

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

LANA DORNELES PEDROSO

Capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) sob uma nova perspectiva: análise do perfil fitoquímico e efeito entomotóxico sobre *Nauphoeta cinerea* (Olivier)

**São Gabriel - RS
2019**

LANA DORNELES PEDROSO

Capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) sob uma nova perspectiva: análise do perfil fitoquímico e efeito entomotóxico sobre *Nauphoeta cinerea* (Olivier)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Silvane Vestena

Coorientadora: Ms. Bruna Trindade Borges

**São Gabriel - RS
2019**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

P243c Pedroso, Lana Dorneles

Capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) sob uma nova perspectiva: análise do perfil fitoquímico e efeito entomotóxico sobre Nauphoeta cinerea (Olivier) / Lana Dorneles Pedroso.

47 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -- Universidade Federal do Pampa, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2019.

"Orientação: Silvane Vestena".

1. Metabolismo secundário. 2. Anticolinesterásico. 3. Bioinseticidas. I. Título.

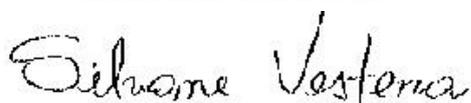
LANA DORNELES PEDROSO

**Capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) sob uma nova perspectiva:
análise do perfil fitoquímico e efeito entomotóxico sobre *Nauphoeta
cinerea* (Olivier)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Pampa,
como requisito parcial para obtenção
do Título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 05 de julho de
2019.

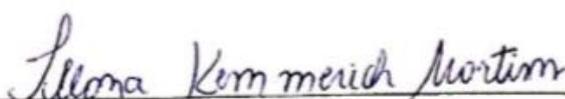
Banca examinadora:



Prof. Dra. Silvane Vestena
(Orientadora)
(UNIPAMPA)



Prof. Dra. Lúcia Helena do Canto Vinadé
(UNIPAMPA)



Ms. Ilana Kemmerich Martins
(PPGCB - UNIPAMPA)

Dedico este trabalho às mulheres da minha vida, Lisandra e Eni, por todo incentivo e amor.

AGRADECIMENTO

À minha mãe, Lisandra, por sonhar junto comigo, por me incentivar a continuar quando eu pensei em desistir, por me receber com amor depois de semanas de saudade, por abrir mão de desejos pessoais para me sustentar e por ter me dado a melhor herança que alguém poderia ter: a oportunidade de estudar.

À minha vó, Eni, por me receber com comidinhas gostosas (carreteiro de charque e feijão todo sábado, né vozinha?!), por se preocupar com a minha saúde e me proteger, por ser minha companheira de chimarrão, por me ensinar a cozinhar e cuidar da minha casa e por me transmitir o seu conhecimento sobre as plantinhas lá do nosso pátio (formada pela vida na zona rural, conhecimento que vale ouro).

Ao meu pai, Miguel, por me incentivar a estudar e por me transmitir calma mesmo via telefone.

Aos professores que passaram pela minha vida. Em especial às minhas professoras de biologia do ensino médio e cursinho pré-vestibular, Dora e Pâmela, que despertaram em mim o amor pela biologia. Ao professor Felipe (tio Lipe) pelos (MUITOS) conselhos ao longo desses 4 anos e meio e aos professores Silvane, Lúcia e Cháriston, que mesmo num cenário caótico de investimento na ciência brasileira, não medem esforços para que seus alunos continuem suas pesquisas e não desistam de seus sonhos. Eu admiro muito vocês!

À professora Silvane, por acreditar no meu potencial e por contribuir não só para o meu crescimento profissional, como também para o pessoal. Pessoa ímpar, acessível, responsável e organizada (quando eu crescer quero ser assim), de alegria contagiante (mesmo às 8h da manhã de uma segunda-feira) e que tem uma didática maravilhosa. Não é à toa que conquistou o coração de todos da turma 19 da biologia e hoje, além de minha orientadora, também faz uma “horinha extra” como mãe e amiga confiante.

À minha coorientadora Bruna, que se tornou uma grande amiga, sempre risonha, carinhosa e talentosíssima (olha as figuras desse trabalho, bicho!). Agradeço pelas histórias que me fizeram rir muito (a do gato Bagé é a minha preferida), pela companhia pro café de todo dia, pãozinho de queijo do RU e por todo carinho e atenção durante a execução desse projeto.

Às minhas amigas Angélica e Carol Burgs, minhas companheiras de jornada desde 2015. Passamos por muitos momentos né gurias?! Dividiram comigo muito

litirão barato no bar do pescador, casa, xis do sano e desespero na hora das provas. Aguentaram meus choros, comemoraram minhas conquistas e estarão sempre nos meus pensamentos.

Aos meus amigos Neil, Adal, Gui e Carol Mafaldo, por me apoiarem muito e fazerem os meus dias em SG serem muito mais felizes. Obrigada por se manterem presentes na minha vida, mesmo que tenhamos tomado rumos diferentes. Amo vocês!

Aos meus colegas de laboratório, parceiros de MUITO CAFÉ e experimentos, guerreiros (quase) sempre presentes na famigerada reunião do sábado de manhã e loucos por uma “lanepizza”. Falam de política, música e canais de cálculo (tudo no mesmo dia) e são contadores das melhores histórias que eu já ouvi. Um carinho especial à Angélica, Duda, Zanatta e Bruna pela “mãozinha” nos experimentos. Minha segunda família, meus colegas de profissão, amigos e confidentes.

À Duda (filha do João de Deus, lá de Borborema, que matou uma vaca no soco), que parece super durona pra quem vê ela de longe, mas que depois de um tempo me mostrou que tem um coração bem “molinho”. Minha parceira de caminhada (juro que a gente tenta ter uma vida “fitness”), de churrasco no final de semana e que eu ainda preciso ensinar a tomar chimarrão. Essa guria vai fazer muito sucesso!

Por último e não menos importante, ao meu namorado Jardel, que me entende até pelo olhar e pelo tom de voz, pessoa cheia de luz que, entre idas e vindas, me conquista a cada dia mais. Meu cozinheiro particular (ele faz o melhor feijão do mundo – espero que a minha vó não leia isso), obrigada por compreender minha ausência, por não fugir nos dias ruins e por dividir teus sonhos comigo.

“The true sign of intelligence is not knowledge but imagination”.

Albert Einsten

RESUMO

No cenário atual de contaminação sistêmica dos ecossistemas, pelo uso inadequado de agrotóxicos, especialmente inseticidas, a síntese de bioinsumos é uma alternativa rentável e sustentável. A gramínea *Eragrostis plana* é um empecilho para a atividade agropecuária brasileira, desde que foi inserida no país acidentalmente na década de 50. Embora o seu potencial alelopático seja bastante relatado na literatura, há poucos estudos a respeito de sua composição fitoquímica. Neste trabalho propomos uma nova visão sobre essa espécie, onde associamos o perfil fitoquímico com os efeitos biológicos em ensaios bioquímicos, comportamentais e eletrofisiológicos de *Nauphoeta cinerea* administradas com extrato hidroalcoólico de *E. plana* (EHEP). Os resultados demonstraram que a presença de compostos fenólicos, flavonoides e taninos em *E. plana* é tempo-dependente. Observamos o aumento da atividade de autolimpeza (*grooming*) das pernas quando os animais foram tratados com EHEP. Quercetina, um dos compostos majoritários observados no perfil fitoquímico de *E. plana*, demonstrou modular a atividade de *grooming* de pernas e antenas, demonstrando que o composto age nas vias responsáveis por esse comportamento. A locomoção também foi significativamente alterada pelo EHEP, aumentando a distância percorrida pelos animais e diminuindo o tempo de parada e o número de episódios de imobilidade. Além disso, observamos a inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e diminuição da resposta contrátil muscular nos tratamentos com EHEP. Portanto, este trabalho demonstra o potencial biotecnológico do capim-annoni-2, que demonstra modular as principais vias de sinalização dos invertebrados, sugerindo uma provável ação como bioinseticida.

Palavras-Chave: Metabolismo secundário. Anticolinesterásico. Bioinseticidas.

ABSTRACT

In the current scenario of systemic contamination of ecosystems, by inappropriate use of pesticides, especially insecticides, the synthesis of bioinsecticides is a profitable and sustainable alternative. The grassy *Eragrostis plana* is an obstacle to Brazilian agricultural activity, since it was accidentally inserted in the country in the 50's. Although its allelopathic potential is well reported in the literature, there are few studies about its phytochemical composition. In this work we propose a new view about this species, where we associate the phytochemical profile with the biological effects in biochemical, behavioral and electrophysiological tests of *Nauphoeta cinerea* administered with hydroalcoholic extract of *E. plana* (EHEP in portuguese). The results demonstrated that the presence of phenolic compounds, flavonoids and tannins in *E. plana* is time dependent. We observed increased self-cleaning activity (grooming) of the legs when the animals were treated with EHEP. Quercetin, one of the major compounds observed in the phytochemical profile of *E. plana*, has been shown to modulate the grooming activity of legs and antennae, demonstrating that the compound acts in the pathways responsible for this behavior. Locomotion was also significantly altered by EHEP, increasing the distance traveled by the animals and decreasing the time of stopping and the number of episodes of immobility. In addition, we observed inhibition of acetylcholinesterase enzyme activity (AChE) and decreased muscle contractile response in EHEP treatments. Therefore, this work demonstrates the biotechnological potential of capim-anonni-2, which demonstrates modulating the main signaling pathways of invertebrates, suggesting a probable action as a bioinsecticide.

Keywords: Secondary metabolism. Anticholinesterasic. Bioinsecticides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rotas que compõem o metabolismo secundário vegetal	18
Figura 2 – Aspecto geral de capim-annoni-2 (<i>Eragrostis plana</i>).....	21
Figura 3 – Aspecto da porção dorsal de baratas <i>Nauphoeta cinerea</i>	22
Figura 4 – Esquema do sistema nervoso de <i>Nauphoeta cinerea</i>	23
Figura 5 – Aspecto de <i>Eragrostis plana</i> triturada em moinho tipo Willey.....	27
Figura 6 – Representação da atividade de <i>grooming</i> em <i>Nauphoeta cinerea</i>	29
Figura 7 – Representação do protocolo utilizado para testes comportamentais de locomoção com <i>Nauphoeta cinerea</i>	30
Figura 8 – Representação do protocolo de junção neuromuscular com <i>Nauphoeta cinerea</i>	31
Figura 9 – Comportamento de <i>grooming</i> modulado pela administração de EHEP ou quercetina.....	35
Figura 10 – Locomoção de <i>Nauphoeta cinerea</i> modulado pela administração de EHEP.....	37
Figura 11 – Efeitos do EHEP sobre a preparação nervo-músculo coxal-abdutor de <i>Nauphoeta cinerea</i>	38
Figura 12 – Efeitos do EHEP sobre a atividade da enzima AChE.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos fenólicos e flavonoides presentes em <i>Eragrostis plana</i> Nees.....	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRASCO – Associação Brasileira de Saúde Coletiva

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

DataSUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil

DBC – Delineamento de Blocos Casualizado

EHEP – Extrato Hidroalcoólico de *Eragrostis plana*

HD – High Definition

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

LANETOX – Laboratório de Neurobiologia e Toxinologia

MATLAB – MATrix LABoratory

SN – Sistema Nervoso

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SSI – Solução Salina para Insetos

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

UNIPAMPA – Universidade Federal do Pampa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Sustentabilidade na agricultura	16
1.2 Defensivos agrícolas.....	16
1.3 Bioinseticidas.....	17
1.4 Metabolismo vegetal.....	18
1.5 Capim-annoni-2 (<i>Eragrostis plana</i> Nees).....	19
1.6 <i>Nauphoeta cinerea</i> como modelo para a neurotoxinologia.....	22
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3 METODOLOGIA.....	26
3.1 Quantificação fitoquímica de <i>Eragrostis plana</i> (Nees).....	26
3.2 Extrato hidroalcoólico de <i>Eragrostis plana</i> (EHEP).....	27
3.3 Reagentes.....	28
3.4 Modelo biológico.....	28
3.5 Experimentos comportamentais.....	28
3.5.1 <i>Grooming</i> : comportamento psicomotor de autolimpeza.....	28
3.5.2 Locomoção.....	29
3.6 Preparação do nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico <i>in vivo</i> de baratas.....	30
3.7 Ensaio <i>in vitro</i> da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE).....	31
3.8 Delineamento experimental e análise.....	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Perfil fitoquímico de <i>Eragrostis plana</i> (Nees).....	33
4.2 Modulação de EHEP e quercetina no comportamento de <i>grooming</i>	34

4.3 Efeito do EHEP sobre a locomoção de <i>N. cinerea</i>	36
4.4 Diminuição da resposta contrátil induzida pelo EHEP.....	38
4.5 Inibição da atividade da enzima AChE.....	39
5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
7 REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sustentabilidade na agricultura

A demanda por técnicas de manejo na zona rural que visam a redução do impacto ambiental, advindo da industrialização da atividade agrícola, surgiu no Brasil entre as décadas de 1960 e 1970. Essa busca por novas opções de manejo foca em alternativas com maior biodegradabilidade, porém, que ainda permitam o melhor desempenho econômico da atividade agrícola (DE ASSIS; ROMEIRO, 2002).

Embora as práticas alternativas tivessem seus proponentes alocados na categoria de retrógrados frente à modernização da agricultura no país naquela época, a preocupação com a saúde do solo, manutenção da biodiversidade e a garantia de qualidade da produção mostra-se cada vez mais constante (DE ASSIS; ROMEIRO, 2002). Além do equilíbrio ecológico como premissa básica da produção de base agroecológica, destaca-se também a importância de reduzir, mesmo que gradativamente, o uso dos defensivos agrícolas convencionais (PORTO; SOARES, 2012).

1.2 Defensivos agrícolas

Os insumos químicos utilizados na agricultura convencional visam evitar a perda da produtividade em função dos danos ocasionados por plantas invasoras, insetos, fungos e demais organismos (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003). Entretanto, o uso indiscriminado desses produtos põe em risco a saúde humana, a qualidade do ar e dos recursos hídricos (MATEO-SAGASTA; ZADEH; TURRAL, 2018), bem como a biodiversidade (SOUZA *et al.*, 2017). Segundo a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO), foram registradas 34.147 notificações de intoxicação por defensivos agrícolas no Brasil de 2007 até 2014, mesmo ano em que o faturamento da indústria desses insumos movimentou cerca de doze bilhões de dólares (CARNEIRO *et al.*, 2015).

O modelo de agricultura químico-dependente do agronegócio brasileiro pode perder credibilidade no mercado de exportação de alimentos à medida que são desenvolvidas pesquisas que revelam os possíveis mecanismos de ação teratogênica (UGGINI; PATEL; BALAKRISHNAN, 2010), bem como os efeitos

neurotóxicos (DEMICCO *et al.*, 2009; JOCANOVIĆ; KOSANOVIĆ, 2010) desses produtos.

Os defensivos com ação inseticida geralmente são comercializados na forma de organofosforados, carbamatos, organoclorados e piretroides. Na literatura esses químicos são frequentemente associados à intoxicações de seres humanos e animais domésticos, como dermatites (MELO; OLIVEIRA; LAGO, 2002), disfunções respiratórias (CASSAL *et al.*, 2013), disfunções cognitivas, motoras e sensoriais (COLOSIO; TIRAMANI; MARONI, 2003), alterações endócrinas (ALEWU; NOSIRI, 2011), aumento da predisposição a arritmias cardíacas (PERES *et al.*, 2007) e doenças neurodegenerativas como o Parkinson (BHATT; ELIAS; MANKODI, 1999).

Além dos efeitos nocivos à saúde humana, defensivos agrícolas comumente atuam de forma não-específica sobre os organismos, ou seja, a aplicação desses compostos na tentativa de contornar o problema das pragas, acaba por afetar animais que não se enquadram no objetivo desses defensivos, como os animais polinizadores (PINHEIRO; FREITAS, 2010). Num cenário de contaminação sistêmica, nota-se que a aplicação de insumos nos cultivos agrícolas, especialmente aqueles empregados em monoculturas, é uma das principais causas do exício em massa de abelhas e outros importantes polinizadores. Esses produtos oferecem risco ao equilíbrio dos ecossistemas e esses danos podem se tornar irreversíveis. (CARNEIRO *et al.*, 2015; GOMES, 2017).

1.3 Bioinseticidas

No contexto atual, a busca por substituintes ou complementares orgânicos para os defensivos agrícolas tem sido amparada pelo mercado de desenvolvimento de biodefensivos, como os bioinseticidas (DE VASCONCELOS; GONDIM; BARROS, 2006). Os inseticidas à base de extratos vegetais apresentam diversas vantagens em relação ao uso de inseticidas sintéticos, além de não serem tóxicos aos seres humanos, apresentam fácil obtenção da matéria-prima, baixo custo operacional e a minimização do impacto ambiental gerado pelos defensivos convencionais, por se degradarem rapidamente no ambiente (BÉLO *et al.*, 2009).

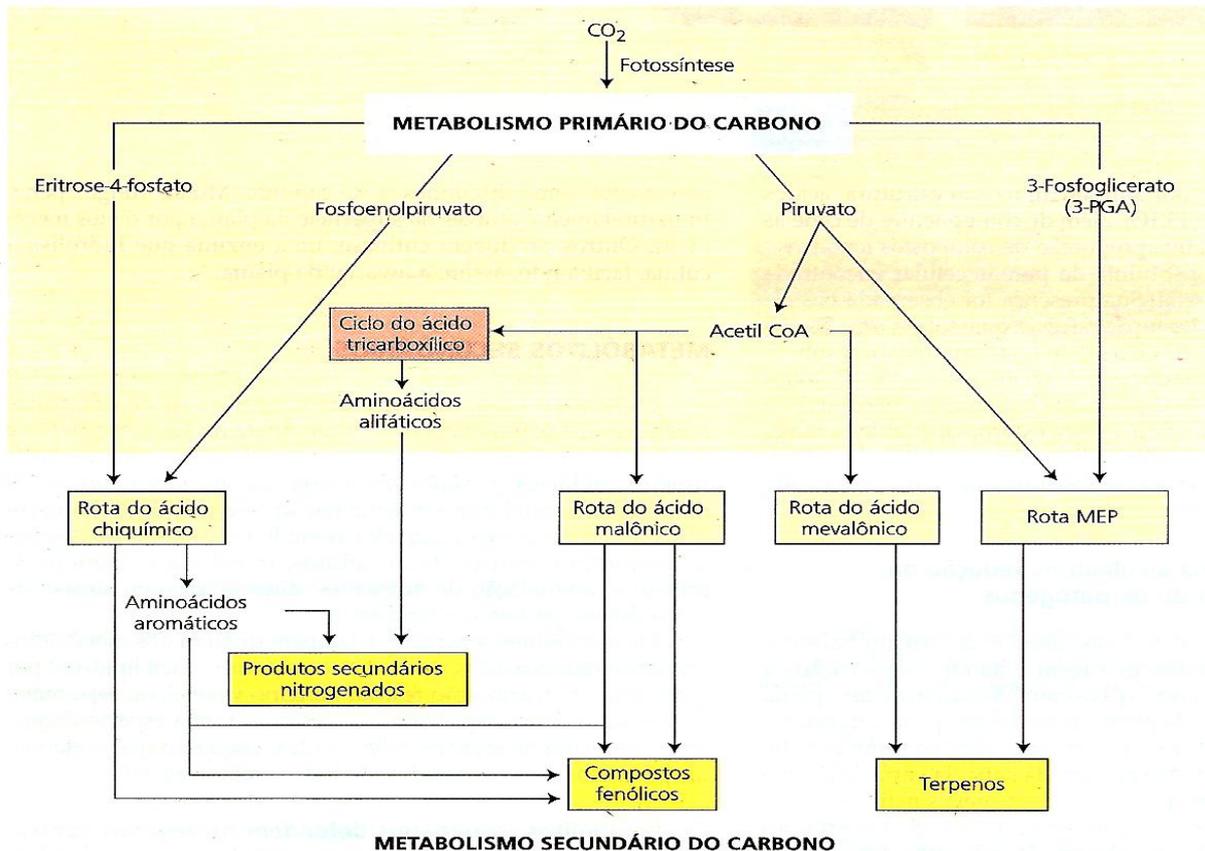
Fitocomplexos apresentam uma gama de mecanismos de ação, devido a variabilidade de compostos ativos na sua constituição, que podem ser explorados a fim de obter um produto com atuação mais específica sobre os organismos (BÉLO *et*

al., 2009). Assim, uma análise fitoquímica preliminar viabiliza o estudo de plantas que produzem naturalmente, como produtos do seu metabolismo, compostos com ação inseticida, para que essas possam ser empregadas na síntese de biocompostos.

1.4 Metabolismo vegetal

Metabolismo é a denominação do conjunto de reações químicas, que ocorrem no meio intracelular dos organismos vivos. Em vegetais, o metabolismo é dividido em duas partes: primário e secundário (Figura 1) (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Figura 1: Rotas que compõem o metabolismo vegetal



Fonte: Taiz; Zeiger (2017).

O metabolismo primário compreende as reações essenciais à sobrevivência da planta, ou seja, que estão diretamente relacionadas aos seus processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução. Os metabólitos primários, como são denominados os produtos dessas reações, são compostos essenciais ou

intermediários que atuam nas vias catabólica e anabólica e são comuns à todas as plantas (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Por outro lado, os produtos do metabolismo secundário, como os terpenos e compostos fenólicos, fornecem à planta um conjunto de estratégias químicas para a aclimação às condições ambientais, ou seja, determinam a forma como as plantas respondem ao ambiente. Esses compostos são liberados de acordo com a taxa de incidência da radiação solar, em interações de facilitação, competição, defesa contra herbívoros e patógenos (SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ; PORTA DUCOING; ROCHA SOSA, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2017).

Os metabólitos secundários estão presentes em todo o corpo vegetal e são liberados no ambiente na forma de compostos solúveis em água, por volatilização, lixiviação, biodegradação ou ainda, pela exsudação radicular. Essas micromoléculas, produzidas em pequena escala pelas plantas, variam em função e complexidade estrutural, de acordo com suas características e propriedades físico-químicas (TAIZ; ZEIGER, 2017). A compreensão dos mecanismos de ação dos metabólitos secundários contribui para o desenvolvimento de defensivos naturais à base de extratos vegetais, especialmente bioinseticidas.

1.5 Capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees)

O capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) (Figura 2) é uma gramínea pertencente à Família botânica Poaceae, sendo uma espécie tropical, estival e de origem Sul Africana. Foi introduzida no Brasil em 1950, como contaminante de lotes de sementes importadas de capim-de-rhodes (*Choris gayana* Kunth) (DE MEDEIROS; FOCHT, 2007). Essa espécie apresenta rápido crescimento, longa fase reprodutiva e, em razão do seu alto potencial alelopático, essa espécie exótica consegue se estabelecer em diferentes ambientes e consolidar um banco de sementes no solo (DALBOSCO, 2013).

A liberação dos produtos do metabolismo secundário de *E. plana* no ambiente prejudica a germinação de outras espécies vegetais, um fenômeno conhecido como alelopatia. Assim, o capim-annoni-2 passa a competir com as espécies forrageiras, o que confere à pastagem altos teores de fibra e baixa digestibilidade, causando injúrias ao gado (BRÜNING, 2007).

No Bioma Pampa, *E. plana* é modelo de estudo para o fenômeno de alelopatia (DALBOSCO, 2013; FIORENZA *et al.*, 2016). Entretanto, há baixa prospecção sobre o seu perfil fitoquímico e inexistem trabalhos que correlacionam seus compostos com uma possível atividade entomotóxica.

Figura 2 - Aspecto geral de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees)



Fonte: Reid *et al.* (2015).

1.6 *Nauphoeta cinerea* como modelo para a neurotoxicologia

Baratas *Nauphoeta cinerea* (Olivier) apresentam coloração marrom-acinzentada, são ovíparas e frequentemente utilizadas como modelo neurobiológico para a elucidação do mecanismo de ação de novos agentes inseticidas (CARRAZONI *et al.*, 2016). A utilização desses animais em bioensaios é conveniente em razão da facilidade de manipulação em procedimentos experimentais e da notável semelhança de seus neurotransmissores em comparação a modelos vertebrados. Adicionalmente, a reprodução desses animais gera proles abundantes (Figura 3) e o custo de manutenção das colônias é baixo (RODRIGUES *et al.*, 2013).

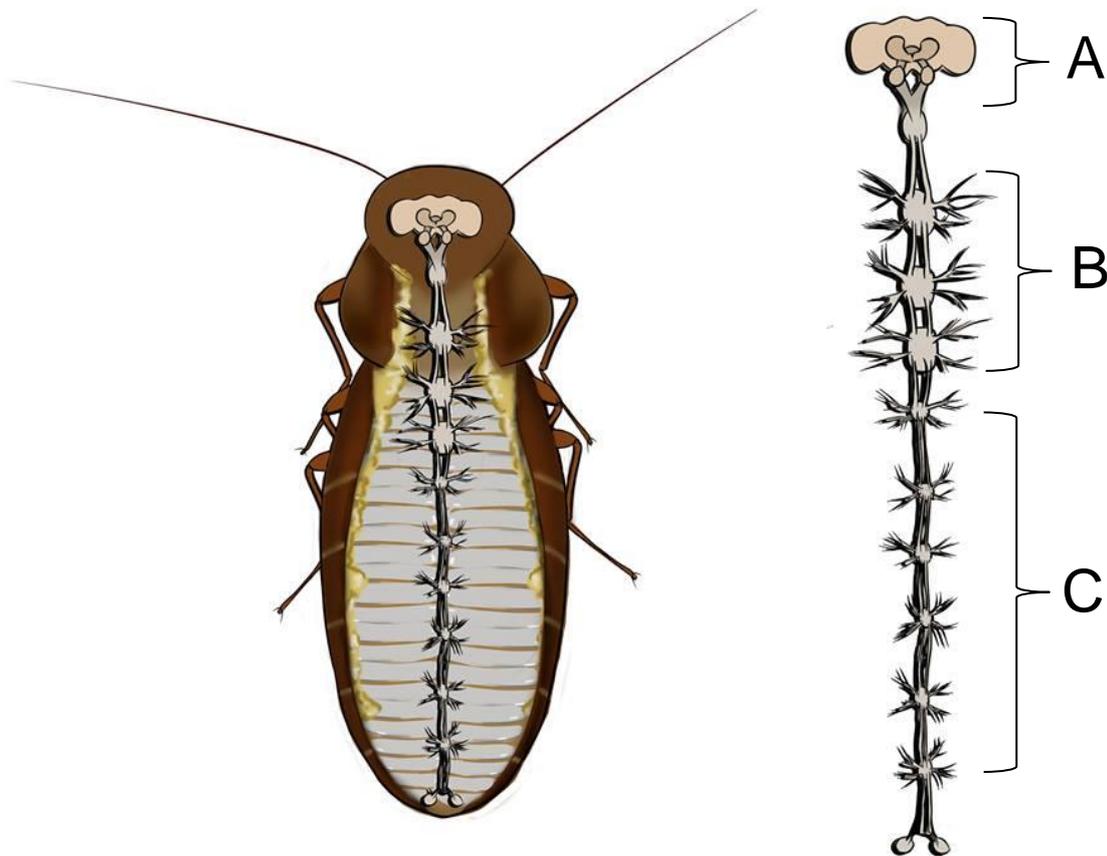
Figura 3 - Aspecto da porção dorsal de baratas adultas de *Nauphoeta cinerea* e momento da eclosão da ooteca



Fonte: A autora (2018).

O sistema nervoso (SN) desses insetos localiza-se na porção ventral e é constituído por gânglios, que inervam o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP) (Figura 4).

Figura 4 - Esquema do sistema nervoso de *Nauphoeta cinerea*. Em A: gânglios supraesofágico e subesofágico (ligados ao cérebro); B: gânglios protorácico, mesotorácico e metatorácico (conectados ao SNP enervando as pernas da barata); C: seis gânglios abdominais (responsáveis pelo sistema estomatogástrico)



Fonte: Bruna Borges (2018).

Como demonstrado na literatura, os insetos realizam *grooming*, um comportamento de higiene que consiste na autolimpeza de diferentes partes do corpo. O comportamento de limpar pernas e antenas é modulado pela atividade de dois principais neurotransmissores no SNP dos insetos, as aminas octopamina e dopamina, respectivamente (LIBERSAT; PFLUEGER, 2004; GAL; LIBERSAT, 2010). Ademais, outras vias de neurotransmissão estão correlacionadas à sobrevivência desses animais. Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNP e, juntamente com o neurotransmissor GABA (principal inibitório do SNP) (OSBORNE, 1996), modula as sinapses que ocorrem entre a porção terminal dos axônios motores e as células da placa motora (junção neuromuscular) (GERSCHENFELD, 1993).

Embora o SN de insetos possua uma gama de vias de neurotransmissão, a via colinérgica, onde atua o neurotransmissor acetilcolina (ACh), costuma ser um

dos principais alvos de inseticidas convencionais com ação anticolinesterásica. O principal foco desses produtos é a atividade da enzima AChE que, quando inibida, gera o acúmulo de ACh na fenda sináptica, alterando conseqüentemente os padrões comportamentais dos insetos (OSBORNE, 1996; TARKOWSKI; LUTZ; BIRINDELLI, 2004). O sistema colinérgico, juntamente com o sistema dopaminérgico, é uma das vias de neurotransmissão que regula a atividade locomotora em invertebrados (DE JAEGER, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a toxicidade do extrato hidroalcoólico de *Eragrostis plana* (Nees) (EHEP) sobre o sistema nervoso central e periférico no modelo experimental *Nauphoeta cinerea* (Olivier).

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil fitoquímico de *E. plana*;
- Relacionar o metabolismo secundário de *E. plana* com seus efeitos entomotóxicos;
- Avaliar as alterações no comportamento de autolimpeza (*grooming*) de baratas sob os efeitos do extrato hidroalcoólico de *E. plana* (EHEP);
- Verificar se o EHEP altera o comportamento exploratório e a locomoção de baratas;
- Avaliar o efeito do EHEP sobre a atividade da enzima AChE em baratas;
- Verificar se o EHEP exerce atividade direta sobre a junção neuromuscular de baratas.

3 METODOLOGIA

A caracterização fitoquímica de *Eragrostis plana* foi realizada no Laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. A preparação do extrato hidroalcoólico e os experimentos comportamentais, eletrofisiológicos e bioquímicos foram conduzidos no Laboratório de Neurobiologia e Toxinologia (LANETOX) da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) - Campus São Gabriel, São Gabriel, RS.

3.1 Quantificação fitoquímica de *Eragrostis plana* (Nees)

A caracterização fitoquímica de *E. plana* foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e foi utilizado um sistema de HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) e auto injetor Shimadzu (SIL-20A), equipado com bombas alternativas (Shimadzu LC-20AT) ligadas a um desgaseificador (20A5 DGU) com um integrador (CBM 20A), detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) e software (LC solution SP1 1.22).

Análises cromatográficas foram realizadas em fase reversa sob condições de gradiente utilizando coluna C₁₈ (4,6 mm x 150 mm) carregada com partículas de diâmetro 5 µm; a fase móvel utilizada foi água contendo 2 % de ácido acético (A) e metanol (B), e o gradiente de composição foi: 5 % (B) durante 2 min, 25 % (B) até 10 min, 40, 50, 60, 70 e 80 % (B) a cada 10 min, seguindo o método descrito por Kandem *et al.* (2012) e Da Silva *et al.* (2014) com pequenas modificações.

O extrato por infusão de *E. plana* foi analisado a uma concentração de 20 mg/mL. O fluxo usado foi de 0,7 mL/min; o volume de injeção de 50 µL e o comprimento de onda foi de 271 nm para o ácido gálico, 280 nm para catequina e epicatequina, 327 nm para ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido elágico e, 365 nm para quercetina, apigenina e rutina. As amostras e a fase móvel foram filtradas por meio de filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore) e em seguida desgaseificada por banho de ultra-som antes da utilização. As soluções de referência foram preparadas na fase móvel para HPLC nas concentrações de 0,050-250 mg/mL para catequina, epicatequina, quercetina, apigenina e rutina; e 0,20-200 mg/mL para ácido gálico, ácido clorogênico, ácido elágico e ácido cafeico. Os picos cromatográficos foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com

os dos padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 600 nm). A curva de calibração para o ácido gálico foi: $Y = 13569x + 1344,9$ ($r = 0,9995$); catequina: $Y = 10932x + 1258,0$ ($r = 0,9987$), ácido clorogênico: $Y = 12573x + 1206,5$ ($r = 0,9997$); ácido cafeico: $Y = 11872x + 1570,3$ ($r = 0,9996$); ácido elágico: $Y = 12653x + 1367,5$ ($r = 0,9991$); quercetina: $Y = 13620x + 1337,6$ ($r = 0,9996$), rutina: $Y = 15983x + 1321,5$ ($r = 0,9998$), apigenina: $Y = 12784x + 1372,7$ ($r = 0,9996$) e epicatequina: $Y = 16423x + 1853,2$ ($r = 0,9998$). Todas as operações cromatográficas foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata.

3.2 Extrato hidroalcoólico de *Eragrostis plana* (EHEP)

Partes aéreas de *E. plana* foram coletadas no período matutino, no mês de junho do ano de 2017, na Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) – Campus São Gabriel, no município de São Gabriel – RS.

Para a obtenção do extrato hidroalcoólico de *E. plana* (EHEP), o material vegetal coletado foi desidratado em uma estufa com circulação forçada de ar a uma temperatura de 60 ° C por sete dias, posteriormente triturado em Moinho de Facas tipo Willey, com malha das peneiras de 1,70 mm (Figura 5).

Figura 5 - Aspecto de *Eragrostis plana* triturada em moinho de facas tipo Willey



Fonte: A autora (2017).

O material foi percolado em solução hidroalcoólica 90 % confeccionada com álcool absoluto 99,99 % (P.A.). Após a destilação por rotação utilizando um Rotaevaporador aquecido a 60 °C, a solução foi criodessecada a -80 °C (CARRAZONI et al., 2014). O resíduo seco da liofilização foi diluído em água ultrapura Milli-Q para a obtenção das doses de EHEP: 5; 2,5; 5,0; 12,5; 25; 50 e 100 µg/g animal.

3.3 Reagentes

Solução salina para insetos (SSI) (em mM: 150 NaCl; 2 CaCl₂; 10 KCl e 10 TRIS) foi utilizada como tratamento controle em todos os protocolos. Adicionalmente, alguns ensaios foram executados com administração de Quercetina (Sigma-Aldrich).

3.4 Modelo biológico

Os bioensaios foram realizados com espécimes adultos (3 a 4 meses pós-muda), de ambos os sexos, de baratas *N. cinerea*. Os animais foram mantidos no Biotério Anipampa da UNIPAMPA - Campus São Gabriel, com temperatura e iluminação controladas ($\pm 24^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h), em caixas de poliestireno (34,4 cm de largura x 41,4 cm de comprimento x 16,8 cm de altura), com água e alimento (ração para cachorro) *ad libitum* (DOS SANTOS et al., 2019).

Em todos os protocolos foram injetados (10 µL/animal) SSI, EHEP ou Quercetina na terceira porção abdominal dos espécimes, diretamente na hemolinfa, utilizando uma microseringa Hamilton.

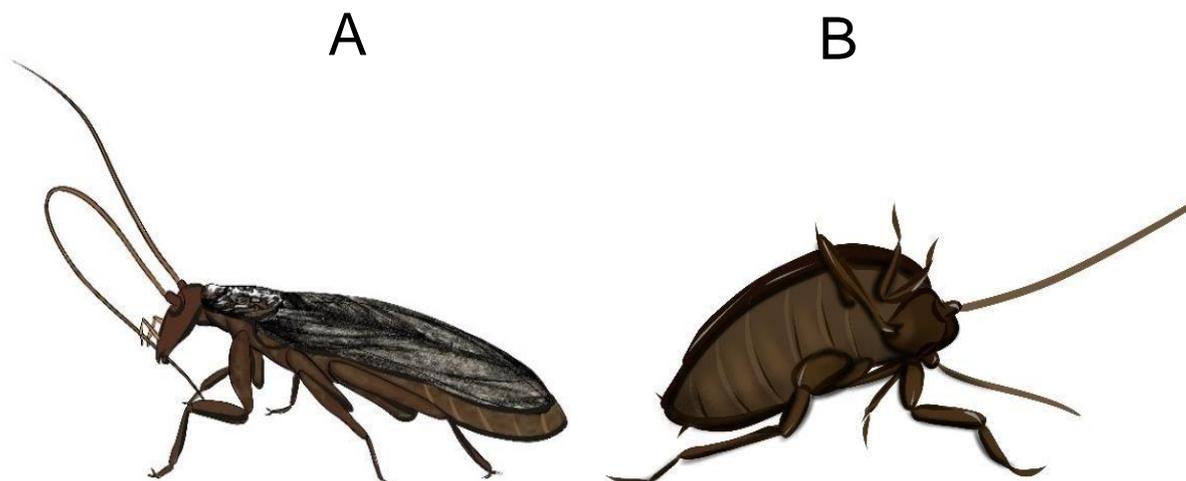
3.5 Experimentos comportamentais

3.5.1 *Grooming*: comportamento psicomotor de autolimpeza

Os bioensaios de *grooming* foram executados após a injeção de EHEP (5; 50 e 100 µg/g de animal) e SSI (tratamento controle), conforme descrito por Stürmer *et al.* (2014). Para este protocolo foram utilizadas 30 baratas por tratamento. Esse ensaio, que tem como princípio a atividade de limpeza de antenas e pernas do animal (Figura 6), foi monitorado pelo período de 30 minutos. Adicionalmente,

quercetina, um flavonoide já identificado e quantificado em *E. plana* (FIORENZA *et al.*, 2016), foi testado nas concentrações (5; 50 e 100 $\mu\text{g/g}$ de animal).

Figura 6 - Representação do bioensaio de *grooming* em *Nauphoeta cinerea*. Em A: representação do comportamento de autolimpeza das antenas e em B: comportamento de autolimpeza das pernas

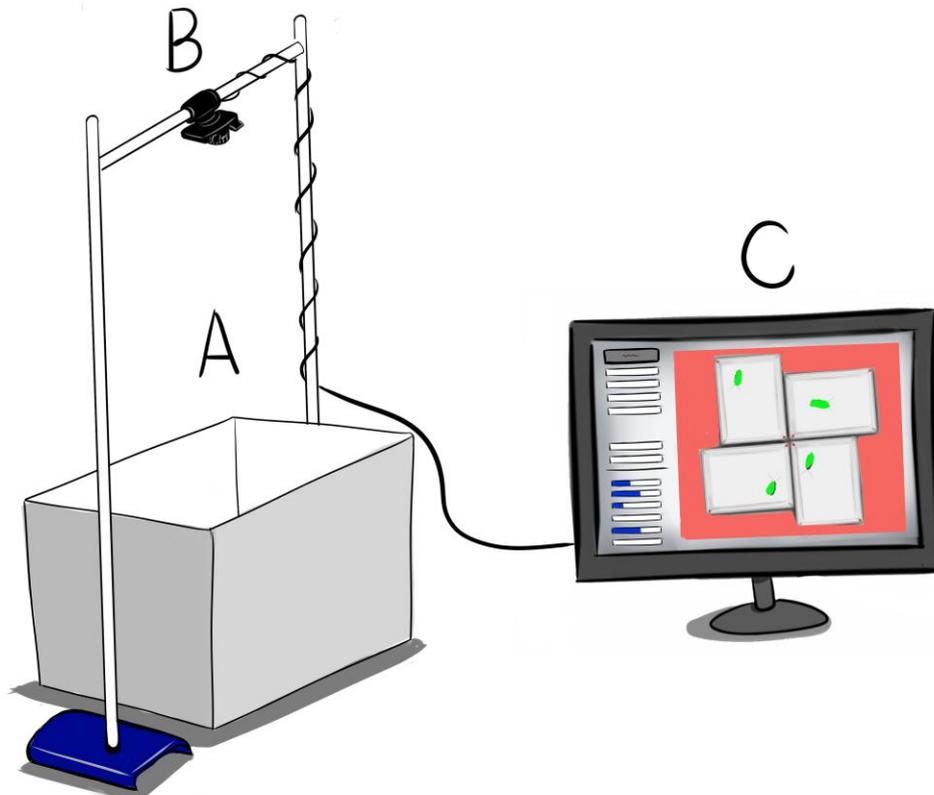


Fonte: Borges (2018).

3.5.2 Locomoção

A atividade locomotora das baratas foi avaliada conforme descrito por Leal *et al.* (2018). Para este protocolo foram utilizadas 28 baratas por tratamento. Após a injeção do EHEP (0,5; 2,5; 5; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/g}$ de animal) e SSI (tratamento controle), as baratas foram dispostas individualmente em caixas brancas de poliestireno (15 cm de largura x 25 cm de comprimento x 7 cm de altura). A locomoção dos espécimes foi registrada durante 10 minutos por uma câmera Logitech® HD WEBCAM (Philips, Brasil), acoplada sobre o aparato experimental e conectada a um computador Desktop (Dell, São Paulo, Brasil) (Figura 7). A partir dos registros, os parâmetros foram calculados pelo Software idTracker® (Stoelting, CO, USA). Nesses ensaios, foram avaliados os seguintes parâmetros: número de episódios de imobilidade, tempo de parada e distância total percorrida. Os dados foram analisados pelo Software Matlab®.

Figura 7 - Representação do protocolo utilizado para testes comportamentais de locomoção com *Nauphoeta cinerea*. Em (A) o local destinado a manter o isolamento das caixas de testes. Em (B) a câmera de vídeo responsável pelos registros de locomoção dos insetos e em (C), o monitor responsável por transmitir detalhes do comportamento de locomoção de cada animal



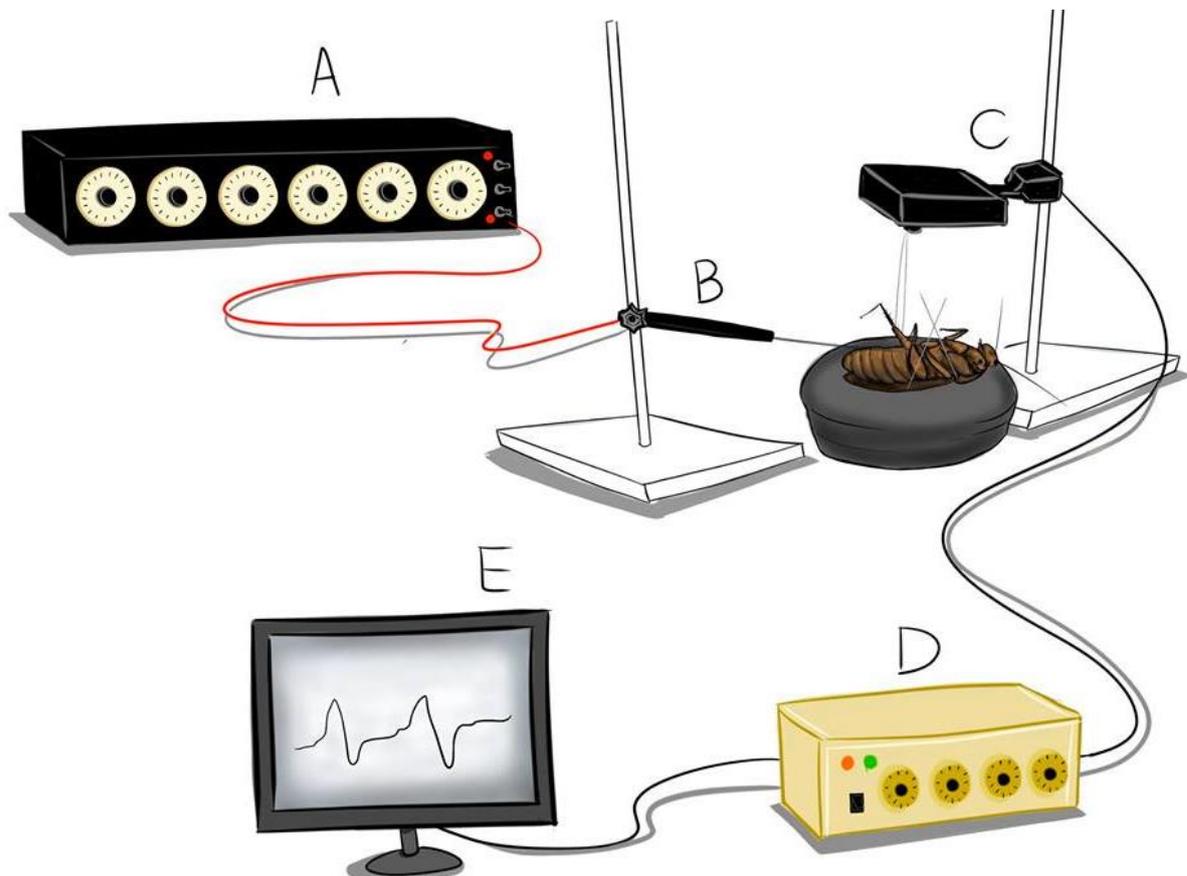
Fonte: Bruna Borges (2018).

3.6 Preparação do nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico *in vivo* de baratas *Nauphoeta cinerea*

Os testes eletromiográficos, realizados para verificar a susceptibilidade do Sistema Nervoso Periférico (SNP) das baratas ao EHEP, foram realizados conforme descrito por Martinelli *et al.* (2014). Para este protocolo foram utilizadas 6 baratas por tratamento, sendo estes: SSI (tratamento controle) e EHEP (5; 25 e 50 $\mu\text{g/g}$ de animal). Os insetos foram fixados individualmente em um suporte, em decúbito dorsal, com o auxílio de agulhas entomológicas. Uma das pernas do terceiro par foi suspensa em um transdutor de sinal de força de 1g (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil). O nervo 5 (região torácica) foi estimulado a uma taxa de 0,5Hz/5ms, durante 120 minutos (Figura 8). Os registros foram obtidos por meio de um amplificador AECAD 05 (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil), digitalizados pelo Software

AQCAD (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil) e analisados pelo Software ANCAD (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil).

Figura 8- Representação do protocolo de junção neuromuscular com *Nauphoeta cinerea*. Em (A) o estimulador elétrico, em (B) o eletrodo bipolar de platina, em (C) o transdutor isométrico, em (D) um amplificador e em (E) uma representação do registro eletromiográfico a ser analisado pelo software



Fonte: Bruna Borges (2018).

3.7 Ensaio *in vitro* da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A avaliação da atividade da enzima AChE foi realizada conforme o protocolo de Stürmer *et al.* (2014), com algumas modificações. Para este protocolo foram utilizadas 6 baratas por tratamento, realizados em triplicata. Foram administrados SSI (tratamento controle), EHEP (5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/g}$ de animal) e, passadas 4 horas de tratamento, os animais foram anestesiados por resfriamento a 5 °C.

As antenas de cada animal foram removidas e suas cabeças recolhidas e armazenadas em 1500 μL de tampão fosfato (Kpi: pH 7,0). Posteriormente as amostras foram homogeneizadas em um Powerlyzer (Powerlyzer 24 Homogenizer, MO BIO) por 3 minutos e centrifugadas (1000 rpm/15 min/4°C). Foram recolhidos

1000 µL do sobrenadante e a quantificação proteica dessas amostras foi mensurada por espectrofotometria em uma leitura de A280 nm, utilizando espectrofotômetro NanoVue (NanoVue Plus, GE Healthcare). O volume de sobrenadante a ser utilizado para a mensuração da reação enzimática foi determinado levando em consideração os valores obtidos na quantificação proteica das amostras. Os respectivos volumes de sobrenadante foram recolhidos para uma placa de microtitulação e foram adicionados 50 µL de DTNB (10 mM), 50 µL de tampão fosfato (Kpi: pH 8,0) e 2,5 µL de acetiltiocolina e a reação foi mensurada em um espectrofotômetro UV-Visível ($\lambda = 412$ nm, durante 1 min) (modelo de evolução 60S, Thermoscientific, New Hampshire, EUA). Os resultados foram analisados pelo software VISION Lite (Thermoscientific).

3.8 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram realizados por delineamento de blocos casualizado (DBC) e os animais foram escolhidos randomicamente. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio padrão ou Média \pm Erro Padrão da Média. A análise estatística foi realizada utilizando o software Graphpad Prism 7.0 (Software Inc., San Diego, CA), através do teste Tukey ou análise de variância (One / Two) – way ANOVA, seguida pelo teste Bonferroni ou Dunnett como *post hoc* quando necessário. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Perfil fitoquímico de *Eragrostis plana* (Nees)

A análise fitoquímica de capim-anonni-2 demonstrou a presença majoritária dos compostos: ácido clorogênico, ácido cafeico e quercetina, independente do tempo de armazenamento (Tabela 1).

Tabela 1 – Compostos fenólicos e flavonoides presentes em *Eragrostis plana*. Laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS

Compostos	2014	12 meses de armazenagem	24 meses de armazenagem	36 meses de armazenagem
	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g
Ácido gálico	29.82 ± 0.03 Ca	21.03 ± 0.01 Bb	19.87 ± 0.01 Bb	14.61 ± 0.02 Bc
Catequina	17.93 ± 0.01 Da	13.25 ± 0.01 Cb	8.05 ± 0.02 Cbc	7.03 ± 0.03 Cc
Ácido clorogenico	46.05 ± 0.01 Aa	40.19 ± 0.02 Aab	37.84 ± 0.01 Ab	28.19 ± 0.01 Ac
Ácido cafeico	38.61 ± 0.02 ABa	38.61 ± 0.01 Aa	35.62 ± 0.01 Aa	27.86 ± 0.01 Ab
Ácido elagico	19.38 ± 0.01 Da	18.07 ± 0.03 Ba	18.01 ± 0.03 Ba	18.75 ± 0.03 Ba
Epicatequina	20.15 ± 0.03 Da	21.35 ± 0.02 Ba	23.49 ± 0.02 Be	20.06 ± 0.01 Bd
Rutina	15.84 ± 0.02 Da	14.62 ± 0.01 Ca	7.81 ± 0.01 Cb	7.11 ± 0.02 Cb
Quercetina	40.17 ± 0.01 Aa	38.51 ± 0.01 Aa	35.72 ± 0.01 Aa	26.93 ± 0.01 Ab
Apigenina	23.52 ± 0.01 CDa	19.97 ± 0.03 Ba	10.65 ± 0.02 Cb	7.15 ± 0.02 Cb

Média ± Desvio Padrão de três determinações. Letras iguais maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem pelo teste Tukey $p \leq 0,05$.

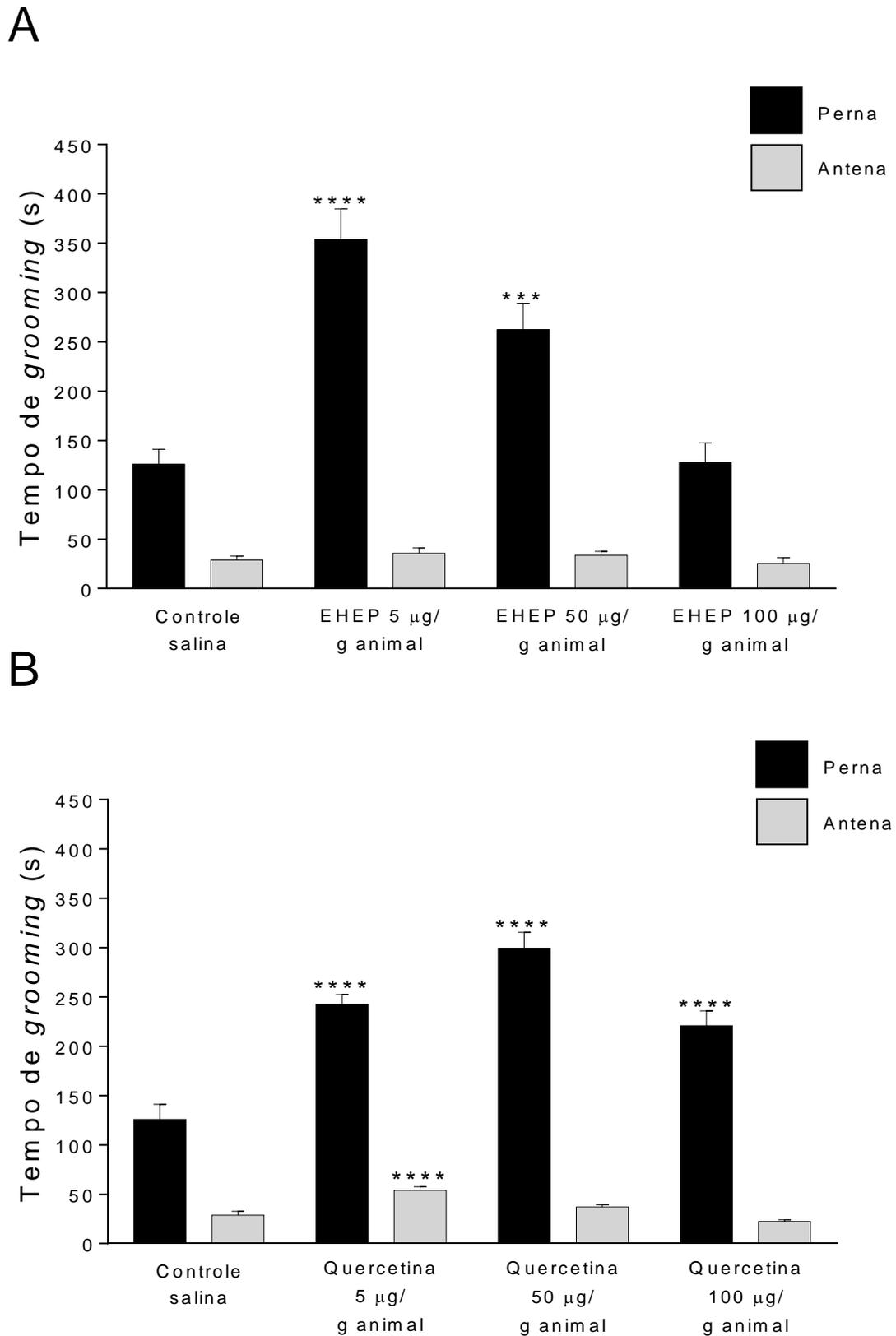
No primeiro ano de análise (2014) a concentração quantificada foi de $46.05 \pm 0,01 \text{ mg/g MS}^{-1}$, $40,17 \pm 0,01 \text{ mg/g MS}^{-1}$ e $38,61 \pm 0,02 \text{ mg/g MS}^{-1}$, respectivamente para os compostos ácido clorogênico, quercetina e ácido cafeico. Ainda, ácido gálico ($29,82 \text{ mg/ g MS}^{-1}$) também foi detectado. Os demais compostos, como catequina, rutina, ácido elágico, epicatequina, rutina e apigenina também foram observados, porém, em menores concentrações (Tabela 1).

Adicionalmente, foi possível identificar o mesmo comportamento nos três anos de armazenamento, porém com redução estatisticamente diferente, especialmente no último ano de armazenamento, 36 meses de armazenamento (2017) (Tabela 1). Ainda, o ácido gálico e catequina, já no primeiro ano de armazenamento (12 meses após a coleta e análise) demonstraram diminuição na concentração analisada (Tabela 1).

4.2 Modulação de EHEP e quercetina no comportamento de *grooming*

A administração de EHEP e quercetina (5; 50 e 100 $\mu\text{g/g}$ animal) alterou significativamente os movimentos de autolimpeza de *N. cinerea*, principalmente das pernas, quando comparado ao tratamento controle (Figura 9). O tratamento controle apresentou tempo médio de 125 s \pm 15,27 de limpeza das pernas e 28 s \pm 3,91 de limpeza das antenas. EHEP apresentou efeito dose-dependente (Figura 9 A), onde observamos o maior aumento de *grooming* de pernas quando a menor concentração de extrato era administrada (5 $\mu\text{g/g}$ animal = 353 s \pm 31,06; 50 $\mu\text{g/g}$ animal = 262 s \pm 47,89 e 100 $\mu\text{g/g}$ animal = 127 s \pm 20,17). EHEP não alterou significativamente o comportamento de limpeza das antenas, que se manteve constante em todos os tratamentos (5 $\mu\text{g/g}$ animal = 35 s \pm 5,31; 50 $\mu\text{g/g}$ animal = 33 s \pm 6,15 e 100 $\mu\text{g/g}$ animal = 25 s \pm 4,62).

Quando a quercetina, identificada como um dos compostos majoritários em *E. plana* (Tabela 1), foi administrada aos insetos, observamos modulação significativa de ambos os comportamentos de limpeza (pernas e antenas) (Figura 9 B). A dose intermediária de quercetina (50 $\mu\text{g/g}$ animal) induziu o maior aumento de tempo de *grooming* de pernas (299 s \pm 16,12), seguida pelos extremos (5 $\mu\text{g/g}$ animal = 242 s \pm 9,87 e 100 $\mu\text{g/g}$ animal = 220 s \pm 15,1). O flavonoide quercetina também induziu o aumento de *grooming* de antenas, onde apenas a menor dose mostrou-se significativa (5 $\mu\text{g/g}$ animal = 53 s \pm 3,91), enquanto as doses de 50 $\mu\text{g/g}$ animal e 100 $\mu\text{g/g}$ animal não diferiram significativamente do controle (37 s \pm 2,04 e 22 s \pm 1,45, respectivamente).

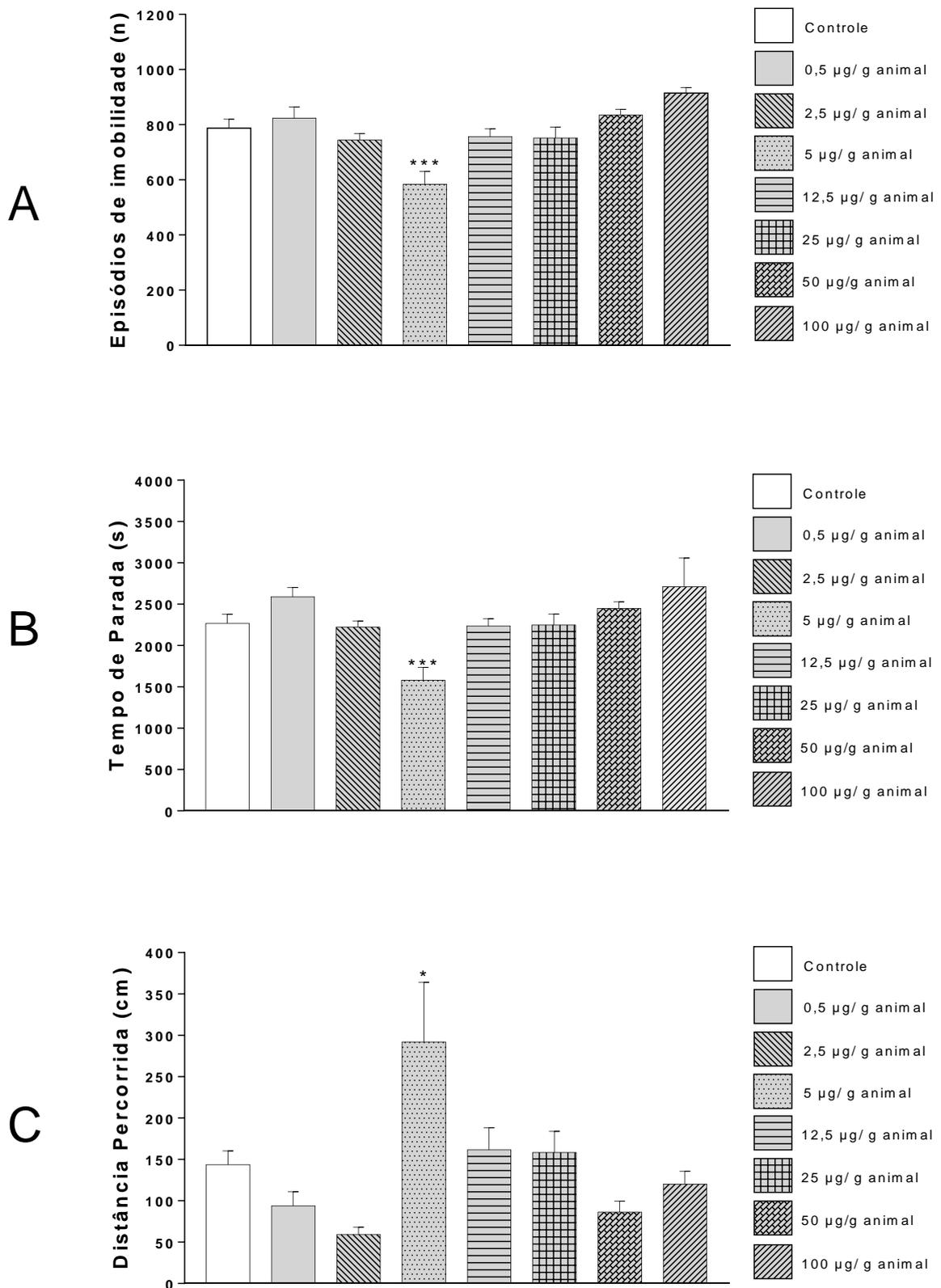
Figura 9 – Comportamento de *grooming* modulado pela administração EHEP ou quercetina

Os resultados foram expressos como Média \pm EPM através da análise One-way ANOVA, seguida pelo teste Dunnett, **** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$; $n=30$.

4.3 Modulação de EHEP sobre a locomoção de *N. cinerea*

A administração de EHEP (0,5; 2,5; 5; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/g}$ animal) interferiu de forma significativa no comportamento de locomoção dos espécimes de *N. cinerea*, durante os ensaios *in vivo* (Figura 10). Os testes comportamentais de locomoção demonstraram que EHEP diminuiu o número de episódios de imobilidade e o tempo de parada e aumentou significativamente a distância percorrida pelos animais. A dose de 5 $\mu\text{g/g}$ de animal demonstrou ser a única significativa sobre os parâmetros analisados. Observamos que essa dose diminuiu o número de episódios de imobilidade ($583 \pm 47,74$) e o tempo de parada ($1579 \pm 157,47$) em relação ao controle (episódios de imobilidade = $787 \pm 32,71$; tempo de parada = $2267 \pm 111,15$) (Figura 10 A e B). Ademais, a mesma dose aumentou a distância percorrida pelos animais em 149 cm em relação ao controle (controle = $143 \pm 16,8$; 5 $\mu\text{g/g}$ animal = $292 \pm 72,25$) (Figura 10 C).

Figura 10 – Locomoção de *Nauphoeta cinerea* modulado pela administração de EHEP. (A): episódios de imobilidade (n); (B): tempo de parada (s) e (C): distância percorrida (cm)

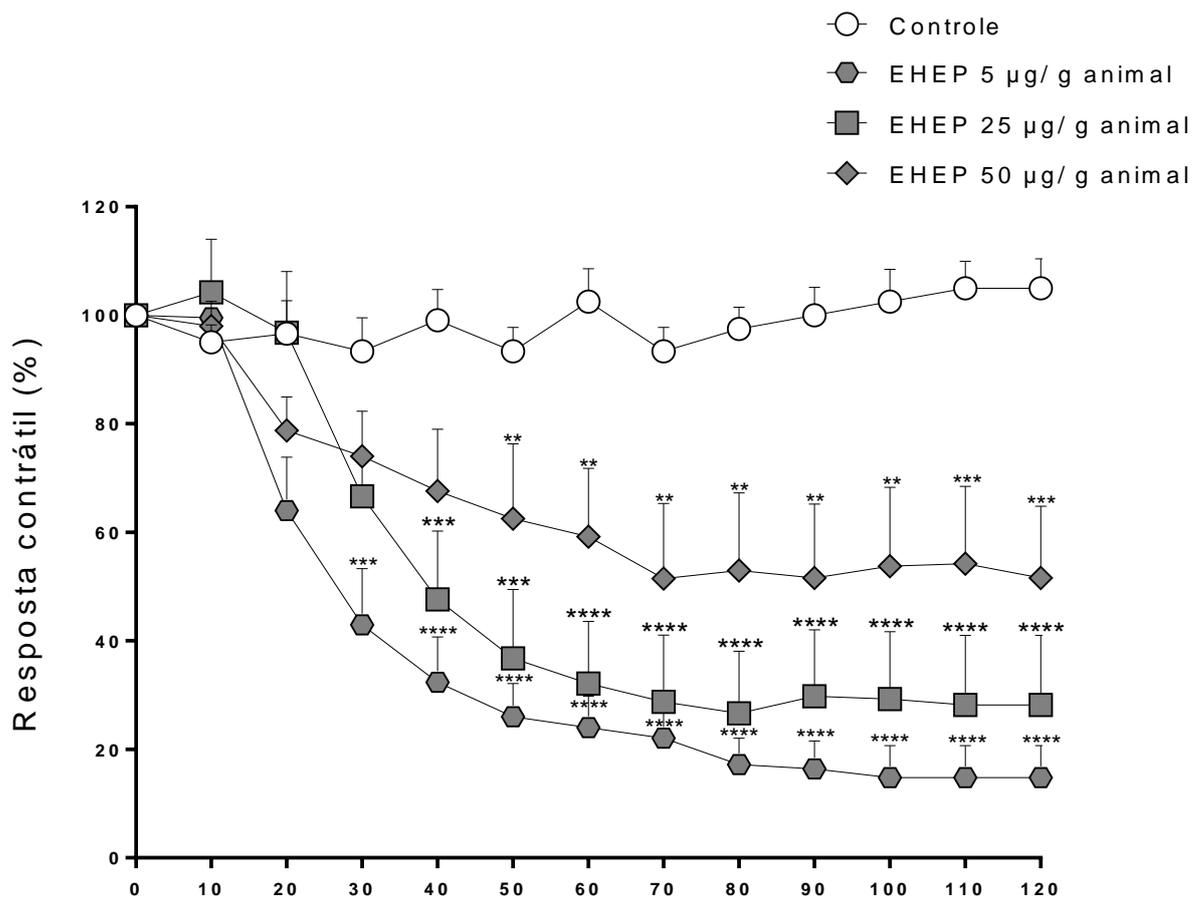


Os resultados foram expressos como Média \pm EPM através da análise One-way ANOVA, seguida pelo teste Dunnett, *** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$; $n=28$.

4.4 Diminuição da resposta contrátil induzida pelo EHEP

Os tratamentos com EHEP (5; 25 e 50 $\mu\text{g/g}$ animal) também demonstraram efeito dose-dependente, onde houve diminuição significativa da resposta contrátil das baratas em relação ao tratamento controle (100 % \pm 1,1 %) (Figura 11). Observamos que a maior concentração de EHEP diminuiu 49% \pm 13,9 % da resposta contrátil, em relação ao tratamento controle, após 70 min de registro. A dose intermediária (25 $\mu\text{g/g}$ animal) diminuiu 73,4 % \pm 11,5 % da contração após 80 min e a menor dose (5 $\mu\text{g/g}$ animal) apresentou diminuição acentuada da resposta contrátil de *N. cinerea* aos 100 min de registro (85,2 % \pm 6 %).

Figura 11 - Efeitos do EHEP sobre a preparação nervo-músculo coxal-abdutor de *Nauphoeta cinerea*

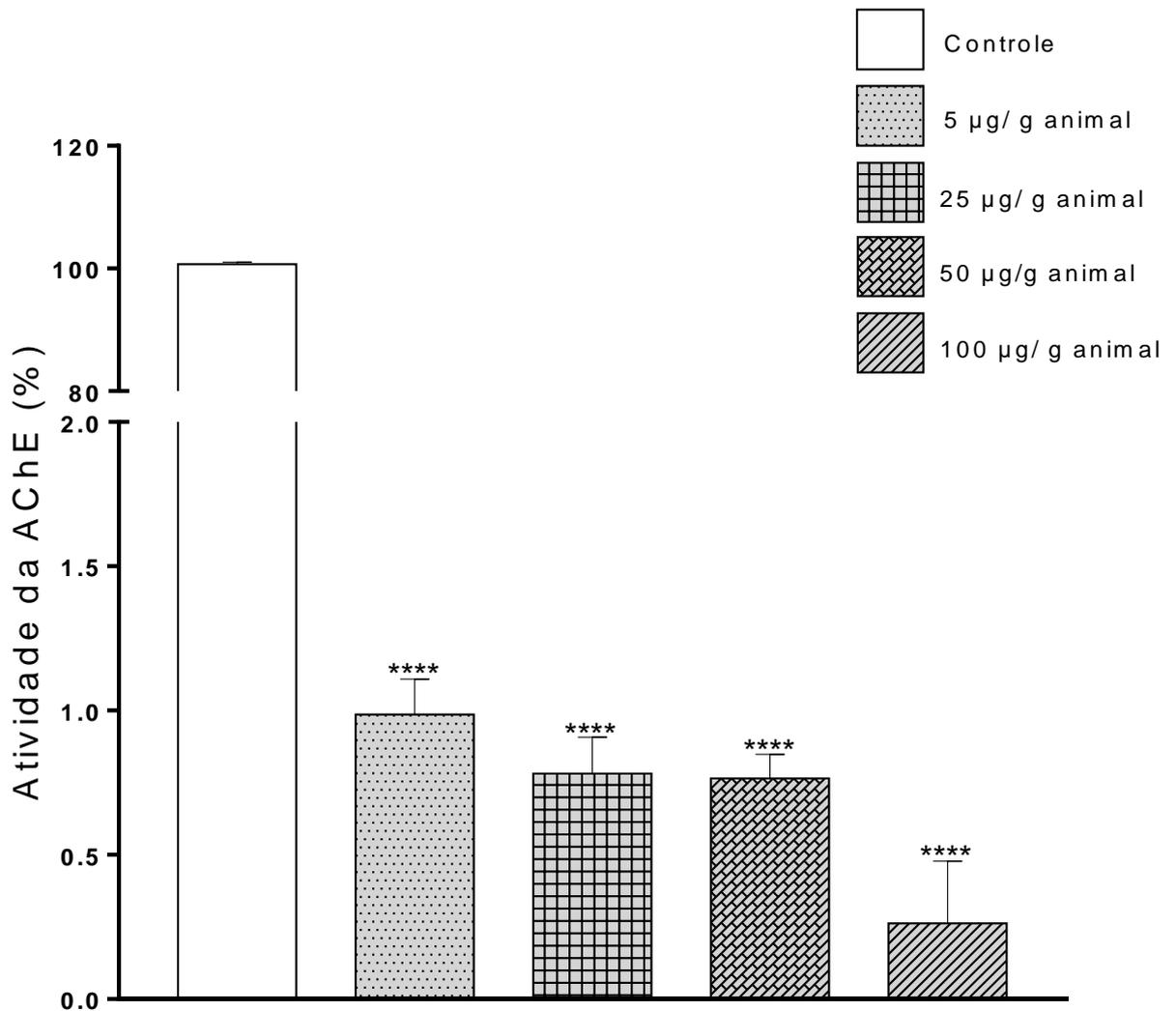


Os pontos na figura representam a Média \pm EPM da porcentagem da resposta contrátil em relação ao tempo controle. As análises foram realizadas por Two-way ANOVA, seguido por teste Bonferroni, **** $p \leq 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; $n=6$.

4.5 Inibição da atividade da enzima AChE pelo EHEP

A administração de EHEP (5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/g}$ animal) demonstrou inibição acentuada da atividade da enzima AChE (Figura 12). Para o tratamento controle a atividade enzimática foi de $100 \% \pm 0,35 \%$ e a incubação com EHEP demonstrou efeito dose-dependente sobre a atividade enzimática (5 $\mu\text{g/g}$ animal = $0,98 \% \pm 0,12 \%$; 25 $\mu\text{g/g}$ animal = $0,78 \% \pm 0,13 \%$; 50 $\mu\text{g/g}$ animal = $0,76 \% \pm 0,08 \%$ e 100 $\mu\text{g/g}$ animal = $0,26 \% \pm 0,21 \%$), onde a dose de 100 $\mu\text{g/g}$ animal diminuiu cerca de 99,74 % a atividade da enzima AChE.

Figura 12 - Efeitos do EHEP sobre a atividade da enzima AChE



Os resultados foram expressos como Média \pm EPM das porcentagens. As análises foram realizadas por One-way ANOVA, seguida pelo teste Dunnett, **** $p < 0,0001$; $n=6$.

5 DISCUSSÃO

Fiorenza *et al.* (2016) testaram o efeito alelopático de *E.plana* e quantificaram alguns compostos presentes em infusão e extratos metanólicos preparados com a parte aérea desse vegetal. Assim como no presente estudo, os autores encontraram como compostos fenólicos: ácidos clorogênico, elágico e caféico; como flavonoides: quercetina e rutina e como taninos: epicatequina e catequina. Além do potencial alelopático, esses produtos do metabolismo secundário de *E. plana* também conferem outras características a esses organismos, como palatabilidade (ZUCKER, 1983; TAIZ; ZEIGER, 2017), proteção contra radiação ultravioleta, estratégias de proteção ao estresse ambiental e pigmentação (TAIZ; ZEIGER, 2017). Desses compostos presentes em *E. plana*, podemos destacar a alta concentração de quercetina, composto já descrito pela sua atividade inseticida, caracterizada pela inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) (JUNG; PARK, 2007). Além disso, no presente estudo observamos que a concentração dos compostos identificados em *E. plana* variou de acordo com o tempo de armazenamento das amostras, o que pode estar relacionado às propriedades químicas dessas moléculas, como solubilidade e volatilidade.

Apesar de serem encontrados inúmeros trabalhos na literatura relacionados à *E. plana*, poucos se referem ao poder alelopático dessa espécie e inexistem trabalhos referentes ao seu possível papel bioinseticida. Ademais, são escassos trabalhos que caracterizam e quantificam o seu perfil fitoquímico, correlacionando as substâncias presentes com a sua ação biológica, não apenas sobre outros vegetais, mas também sobre invertebrados. Com a detecção dos princípios ativos, os produtos do metabolismo secundário de espécies vegetais podem trazer alternativas ecológicas para a redução do uso de defensivos agrícolas convencionais, sendo empregados na síntese de bioinsumos (ROSA *et al.*, 2007; RIGON *et al.*, 2013).

Em nossos ensaios, EHEP apresentou uma forte modulação sobre a via colinérgica, inibindo a ação da enzima AChE em níveis extremos (Figura 12). Possivelmente esse efeito está associado à presença de quercetina como um dos compostos majoritários em *E. plana*. Além da via colinérgica, podemos destacar a provável modulação do EHEP sobre as vias octopaminérgicas de *N. cinerea* observada durante os ensaios de *grooming* (Figura 9).

O aumento do *grooming* de perna por EHEP indica uma possível alteração nas vias de neurotransmissão da octopamina, efeito também demonstrado por Aguiar (2018). O fato de desconhecermos detalhadamente a proporção de compostos em cada uma das concentrações de EHEP torna difícil a total compreensão do mecanismo de ação sobre esse comportamento, entretanto, é provável que a quercetina seja um dos compostos responsáveis pelos efeitos observados. Além disso, resultados nos ensaios de *grooming* evidenciam a forte modulação de EHEP e quercetina sobre a limpeza de pernas, sendo que a concentração de 50 µg/ g de animal para ambos, extrato e composto puro, demonstraram ser totalmente equivalentes (Figura 9 A e B).

Adicionalmente, a complexidade do perfil fitoquímico também justifica o efeito de quercetina sobre o comportamento de limpeza das antenas, pois esse efeito só é observado quando quercetina é administrada em uma concentração muito baixa. Sendo assim, possivelmente há uma combinação de compostos no EHEP que, em conjunto, não sejam visivelmente atuantes sobre esse comportamento nas concentrações administradas (Figuras 9 A e B).

A diminuição do número de episódios de imobilidade (Figura 10 A) e do tempo de parada dos insetos (Figura 10 B) após a administração de EHEP indica uma provável modulação das vias colinérgicas, uma vez que essa via de neurotransmissão é uma das responsáveis pelo comportamento locomotor de insetos e ao fato de que o EHEP ocasionou a inibição da atividade da AChE em todas as concentrações propostas (Figura 12). O aumento da distância percorrida pelos insetos (Figura 10 C), em razão do tratamento com EHEP, indica que esses animais podem ficar desorientados e, portanto, suscetíveis a eventos que os levem ao exício. Frente a esses resultados, sugerimos a gramínea *E. plana* como um possível foco para a pesquisa de bioinseticidas. A concentração de 5 µg/g de animal, que outrora demonstrou a maior modulação sobre o aumento do *grooming* de perna, em relação à locomoção também demonstra ser a concentração ideal, que altera significativamente o padrão locomotor de *N. cinerea*.

A diminuição da resposta contrátil observada após a administração de EHEP pode estar relacionada ao aumento da concentração de GABA e/ou diminuição da concentração de glutamato nessas vias de neurotransmissão. Além disso, o nervo 5 metatorácico de insetos está relacionado ao funcionamento do sistema colinérgico (CARR; FOURTNER, 1980). Assim, a diminuição contrátil observada nas

preparações do nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico tratados com EHEP sugere que as sinapses gabaérgicas são ativadas e que há interação interneural com o sistema colinérgico, modulado por EHEP, com possível alteração das vias glutamatérgicas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os nossos resultados observamos que o extrato hidroalcoólico de *E. plana* alterou os padrões comportamentais, eletrofisiológicos e bioquímicos de *N. cinerea*, sugerindo entomotoxicidade.

O perfil fitoquímico dessa gramínea é bastante diversificado, justificando os efeitos neurotóxicos, tanto sobre o SNC quanto o SNP, observados sobre as preparações de *N. cinerea*. Podemos considerar que concentrações subletais desse extrato modulam as vias colinérgicas, inibindo a atividade da enzima AChE, além de prováveis alterações nas vias octopaminérgicas, gabaérgicas e glutamatérgicas. Esses sistemas de neurotransmissão estão diretamente relacionados aos processos vitais de insetos.

Frente ao exposto, embora esta espécie invasora limite em diversos aspectos a atividade agropecuária, *E. plana* apresenta alto potencial biotecnológico. Por ser uma potente inibidora da atividade da AChE, é um organismo em potencial para o estudo de novos bioinsumos com maior degradabilidade, especialmente boinseticidas. Ademais, os efeitos observados pela administração de quercetina contribuem para a elucidação dos sítios de ação desse metabólito no sistema nervoso de insetos.

É mister a prospecção do sítio de ação primário dos outros produtos do metabolismo secundário de *E. plana*, especialmente aqueles encontrados majoritariamente. Também é fundamental correlacionar a condição tempo-dependente à composição do EHEP em diferentes concentrações, para a melhor compreensão da forma pela qual essas biomoléculas são capazes de modular as vias de neurotransmissão dos invertebrados.

7 REFERÊNCIAS

ABRASCO. **Dossiê ABRASCO.** Disponível em < <http://abrasco.org.br/dossieagrotoxicos/> > Acesso em 02 de maio de 2019.

AGUIAR, Angélica V. **Potencial entomotóxico de extrato de *Eragrostis plana* Nees em modelo experimental de *Nauphoeta cinerea* Olivier.** 2018, 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa, 2018.

ALEWU, B.; NOSIRI, C. Pesticides and human health. *In: Pesticides in the Modern World-Effects of Pesticides Exposure.* **IntechOpen**, p. 231-250, 2011.

BÉLO, Muracy *et al.* Avaliação do efeito bioinseticida dos extratos de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae) e *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) sobre a mosca *Zaprionus indianus* (Díptera: Drosophilidae) (Gupta, 1970). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 3, p. 235-239, 2009.

BHATT, Mohit H.; ELIAS, Mikhail A.; MANKODI, Ami K. Acute and reversible parkinsonism due to organophosphate pesticide intoxication: five cases. **Neurology**, v. 52, n. 7, p. 1467-1467, 1999.

BRÜNING, Gilmar. **Efeito da suplementação mineral e protéica na composição químico-bromatológica da forragem e desempenho de novilhas em pastagem nativa dominada por capim-annoni-2 na depressão central-RS.** 2007. 140 f. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

CARNEIRO, Fernando Ferreira *et al.* **Dossiê ABRASCO:** um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. EPSJV/Expressão Popular, 2015.

CARR, Catherine E.; FOURTNER, Charles R. Pharmacological analysis of a monosynaptic reflex in the cockroach, *Periplaneta americana*. **Journal of Experimental Biology**, v. 86, n. 1, p. 259-273, 1980.

CARRAZONI, Thiago *et al.* Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. **Toxicology**, v. 368, p. 162-171, 2016.

CASSAL, Vivian Brusius *et al.* Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 437-445, 2014.

COLOSIO, C.; TIRAMANI, M.; MARONI, M. Neurobehavioral effects of pesticides: state of the art. **Neurotoxicology**, v. 24, n. 4-5, p. 577-591, 2003.

DALBOSCO, Talita. **Avaliação do potencial alelopático dos extratos foliares brutos do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) e estudo do óleo essencial.** 2013, 105 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.

DA SILVA, Andreia RH *et al.* Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 3, p. 908-916, 2014.

DE ASSIS, Renato Linhares; ROMEIRO, Ademar Ribeiro. Agroecologia e agricultura orgânica: controvérsias e tendências. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 6, p. 67-80, 2002.

DE JAEGER, Xavier. **Modelos animais de disfunção colinérgica: papel da acetilcolina na cognição**. 2010, 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

DE MEDEIROS, Renato Borges; FOCHT, Telmo. Invasão, prevenção, controle e utilização do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 13, p. 105-114, 2007.

DEMICCO, Amy *et al.* Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides in zebrafish embryos. **Toxicological Sciences**, v. 113, n. 1, p. 177-186, 2009.

DE VASCONCELOS, Geraldo José Nascimento; GONDIM, Manoel Guedes Corrêa; BARROS, Reginaldo. Extratos aquosos de *Leucaena leucocephala* e *Sterculia foetida* no controle de *Bemisia tabaci* biótipo B (*Hemiptera: Aleyrodidae*). **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1353-1359, 2006.

DOS SANTOS, Douglas Silva *et al.* Neurotoxic effects of sublethal concentrations of cyanobacterial extract containing anatoxin-a (s) on *Nauphoeta cinerea* cockroaches. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 171, p. 138-145, 2019.

FIORINZA, Mireli *et al.* Análise fitoquímica e atividade alelopática de extratos de *Eragrostis plana* Nees (capim-annoni). **Iheringia: Série Botânica**, v. 71, n. 2, p. 193-200, 2016.

GAL, Ram; LIBERSAT, Frederic. On predatory wasps and zombie cockroaches: investigations of free will and spontaneous behavior in insects. **Communicative & Integrative Biology**, v. 3, n. 5, p. 458-461, 2010.

GAZZIERO, Dionisio Luiz Pisa. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. **Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2015.

GERSCHENFELD, H. M. Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. **Physiological Reviews**, v. 53, n. 1, p. 1-119, 1973.

GOMES, Ingrid Naiara. **Bioensaios em laboratório indicam efeitos deletérios de agrotóxicos sobre as abelhas *Melipona capixaba* e *Apis mellifera***. 2017, 51 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

JOKANOVIĆ, Milan; KOSANOVIĆ, Melita. Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 29, n. 3, p. 195-201, 2010.

JUNG, Mankil; PARK, Moonso. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. **Molecules**, v. 12, n. 9, p. 2130-2139, 2007.

KAMDEM, Jean Paul et al. In vitro antioxidant activity of stem bark of *Trichilia catigua* Adr. Juss. **Acta Pharmaceutica**, v. 62, n. 3, p. 371-382, 2012.

LEAL, Allan Pinto et al. Entomotoxic activity of *Rhinella icterica* (Spix, 1824) toad skin secretion in *Nauphoeta cinerea* cockroaches: An octopamine-like modulation. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 148, p. 175-181, 2018.

LIBERSAT, Frederic; PFLUEGER, Hans-Joachim. Monoamines and the orchestration of behavior. **Bioscience**, v. 54, n. 1, p. 17-25, 2004.

MARTINELLI, Anne H. S. *et al.* Structure–function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. 3, p. 935-944, 2014.

MATEO-SAGASTA, Javier; ZADEH, S. M.; TURRAL, H. **More people, more food, worse water?: a global review of water pollution from agriculture**. Rome, Italy: FAO Colombo, Sri Lanka: International Water Management Institute (IWMI). CGIAR Research Program on Water, Land and Ecosystems (WLE), 2018.

MELO, Marília Martins; DE OLIVEIRA, Neide Judith Faria; LAGO, Luiz Alberto. Intoxicações causadas por pesticidas em cães e gatos. Parte I: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 5, n. 2, p. 188-195, 2002.

OSBORNE, Richard H. Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. **Pharmacology & therapeutics**, v. 69, n. 2, p. 117-142, 1996.

PERES, Frederico; MOREIRA, Josino Costa; DUBOIS, Gaetan Serge. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. **É veneno ou é Remédio**, p. 21-41, 2003.

PERES, Frederico *et al.* El uso de pesticidas en la agricultura y la salud del trabajador rural en Brasil. **Revista Ciencia y Trabajo**, v. 9, n. 26, p. 158-163, 2007.

PINHEIRO, José Nunes; FREITAS, Breno Magalhães. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 266-281, 2010.

PORTO, Marcelo Firpo; SOARES, Wagner Lopes. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Revista brasileira de Saúde ocupacional**, v. 37, n. 125, p. 17-50, 2012.

REID, Christopher *et al.* *Eragrostis plana* (Poaceae) new to Texas. **Phytoneuron**, v. 5, p. 1-3, 2015.

RIGON, C. A. G. *et al.* 2013. Potencial alelopático de extratos de mamoneira sobre a germinação e crescimento de azevém. **Revista Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 7, n. 2, p. 1-7, 2013.

ROSA, Danielle Medina *et al.* 2007. Efeito dos extratos de tabaco, leucena e sabugueiro sobre a germinação de *Panicum maximum* Jacq. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 444-446, 2007.

RODRIGUES, Nathane Rosa *et al.* Is the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* a valuable model for evaluating mercury induced oxidative stress?. **Chemosphere**, v. 92, n. 9, p. 1177-1182, 2013.

SEPÚLVEDA JIMÉNEZ, Gabriela; PORTA DUCOING, Helena; ROCHA SOSA, Mario. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. **Revista mexicana de fitopatología**, v. 21, n. 3, p. 353-363, 2003.

SOUZA, Gustavo dos Santos *et al.* Presença de agrotóxicos na atmosfera e risco à saúde humana: uma discussão para a Vigilância em Saúde Ambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3269-3280, 2017.

STÜRMER, Grazielle Daiane *et al.* Modulation of dopaminergic neurotransmission induced by sublethal doses of the organophosphate trichlorfon in cockroaches. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 109, p. 56-62, 2014.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre, Artmed, 2017.

TARKOWSKI, Maciej; LUTZ, Waldemar; BIRINDELLI, Sarah. The lymphocytic cholinergic system and its modulation by organophosphorus pesticides. **International journal of occupational medicine and environmental health**, v. 17, n. 3, p. 325-337, 2004.

UGGINI, Gowri K.; PATEL, Prabhudas V.; BALAKRISHNAN, Suresh. Embryotoxic and teratogenic effects of pesticides in chick embryos: a comparative study using two commercial formulations. **Environmental toxicology**, v. 27, n. 3, p. 166-174, 2012.

ZUCKER, William V. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. **The American Naturalist**, v. 121, n. 3, p. 335-365, 1983.