**Executive Office**  
Celia Maria de Silva Balhar – IQ/UFRJ

**Finance Technical Support**  
Mara Helena Amaral de Silva – IQCC/UFRJ  
Marta de Oliveira Farias – IQCC/UFRJ

#### Support



Ministério do  
Meio Ambiente

Ministério da  
Ciência, Tecnologia  
e Inovação



#### Collaborations



#### Production

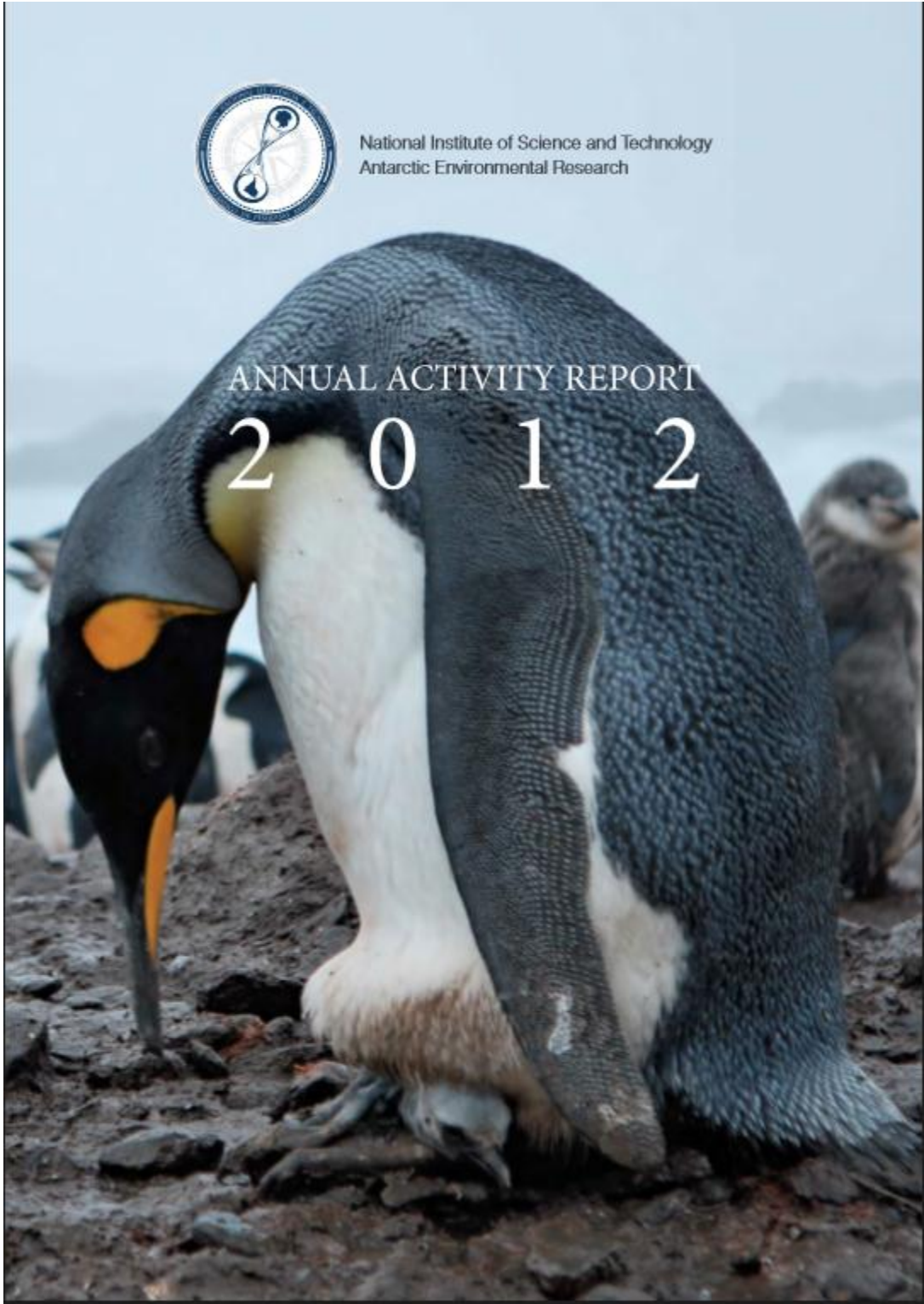
editora **cubo**  
soluções para o universo científico



National Institute of Science and Technology  
Antarctic Environmental Research

ANNUAL ACTIVITY REPORT

2 0 1 2



## Cataloguing Card

I594

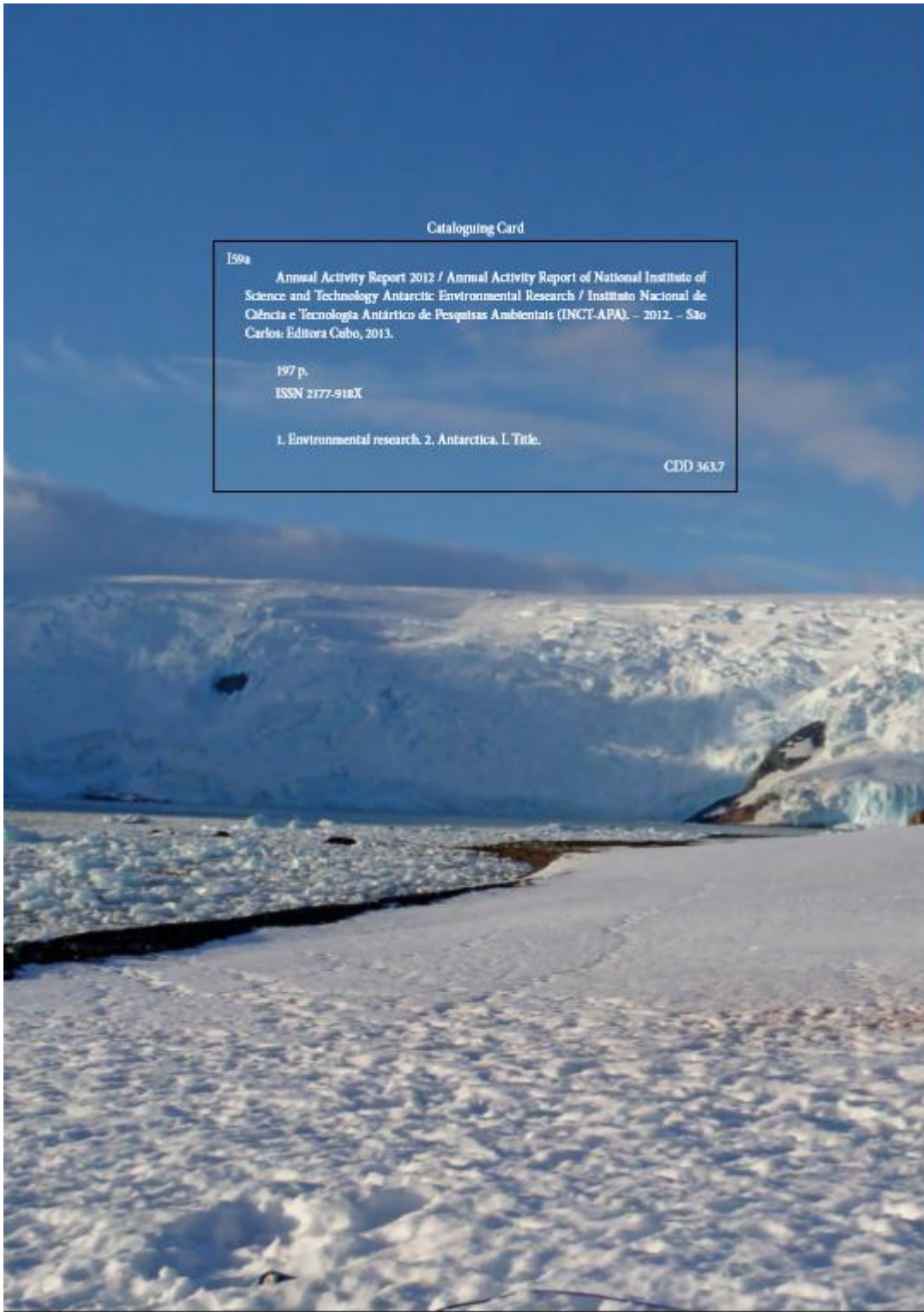
Annual Activity Report 2012 / Annual Activity Report of National Institute of Science and Technology Antarctic Environmental Research / Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais (INCT-APA). - 2012. - Sao Carlos: Editora Cubo, 2013.

197 p.

ISSN 2177-918X

1. Environmental research. 2. Antarctica. I. Title.

CDD 363.7





## 2

## NEUROTOXIC EFFECT INDUCED BY *Prasiola crispa* ANTARCTIC-ALGAE METHANOLIC EXTRACT IN COCKROACHES

Graziela Holkem Lorensi<sup>2</sup>, Raquel Soares Oliveira<sup>1</sup>, Grazielle Daiane Stürmer<sup>1</sup>, Thais Posser<sup>1</sup>, Jefferson Luis Franco<sup>1</sup>, Valéria Laneuville Teixeira<sup>2</sup>, Antonio Batista Pereira<sup>1</sup>, Cháriston André Dal Belo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro Interdisciplinar de Pesquisa em Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa – Unipampa, Campus São Gabriel, Av. Antônio Tilha, 1847, CEP 97300-000, São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup>Centro de Estudos Gerais, Universidade Federal Fluminense – UFF, Rua Outeiro São João Batista, CEP 24.210-130 Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

\*e-mail: ctabat@unipampa.edu.br

**Abstract:** In this work we have demonstrated the direct neurotoxic effect of *Prasiola crispa* methanolic extract at cockroach neuromuscular junctions. At *in vivo* cockroach neuromuscular preparations the extract induced a progressive and irreversible neuromuscular blockade, which was preceded by an increase in the muscular tonus with the appearance of spontaneous twitches. The previous application of chloral hydrate, a *n*-methyl-*d*-aspartate receptor blocker, increased the time to blockade of the muscle twitches by 50%, whereas it extinguished both the previous increase of tonus and the appearance of spontaneous twitches, before the onset of neuromuscular blockade. Together, these results suggest that *P. crispa* extract induced an insecticide activity by acting mainly at insect neuromuscular junctions. Therefore, the NMDA receptors must be the target of this pharmacological interaction. A further phytochemical and pharmacological investigation will increase the knowledge about the cellular and molecular aspects of *P. crispa* insecticide effect.

**Keywords:** *Prasiola crispa*, Antarctic Algae, Acurotoxic Effect, Cockroaches, Neuromuscular Junctions

### Introduction

From the biological point of view, the co-evolution between plants and insects are recognized (Ryan & Byrne, 1988) and may explain the selection of a broad spectrum of secondary metabolites used as defense (i.e. one or a few plant chemicals antagonistic to insects) (Bown *et al.*, 2006). Nowadays, there is a major motivation to promote research on botanical insecticides with the low environmental cost and minimal ecological impact, and a demand for healthier products. Cockroaches are primitive pest insects, and most of their functional systems are fairly unspecialized. The cockroach nervous system can be used not only to understand the physiological aspects between insect and natural compounds, but also as an important model of biomedical research (Stankiewicz *et al.*, 2012).

The thalloid green alga *Prasiola crispa* is abundant on the upper shores of Antarctica, often near to and on penguin benches. In this habitat, the alga is exposed to a number of stressful conditions, which may give rise to the development of multiple survival strategies, including the production of different secondary metabolites (Harwood & Gushina, 2009; Pereira *et al.*, 2009). The studies targeting *P. crispa* biological activity are scarce, and indeed, our group was the pioneer in investigating the inherent insecticide activity of this alga (Posser *et al.*, 2010). Despite the wealth of literature on the ecological and pesticidal effects, few studies of plant extracts have considered their mechanism of action. Therefore, to the best of our knowledge, the present study is likely to be the first on investigating the cellular aspects involved in the



action insecticide actions of Antarctic algae in cockroaches. The aim of this work was to investigate the mechanism involved in the insecticide effect of *Prasiola crispa* methanolic extract, especially those related to the cellular interactions at insect neuromuscular junctions.

## Materials and Methods

### Animals

Cockroaches (*Leurolestes circumvagans*) were reared with water and food *ad libitum*, at controlled temperature (22–25°C).

### Reagents

All chemicals and reagents used were of the highest purity and were obtained from Sigma, Aldrich, Merck or BioRad.

### Plant material

*Prasiola crispa* (Lightfoot) Kützing (1843) was collected in the ice-free areas near Arctowski Polish Base Region, Admiralty Bay, King George Island (61° 50' - 62° 15' S and 57° 30' - 59° 00' W), Antarctica. The *Prasiola crispa* methanolic extract (PCME) was produced as described elsewhere (Posser *et al.*, 2010). The extracts were dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) previously to animal administration.

### *In vivo* Cockroach Metathoracic Coxal-Adductor Nerve-Muscle Preparation

We used the *in vivo* cockroach metathoracic coxal-adductor nerve-muscle preparation as biological assay (Full & Stokes, 2008). The animals were previously anesthetized by chilling (-5°C), and fixed ventral side up in Perspex plate recovered with Styrofoam by means of entomologic needles. Isometric recordings were made using a computer-based software model AQDAD (AVS Instruments, São Carlos, SP, Brazil) with a 1g force transducer model AEGAD (AVS Instruments). Supramaximal electrical stimuli (5 ms, 0.5 Hz) was delivered at nerve 5 by insertion of a bipolar Ag/AgCl electrode, coupled to a stimulator (AVS Instruments), during 120 min. Drugs (40 µL) were injected with a Hamilton syringe at the third abdominal segment.

### Statistical analysis

The results were presented as mean  $\pm$  S.E. The ANOVA/MANOVA, was used for significance ( $p < 0.05$ ). The non-parametric Student "U" test was used as a *post hoc*.

## Results

The administration of DMSO alone did not interfere with the muscle strength ( $n = 6$ ) during 120 min recordings. The injection of PCME (100, 200, 400 and 800 µg/g of animal weight) induced a dose and time-dependent neuromuscular blockade in 120 min recordings. When the minimum dose of 100 µg/g was assayed there was  $80 \pm 5\%$  blockade of twitches in 120 min recordings ( $n = 6$ ,  $p < 0.05$ ). The injection of (800 µg/g) PCME induced 100% blockade of twitch tension in 10min ( $n = 6$ ,  $p < 0.05$ ). In all doses tested, before the onset of extract neurotoxic effect, there was a previous increase of muscular tonus followed by a blockade of the twitches. The appearance of spontaneous post-twitches, during the first 30min recordings was also noticed. The addition of Chloral hydrate (40 µg/g), a *n-methyl-d-aspartate* receptor antagonist, 15 min previously to PCME (400 µg/g), increased the time required to 50% blockade of the twitches (from  $70 \pm 2$  min to  $110 \pm 3$  min,  $n = 5$ ,  $p \leq 0.05$ ). In this protocol, there was also an inhibition of the tonus increasing effect.

## Discussion

In this work we have dealt with the cellular aspects of the insecticide activity induced by *Prasiola crispa* methanolic extract. In this respect, we have confirmed this latter effect and, in addition, we observed a direct interaction of the algae biocompounds at the cockroach neuromuscular junctions.

A number of plants have been ascribed as natural insecticides and their active constituents isolated and characterized (Pavela, 2005). Such plants, synthesize several chemical constituents which act by inhibiting insect growth, feeding and by altering other important physiological parameters (Viegas Junior, 2003). In cockroaches, the neuromuscular transmission releases glutamate as chemical neurotransmitter to promote the muscle twitches by activation of the insect *n-methyl-d-aspartate* (NMDA) receptor (Peoples & Weight, 1998). According to our results, PCME induced a progressive inhibitory effect of insect muscle twitch tension that resulted in an irreversible paralysis of neuromuscular activity. Neurotoxic insecticides act in different manners in the insect nervous system. Natural and synthetic piretroids for example, act by causing a persistent activation of muscle sodium channels, inducing an irreversible and lethal depolarizing effect





(Soderlund, 2012). Others, like insect venoms, prefer the central nervous system as target, inducing a decrease in the release of the neurotransmitter dopamine to cause lethargy and motion weakness (Weisel-Eichler *et al.*, 1999). In the case of PCME, it seems that the algae biocompounds are activating the NMDA receptors at the insect end plate. The first clue for this theory comes from the observation that chloral hydrate, an NMDA blocker, is able to reduce the potency of the neuromuscular blockade induced by the algae extract. Therefore, having followed this treatment, no increase in muscular tonus was seen, indicating that NMDA receptors were not activated. In addition, the

spontaneous twitches were extinguished after chloral hydrate, which demonstrates that the depolarizing action of PCME is caused possibly by the activation of NMDA receptors. The results are of notorious importance because it reinforces the potential biotechnological application of *Prasiola crispa*. To note, NMDA-receptor subunits are particularly involved in several CNS pathologies including acute and chronic pain, stroke, head trauma, drug-induced dyskinesias, and dementia in Alzheimer's disease and Parkinson's disease (Dingledine *et al.*, 1999). The evidence that *P. crispa* possess secondary metabolites that interact with NMDA receptors not only demonstrates the cockroach

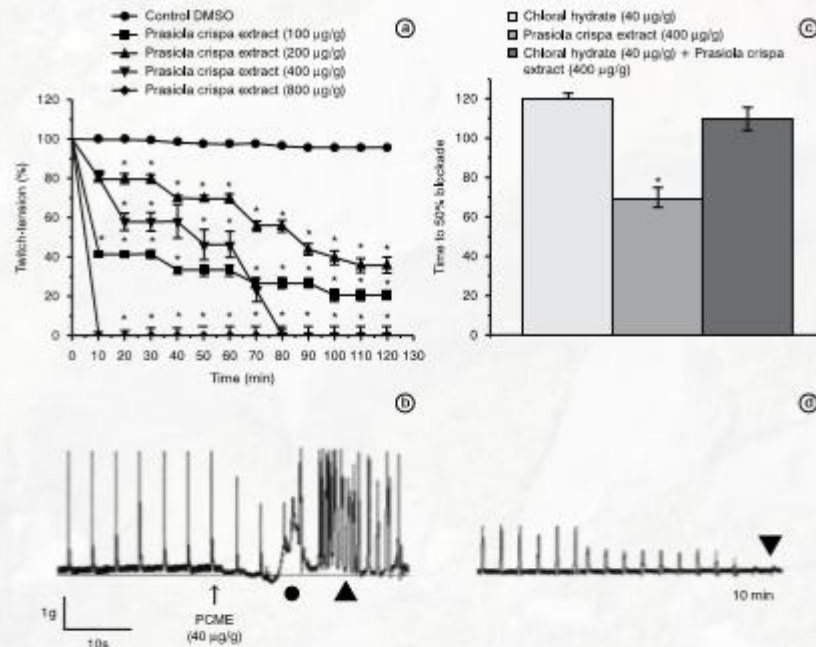


Figure 1. Effect of *Prasiola crispa* methanolic extract (PCME) on the in vivo cockroach mesothoracic costal adductor nerve-muscle preparation. Panel A, shows the graph of the effect of different concentrations of *P. crispa* extracts on 120 min muscle twitch tension recordings. Panel B shows the increase of muscular tonus and the followed appearance of spontaneous twitches. In C, the graphical expression of the time required to 50% blockade of twitches before and after chloral hydrate (40 µg/g). In Panel D, complete inhibition of neuromuscular twitches by PCME (40 µg/g) after 5 min recordings. \*significance at  $p < 0.05$ ; • increase of muscular tonus; + spontaneous twitches; ▾ complete neuromuscular blockade.

neuromuscular models as suitable for investigating the mechanism of insecticide interactions, as well as, showed its yield potential for the development of NMDA-receptor-selective therapeutic agents.

### Conclusion

*Prasiola crista* methanolic extract induces neuromuscular blockade in *Leurolestes circumvagans*. The latter effect is probably evoked by activation of insect NMDA receptors at the motor end plate. The results also confirm the presence of potent insecticide chemical constituents in *Prasiola crista* extract as future candidates for the development of NMDA-receptor-selective therapeutic agents.

### Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian Antarctic Program through National Council for Scientific and Technological Development, (CNPq, Portuguese acronym) process no. 574018/2008-5, Carlos Chagas Foundation for Support of Research in the State of Rio de Janeiro, (FAPERJ, Portuguese acronym) process no. E-26/170.023/2008, and the Ministry of Science and Technology – (MCT, Portuguese acronym), Ministry of Environment – (MMA, Portuguese acronym) and the Interministerial Commission for Resources of the Sea (CIRM, Portuguese acronym through the Brazilian National Institute of Science and Technology – Antarctic Environmental Research (INCT-APA, Portuguese acronym).

### References

- Bown, A.W.; MacGregor, K.E. & Shelp, B.J. (2006). Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pest? *Trends in Plant Science*, 11(9): 424-27.
- Dingledine, R.; Borges, K.; Bowie, D. & Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, 51(1): 7-61.
- Fitt, R. & Stokes, D.A. (1998). Energy absorption during running by leg muscles in a cockroach. *The Journal of Experimental Biology*, 201(7): 997-1012.
- Harwood, J.L. & Gushina, I.A. (2009). The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, 91: 679-84.
- Pavela, R. (2005). Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia*, 76:891-96.
- Peoples, R.W. & Weight, F.F. (1998). Inhibition of excitatory amino acid-activated currents by trichloroethanol and trifluoroethanol in mouse hippocampal neurons. *The British Journal of Pharmacology*, 124:1159-64.
- Pereira, B.K.; Rosa, R.M.; da Silva, J.; Guecheva, T.N.; Oliveira, I.M.; Janicki, M.; Benwegnu, V.C.; Furtado, G.V.; Ferraz, A.; Richter, M.F.; Schroder, N.; Pereira, A.B. & Henriques, J.A. (2009). Protective effects of three extracts from Antarctic plants against ultraviolet radiation in several biological models. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(2):117-29.
- Posser, T.; Pereira, B.K.; Zemolin, A.P.P.; Dal Belo, C.A.; Pereira, A.B. & Franco, J.L. (2010). Insecticidal effects of Antarctic algae *Prasiola crista* extract in the adult fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Annual Activity Report of National Institute of Science and Technology Antarctic Environmental Research*, 2(4): 73-6.
- Ryan, M.F. & Byrne, O. (1988). Plant-insect co-evolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology*, 14: 1965-75.
- Soderlund, M.D. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of Toxicology*, 86:165-81.
- Stankiewicz, M.; Dabrowski, M. & de Lima, M.E. (2012). Nervous system of *Periplaneta americana* as model in toxicological studies: A short historical and actual view. *Journal of Toxicology*, 2012: 1-12.
- Viegas Junior, C. (2003). Terpenes with insecticidal activity: an alternative to chemical control of insects. *Quimica Nova*, 26(3): 390-400.
- 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: 957-64.