



Universidade Federal do Pampa

Campus São Gabriel

Bacharelado em Biotecnologia

FABÍOLA DUARTE MACHADO DOS SANTOS

**IMPACTOS DO ORGANOFOSFORADO TRICLORFON SOBRE A FREQUÊNCIA
CARDÍACA DE *Nauphoeta cinérea* Oliver 1974**

São Gabriel

2015

FABÍOLA DUARTE MACHADO DOS SANTOS

**IMPACTOS DO ORGANOFOSFORADO TRICLORFON SOBRE A FREQUÊNCIA
CARDÍACA DE *Nauphoeta cinerea***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no *campus* de São Gabriel da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Professor Dr. Chariston André Dal Belo.

São Gabriel

2015

**IMPACTOS DO ORGANOFOSFORADO TRICLORFON SOBRE A FREQUÊNCIA
CARDÍACA DE *Nauphoeta cinerea***

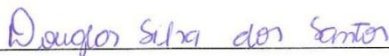
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no
campus de São Gabriel da Universidade Federal do
Pampa, como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 03 de dezembro de
2015.


Banca examinadora:



Prof. Doutor Chariston André Dal Belo
Orientador
UNIPAMPA



Doutorando Douglas Silva dos Santos
UFSM



Prof. Doutor Ronaldo Erichsen
UNIPAMPA

Dedico esse Trabalho aos meus pais, minha avó Lourdes José, ao meu tio Luis Machado e aos demais membros da minha família, que apesar da distância sempre me ampararam com seu afago, até mesmo nos momentos em que me vi esmorecer.

AGRADECIMENTOS

A minha vó por acreditar em mim a todo o momento, pelo auxílio com os custos durante a minha graduação, aos meus pais por sempre me incentivarem a nunca desistir dos meus sonhos, ao meu tio Luis Machado dos Santos pelos conselhos e aos demais membros da minha família, pois minha família sempre será o pilar que me mantém de pé.

A professora Lúcia Vinadé, ao meu orientador Cháriston André Dal Belo e ao meu coorientador Douglas Silva dos Santos por compartilharem dos seus conhecimentos comigo, conhecimentos esses que foram de fundamental importância para conclusão desse trabalho.

Ao corpo docente da UNIPAMPA, onde me deparei com professores de excelente qualidade, os quais contribuíram para o aprimoramento do meu conhecimento no meio acadêmico.

A equipe do LANETOX (Laboratório de Neurobiologia e Toxinologia) pela parceria que mantivemos no laboratório e a ajuda fornecida para o término de dados experimentais, à ex-aluna Polyana Veloso Rodrigues, que foi de suma importância para a realização desse projeto.

Aos moradores de São Gabriel que me acolheram em sua cidade com tanto carinho, e às pessoas como a Luciana Catardo, Talita Moraes, Letícia Madeira que fizeram de sua família a minha, me ajudando nos momentos mais difíceis durante a graduação, e aos demais amigos que fiz durante minha estadia aqui.

A Deus, pois mesmo iniciando dentro da ciência, acredito sua força superior que nos rege.

E à CAPES que foi o órgão que financiou essa pesquisa; sem esse auxílio de custeio esse trabalho jamais teria sido realizado.

A todos o meu mais sincero, Obrigada!

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até aonde os outros já foram”.

Alexander Graham Bell

LISTA DE ABREVIATURAS

CSIB – Coração semi-isolado de barata

TRC – Triclorfon

EPM – Erro padrão da média

Ach – Acetilcolina

RESUMO

O uso de inseticidas organofosforados no Brasil tem acarretado graves problemas ambientais devido às grandes dosagens. Os efeitos tóxicos desses compostos ainda são pouco conhecidos sobre os diferentes sistemas fisiológicos de insetos. Nesse trabalho propusemo-nos investigar a atividade do organofosforado Triclorfon sobre a frequência cardíaca de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. Foram usadas baratas da espécie *N. cinerea* de ambos os sexos, mantidas em insetário com temperatura controlada (24-25°C) e água e ração *ad libitum*. Para a montagem da preparação coração semi-isolado de barata (CSIB), os animais foram anestesiados por resfriamento à 4°C por 10 min. Os animais foram afixados em uma plataforma de isopor por meio de alfinetes entomológicos e as margens laterais do abdômen foram cortadas ao longo de cada lado com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e a cutícula abdominal foi removida com a ajuda de uma pinça, expondo as vísceras que foram cuidadosamente afastadas para expor o coração. O coração foi banhado em solução salina para insetos 0,15 mM em temperatura ambiente em volume final de 200 ml. A frequência cardíaca foi monitorada por meio de um microscópio estereoscópico (Olympus, Damstat, Alemanha) durante 30min. Os registros foram feitos em um tempo total de 120 min. Foi usado o teste Two way ANOVA para análise estatística. A análise da frequência cardíaca em preparação (CSIB) incubada apenas com solução salina foi de $90 \pm 1\%$ batimentos por min (bpm). Quando o triclorfon foi incubado nas concentrações de 20, 100 e 500µg/mL, houve um efeito tempo-dependente na frequência cardíaca, ocorrendo uma diminuição máxima de $50 \pm 2\%$ (100µg/ml) no cronotropismo cardíaco em 30 min ($n=9$, $p < 0.05$). Quando a octopamina 0,5-5µg/ml foi ensaiada, houve uma diminuição máxima da frequência cardíaca de $25 \pm 3\%$ com a maior concentração, em 30 min ($n=9$, $p < 0.05$). Também foram ensaiadas a acetilcolina e neostigmina, 5µg/ml, que induziram uma diminuição de $20 \pm 3\%$ e $19 \pm 1\%$ da frequência cardíaca em 30min, respectivamente ($n=9$, $p < 0.05$). O ensaio da dexametasona 20 µg/ml, induziu uma diminuição da frequência cardíaca de $35 \pm 4\%$ em 30 min ($n=9$, $p < 0,05$). Esses resultados demonstram que os pesticidas organofosforados exercem um efeito tóxico direto sobre o sistema cardiovascular de insetos. A inibição da enzima fosfolipase A_2 pela dexametasona demonstrou que essa via é importante para a modulação da frequência cardíaca em insetos e será alvo de novos estudos. Também reforçam o papel dos agentes colinérgicos atuando diretamente sobre o cronotropismo cardíaco de insetos. Esses dados demonstram o potencial tóxico dos organofosforados que na natureza podem influenciar diretamente insetos benéficos não-alvo, acarretando sérios prejuízos ao meio ambiente.

Palavras-chave: Baratas, coração semi-isolado; organofosforados; eicosanóides

ABSTRACT

In Brazil the use of organophosphate insecticides is provoking serious environmental problems because of the large dosages used. The toxic effects of these compounds are not completely understood in the different physiological systems of insects. In this work we sought to investigate the activity of the organophosphate Trichlorfon in the cardiac rhythm of *Nauphoeta cinerea* cockroaches. The cockroach *N. cinerea* of both sex were kept in insectary under controlled temperature (24-25 ° C) with water and food *ad libitum*. Cockroach semi-isolated heart preparation (CSIB) was mounted by anesthetizing the animals by cooling at 4 °C for 10 min. The animals were then fixed in a platform with entomological needles and the sides of the abdomen edges were cut along each side. The abdominal cuticle was removed with the aid of surgical scissors and with tweezers to expose the viscera which have been carefully removed to improve the heart observation. The heart was bathed in insect saline 0.15 mM at room temperature in a final volume of 200 µl. The heart rate was monitored by means of a stereomicroscope (Olympus, Damstat, Germany) for 30 minutes. The recordings were made in a total time of 120 min. Statistical analysis was applied using Two way ANOVA test. The analysis of control heart rate (CSIB) incubated only with saline was $90 \pm 1\%$ beats per minute (bpm). When trichlorfon was incubated at concentrations of 20, 100, 500µg / mL, there was a time dependent effect on heart rate, causing a maximal decrease of $50 \pm 2\%$ (100µg / ml) in the frequency of the heart beats in 30min ($n = 9$, $p < 0.05$). When octopamine 0,5-5µg / ml was tested, there was a decrease in maximum heart rate of $25 \pm 3\%$ with the highest concentration at 30 min ($n = 9$, $p < 0.05$). Acetylcholine and neostigmine, 5µg / ml, were also assayed and induced a decrease of $20 \pm 3\%$ and $19 \pm 1\%$ of cardiac frequency in 30 minutes, respectively ($n = 9$, $p < 0.05$). When dexamethasone 20 / ml was tested, there was a decrease in heart rate of $35 \pm 4\%$ at 30 min ($n = 9$, $p < 0.05$). These results demonstrate that the organophosphate pesticides exert a toxic effect on the cardiovascular system of insects. Inhibition of phospholipase A₂ by dexamethasone demonstrated that this pathway is important for modulating the cardiac frequency in insects and will be subject of further studies. Also reinforce the role of cholinergic agents acting directly on the cardiac rhythm of insects. These data demonstrate the toxic potential of organophosphates that in nature can directly influence non-target insects, causing serious damage to the environment.

Key-words: Cockroaches, semi-isolated heart; organophosphates, eicosanoids.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Inseticidas químicos e suas aplicações.....	12
1.2. Organofosforado tricloron em relação sua atividade neurofarmacologica....	13
1.3. O Sistema Cardiovascular de insetos	14
1.4. Eicosanóides e as vias de sinalização celular em insetos	15
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo Geral	18
3.2. Objetivos Específicos	18
4. METODOLOGIA	19
4.1. Animais	19
4.2. Solução fisiológica (solução salina).....	19
4.3. Drogas.....	20
4.4. Preparação do coração semi-isolado (CSI).....	20
4.5. Análise estatística dos dados.....	21
5. RESULTADOS	22
5.1. Ensaio com triclorfon.....	22
5.2. Ensaio com os outros compostos químicos e neurotransmissores de inseto	24
6. DISCUSSÃO	26
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	29
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	30

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inseticidas químicos e suas aplicações

Os inseticidas têm sido usados pelo homem desde a antiguidade para controlar pragas em lavouras (CASARETT & DOULL'S, 2007). Nesse contexto, agrotóxicos são substâncias classificadas de acordo com o seu grau de toxicidade, em relação ao seu mecanismo de ação com o organismo alvo ou a natureza da praga a ser combatida. Podem ser classificados como inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas e/ou raticidas, acaricidas, nematocidas, fumigantes, moluscocidas, entre outros (OGA, S, 2003). Dessa forma, inseticidas podem ser definidos como compostos químicos não espécie-seletivos dos quais humanos e insetos são altamente sensíveis (CASARETT & DOULL'S, 2007).

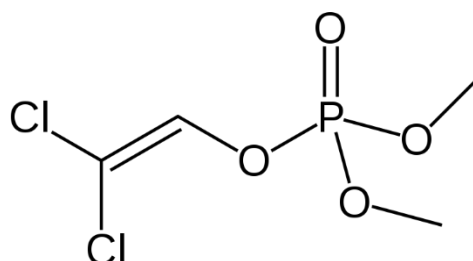
Os inseticidas são classificados de acordo com a sua composição química, podendo ser caracterizados em: **1-organoclorados** (DDT, BHC, HHC), que são compostos orgânicos contendo ligações de átomos de carbono covalentes em sua cadeia; **2-organofosforados** (PARATHION, MALATHION, ORTHENE, BIDRIN) que são à base de ácido fosfórico, menos tóxico que os organoclorados, os organofosforados geralmente se apresentam com a mesma conformação estrutural; **3-carbamatos** (CARBARYL, METHOMIL, FURADAN) que são compostos de ácido carbâmico, em sua grande maioria sintetizada a partir dos organofosforados; **4-piretróides** que são sintetizados a partir do composto piretrina (OGA, S, 2003).

Os inseticidas organofosforados agem basicamente sobre a inibição da enzima acetilcolinesterase de insetos e mamíferos (NICRASTO, R. L; SATO, M. E; SILVA, M. Z, 2010). Esses compostos foram sintetizados pela primeira vez pelo químico alemão Gerhard Shrader durante a segunda guerra mundial (HENRIQUE, F; PELAEZ, V; LETÍCIA RODRIGUES, L. SILVA, 2010). A figura 1 mostra uma molécula básica dos compostos organofosforados.

No Brasil, a Lei Federal nº 7.802, de 12 de julho de 1989 (BRASIL, 1989), relata que todos os inseticidas são compostos oriundos de sistemas físicos, químicos ou biológicos, sendo destinados para uso no sistema de produção ou armazenamento agrícola, ou na prevenção, destruição, repelência ou destruição de insetos-praga. O uso excessivo de agrotóxicos no Brasil tem ocasionando um

grande desequilíbrio ecológico, o que acaba desenvolvendo populações de insetos resistentes (BOHMONT, 1981).

Figura 1: Conformação geral da estrutura do organofosforado.

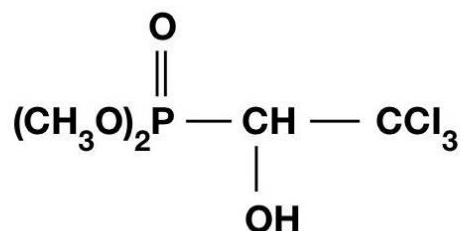


Fonte: Casarett & Daull's (2008, p, 888)

1.2 Organofosforado triclorfon em relação sua atividade neurofarmacologica

O organofosforado triclorfon (Fig. 2), é atualmente o composto químico mais usado na agricultura para combater insetos-praga (LOPES, R. B et al; 2006). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o triclorfon se enquadra dentro da classe toxicológica II, sendo considerado altamente tóxico. No meio ambiente o Triclorfon (TRC) possui uma meia vida de 27 dias, mas em contato com o sistema fisiológico do inseto, a sua atividade pode se estender por mais tempo, ocasionando um elevado acúmulo no sistema nervoso central desses organismos (LOPES, R. B et al., 2006). Recentemente nosso grupo demonstrou que o organofosforado triclorfon induz profundas alterações comportamentais em baratas, mesmo quando administrado em doses subletais (STUMER et al., 2014). Por outro lado, não existem até o momento estudos quanto a atividade do triclorfon sobre o sistema cardiovascular de insetos.

Figura 2: Estrutura química do Triclorfon



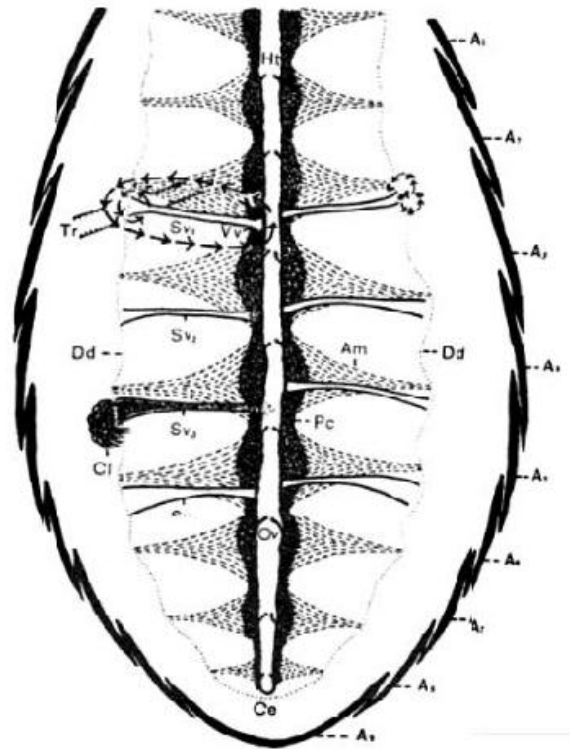
Fonte: Fitogest (2014)

1.3 O Sistema Cardiovascular de insetos

Esse sistema é composto por um coração dorsal contendo seis câmaras abertas em formato tubular que abrangem doze segmentos, formando um coração primitivo (Fig. 5). Contém uma aorta que juntamente com os músculos alares bombeiam a hemolinfa por meio de válvulas ostiolares que impedem o refluxo (Fig. 3). A hemolinfa é bombeada pelo coração, sendo responsável pela distribuição dos nutrientes, sais minerais e o transporte de substâncias a serem excretadas. Órgãos pulsáteis acessórios, como os músculos alares, fazem parte do aparelho respiratório do inseto mas auxiliam a irrigação dos apêndices, asas e pernas (SILVA, 2013).

A natureza fisiológica exata dos batimentos cardíacos em insetos, quanto a serem neurogênicos ou miogênicos, tem sido matéria de discussões científicas. Observações feitas em sistema cardiovascular de artrópodes indicam a possibilidade de uma regulação neurogênica da frequência cardíaca (JONES, J. C, 1974). Por outro lado, estudos realizados *in vitro* com corações desnervados de insetos demonstram que os mesmos foram capazes de contrair por um determinado tempo em solução salina, sugerindo uma regulação miogênica para as contrações sistólicas (MILLER, T 1969). Vários moduladores químicos já demonstraram atividade sobre a frequência cardíaca de insetos. Infelizmente, esses ensaios preliminares não demonstraram consistência, tornando a interpretação do papel de neurotransmissores sobre a frequência cardíaca de insetos um assunto ainda em debate. Neurotransmissores como a acetilcolina, octopamina, serotonina, dopamina dentre outros, demonstram atividade cardioaceleratória (HIDEO HONDA, 2007) enquanto que a proctolina induziu efeitos inibitórios (CLARK, L, 2006).

Figura 3: Sistema cardiovascular dos insetos.



Fonte: The American Cockroach, 2005

1.4 Eicosanóides e as vias de sinalização celular em insetos

A via do ácido aracdônico é uma cascata metabólica que usa esse composto para a síntese de uma série de mediadores lipídicos com atividade farmacológica chamados de eicosanóides. Esse processo começa à partir da ativação de uma fosfolipase A_2 de membrana. A histamina, bradicinina, serotonina e as prostaglandinas são alguns mediadores relacionados com o metabolismo do ácido aracdônico, sendo produzidas pelas enzimas ciclooxigenases e lipoxigenases. As ciclooxigenases são classificadas em enzimas COX-1, COX-2 e COX-3 (BOUTTING, 2003). O metabolismo do ácido aracdônico dá origem a inúmeras outras substâncias biologicamente ativas como: prostaglandinas, tromboxanos (Txs), ácido hidroieicoastetraenóide (HETE), ácido hidroperoxicieicostetraenóicos (HPETES), leucotrienos (LTs) e ácido epoxieicosatetraenóicos (EETS), que também são de

grande importância para a cascata da inflamação. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) bem como os esteroidais (AIES), do qual a dexametasona é um membro, correspondem ao grupo de fármacos que inibem a cascata de formação dos eicosanóides por diferentes vias. A enzima fosfolipase A₂, presente em membranas cardiovasculares de insetos e mamíferos, é responsável pela transformação dos fosfolípidios em ácido araquidônico e é inibida pelos AINEs (GEORGIA, C. ATELLA; DAVID MAJEROWICZ; KATIA, C. GONDIM, 2012). Estudos recentes demonstram que o ácido araquidônico possui um papel na modulação positiva da frequência cardíaca de artrópodes (BOTTING, 2003). Por outro lado, a influência dessa via de sinalização celular ainda não foi comprovada em baratas.

2. JUSTIFICATIVA

O organofosforado triclorfon é um composto considerado de grande toxicidade e é muito utilizado como agente inseticida na agropecuária. Pesquisas recentes demonstram que o triclorfon atua sobre o sistema nervoso dos insetos, modulando o comportamento desses animais em doses subletais. Dessa forma, uma melhor compreensão acerca do mecanismo de atuação do triclorfon sobre diferentes sistemas neurofisiológicos é de extrema importância, para uma melhor compreensão dos impactos gerados pelos compostos organofosforados na natureza. Nesse trabalho, foi investigada a atividade do organofosforado triclorfon e de vias relacionadas à modulação da frequência cardíaca de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*, no sentido de aumentar o conhecimento sobre a influência do sistema cardiovascular na atividade entomotóxica e moduladora do comportamento induzida pelos organofosforados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

-Investigar a influência do organofosforado triclorfon sobre a modulação da frequência cardíaca de *Nauphoeta cinerea*.

3.2 Objetivos Específicos

-Caracterizar a ação de doses subletais do Triclorfon sobre o ritmo cardíaco de *Nauphoeta cinerea*;

-Investigar diferentes vias de modulação da frequência de *Nauphoeta cinerea* usando-se compostos farmacológicos de mecanismos de ação reconhecidos;

-Investigar a influência das vias do ácido aracdônico sobre a modulação da frequência cardíaca de *Nauphoeta cinerea*.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram usados animais adultos da espécie *Nauphoeta cinerea* de ambos os sexos. Os animais foram mantidos com água e ração (Purina®) *ad libitum*, sob condições de temperatura controlada (22-25°C), em insetário do *Campus* São Gabriel da Universidade Federal do Pampa.

Figura 4: Imagem do insetário para criação de *Nauphoeta cinerea*.



Fonte: Post small creatures

4.2 Solução fisiológica (solução salina para insetos)

A solução salina para insetos foi preparada de acordo como a composição em mM: NaCl 150, CaCl₂ 2, KCl 10 e Tris-HCl 10, em pH 6.8 corrigido com NaOH 2N. O pH foi medido com pHmetro de eletrodo de vidro, previamente calibrado.

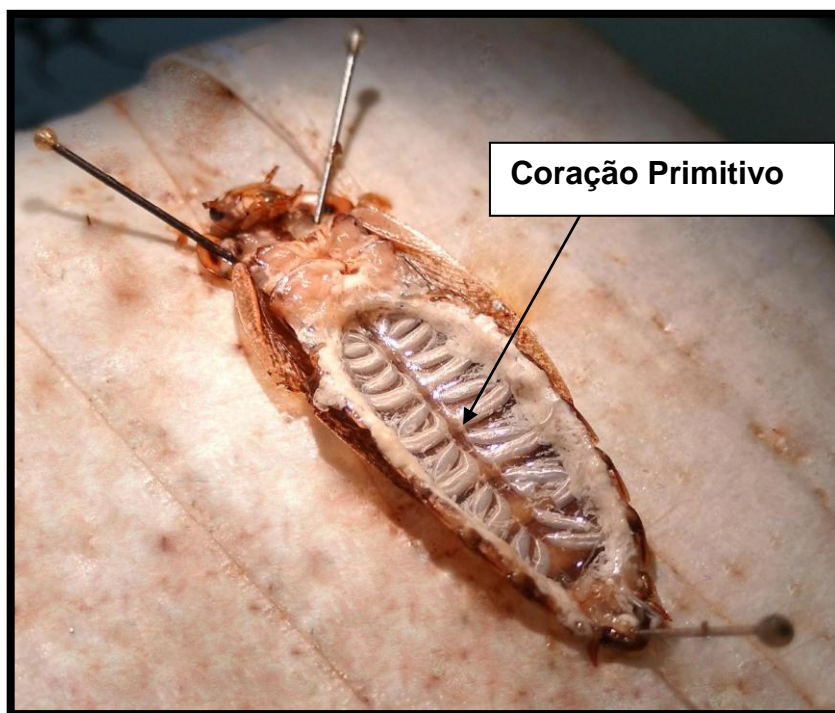
4.3 Drogas

As drogas ensaiadas foram pesadas em balança analítica (SHIMADZU AUW220D) e dissolvidas na mesma solução salina usada nos ensaios controle. Todos os compostos foram dissolvidos e preparados diariamente e quando necessário estocados em geladeira.

4.4 Preparação do coração semi-isolado de *Nauphoeta cinerea*

A preparação coração semi-isolado da *Nauphoeta cinerea* foi montada seguindo-se o protocolo de BAUMANN; GRESCH 1982 adaptado por RODRÍGUEZ *et al.* 2012. Esse método foi utilizado para observar os efeitos das drogas ensaiadas sobre os batimentos cardiovasculares. Os animais foram anestesiados por resfriamento a 4°C por 10 min. À seguir, os mesmos foram colocados em decúbito dorsal em uma placa de dissecação e imobilizados por meio de alfinetes entomológicos. As laterais do abdome foram cortadas com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e uma pinça entomológica removendo-se a cutícula abdominal, expondo assim as vísceras, as quais foram cuidadosamente afastadas, para permitir a visualização do coração e a adequada contagem dos batimentos cardíacos. O coração foi lavado várias vezes com solução salina para insetos e posteriormente banhado com um volume de 150µL da mesma solução em temperatura ambiente (22-25°C). Após um período de 5 minutos para a estabilização da frequência cardíaca, os diferentes tratamentos foram administrados sobre o coração não ultrapassando o volume final de 150 µL/animal. Os batimentos cardíacos foram monitorados visualmente durante 30 minutos, usando-se um microscópio estereoscópio (Olympus, Damstat, Alemanha). Após esse período, a preparação foi lavada com solução salina e monitorada por mais 5 minutos para verificar se haveria recobro da frequência cardíaca. Para cada dose de reagente testada foram usados no mínimo nove animais (n=9).

Figura 5: Preparação coração semi-isolado de barata (CSIB) da espécie *Nauphoeta cinerea*.



Fonte: Douglas Santos

4.5 Análise estatística dos dados

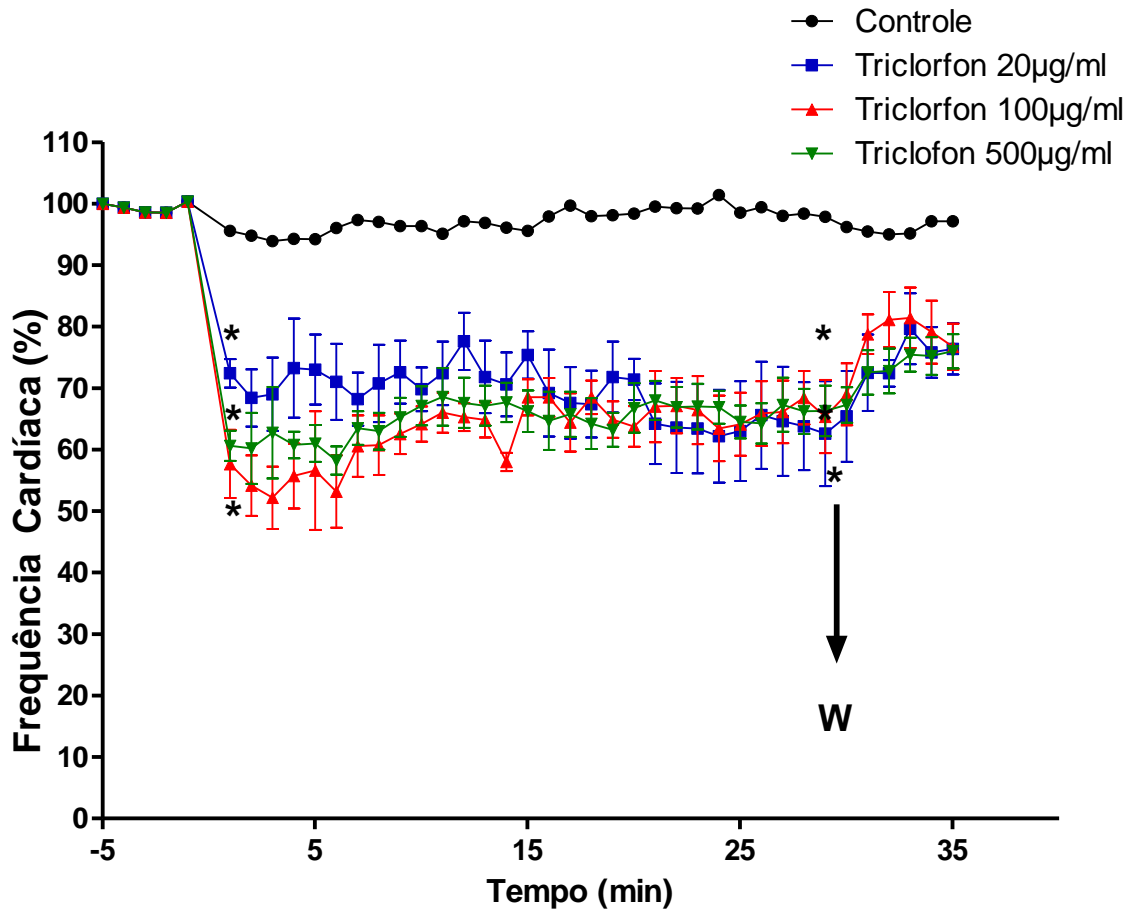
Os dados foram analisados e plotados como média \pm erro padrão, com auxílio do *software* Graph Pad PRISM 5. A análise estatística foi realizada utilizando o método ANOVA de duas vias. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Ensaio com triclorfon

Quando o triclorfon foi incubado nas concentrações de 20, 100, 500 μ g/mL, houve um efeito cronotrópico negativo tempo-dependente, que se caracterizou por uma diminuição máxima de $50 \pm 1\%$ na frequência dos batimentos cardíacos em 30 min, com a dose de 100 μ g/ml. Não houve diferença significativa entre os resultados para as doses ensaiadas. Não houve reversão da resposta cronotrópica após a lavagem da preparação como solução salina (Figura 6).

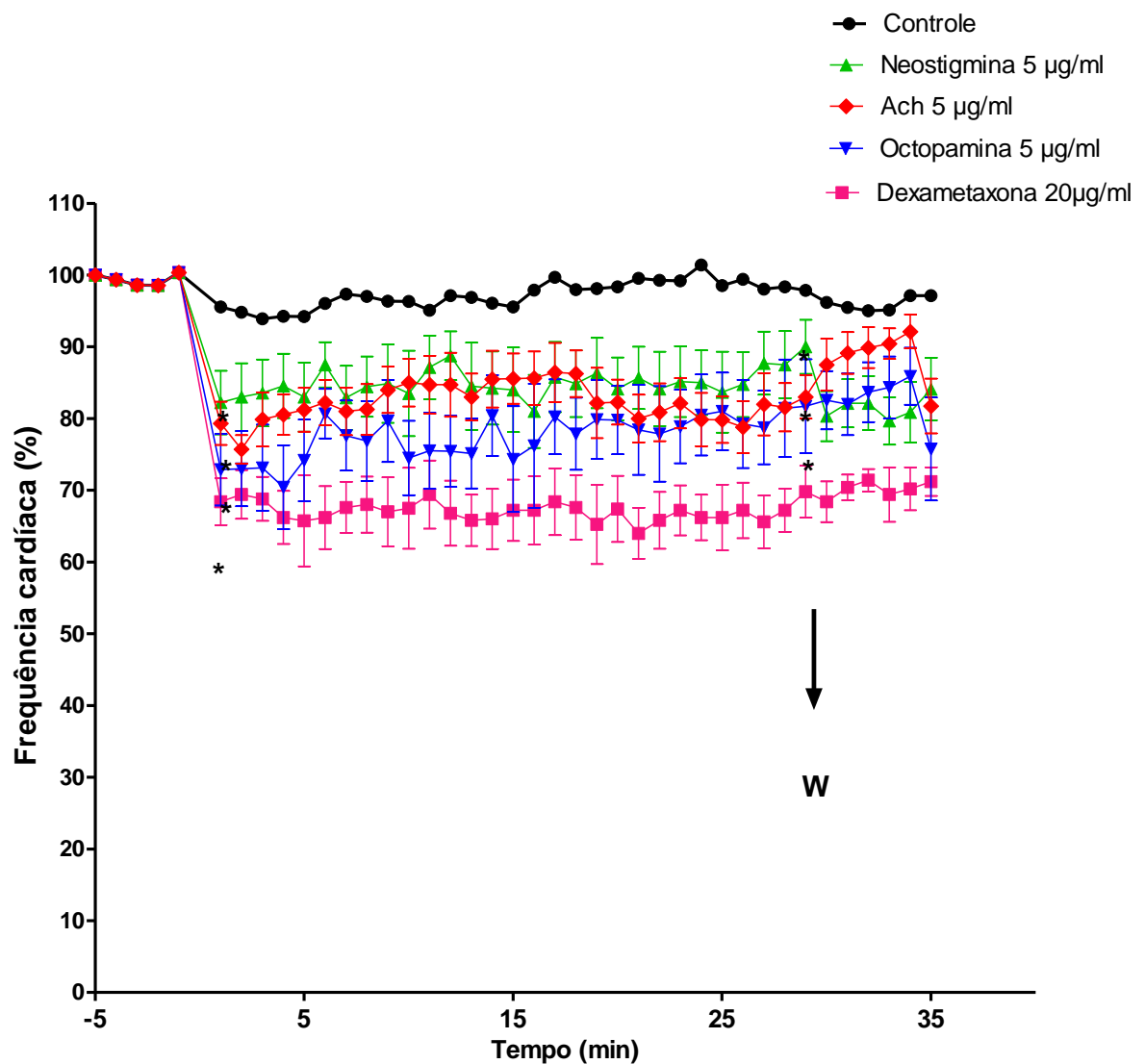
Figura 6. Efeito do organofosforado Triclorfon sobre a frequência cardíaca de *Nauphoeta cinerea*. No gráfico cada ponto representa a média \pm E.P.M. da porcentagem das respostas cronotrópicas em relação ao controle salina. Note o efeito tempo-dependente do triclorfon na dose de 100 μ l . *significância para $p < 0.05$. W: lavagem da preparação.



5.2 Comparação da atividade do Triclorofon com outros compostos químicos com atividade sobre a frequência cardíaca de baratas

No sentido de identificar o mecanismo de ação do Triclorofon sobre as respostas cronotrópicas em baratas, foram usados como instrumentos farmacológicos diferentes compostos químicos. Assim, quando a octopamina 0,5-5µg/ml foi ensaiada, houve uma diminuição máxima da frequência cardíaca de $25 \pm 3\%$ com a maior concentração ensaiada em 30 min (n=9, $p < 0.05$). Quando os compostos colinérgicos, acetilcolina (5µg/ml) e neostigmina (5µg/ml) foram ensaiados, ocorreu uma diminuição frequência cardíaca de $20 \pm 3\%$ e $19 \pm 1\%$, respectivamente, em 30min (n=9, $p < 0.05$). Quando a dexametasona 20 µg/ml foi incubada, houve uma diminuição da frequência cardíaca de $35 \pm 4\%$ em 30 min (n=9, $p < 0.05$) (Figura 7).

Figura 7. Atividade de diferentes compostos farmacológicos sobre a frequência cardíaca de *Nauphoeta cinerea*. No gráfico cada ponto representa a média \pm E.P.M. da porcentagem da frequência cardíaca. Note que a dexametasona (20 μ M) foi o composto que induziu o maior nível de inibição da frequência cardíaca. W: lavagem da preparação.



6. DISCUSSÃO

Nesse trabalho foram investigados os efeitos de concentrações subletais do organofosforado Triclorfon sobre a resposta cronotrópica do coração de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. Abaixo serão discutidos os aspectos inerentes a essa atividade comparando-se esses achados com o de compostos farmacológicos.

Em nossas condições experimentais os ensaios com o triclorfon induziram somente diminuição da resposta cronotrópica. Similarmente ao triclorfon, o neurotransmissor acetilcolina e o inibidor da enzima acetilcolinesterase, neostigmina, também induziram o mesmo efeito. A literatura demonstra que o coração de baratas é sensível a compostos colinérgicos e que em insetos esses compostos induzem um aumento da frequência de contração do coração (OSBORNE, 1996). Por outro lado, nas concentrações em que os compostos foram utilizados em doses mais elevadas, houve apenas redução da frequência cardíaca, o que sugere que a dose utilizada dos compostos colinérgicos possa ter sido exacerbada.

Nos ensaios com composto octopamina, houve também uma diminuição da frequência cardíaca em nossas condições experimentais. A octopamina é o principal agente cardioaceleratório em insetos, exercendo um efeito bifásico caracterizado por aumento da frequência seguido de diminuição em abelhas (PAPEFTHIMIOU; THEOPHILIDIS, 2011). Assim, parece que em nossas condições experimentais a dose de octopamina utilizada foi também elevada não permitindo a observação do efeito cronotrópico positivo, mas tão somente da segunda fase desse fenômeno. Por outro lado, em *Schistocerca americana gregaria*, uma espécie de gafanhoto, também foi observado um efeito cronotrópico negativo induzido pela octopamina, similarmente aos nossos resultados (EVANS, 1984). Esse último dado sugere que os efeitos desse neurotransmissor sejam do tipo espécie-seletivo.

Por último foi ensaiado em nossas condições experimentais a dexametasona, um anti-inflamatório esteroide que inibe a cascata de formação do ácido aracídico. Tem sido demonstrado que a indução da formação de compostos eicosanóides pela ativação da via das enzimas lipoxigenases em insetos é capaz de produzir intensa modulação do comportamento desses insetos (WAR et al., 2012). Em cefalópodes, o ácido aracídico induz aumento da frequência cardíaca, com diminuição da força de contração da musculatura cardíaca (AGNISOLA et al., 1994). Por outro lado a literatura é escassa em demonstrar o efeito de compostos pró-inflamatórios sobre a

frequência cardíaca de insetos. No entanto, os poucos dados existentes demonstram que o ácido aracdônico exerce um efeito cronotrópico positivo em invertebrados como demonstrado com o coração de *Ciona intestinalis* um cordado marinho (POPE; ROWLEY, 2002).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi demonstrado nesse trabalho que o organofosforado triclorfon também exerce efeitos cardiovasculares em insetos, em doses subletais. Esse efeito foi similar ao de compostos colinérgicos, comprovando essa via de atuação farmacológica. Os ensaios com a octopamina e dexametasona indicam que, como em outros invertebrados, o coração da barata também sofre a influência de neurotransmissores e eicosanoides, sugerindo que a frequência cardíaca de *Nauphoeta cinerea* também seja modulada por um marca-passo neurogênico.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Testar a ação dos compostos químicos em doses menores.
- Realizar o ensaio de fluorescência de cálcio, para observar melhor como o influxo de cálcio ocorre junto com outros compostos.
- Realizar ensaio de junção neuromuscular para observar como esses compostos vão interferir no estímulo da contração muscular.
- Realizar eletroforese para observar os níveis proteicos após administração desses compostos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL RASHID WAR et al., Mechanisms of Plant Defense against Insect Herbivores, **Plant Signaling & Behavior**, p. 1306-1320; October 2012

ADIYODI, K.G. Reviw the American Cockroach.Kluwer **Academic Publishers**, V.6, p.34-35, 1981

BAUMANN, E; GERSCH, M. Purification and identification of neurohormone-D, a heart accelerating peptide from the corpora cardíaca of the cockroach *Periplaneta americana*. **Insect Biochem**, v. 12, p.7-14, 1982

BOHMONT, B. L. The new pesticide user's guide. Fort Collins: **B & K. Enterprises**, V.1,1981

BOLTER, C; JONGSMA, M. A. The adaptation of insects to plant peptidase inhibitors. **J. Insect Physiol.** V.43(10), p.885-895, 1997

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

BOTTING, R. COX-1 and COX-3 inibitorons. **Reserch Thromosis**, v.110, n. 5-6, p. 269-272, 2003

BUTLER, A. R; WILLIAMS, D. L. H.; **Chem. Soc. Rev.** p. 22-233, 1993

CASARETT & DOULL'S Toxicology: The Basic Science of Poisons, Seventh Edition, Ed. 7ª, Editora. Cutis D. Kalassen, December 11, 2007

CASTRO, L.L.C. **Fundamentos da farmacoepidemiologia**. 1. ed. Campo Grande: Gupuram, 2001

C. AGNISOLA; R. VENZENI; T. MUSTAFA; B. TOTA. The systemic heart of *Octopus vulgaris*: effects of exogenous arachidonic acid and capability for arachidonate metabolism, **Marine Biology**, V. 47-53, 1994

CHRISOVALANTIS PAPAETHIMIOU; GEORGE THEOPHILIDIS. Octopamine - A single modulator with double action on the heart of two insect species (*Apis mellifera macedonica* and *Bactrocera oleae*): Acceleration vs. Inhibition, **Journal of Insect Physiology**, 2010

COLLINS, C; MILLER, T. Studies on the action of biogenic amines on cockroach heart. **Department of Entomology Division of Toxicology and Physiology; University of California, Exp. Bio**, v.67, p.1-15, 1977.

COSTA-NETO, E. V. Animal-based medines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resouces. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. V. 77(1), p. 33-43, 2005

DEVINE, G. J.; FURLONG, M. J. Insecticide use: contexts and ecological consequences. **Agr. Hum. Values**, V. 24, p. 281–306, 2007

DUAN, C; DELP, M. D; HAYES, D. A; et al. Rat skeletal muscle mitochondrial $[Ca^{+2}]$ and injury from downhill walking. **Journal of Applied Physiology**, v. 68, n. 03, p. 1241-1251, 1990

EDWARD C. POPE, ANDREW F. ROWLEY. The heart of *Ciona intestinalis*: eicosanoid-generating capacity and the effects of precursor fatty acids and eicosanoids on heart rate, **The Journal of Experimental Biology** 205, 1577–1583; 2002

FOX, E. L., BOWERS, R. W, FOSS, M, L. **Bases fisiológicas da educação física e dos desportos**. Rio de Janeiro: Guanabara, Ed. 4^a, 1991

FRANKLIN YEAGER. Mechanographic method of recording insect cardiac activity, with reference to effect of nicotine on isolated heart preparations of *Periplaneta Americana*. **Journal of Agricultural Research**, vol. 56, No. 4, Washington, D. C. Feb. 15, 1938

GARDNER, F. E; ROUNDS, H. D. **The pharmacology of cardioaccelerators in the central nervous system of *Periplaneta Americana* L.** **Comp. Biochem. Pkysiol.** V.29, p. 1071-8, 1969

GEORGIA, C. ATELLA; DAVID MAJEROWICZ; KATIA, C. GONDIM. Metabolismo de Lipídeos, **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT**, 2012

GERSCH, M. Experimentelle untersuchungen zum freisetzung mechanismus von neurohormonen nach elektrischer Reizung der corpora cardiaca von *Periplaneta Americana in vitro*. **J. Insect Pkysiol**, V. 18, p. 2425-39, 1972

GRAZIELE DAIANE STURMER et al., Modulation of Dopaminergic Pathway Induced by Sublethal Doses of the Organophosphate Trichlorfon in Cockroaches, **Journal of Comparative Physiology. A: Sensory, Neural and Behavioral**, 2014

HANSFORD, R. G. Role of calcium in respiratory control. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. v. 26, n. 01, p. 44-51, 1994

HENRIQUE. F; PELAEZ. V; RODRIGUES. L. SILVA. Agrochemical regulation in Brazil: market power vs. health and environment defense, **Revista de Economia**, v. 36, n. 1, p. 27-48, Editora. UFPR, jan./abr. 2010

HERTHL, W. Untersuchen zur neurohormonalen Steuerung des Herzens der Amerikanischen Schabe *Periplaneta Americana* L. **Zool. Jb. Pkysiol**, V.76, p. 152-84, 1971

HIDEO HONDA;† MOTOHIRO TOMIZAWA; JOHN E. CASIDA*. Insect Muscarinic Acetylcholine Receptor: Pharmacological and Toxicological Profiles of Antagonists and Agonists. **Journal of agricultural and food chemistry**, 2007

J. FRANKILIN YEAGER. **Journal of Agricultural Research**, Washinton, 1938

JONES, J. C. Factors affecting heart rates in insects. In *The Physiology of Insecta*, vol. V (ed.M. Rockstein), p. 119-67. New York: **Academic Press**, 1974

KOIWA, H; KATO, H; NAKATSU, T; ODA, J, YAMADA, Y; SATO, F. Purification and characterization of tobacco pathogenesis-related protein PR-5d, antifungal thaumatin-like protein. **Plant Cell Physiol**, v. 38(7), p. 783-791, 1997

LARKSON, P. M; NOSAKA, K; BRAUM, B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 24, n. 05, p. 512-520, 1992

LI, F, HAN, ZJ, 2004. Mutations in acetylcholinesterase associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis Gossypii* Glover Insect Biochem. **Mol. Biol.** 34, 3997-405. Li, W, Ma, Y Li, L, Quin, Wu, Yj, 2011

LIMA, U. A; AQUARONE, E; BORZANI, W; SCHMIDELL,W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo, Edgard Blucher Ltda, vol.3, 2001

LISA CLARK, JIN RUI ZHANG, STEPHEN TOBE , AGELA, B. LANGE. Proctolin: A possible releasing factor in the corpus cardiacum/corpus allatum of the locust; **Peptides**, 2005

LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: **AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa**, p.17-23, 2011

LONZO, H. G .A; CORREA, C. L; ZAMBRONE, F. A. D. Analgesicos , antípiréticos e anti-inflamatorios não-esteroidais: dados epidemiológicos em seis centros de controle de intoxicações do Brasil. **Revista brasileira de toxicologia** , São Paulo v.14, n.2, p. 49-54, 2001

LOPES, R. B et al; Bioconcentration of trichorfon insecticides in pacu (*Piaractus Mesopotamicus*), **Chemosphere**, v. 64, p.56-62, 2006

MILLER, T. Cockroach heart response to cardioaccelerators. **Entomologia**, exp. appl. ia, p.53-61, 1969

NA, LIN et al., A method to measure myocardial calcium handling in adult *Drosophila*; **New Methods in Cardiovascular Biology**, 2011

NATION, J. L. **Insect physiology and biochemistry**, 2001

NICASTRO, R. L; SATO, M. E; SILVA, M. Z. da. Milbemectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): selection, stability and cross-resistance to abamectin. **Experimental and Applied Acarology**, v.50, n.3, p.231-241, 2010

NIROOMAND, F; BOÖHME. E. **Eur. J. Pharmacol.** p. 154-213, 1988

OLIVIER, G. A. **Entomologie, ou histoire naturelle des insectes, avec leurs caracteres génériques et spécifiques, leur description, leur synonymie et leur figure enluminée.Coléoptères**, n.3, p.350-455, Paris (Baudouin), 1789

OLGA, S. **Fundamentos de toxicologia**, Ed. 2ª Editora. Atheneu, São Paulo, 2003

PARDO-LÓPEZ, L; SOBERÓN, M; BRAVO, A. Bacillus thuringiensis insectidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, v.37,p.3-22, 2013

PENILDON, S. **Farmacologia**. Edição 7º. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006

PELAEZ, V; TERRA, F. H. B; SILVA, L. R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. Artigo apresentado no **XIV Encontro Nacional de Economia Política / Sociedade Brasileira de Economia Política** - São Paulo/SP, de 09/06/2009 a 12/06/2009. p.22.

PETER D. EVANS. STUDIES ON THE MODE OF ACTION OF OCTOPAMINE, 5-HYDROXYTRYPTAMINE AND PROCTOLIN ON A MYOGENIC RHYTHM IN THE LOCUST, **J. exp. Biol.** V.110, p. 231-251, 1984

PURVES, D; AUGUSTINE, G. J; FITZPATRICK, D; et al. **Neuroscience and Edition.Sunderland** (MA), 2001

RICHARD, H. OSBORNE. Insect Neurotransmission: Neurotransmitters and Their Receptors, **Pharmacol** , V. 69, No. 2, p. 117-142, 1996

RICHTER, K; STURZEBECKER, J. Zur Wirkung von Neurohormon Daus *Periplaneta Americana* L. (Insecta) auf das Herz und das Herzganglion von *Tegenaria atrica* C. L. Koch und *Coelotes Atropos* Walckenaer (Arachnida-Araneae). **Zool. Jb. Pkysiol.** Bd.V. 76, p.64-79, 1971

RODRIGUES, D.T; NOVAIS, R. F; ALVAREZ, V.H; DIAS, J. M. M. Cultivo in vitro de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral. **Revi Ceres.** V. 59, p.9–15, 2012

ROSENTHAL, G.A. The biological effects and mode of action of L-canavanine, a structural analogue of L-arginine. **The quarterly review of biology**.V.52, p.155-180, 1977

RYAN, C. A. Petidase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Ann.Rev. Phytopathol**, v.28, p. 425-449, 1990

SHAW, A. W; VOSPER, A. J.; **J. Chem. Soc.; Faraday Trans.** p. 8-1239, 1977

WISE, D. L; HOUGHTON, G.; **Chem. Eng, Sci.** p. 23-1211, 1968,

SILVA, J. M; et al. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & Saúde Coletiva**, V. 10(4), p.891-903, 2005

SILVA; P. R. FARIA. Manual de entomologia geral; **Ufra/ universidade federal da Amazônia**, Amazonia, 2013

SPADOTTO, C. A; GOMES, M. A. F; LUCHINI, L. C; ANDREA, M. M. de. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente** (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, n 42), p. 29, 2004

STOTZ, H.U; KROYMAN, J; MITCHELL-OLDS, T. Plant-insect interactions. **Cur. Opinion Plant Biol**, V. 2(4), p.268-272, 1999

WIELAND HERTELA*; GU"NTHER PASSB. An evolutionary treatment of the morphology and physiology of circulatory organs in insects_ **Comparative Biochemistry and Physiology Part A** 133, p. 555-575, 2002