

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CAMPUS SÃO GABRIEL

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

**NEUROTOXICIDADE CENTRAL E PERIFÉRICA INDUZIDA POR
EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Manilkara rufula* EM BARATAS DA ESPÉCIE
*Nauphoeta cinerea***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BRUNA TRINDADE BORGES

SÃO GABRIEL

2018

BRUNA TRINDADE BORGES

**NEUROTOXICIDADE CENTRAL E PERIFÉRICA INDUZIDA POR
EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Manilkara rufula* EM BARATAS DA ESPÉCIE
*Nauphoeta cinerea***

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

Orientadora: Prof^ª Dr Lucia Helena do Canto Vinadé

Coorientadora: Dr Patrícia de Brum Vieira

SÃO GABRIEL

2018

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)

B732n Borges, Bruna

NEUROTOXICIDADE CENTRAL E PERIFÉRICA INDUZIDA POR EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Manilkara rufula* EM BARATAS DA ESPÉCIE *Nauphoeta cinerea* / Bruna Borges.

57 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2018.

"Orientação: Lúcia Vinadé".

1. Neurotoxicidade. 2. Toxinologia. 3. Via Octopaminérgica. 4. Metabolismo Secundário. I. Título.

BRUNA TRINDADE BORGES

**NEUROTOXICIDADE CENTRAL E PERIFÉRICA INDUZIDA POR
EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Manilkara rufula* EM BARATAS DA ESPÉCIE
*Nauphoeta cinerea***

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

Orientadora: Profª. Dr Lucia H. C. Vinadé

Coorientadora: Dr Patrícia de Brum Vieira

Área de Concentração: Qualidade Ambiental

Dissertação defendida e aprovada em 02 de Março de 2018.

Banca examinadora:



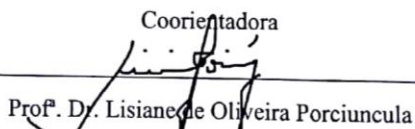
Profª. Dr. Lucia Helena do Canto Vinadé

Orientadora



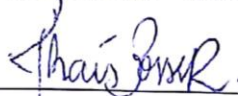
Profª. Dr. Patrícia de Brum Vieira

Coorientadora



Profª. Dr. Lisiane de Oliveira Porciuncula

Membro Titular – UFRGS



Profª. Dr. Thaís Posser

Membro Titular – UNIPAMPA

Dedico essa dissertação aos meus pais,
Isander e João Emilio, por todo o apoio,
incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dr. Lúcia, todo meu agradecimento pela orientação, disponibilidade e amizade. Agradeço por ter me acolhido há dois anos atrás, me dado a oportunidade de aprender e crescer como pessoa e profissional. Serei sempre grata!

À Dr. Patrícia, ou “Patíchia”, por tudo! O Allan que me perdoe, mas terei de ser puxa-saco: me sinto muito orgulhosa de poder conviver e aprender contigo. Sua coorientação me trouxe muito mais que conhecimento; me trouxe amizade, companheirismo, muito café e boas risadas. Terás sempre uma amiga em mim! Obrigada!

Ao Profº Dr. Cháriston, por igualmente me receber no laboratório, pelos ensinamentos que ofereceu a mim desde a época de Graduação e pela disponibilidade. Muito obrigada!

À UNIPAMPA, por ser minha casa durante seis anos, por ter me permitido conhecer e conviver com tantas pessoas maravilhosas e principalmente por me permitir ter a certeza de que estou no lugar certo, fazendo o que eu realmente amo fazer.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade, assim como o auxílio financeiro da CAPES durante o Mestrado.

Aos meus colegas de laboratório, tanto aos que já foram parte do LANETOX quanto aos que acabaram de chegar, muito obrigada! Agradeço ao Allan, Etiely e Bárbara por tantas histórias! Obrigada aos meus amigos por dividirem comigo, seja um café, uma música, uma viagem ou simplesmente aquele momento de descanso entre uma barata e outra, até o próximo experimento começar. Sou imensamente grata, por cada momento que passo com vocês.

Aos amigos que, após eu sair do laboratório, me esperaram com um chimarrão, filme ou uma boa conversa. Agradeço pela paciência e compreensão que tiveram comigo quando não pude fazer aquela visita no momento em que eu só pensava em terminar os experimentos e escrever a dissertação. Agradeço principalmente à Clari, minha amiga, que acompanhou toda essa jornada e sempre tinha uma palavra de incentivo e uma boa conversa. Muito obrigada por seguirem comigo!

À minha vó Genessi, que sempre me esperava com um docinho quando eu chegava em casa e sempre ouvia com curiosidade, atenção e espanto quando o assunto eram os insetos e animais que eu estudava. Obrigada por ter e compartilhar comigo as melhores histórias e ainda assim, se interessar pelas minhas. Eu te amo!

E principalmente agradeço aos meus pais. Vocês não mediram esforços para me ver conquistando meus objetivos, sempre me apoiando e acreditando em mim. Por toda conversa, todo amor e conforto nos momentos de desafios: muito obrigada! Sinto que nunca conseguirei expressar minha gratidão por ser filha de vocês, mas mesmo assim seguirei tentando, sempre. Amo vocês!

“Mantenha seu cérebro ativo com ilusões e pensamentos. Faça com que ele trabalhe. Assim, ele nunca se degenerará. [...] perdi um pouco a visão, e muito a audição. Mas penso muito mais agora do que quando tinha vinte anos. Que o corpo faça aquilo que quiser. Eu não sou o corpo: eu sou a mente. Nosso futuro se encontra em nosso cérebro.”

Rita Levi-Montalcini

RESUMO

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, no qual as plantas estão expostas a condições climáticas extremas como baixa precipitação, elevada temperatura e radiação ultravioleta. A adaptação das plantas a estas condições garante sua sobrevivência neste bioma e resulta em um metabolismo secundário único. Inúmeras propriedades biológicas são atribuídas aos metabólitos secundários, entre elas, propriedades inseticidas. O objetivo desta dissertação foi avaliar o potencial entomotóxico do extrato bruto (EBMR) e de frações da planta *Manilkara rufula*, planta nativa da Caatinga, contra baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. A atividade locomotora dos insetos foi afetada por todas as concentrações do EBMR, de maneira dose-dependente, levando os animais à letargia, comprometendo o seu perfil exploratório. O *grooming* de perna foi reduzido por todas as concentrações de EBMR testadas. Além disso, a octopamina aumentou o *grooming* de perna, enquanto a fentolamina diminuiu esse padrão. A injeção de octopamina 15 min antes da injeção de EBMR impediu a inibição do *grooming* de perna pelo extrato, indicando o envolvimento da via octopaminérgica nos efeitos observados. O EBMR induziu um efeito cronotrópico negativo, semelhante ao ensaio com fentolamina, sugerindo novamente o envolvimento da via octopaminérgica nos efeitos induzidos pela *M. rufula*. O sistema colinérgico também foi afetado pelo EBMR, pois houve diminuição da atividade da acetilcolinesterase. Corroborando com dados da atividade locomotora, o EBMR reduziu a contração muscular dos insetos. Buscando identificar os compostos responsáveis pelas alterações observadas, a fração aquosa (FAMR) e metanólica (FMMR) foram administradas em preparação de junção neuromuscular (JNM). A FMMR demonstrou pouca influência sobre a contração muscular, ao contrário, a FAMR reduziu a força de contração. A administração das frações em associação reduziu a contração muscular semelhante à fração aquosa isolada, sugerindo que a saponina, denominada Mi-saponina C, principal metabólito da fração aquosa, seria a responsável pelos efeitos observados. Os dados apresentados nesta dissertação destacam o potencial entomotóxico da planta *M. rufula* e da saponina, principal constituinte da fração aquosa, os quais provocaram alterações comportamentais, bioquímicas e eletrofisiológicas significativas, tendo a orquestração da via octopaminérgica nesses processos.

Palavras-chave: Bioinseticidas. Via octopaminérgica. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

The Caatinga is an exclusively Brazilian biome, in which the plants are exposed to extreme climatic conditions like low precipitation, elevated temperature, and ultraviolet radiation. The adaptation of plants to these conditions ensures their survival in this biome and results in a unique secondary metabolism. Numerous biological properties are attributed to secondary metabolites, including insecticidal properties. The objective of this dissertation was to evaluate the entomotoxic potential of the crude extract (CEMR) and fractions of the plant *Manilkara rufula*, native plant of the Caatinga, against cockroaches of the species *Nauphoeta cinerea*. The locomotor activity of the insects was affected by all concentrations of CEMR, in a dose-dependent manner, leading the animals to lethargy, compromising their exploratory profile. Leg grooming was reduced by all CEMR concentrations tested. In addition, octopamine increased leg grooming, while phentolamine decreased this pattern. Injection of octopamine 15 min before CEMR injection reduced leg grooming, indicating octopaminergic pathway involvement in the observed effects. CEMR induced a negative chronotropic effect, a result like the phentolamine assay, again suggesting the involvement of the octopaminergic pathway in the effects induced by *M. rufula*. The cholinergic system was also affected by CEMR, which decreased acetylcholinesterase activity. Corroborating with locomotor activity data, CEMR reduced the muscular contraction of the insects. Aiming to identify the compounds responsible for the observed modulations, the aqueous fraction (AFMR) and methanolic fraction (MFMR) were tested in *in vivo* cockroach metathoracic coxal-adductor nerve-muscle preparation (CNP). MFMR showed little influence on muscle contraction; on the contrary, AFMR reduced the force of contraction. The administration of the fractions in association reduced the muscular contraction like the aqueous fraction alone, suggesting that the saponin, denominated Mi-saponin C, the main metabolite of the aqueous fraction, is responsible for the observed effects. Together, the data presented in this dissertation highlight the entomotoxic potential of the *M. rufula* plant and saponin, the main constituent of the aqueous fraction, which caused significant behavioral, biochemical and electrophysiological alterations, and orchestration of the octopaminergic pathway in these processes.

Keywords: Bioinsecticides. Octopaminergic pathway. Secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Manilkara rufula</i> e sua localização no mapa.	16
Figura 2. Sistema nervoso de barata.	19
Figura 3. Barata da espécie <i>Nauphoeta cinerea</i>	20
Figura 4. Representação do comportamento de <i>grooming</i>	22

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

AFMR – Aqueous fraction of *Manilkara rufula*

AMPA – Receptores Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

CEMR – Crude extract of *Manilkara rufula*

CNP – *In vivo* cockroach metathoracic coxal-adductor nerve-muscle preparation

EBMR – Extrato bruto de *Manilkara rufula*

FAMR – Fração aquosa de *Manilkara rufula*

FMMR – Fração metanólica de *Manilkara rufula*

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GLU – Glutamato

iGluR – Receptores glutamatérgicos ionotrópicos

JNM – Junção neuromuscular

MFMR – Methanolic fraction of *Manilkara rufula*

mGluR – Receptores glutamatérgicos metabotrópicos

NMDA – Receptores N-Metil-D-Aspartato

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS	19
1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Plantas Medicinais e Metabolismo Secundário	23
1.2 <i>Manilkara rufula</i>.....	24
1.3 Caatinga	26
1.4 Bioinseticidas	26
1.5 Sistema Nervoso de Insetos	27
1.5.1 Sistemas de Neurotransmissores em Baratas	28
1.5.1.1 Aminoácidos	29
1.5.1.2 Aminas Biogênicas	29
1.5.1.3 Sistema Colinérgico	31
1.6 Baratas como Modelo de Pesquisa	32
2 OBJETIVO	34
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 MANUSCRITO.....	35
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas Medicinais e Metabolismo Secundário

Desde o surgimento das civilizações, a humanidade está em constante descoberta de recursos obtidos da natureza. O homem primitivo encontrou nas plantas a solução para muitos problemas relacionados à saúde, com os primeiros registros datados de 1.500 a.C. no manuscrito Egípcio “Ebers Papyrus” que continha mais de 800 prescrições de espécies que poderiam ser utilizadas para tratamento de doenças (DUARTE, 2006). A confiança da população em produtos de origem vegetal contribuiu para o fortalecimento da pesquisa em torno dessa fonte, sendo nos dias atuais um dos recursos mais bem explorados no âmbito biotecnológico quanto à identificação e ação de seus princípios ativos (GURIB-FAKIM, 2006).

O uso de plantas medicinais pelas antigas civilizações despertou a busca por novos métodos terapêuticos e biotecnológicos oriundos de plantas. O efeito que as plantas provocam em determinado organismo está associado à ação de seus metabólitos secundários, sendo o metabolismo secundário o principal foco de estudo dos pesquisadores na busca de novos compostos com atividade biológica (CALIXTO, 2005). Metabolismo é a denominação de um grupo de reações químicas que ocorrem constantemente em cada célula, seja animal ou vegetal. Os compostos químicos produzidos durante esse processo são chamados de metabólitos, sendo estes resultados de uma série de transformações enzimáticas que resultam em duas classes distintas: metabólitos primários e secundários (SIMÕES, 2001; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, SHERMA e KOWALSKA, 2008).

Os metabólitos primários como ácidos nucleicos, carboidratos, proteínas e lipídeos são considerados essenciais à vida, sendo comuns a todos os seres vivos. Simões e colaboradores (2001) descrevem que essa semelhança metabólica entre os seres vivos pode ser uma herança evolutiva, sendo em decorrência do fato de animais e vegetais possuírem um ancestral comum.

Metabólitos secundários podem ser definidos como todo o composto químico produzido por microrganismos ou vegetais, cuja função é atribuir benefícios ao organismo. Do ponto de vista vegetal, a síntese de um metabólito secundário contribui diretamente com a sobrevivência da planta no local onde ela está inserida, não através de funções vitais, mas sim, por auxiliar na competição por espaço e nutrientes, na atração de polinizadores e outros animais que possam dispersar as suas sementes, além de proteção a fatores externos, como raios UV, temperatura e umidade (ALVES, 2001).

A síntese e disponibilidade de um metabólito secundário nas plantas podem ser afetadas por fatores como sazonalidade, temperatura, radiação ultravioleta, poluição e altitude. Visto que esses fatores são distintos em cada região do planeta, as plantas podem apresentar um metabolismo único, o qual está adaptado às condições nas quais a planta está exposta (GOBBONETO e LOPES, 2007). Essa exclusividade na produção dos metabólitos secundários pode ser utilizada na caracterização taxonômica das plantas (WAKSMUNDZKA-HAJNOS, SHERMA e KOWALSKA, 2008).

A busca por metabólitos com funções terapêuticas surgiu há séculos atrás, sendo que a relação entre homem e natureza oscila entre domínio e proteção à mesma, desde então. Muitas descobertas sobre o uso de plantas cujos metabólitos secundários possuem funções medicinais surgiram a partir da curiosidade e necessidade das antigas civilizações, principalmente para fins de tratamento e curas de doenças (DI STASI, 1996).

Visto que a grande parte dos metabólitos secundários está envolvida prioritariamente na defesa da planta contra herbívoros, bactérias e fungos (WINK, 2015), geralmente esses compostos são descritos na literatura como antifúngicos, antimicrobianos e inseticidas. Consequentemente, essas moléculas são alvos de estudos farmacológicos, representando um conjunto amplo de possibilidades terapêuticas. Na área agrícola os estudos envolvendo metabólitos destinam-se principalmente à descoberta de inseticidas naturais/bioinseticidas, alternativas mais seguras ao uso de inseticidas químicos (BOURGAUD et al., 2001).

1.2 *Manilkara rufula*

Manilkara rufula (Miq.) H.J. Lam, Blumea 4(2): 356. 1941. [*Mimusops rufula* Miq. in Martius, Fl. bras. 7:44. 1863] [sin. het. *Manilkara duckei* Monach.] – Typus (K): Brasil. Piauí, Serra da Batalha, IX.1839 (fl), Gardner 2910.

A *M. rufula* é uma planta endêmica da Caatinga, pertencente à família Sapotaceae, a qual é composta por 53 gêneros e 800 espécies (PENNINGTON, 1991). O gênero *Manilkara* compreende 19 espécies, sendo que estas podem ser encontradas na Caatinga, Cerrado, restinga e florestas Amazônica e Atlântica (ALMEIDA JR, 2010) (Figura 1).

Diversas espécies do gênero *Manilkara* apresentaram funções biológicas como antitumorais, anti-HIV, hipotensiva e antimicrobiana (AKHTAR, ALI e ALAM, 2010; FERNANDES et al., 2013). A grande variedade de atividades biológicas relatada para as espécies de *Manilkara* é atribuída à miscelânea de metabólitos secundários presentes nestas espécies como triterpenos (MISRA e MITRA, 1969; RHOURRI-FRIH et al., 2013), saponinas triterpênicas (SAHU et al., 1997;

ESKANDER et al., 2006), taninos (WANG et al., 2012) e flavonoides (MA et al., 2003). Em relação à espécie *M. rufula*, poucos estudos são encontrados na literatura relatando sua atividade biológica e caracterização fitoquímica. Dentre estes, destaca-se o potente efeito inibitório sobre a lectina e tripsina (ARCOVERDE et al., 2014), assim como o potencial antiparasitário de *M. rufula* frente aos parasitos *Trichomonas vaginalis* e *Tritrichomonas foetus*, o qual foi relacionado a diferentes compostos como saponinas, taninos e flavonoides (VIEIRA et al., 2016). A saponina é um composto presente em diversas plantas com propriedades inseticidas. Estudos com esse metabólito evidenciam a ação do mesmo sobre diferentes sistemas dos insetos, entre eles, o sistema nervoso, principal alvo de bioinseticidas (ISHAAYA e BIRK, 1965; DE GEYTER et al., 2007; KAMAL et al., 2015). Como demonstrado em estudo prévio, a partir do extrato bruto de *M. rufula* uma saponina bidesmosídica incomum foi isolada e identificada como Mi-saponina C, sendo o principal metabólito relacionado à atividade antiparasitária da espécie (VIEIRA et al., 2017). De modo geral, os compostos encontrados em *M. rufula*, como triterpenos, taninos, flavonoides e saponinas, já foram relacionados a diferentes atividades biológicas como anticâncer, antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiparasitária, demonstrando o potencial desta planta (AUGUSTIN et al., 2011; TRENTIN et al., 2011).



Figura 1. *Manilkara rufula* e sua localização no mapa. Em (A) a espécie *M. rufula*, uma árvore nativa da Caatinga. Em (B) um destaque da parte aérea da planta. Fonte: Alexandre Macedo.

1.3 Caatinga

Correspondendo a 11% do território nacional e 60% do Nordeste do país, a Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro com grande diversidade de flora, sendo considerado o mais variado dentre os biomas brasileiros (RIZZINI, 1997). Nesse bioma podemos encontrar 159 famílias, 1.141 gêneros e até 4.547 espécies de plantas (FORZZA et al., 2010), sendo que do total, 318 espécies são nativas e particulares da região (LEAL, TABARELLI e DA SILVA, 2003).

Um grande interesse econômico é voltado para a vegetação da Caatinga, a qual possui importância como forrageiras, frutífera e lenhosa (ALBUQUERQUE, 2000). Além disso, devido às condições ambientais da Caatinga, como o clima seco e temperaturas elevadas (AGRA, FREITAS e BARBOSA-FILHO, 2007), as plantas encontradas nessa região possuem diversos metabólitos secundários que servem como estratégia de sobrevivência e adaptação, sendo muitos já confirmados com potencial biotecnológico (GOMES et al., 2008). Vários estudos demonstram o uso, na medicina popular, de plantas dessa região como *Selaginella convoluta* (ação diurética), *Myracrodruon urundeuva* (adstringente), *Ziziphus joazeiro* (problemas estomacais), *Cnidocolus phyllacanthus* (antimicrobiana, cicatrizante e analgésica), entre outras plantas que podem ser utilizadas no tratamento de inúmeras enfermidades (AGRA, 1996).

Em contraste à ampla variedade de recursos biológicos da Caatinga, há um extenso histórico de exploração e mau uso desse patrimônio (LEAL, TABARELLI e DA SILVA, 2003). O processo de desertificação da Caatinga tem aumentado em conjunto ao desmatamento e a implantação de culturas irrigadas, a qual substitui a vegetação nativa (GARDA et al., 2013). Desta forma, a Caatinga é considerada o bioma menos conservado e com menor área protegida dentre os biomas brasileiros. A prática de desmatamento criminoso já alterou cerca de 75% da região, sendo que em 2008, pesquisas relataram que 45% da vegetação típica da Caatinga já havia sido desmatada (KILL, 2009).

1.4 Bioinseticidas

A busca por alternativas aos inseticidas sintéticos tem sido uma constante. Há décadas derivados vegetais são utilizados como bioinseticidas, como exemplo, as folhas de *Nicotiana tabacum* e *N. rustica*, contendo o alcaloide nicotina. Com a Segunda Guerra Mundial, houve a necessidade de agentes mais potentes, e então, iniciou-se o desenvolvimento de inseticidas sintéticos (VIEIRA, MAFEZOLI e BIAVATTI, 2001).

O mecanismo de ação dos inseticidas geralmente envolve a modulação do sistema nervoso dos insetos. Esse sistema está diretamente relacionado a funções distintas, como

alimentação (NICOLAUS e LEE, 1999), reprodução (DELPUECH, BARDON e BOULÉTREAU, 2005), limpeza (HAMPEL et al., 2015), locomoção (BONILLA-RAMIREZ, JIMENEZ-DEL-RIO e VELEZ-PARDO, 2011) entre outros, cuja alteração causa diversos desequilíbrios biológicos, levando, conseqüentemente, o animal à morte. Do ponto de vista molecular, os principais alvos dos inseticidas neurotóxicos são as enzimas colinesterases, como acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. No entanto, muitos estudos relatam a ação direta desses agrotóxicos em canais de sódio, receptores de acetilcolina, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA). Além disso, os inseticidas podem agir em receptores de octopamina, os quais são restritos aos insetos, tornando esse mecanismo um alvo de grande interesse (RAYMOND-DELPECH et al., 2005).

Não é raro que inseticidas químicos sejam ineficazes para um controle biológico, embora sejam considerados mais potentes. Devido ao uso indiscriminado de agrotóxicos, muitas espécies tornaram-se resistentes aos defensivos químicos, levando ao aumento no uso destes insumos para obter os mesmos resultados. Além disso, o uso indiscriminado de inseticidas provoca efeitos econômicos e ambientais negativos, levando ao desequilíbrio biológico, motivando a busca por compostos que possam substituir os defensivos químicos (COUTINHO et al., 2005).

1.5 Sistema Nervoso de Insetos

De acordo com Osborne (1996), o sistema nervoso de insetos é constituído por um sistema nervoso central (SNC), formado por pares de gânglios, incluindo um gânglio subesofágico ligado ao cérebro, três gânglios metatorácicos e seis gânglios abdominais dispostos ventralmente no corpo do animal. Os gânglios metatorácicos se conectam ao sistema nervoso periférico (SNP) que enervam as pernas e o sistema estomatogástrico. De modo geral, cada segmento do inseto possui um par de gânglios que são interligados entre si por comissuras e conectivos (RANDALL, BURGGREN e FRENCH, 1997; GALLO et al., 2002) (Figura 2). Nenhum gânglio possui um centro completamente vital, o que explica o fato do inseto, quando decapitado, conseguir manter a locomoção (OSBORNE, 1996).

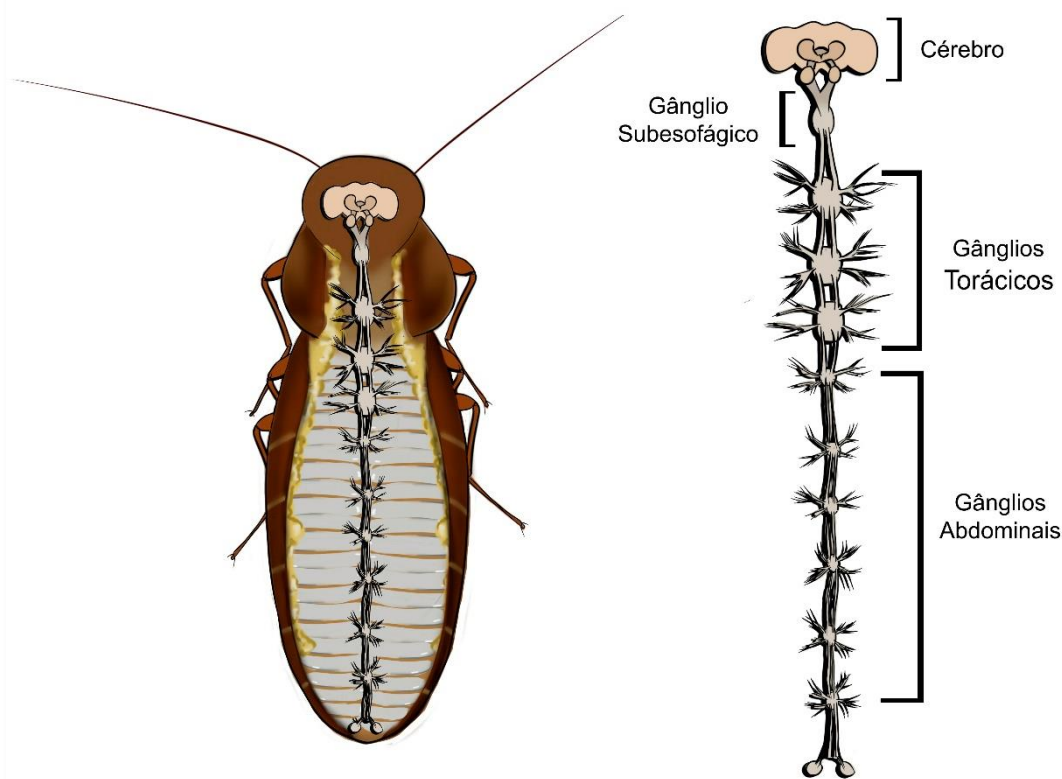


Figura 2. Sistema nervoso de barata. O sistema nervoso é localizado ventralmente no inseto, sendo composto por um cérebro, um gânglio subesofágico, três gânglios torácicos e seis gânglios abdominais. Fonte: A autora.

Os processos fisiológicos, sistema motor e sensorial são controlados pelos diversos estímulos hormonais. Quanto aos neurotransmissores, os principais moduladores do SNC de insetos, são acetilcolina, octopamina, dopamina, 5-hidroxitriptamina e histamina, porém, tratando-se de junção neuromuscular, os estímulos dessa sinapse periférica incluem o glutamato como principal neurotransmissor excitatório e o GABA, como neurotransmissor inibitório (TAYLOR e NEWBURGH, 1979; OSBORNE, 1996).

1.5.1 Sistemas de Neurotransmissores em Baratas

Assim como outros insetos, as baratas possuem uma série de neurotransmissores que fazem parte dos diversos sistemas que compõem seu sistema nervoso. Esses neurotransmissores necessitam da homeostase para que a neurotransmissão ocorra de maneira correta e garanta a perfeita função bioquímica, fisiológica e comportamental do inseto. A neurotransmissão envolve muitos estágios e é regulada pela secreção de neurotransmissores pelos neurônios, obtendo respostas rápidas ou lentas, dependendo do propósito do estímulo e do local onde o mesmo ocorre (LANGLEY e GRANT, 1997).

A liberação de um neurotransmissor ocorre através da despolarização da membrana neuronal. Em um processo denominado potencial de ação, no qual um impulso elétrico percorre todo o axônio do neurônio até o terminal nervoso e causa a despolarização do terminal pré-sináptico, ocorrendo a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica. Os íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} são essenciais para gerar e conduzir o potencial de ação, visto que a despolarização da membrana ocorre devido a mudanças no gradiente de concentração desses íons no interior e exterior da célula. Além disso, o íon Ca^{2+} possui uma função importante durante a neurotransmissão. A entrada desse íon na terminação do axônio, a favor do gradiente de concentração, causa a união das membranas da vesícula e membrana plasmática da célula, permitindo assim a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica. O processo seguinte é a interação do neurotransmissor pelo neurônio pós-sináptico ou células eferas presentes nos músculos esqueléticos (OSBORNE, 1996; MARCUSSI et al., 2011).

1.5.1.1 Aminoácidos

A junção neuromuscular (JNM) é uma comunicação eficiente entre nervo e músculo que sinaliza a contração muscular. Em baratas, essa sinalização ocorre basicamente pelos neurotransmissores glutamato (GLU) com função excitatória e o ácido gama-aminobutírico (GABA), neurotransmissor inibitório (HUBER, MASLER e RAO, 1990).

GLU está presente principalmente nos terminais nervosos e ativa a contração muscular através da ligação em seus receptores. Os receptores de GLU são divididos em duas classes principais: receptores metabotrópicos (mGluR) e ionotrópicos (iGluR). Os mGluR são receptores acoplados à proteína G, os quais são responsáveis pela ativação de uma cascata de segundos mensageiros após a ligação do GLU. Os iGluR são subdivididos em outras três subclasses: receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4isoxazolpropiónico (AMPA) (GIULIETTI et al., 2004) e os receptores de cainato (DIANTONIO, 2006). Por sua vez, o neurotransmissor inibitório GABA é encontrado em toda a fibra muscular e a ativação de seus receptores (GABA_A e GABA_B) parece estar envolvida com a ativação de canais de cloreto (CULL-CANDY e MILEDI, 1981; FONNUM, 1984).

1.5.1.2 Aminas Biogênicas

Assim como GLU e GABA possuem papéis importantes na contração muscular de baratas, as aminas biogênicas, dopamina e octopamina, têm sido relacionadas a muitos

processos fisiológicos importantes desse inseto. O sistema dopaminérgico e octopaminérgico estão relacionados com muitos mecanismos padrões em insetos, sendo o *grooming* um exemplo da ação desses neurotransmissores. O *grooming*, ato de limpeza de antenas e pernas, é um padrão comportamental regulado por essas duas aminas, sendo o *grooming* de antenas prioritariamente um padrão modulado pela dopamina (LIBERSAT e PFLUEGER, 2004) enquanto o *grooming* de pernas é controlado pela octopamina (GAL e LIBERSAT, 2010).

O comportamento de *grooming* de antenas e pernas não está relacionado apenas à limpeza do corpo, mas também como sinalização de deslocamento e comportamento social e de corte (SPRUIJT, HOL e ROUSSEAU, 1992). Além disso, o *grooming* é observado em muitas espécies de insetos, importante para a remoção de parasitos e outras impurezas externas presentes no corpo do animal (SACHS, 1988; SPRUIJT, VAN HOOFF e GISPEN, 1992) (Figura 4).



Figura 4. Representação do comportamento de *grooming*. Em (A) o *grooming* de antena e em (B) o grooming de pernas. Fonte: A autora.

A octopamina é descrita como uma amina multifuncional no sistema nervoso de insetos (OSBORNE, 1996). Libersat e Weisel-Eichler (2004) descrevem o padrão de voo do gafanhoto (*Locusta migratoria*) como um processo diretamente relacionado à octopamina. Ainda sobre estudos com *L. migratoria*, Orchard e colaboradores (1993) notaram diversos papéis desempenhados pela octopamina durante o voo, a qual controla a liberação de hormônios adipocinéticos e permite a elevação de diacilglicerol na hemolinfa. Os lipídeos são responsáveis por cerca de 75% da energia necessária durante o voo, sendo que a octopamina está diretamente relacionada com o aumento dos níveis dessas moléculas na hemolinfa.

Além disso, foi demonstrado que os níveis de octopamina aumentam durante o estresse, elevando a contração cardíaca em insetos (PAPAEFTHIMIOU e THEOPHILIDIS, 2011). O coração da barata é composto por 12 câmaras que através de aberturas recebem a hemolinfa

(CORNWALL, 1968). A contração é caracterizada por três fases (sístole, diástole e diástase) que são geradas pelas contrações da parede muscular. Estudos comparando a ação de seis aminas biogênicas sobre o coração de baratas demonstram a grande sensibilidade da resposta cardíaca para octopamina e dopamina (COLLINS e MILLER, 1977). Essa última, também modula o comportamento motor dos insetos e, pelo fato dos receptores dopaminérgicos estarem amplamente distribuídos em todo o sistema nervoso, a dopamina modula os processos desde a periferia até o processamento de informações cerebrais (OSBORNE, 1996; MUSTARD, PHAM e SMITH, 2010).

O comportamento motor dos insetos é igualmente afetado por dopamina e octopamina. Comportamentos rítmicos, como caminhar e voar, são controlados por iniciadores centrais rítmicos, que partem dos gânglios torácicos, e podem ser modulados por diversas aminas biogênicas (MARDER et al., 2005). Em um estudo com abelhas *Apis mellifera*, a injeção de octopamina aumentou o tempo de voo dos insetos; em oposição às injeções com tiramina, que diminuiu esse padrão comportamental (FUSSNECKER, SMITH e MUSTARD, 2006). Do mesmo modo, larvas mutantes de *Drosophila melanogaster* que continham níveis reduzidos de octopamina, demonstravam perda do padrão de locomoção, sendo necessário o aumento da concentração de octopamina para que o fenótipo de locomoção retornasse ao normal (SARASWATI et al., 2004).

1.5.1.3 Sistema Colinérgico

O uso de insetos como modelos experimentais permitiu grandes avanços sobre a compreensão do funcionamento do sistema colinérgico, em específico, das sinapses (KERKUT, HORN e WALKER, 1969). A acetilcolina (ACh) é um dos principais neurotransmissores presentes no sistema nervoso e com função direta sobre a transmissão do impulso nervoso nos neurônios (LÓPEZ e PASCUAL-VILLALOBOS, 2010). Estima-se que o conteúdo de ACh em insetos seja notavelmente superior ao encontrado em mamíferos e além disso, a variação desse conteúdo entre espécies de invertebrados varia amplamente (LEWIS e SMALLMAN, 1956). Está presente, principalmente, nos axônios e dendritos dos neurônios do SNC e em menor quantidade nos gânglios (OSBORNE, 1996). Ao final da sinapse colinérgica, ocorre a hidrólise da ACh em colina e acetato pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (MARCEL et al., 1998).

O nervo terminal pré-sináptico de insetos parece possuir autorreceptores muscarínicos para as sinapses colinérgicas, tanto no SNC quanto no SNP. Porém, além dos receptores muscarínicos, foram relatados receptores nicotínicos e mistos (nicotínicos/muscarínicos) em

diversas espécies de invertebrados, incluindo a barata (BREER e SATTELLE, 1987). Osborne (1996) cita que essas diferentes classes de receptores colinérgicos estão amplamente distribuídas pelo sistema nervoso dos insetos. Os receptores muscarínicos, provavelmente, estão presentes tanto no SNC e SNP quanto no sistema estomatogástrico. Já os nicotínicos são encontrados, principalmente, no SNC e estomatogástrico, enquanto os mistos (nicotínicos/muscarínicos) encontram-se somente no SNC.

Muitos bioinseticidas possuem ação anticolinesterásica e é abundante o estudo de compostos que atuem nesse sistema. Alguns desses estudos demonstraram que alterações na síntese e no conteúdo de ACh pode influenciar diretamente muitos aspectos bioquímicos e comportamentais nos insetos. A diminuição na atividade da enzima AChE e a concentração de ACh foram relacionadas à perda de funções motora e exploratória em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* (ADEDARA et al., 2015), além de alterações na frequência cardíaca de insetos (DAHM, 1971). O comprometimento motor e alterações no comportamento de *grooming* também foram observados em baratas da espécie *Phoetalia pallida* após injeções de doses subletais do organofosforado triclorfon, um potente anticolinesterásico. O mesmo estudo demonstrou que a via colinérgica pode modular a liberação de outros neurotransmissores, como a dopamina, no sistema nervoso central de invertebrados (STURMER et al., 2014).

1.6 Baratas como Modelo de Pesquisa

O uso de insetos como modelos biológicos em pesquisas deve-se principalmente a sua semelhança estrutural molecular com os vertebrados. Além disso, uma considerável quantidade de neurotransmissores já foi identificada em insetos, assim como seus receptores. As baratas possuem mais de 200 neurotransmissores que são idênticos aos presentes em seres com período evolutivo maior, confirmando dados da literatura que demonstram a grande homologia dessas moléculas com outros seres, incluindo humanos (HUBER, MASLER e RAO, 1990).

As baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* são insetos-praga primitivos. Possuem corpo de cor acinzentada e, assim como outras espécies de baratas, o corpo é dividido em metâmeros, que são segmentos agrupados em cabeça, tórax e abdome. Os órgãos internos são revestidos por uma fina camada de tecido conjuntivo e são dispostos na cavidade corporal (hemocele) com a presença da hemolinfa, a qual é responsável por diversas funções como dispersão de nutrientes e remoção de metabólitos (GULLAN e CRANSTON, 2014) (Figura 3).

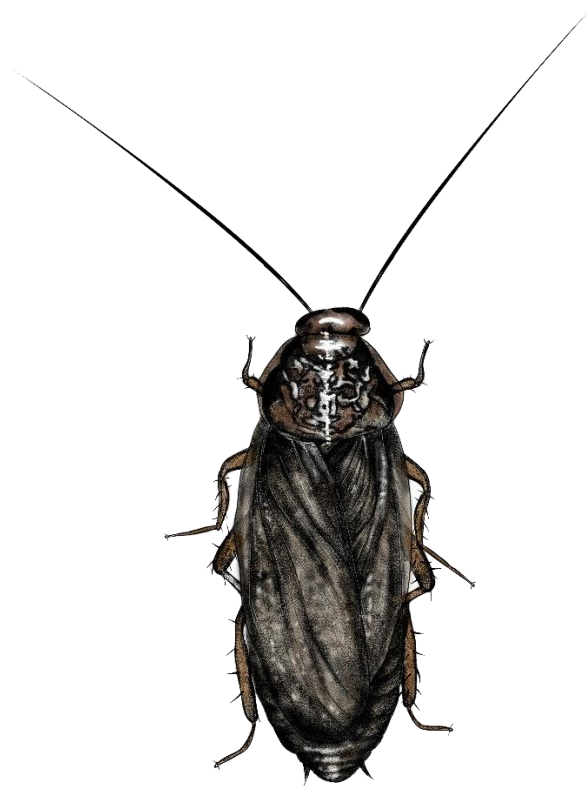


Figura 3. Barata da espécie *Nauphoeta cinerea*. Detalhe da porção dorsal do inseto com a cor acizentada característica e porção ventral marrom. Fonte: A autora.

A espécie *N. cinerea* tem sido utilizada em estudos de neurotoxicidade, entre eles o efeito neuromodulatório de metilmercúrio sobre a locomoção do inseto (ADEDARA et al., 2015), alterações no SNC e SNP pela ação da urease de *Canavalia ensiformis* (Jack Bean Urease – JBU) (CARRAZONI et al., 2016) e efeito modulatório sobre os mecanismos eletrofisiológicos da barata sob a influência da peçonha do escorpião *Bothriurus bonariensis* (SANTOS et al., 2016). Estes resultados demonstram a grande importância da espécie *N. cinerea* para o entendimento do mecanismo de ação de diversas toxinas animais ou vegetais sobre o sistema nervoso de invertebrados. Além disso, estes estudos possibilitam a busca por novos bioinseticidas, além de inferir a ação desses compostos em vertebrados, tendo em vista as semelhanças moleculares descritas anteriormente.

2 OBJETIVO

Avaliar a planta *Manilkara rufula* quanto ao potencial entomotóxico em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* e mecanismos envolvidos na toxicidade da mesma.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o mecanismo de neurotoxicidade periférica induzida pelo extrato bruto de *Manilkara rufula* por meio de testes de locomoção em baratas;
- Avaliar o efeito extrato bruto de *Manilkara rufula* sobre a enzima acetilcolinesterase;
- Determinar o mecanismo de neurotoxicidade central induzida pelo extrato bruto de *Manilkara rufula* por meio do teste de *grooming* em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*;
- Verificar o efeito do extrato bruto e frações de *Manilkara rufula* em preparação de junção neuromuscular de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*;
- Investigar o efeito do extrato bruto de *Manilkara rufula* sobre o sistema cardíaco de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*.

3 MANUSCRITO

Todos os detalhes, bem como resultados, materiais e métodos e discussão, estão apresentados sob a forma de manuscrito para publicação (artigo). O mesmo será submetido para o periódico “**Journal of Pest Science**” e será intitulado como: **Central and Peripheral Neurotoxicity Induced by Extracts and Fractions of *Manilkara rufula* in *Nauphoeta cinerea* Cockroaches.**

Central and Peripheral Neurotoxicity Induced by Extracts and Fractions of *Manilkara rufula* in *Nauphoeta cinerea* Cockroaches

Borges, B.T.¹, Vieira, P.B.¹, Leal, A. P.¹, Karnopp, E.¹, Ogata, B.A.B¹, Rosa, M.E.¹, Barreto, Y. C.¹, Dal Belo, C.A.¹, Vinadé, L.^{1*}

¹Laboratório de Neurobiologia e Toxinologia (LANETOX), Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, RS, Brasil

Abstract

The Caatinga is a Brazilian biome exposed to extreme environmental conditions, allowing the growing of plants with unique characteristics such as plants from *Manilkara* genus. Herein the entomotoxic potential of *Manilkara rufula* in cockroaches *Nauphoeta cinerea* was evaluated in crude extract (CEMR), methanolic (MFMR) and aqueous (AFMR) fractions in different concentrations. The assays were performed on locomotor and acetylcholinesterase activities, behavioral grooming, semi-isolated heart preparation and *in vivo* cockroach metathoracic coxal-adductor nerve-muscle preparation (CNP). CEMR reduced the locomotor activity and exploratory profile, increased the number of immobile episodes and stop time. At the same time that it induced a change in both grooming behavior, antennae and legs. Since, leg grooming was affected in all doses and it is modulated by octopamine, we tested octopamine and its selective antagonist, phentolamine. The administration of CEMR after the injection of octopamine avoided the leg grooming, suggesting the involvement of octopaminergic via in CEMR effects. CEMR also induced a negative chronotropic effect on the heart, where octopamine and phentolamine assays confirmed a role for the octopaminergic pathway. CEMR decreased AChE activity, which may be related to the negative cardiac frequency since the cholinergic pathway has a cardiac involvement. In addition, CEMR produced a neuromuscular blockage at CNP. The aqueous fraction (AFMR) decreased muscle contraction more than methanolic fraction (MFMR). However, when administered in combination, the effect on muscle contraction of both fractions was like the AFMR alone, suggesting that those can be the main responsible. The results obtained demonstrate that CEMR and fractions have entomotoxic activity, mediated by or with involvement of octopaminergic system.

Lç

Keywords: bioinsecticides, octopaminergic pathway, Caatinga biome, neurotoxicity, behavioral modulation

Key Message:

- The Caatinga is a biome with climatic conditions favorable to the development of plants with unique secondary metabolites.
- The phytochemical composition of *Manilkara rufula* suggests its entomotoxic potential due to the presence of saponins, which are considered insecticides.
- Non-mammalian research models such as cockroaches of the species *Nauphoeta cinerea* demonstrate promising results in the neurotoxicity study.
- The observation of behavioral, electrophysiological and enzymatic changes indicates a modulation of the *Manilkara rufula* on the nervous system, as well as their biotechnological potential.

Introduction

Natural compounds have been an important source of new chemical entities over the last decades (Newman and Cragg 2016). The effect produced by plants in an organism is attributed to the presence of secondary metabolites (Calixto 2005). The synthesis of a secondary metabolite contributes for plant survival providing support during competition for space and nutrients, besides favoring the attraction of pollinators and other animals that disperse their seeds. Moreover, secondary metabolites protect plants from external factors and stressful conditions such as ultraviolet radiation, temperature, and humidity (Gobbo-Neto and Lopes 2007). The synthesis of secondary metabolites is frequently affected by seasonality, temperature, and ultraviolet radiation (Gobbo-Neto and Lopes 2007). Then, plants exposed to different environmental conditions may present a unique composition of metabolites.

The Caatinga is a semiarid biome of the northeast of Brazil exposed to extreme environmental conditions, such low humidity, elevated temperatures, and ultraviolet radiation. Native species of this region are well adapted to these conditions, resulting in a production of exclusive metabolites (Agra et al. 2007). The *Manilkara rufula* is an endemic plant of Caatinga and belongs to the Sapotaceae family (Pennington 1991). Regarding the genus *Manilkara*, numerous studies are found in the literature about biological and phytochemical characterization (Akhtar et al. 2010; Fernandes et al. 2012). However, few studies are found about *M. rufula*, such as lectin and trypsin inhibitory activity and anti-*Trichomonas vaginalis* and anti-*Tritrichomonas foetus* activities (Arcoverde et al. 2014; Vieira et al. 2016b) demonstrating the unexplored potential of this plant.

Natural compounds have been widely used as insecticides. As example, the leaves of *Nicotiana tabacum* and *N. rustica*, being the nicotine alkaloid the main compound responsible

for action against insects (Wiesbrook 2004). The advantage of natural insecticides over synthetics is the rapid degradation of that compounds (Quarles 1992), showing the potential of plants as a source of new anti-plague agents.

Cockroaches of the species *Nauphoeta cinerea* have been frequently used in biochemical and neurophysiological research not only by their amenability to experimental manipulation but due to their parallelism with vertebrates, making these insects a suitable model for a number of neurophysiological approaches. Our research group has already observed sensitivity of this species to the action of *Canavalia ensiformis* (Jack Bean Urease) (Carrazoni et al. 2016) and scorpion venom *Bothriurus bonariensis* (Santos et al. 2016), both natural compounds acted on the central nervous system (CNS) and peripheral nervous system (PNS) of the cockroaches.

Taking into account the scarcity of studies regarding endemic plants of Caatinga biome and the necessity of alternatives to synthetic insecticides, in this study was investigated the insecticidal potential of *M. rufula* against *N. cinerea* cockroaches and mechanism of action. To our knowledge, for the first time it was demonstrated a modulatory effect of the crude extract and fractions of *M. rufula* on the CNS and PNS of *N. cinerea* cockroaches, where the main action observed was on the octopaminergic system.

Material and Methods Experimental Animals

Adult *Nauphoeta cinerea* (Olivier) cockroaches were used as the experimental model in all experiments. The animals were kept in an environment with adequate and controlled temperature (22-25 °C) on a 12:12h light/dark cycle with water and food *ad libitum*.

Drugs and Chemicals

Octopamine, phentolamine, and DMSO were used in the highest purity and obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All controls were performed with saline solution (0.5% DMSO). Saline solution is a carbonate-buffered solution (Collins and Miller 1977) which contains the following composition (in mM): NaCl 200.17, KCl 10.73, MgSO₄ 0.996, CaCl₂ 3.40, NaHCO₃ 2.14, and NaH₂PO₄ 0.083 (pH 6.9 adjusted with NaOH 2N). The extract, fractions, and drugs were administered at the third abdominal segment at a final volume of 10 µL with a Hamilton syringe.

Extract and Fractions of *Manilkara rufula*

The crude extract of leaves of *M. rufula* (CEMR), the methanolic (MFMR) and aqueous (AFMR) fractions were prepared through dissolution of powder in 0.5% of DMSO in water (Milli-Q) at the following concentrations: 25, 50 e 100 µg/g of animal for CEMR and 10, 20 e 40 µg/g of animal for the fractions. Crude extract and fractions of *M. rufula* were donated by Dr. Patrícia de Brum Vieira from Universidade Federal do Pampa. The crude extract and fractions were obtained according with in previous studies (Vieira et al. 2016a; Vieira et al. 2017; Vieira et al. 2016b).

Locomotor Activity

The locomotor activity of insects was evaluated as described by Adedara et al. (2015) with some modifications. Briefly, after injection of CEMR in different concentrations (25, 50 and 100 µg/g of animal), the cockroaches were placed in a white polystyrene box (15 cm in width × 25 cm in length × 7 cm in height), their behavior was video-recorder by a webcam (Philips, Brazil) for 10 min, and the video-recordings were further analyzed by using IDtracker® and Matlab® softwares. In these assays, the main insect locomotion patterns were evaluated: total distance traveled, number of stops, the percentage of the number of stops and the stopping time.

The exploratory profile of the insect was also observed. Analyzes were focused on the preference of the insect to the central or peripheral area of the box, as well as the time that the cockroach was positioned in these places. Throughout time, the animal can demonstrate the preference for a particular place, forming a kind of behavioral pattern (Adedara et al. 2015).

Acetylcholinesterase Activity

The activity of the enzyme acetylcholinesterase was evaluated as described by Sturmer et al. (2014) and protein was measured according to Bradford (1976). Six cockroaches were injected with CEMR (25, 50 and 100 µg/g of animal) 30 min before the acetylcholinesterase analysis. The animals were anesthetized by chilling at -5 °C and their brains were removed after cuticle opening. The brains were homogenized with 750 µL of Kpi (pH 7.0) in PowerLyzer™ 24 (MO BIO Laboratories, Inc.) at 2.000 rpm/15 s. The homogenate was centrifuged at 10.000 rpm for 5 min at 4 °C. Fifty µL of supernatant from each sample was added to 50 µL of 50 mM DTNB, 500 µL Kpi (pH 8.0) and 2.5 µL acetylthiocholine. The reaction was measured after 1 min of incubation at 405 nm, reading in the UV-Visible Spectrophotometer (Evolution 60S, Thermoscientific, New Hampshire, USA).

Semi-Isolated Cockroach Heart Preparation

A semi-isolated cockroach heart bioassay was prepared as Carrazoni et al. (2016). Briefly, cockroaches were fixed dorsally after immobilization by chilling (-5 °C for 5 min). The cuticle of the abdominal portion is removed, exposing the viscera of the insect, which was carefully moved aside to expose the heart. The heart preparations were washed with 100 µL of saline solution at room temperature (21-24 °C). After 5 min of heart stabilization, 100 µL of different concentrations of CEMR (25, 50 and 100 µg/g of animal), octopamine (15 µg/g of animal), and phentolamine (0.01 µg/g of animal) were added to exposed heart. Heartbeat frequency was monitored for 30 min under a stereoscopic microscope (Olympus, Damstat, German). Six cockroaches were used for each group.

Grooming Activity

The animals' grooming behavior was evaluated after the injection of CEMR (25, 50 e 100 µg/g of animal) according to Sturmer et al. (2014). The continuous grooming activity (seconds) was measured for 30 min. In addition, octopamine (15 µg/g of animal) and phentolamine (0.01 µg/g of animal), a receptor antagonist, were tested to investigate the participation of the octopaminergic system in the extract effects. In all assays, the temperature of the room was maintained at 22-25 °C and testing was performed 2–8 h after the beginning of the light cycle.

Cockroach Metathoracic Coxal-Adductor Nerve-Muscle Preparation (CNP)

Electromyographic tests were performed as described by Martinelli et al. (2014). In these protocols were tested the CEMR (25, 50 and 100 µg/g of animal), AFMR and MFMR fractions (10, 20 and 40 µg/g of animal) and an association of both fractions (AFMR + MFMR 40 µg/g of animal). Cockroaches were fixed dorsally on a support with the aid of pins. The third pair of legs is exposed, being suspended in a signal transducer connected to a 1.0 g force transducer (AVS Instruments, São Carlos, SP, Brazil). The nerve was stimulated at 0.5 Hz/5 ms, with twice the threshold, during 120 min with the different treatment. The neuromuscular records were made for 10 min to evaluate the integrity of the preparation. The neuromuscular records were made using AQCAD software (AVS Instruments, São Carlos, SP, Brazil). After the tests, the records were analyzed by ANCAD software (AVS Instruments, São Carlos, SP, Brazil).

Statistical Data Analysis

All data were expressed as a mean \pm standard error (S.E.M). Statistical analyses were conducted by Student's *t* test or One-way ANOVA followed by Tukey (all groups were compared to each other) or Dunnett (the groups were compared to a positive control or saline+DMSO (0,5%). When the two-way ANOVA was performed, the Bonferroni's was used as *post hoc* test. The values were considered significantly different when $p < 0.05$. All data analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 (Software Inc., San Diego, CA).

Results

CEMR on Locomotor Activity of Cockroaches

The locomotor activity and exploratory profile were significantly altered in a dose-dependent manner by the injection of CEMR (Fig. 1). The CEMR, at 50 and 100 $\mu\text{g/g}$ of animal reduced significantly the total traveled distance (210 ± 23 cm and 153 ± 22 cm, respectively) compared to control (401 ± 61 cm) (Fig. 1a). On the other hand, at the same concentrations, immobile events and stop time of cockroaches exposed to CEMR were significantly increased (Fig. 1b and c), indicating that CEMR induced a lethargic effect on the cockroaches. The exploratory profile of cockroaches was remarkably reduced after the treatments with CEMR, as depicted in the representative track plots (Fig. 1d). The control demonstrated a normal exploratory profile, preferentially exploiting the periphery instead of the bottom, a common behavior observed in insects. Conversely, after treatment with CEMR, a pronounced decrease of this exploratory profile was observed, demonstrating that animals treated with the extract preferred to remain in the same place over to explore the environment (Fig. 1d).

CEMR on Brain Acetylcholinesterase Activity (AChE)

Activity of AChE was reduced after treatment with CEMR (Fig. 2). Compared to control (insects injected with saline-DMSO 0.5%) all concentrations revealed a significant inhibition of AChE. The concentration of 25 $\mu\text{g/g}$ of animal reduced to $83 \pm 3\%$ ($n=6$; $p < 0.05$) the activity of AChE. At the concentrations of 50 and 100 $\mu\text{g/g}$ of animal, there was a significant decrease in the enzymatic activity ($45 \pm 4\%$ and $46 \pm 2\%$, respectively).

CEMR on the Cockroach's Heart Frequency

The cardiac frequency of cockroaches was significantly modulated after treatment with CEMR (Fig. 3a). The lowest concentration induced a negative chronotropic effect (85 ± 4

beats/min; $p < 0.05$) compared to control (98 ± 2 beats/min). At 50 and 100 $\mu\text{g/g}$, the CEMR induced a higher negative chronotropic effect (70.9 ± 4 beats/min and 75.7 ± 2 beats/min, respectively), with a sudden increase of cardiac frequency 15 min after CEMR treatment ($n=6$). After saline washing, the heart rate was reversed. The same assay using octopamine (15 $\mu\text{g/g}$ of animal) and phentolamine (0.01 $\mu\text{g/g}$ of animal) suggested the involvement of the octopaminergic pathway, since the effect observed in the higher concentrations of CEMR (50 and 100 $\mu\text{g/g}$ of animal) was like that observed with phentolamine (72 ± 5 beats/min), an antagonist of octopaminergic receptors (Fig. 3b).

CEMR on Cockroach Grooming Activity

The injection of CEMR affected grooming activity of legs and antennae on *N. cinerea* cockroaches (Fig. 4), however, the remarkable alterations were observed in leg grooming, which is modulated primarily by the octopaminergic pathway. In saline-DMSO-injected cockroaches, the control condition, the time of continuous grooming was 59 ± 8.0 s/30 min for legs and 36 ± 6 s/30 min for antennae ($n=30$). CEMR decreased leg grooming (7.6 ± 2 s/30 min) at 25 $\mu\text{g/g}$ of animal, whereas for antennae grooming there was no significant effect (37.3 ± 4 s/30 min). The injection of CEMR, at 50 $\mu\text{g/g}$, induced a noteworthy reduction on grooming activity of leg and antennae, which was 5.0 ± 4.0 s/30 min for legs and 1.3 ± 0.5 s/30 min for antennae ($n=30$) (Fig.4a).

Taking into account that leg grooming activity in insects is thought to be modulated mainly by octopamine (Carrazoni et al. 2016; Libersat and Pflueger 2004; Weisel-Eichler et al. 1999) in the present study, the effect of phentolamine, a selective octopamine receptor blocker, and effect of octopamine in modulating the behavioral changes induced by CEMR was tested. When octopamine (15 $\mu\text{g/g}$ of animal) was assayed, there was an increase of leg grooming (158 ± 19 s/30 min; $n=30$) (Fig. 4b). The injection of phentolamine (0.01 $\mu\text{g/g}$ of animal) alone, induced a decrease the grooming activity to 17 ± 3.0 s/30 min for legs and to 53.8 ± 8 s/30 min for antennae, respectively. Administration of octopamine (15 $\mu\text{g/g}$ of animal) 15 min prior to injection of CEMR (50 $\mu\text{g/g}$ of animal) reduced significantly the leg grooming behavior to 62 ± 10 s/30 min compared to octopamine control (Fig. 4b).

Neuromuscular Blockade of a Cockroach Nerve-Muscle Preparation (CNP) Induced by CEMR, AFMR and MFMR Fractions

The effect of CEMR on cockroach nervous system was carried out in *in vivo* metathoracic coxal-abductor nerve-muscle preparation. The administration of saline-DMSO

(control condition) did not interfere with neuromuscular responses during 120 min recordings (n=6) (Fig. 5). The injection of CEMR (25, 50 and 100 $\mu\text{g/g}$ of animal) decreased the twitch tension in the insects.

At 50 $\mu\text{g/g}$ of animal, the CEMR produced a remarkable effect on neuromuscular blockage after 120 min of recordings, which blocked 70.5 \pm 8.0% of the neuromuscular contraction compared to control (n=6) (Fig. 5). The treatment of the animals with CEMR, at 25 and 100 $\mu\text{g/g}$ of animal, induced a blockade of twitch tension, in 120 min, equal to 41.6 \pm 7.0% and 35.8 \pm 5.0%, respectively (n=5).

The activity of the aqueous (AFMR) and methanolic (MFMR) fractions of *M. rufula* on the neuromuscular junction of cockroaches were evaluated (Fig. 6). In these tests, MFMR fraction (20 and 40 $\mu\text{g/g}$ of animal) induced a small decrease in muscle contraction compared to control (Fig. 6a). In contrast, AFMR induced a significant time-dependent reduction of contraction force. When the animals were injected with AFMR 40 $\mu\text{g/g}$ of animal, the maximal inhibition of twitch tension was 66 \pm 7.0% (n = 6) after 120 min recordings (Fig. 6b). To identify the compounds responsible for the modulation of neuromuscular contraction induced by CEMR, the association of AFMR and MFMR fractions was evaluated in CNP. The concentration of 40 $\mu\text{g/g}$ of animal was chosen because it showed significant effects over the course of 120 min recordings for both fractions. The associated administration of the two fractions inhibited 59.7 \pm 7.0% (n = 6) of the twitch tension in 120 min (Fig. 6c). This blockade was smaller than AFMR alone and did not differ significantly from CEMR (50 $\mu\text{g/g}$ of animal), indicating that the aqueous fraction, rich in saponin, is the main responsible for the neuromuscular blocking induced by *M. rufula* extract (Fig. 6d).

Discussion

In the present study, it was demonstrated the effects of *M. rufula*, an endemic plant from the Caatinga biome, on modulation of nervous system of *N. cinerea*.

In neuroscience, the use of different methods, contributes for evaluation end to extend the action of substances in the brain. Nowadays, non-mammalian models are necessary (Peterson et al. 2008) and cockroaches (*N. cinerea*, *Periplaneta americana*, and *Phoetalia pallida*) have proven to be excellent models for neurotoxicology studies, as demonstrated by different researcher's groups have pointed (Adedara et al. 2016; Adedara et al. 2015; Carrazoni et al. 2016; Collins and Miller 1977; Enan 2001; Libersat 2003; Sturmer et al. 2014).

Behavioral studies are an important starting point to evaluate the potential of new compounds that act on the nervous system (Adedara et al. 2016; Adedara et al. 2015; Peterson

et al. 2008; Schechtman 2002). In this study we demonstrated that CEMR affected the locomotor activity and exploratory profile of cockroaches. The locomotor impairment was endorsed by a reduction in the total distance traveled and an increase in the recurrent episodes of immobility and time of immobility. Moreover, the exploratory profile of the cockroaches was also affected. The exploratory behavior of the cockroaches is a complex mechanism and it depends on the novelty of the environment, for example. The control cockroaches demonstrated home base formation, which is a safe place where the cockroach can remain after exploring the environment and searching for food (Adedara et al. 2015). Nevertheless, the treatment with CEMR disrupted this pattern and cockroaches remained outside of the periphery. The alteration in the exploratory profile probably was a consequence of the locomotor changes observed in the CEMR-treated animals, demonstrating a negative impact of the extract on insect orientation and locomotion which may lead to serious ecological consequences when extended to the role played by insects in the environment.

Acetylcholine (ACh) is an important and abundant neurotransmitter in the nervous system of insects (Osborne 1996). The participation of acetylcholine in the regulation of cognitive and behavioral functions is well established (Nagy and Aubert 2013). Acetylcholinesterase (AChE), the enzyme responsible for the breakdown of ACh, is one of the principal targets of insecticides (Leibson and Lifshitz 2008). In the present study, cockroaches treated with CEMR demonstrated a reduction of the AChE activity, which could compromise the locomotor behavior as observed in the treated insects. Previous studies demonstrated impairment of locomotor performance and acetylcholinesterase activities in cockroaches treated with MeHg and chlorpyrifos (Adedara et al. 2016; Adedara et al. 2015). As mentioned earlier, AChE is one of the main routes affected by anti-pest compounds, thus, our data reinforce the potential insecticidal of this plant. The effects induced in *N. cinerea* by CEMR, especially a negative chronotropic effect, could be, at least in part attributed to the anti-AChE-like activity of CEMR. Previous data demonstrated the participation of cholinergic system in heart frequency in *P. americana* (Wigglesworth 1972), which is modulated by ACh and inhibitors (Dahm 1971).

The dual effect induced by CEMR on cockroaches' heart may be due to the action on octopaminergic system. Octopamine is a main cardio-accelerating compound in insects and presented a biphasic effect on heart rate (Papaefthimiou and Theophilidis 2011). Previous studies demonstrated that the octopamine concentration directly influences its function on the heart rate, being able to accelerate the beats when in high concentrations, or to decrease, in low concentrations (Papaefthimiou and Theophilidis 2001; Papaefthimiou and Theophilidis 2011).

Since cholinergic and octopaminergic pathways appear to be involved in the effect induced by CEMR on cockroaches' cardiac rhythm, octopamine and phentolamine, a selective octopamine receptor blocker, were tested. The results suggested that the effect on cardiac frequency induced by CEMR was modulated by octopaminergic system due to the great similarity between the effects obtained with the octopamine antagonist and the extract.

Monoamines, such dopamine and octopamine, participate on the orchestration of behavior in insects (Libersat and Pflueger 2004), such as grooming activity, a common behavioral process in insects, related to hygiene behavior, mating and social interaction (Weisel-Eichler et al. 1999). In this study, a reduction in leg grooming activity rather than of antennae in CEMR-treated cockroaches suggests the involvement of octopamine on modulation of *N. cinerea* (Gal and Libersat 2010; Weisel-Eichler et al. 1999). This hypothesis was evaluated by assaying octopamine and phentolamine. Octopamine alone, as expected, increased significantly the leg grooming. This augment was reverted in treated-cockroaches with CEMR, indicating the participation of octopaminergic system on behavioral alteration elicited by *M. rufula* extract.

Electrophysiological tests of cockroaches injected with crude extract and fractions of *M. rufula* showed a neuromuscular blocking activity. Skeletal musculature contraction of legs of insects is orchestrated by the release of glutamate (GLU - excitatory neurotransmitter) and gamma-aminobutyric acid (GABA - inhibitory neurotransmitter) (Dubreil et al. 1994; Osborne 1996; Wildman et al. 2002). Octopamine may act as an association neurotransmitter, thereby controlling the release of GLU and GABA in the synaptic cleft (Farooqui 2012). Depending on the type of muscle and receptor present in the neuromuscular junctions, the release of GLU or GABA may induce either increase or decrease of the muscular contraction. Thereby, the neuromuscular blockade induced by CEMR in *N. cinerea* could result either from an increase of GABA release or by inhibition of glutamatergic neurotransmission. Koon and Budnik (2012) described that octopamine released in the neuromuscular junction of *Drosophila* larvae will modulate the glutamatergic pathway through different receptors, thus leading to modulation of the neuromuscular junction. Considering the modulation of the octopaminergic pathway, it is possible that CEMR is acting on a specific receptor at the synaptic terminals, directly influencing the release of glutamate to the neuromuscular junction, and consequently, causes a loss of contraction force in *N. cinerea*.

The composition of plant extracts is huge and a large diversity of compounds could be isolated (De Souza et al. 2002; Seccon et al. 2010). In order to identify the compounds responsible for the modulation of *M. rufula* extract on *N. cinerea*, the methanolic (MFMR) and aqueous (AFMR) fractions obtained from the crude extract of *M. rufula* (Vieira et al. 2017;

Vieira et al. 2016b) were tested on the muscular contraction. The methanolic fraction, rich in flavonoids and tannins (Vieira et al. 2016b) showed significant results, compared to control. Conversely, the aqueous fraction, an enriched saponin fraction, showed remarkable results in all the concentrations tested. The associate action of aqueous and methanolic fractions was very similar to CEMR at 50 µg/g of animal. Thereby, these results indicated that the effects on the muscle contraction of cockroaches were mainly due to the aqueous fraction.

The main constituents of aqueous fraction used in this study are saponin. As described in previous study, the aqueous fraction obtained from crude extract of *M. rufula* is constituted of Mi-saponin C, a very uncommon saponin (Vieira et al. 2017). Saponins are known for their diversity of actions on biological systems (Francis et al. 2002; Sparg et al. 2004). In the plants, a key role of saponins is protect them against predators and diseases, therefore, saponins could be considered as insecticides (Geyter et al. 2007b), and one of their mechanism of action involves to permeate the cell membranes, as showed for Lepidoptera (Geyter et al. 2012) and causing the death and/or blockage of the growth of species such as *Spodoptera littoralis* and *Acyrtosiphon pisum* (Geyter et al. 2007a). Interesting data indicate that saponin acts on the cholinergic pathway (Ishaaya and Birk 1965; Kamal et al. 2015), which could explain the anti-cholinesterase action of CEMR.

This study reported the entomotoxicity of crude extract and saponin fraction of *M. rufula* in *N. cinerea*. The main activities modulated by this plant were central and peripheral neurotoxicity and cardiotoxicity. The data suggest the participation of octopamine in the extract toxicological mechanism on the insects. The disruption of cockroaches' behavior and eletrophysiological modifications may reveal the potential of *M. rufula* to act as an alternative product for controlling of insect pests.

Author Contributions

BTB, PBV and LV conceived and designed research. BTB, APL, EK, OBAB, MER and BYC conducted experiments. LV and CAD contributed new reagents and/or analytical tools. BTB and APL analyzed data. BTB wrote the manuscript. ALP and PBV reviewed and edited. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the PRONEM/FAPERGS/CNPq 003/2011, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES 063/2010, Toxinologia and PROPESQ/PROPG UNIPAMPA, for the financial support. BTB, APL and PBV thank for scholarship from CAPES.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests.

References

- Adedara IA, Rosemberg DB, de Souza D, Farombi EO, Aschner M, Souza DO, Rocha JBT (2016) Neurobehavioral and biochemical changes in *Nauphoeta cinerea* following dietary exposure to chlorpyrifos. *Pestic Biochem Physiol* 130:22-30 doi:10.1016/j.pestbp.2015.12.004
- Adedara IA, Rosemberg DB, Souza DO, Kamdem JP, Farombi EO, Aschner M, Rocha JBT (2015) Biochemical and behavioral deficits in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* model of methylmercury exposure. *Toxicol Res* 4:442-451 doi:10.1039/c4tx00231h
- Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM (2007) Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17:114-140
- Akhtar N, Ali M, Alam MS (2010) Gallic acid esters from the stem bark of *Mimusops elengi* L. *Nat Prod Res* 24:962-972 doi:10.1080/14786410902833989
- Arcoverde JHV, Carvalho AS, Almeida Neves FP, Dionízio BP, Pontual EV, Paiva PMG, Napoleão TH, Correia MTdS, Silva MV, Carneiro-da-Cunha MdG (2014) Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. *Nat Prod Res* 28:12971301
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Calixto JB (2005) Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *J Ethnopharmacol* 100:131-134 doi:10.1016/j.jep.2005.06.004
- Carrazoni T, de Avila Heberle M, Perin AP, Zanatta AP, Rodrigues PV, Dos Santos FD, de Almeida CG, Vaz Breda R, Dos Santos DS, Pinto PM, da Costa JC, Carlini CR, Dal Belo CA (2016) Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. *Toxicology* 368-369:162-171 doi:10.1016/j.tox.2016.09.007
- Collins C, Miller T (1977) Studies on the action of biogenic amines on cockroach heart. *J Exp Biol* 67:1-15
- Dahm P (1971) Toxic effects produced in insects by organophosphorus compounds. *Bull World Health Organ* 44:215
- De Souza KC, Schapoval EE, Bassani VL (2002) LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. *J Pharmaceut Biomed* 28:771-777
- Dubreil V, Sinakevitch IG, Hue B, Geffard M (1994) Neuritic GABAergic synapses in insect neurosecretory cells. *Neurosci Res* 19:235-240

- Enan E (2001) Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 130:325-337
- Farooqui T (2012) Review of octopamine in insect nervous systems. *Open Access Insect Physiol* 4:1-17 doi:10.2147/oaip.S20911
- Fernandes CP, Corrêa AL, Lobo JF, Caramel OP, De Almeida FB, Castro ES, Souza KF, Burth P, Amorim LM, Santos MG (2012) Triterpene esters and biological activities from edible fruits of *Manilkara subsericea* (Mart.) Dubard, Sapotaceae. *BioMed Res Int* 2013
- Francis G, Kerem Z, Makkar HP, Becker K (2002) The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr* 88:587-605 doi:10.1079/BJN2002725
- Gal R, Libersat F (2010) A wasp manipulates neuronal activity in the sub-esophageal ganglion to decrease the drive for walking in its cockroach prey. *PLoS One* 5:e10019 doi:10.1371/journal.pone.0010019
- Geyter E, Geelen D, Smaghe G (2007a) First results on the insecticidal action of saponins. *Commun Agric Appl Biol Sci* 72:645-648
- Geyter E, Lambert E, Geelen D, Smaghe G (2007b) Novel advances with plant saponins as natural insecticides to control pest insects. *Pest Technol* 1:96-105
- Geyter E, Swevers L, Caccia S, Geelen D, Smaghe G (2012) Saponins show high entomotoxicity by cell membrane permeation in Lepidoptera. *Pest Manag Sci* 68:1199-1205
- Gobbo-Neto L, Lopes NP (2007) Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím Nova* 30:374-381
- Ishaaya I, Birk Y (1965) Soybean saponins. IV. The effect of proteins on the inhibitory activity of soybean saponins on certain enzymes. *J Food Sci* 30:118-120
- Kamal Z, Ullah F, Ayaz M, Sadiq A, Ahmad S, Zeb A, Hussain A, Imran M (2015) Anticholinesterase and antioxidant investigations of crude extracts, subsequent fractions, saponins and flavonoids of *Atriplex laciniata* L.: potential effectiveness in Alzheimer's and other neurological disorders. *Biol Res* 48:21
- Koon AC, Budnik V (2012) Inhibitory control of synaptic and behavioral plasticity by octopaminergic signaling. *J Neurosci* 32:6312-6322 doi:10.1523/jneurosci.651711.2012
- Leibson T, Lifshitz M (2008) Organophosphate and carbamate poisoning: review of the current literature and summary of clinical and laboratory experience in southern Israel. *Isr Med Assoc J* 10:767-770
- Libersat F (2003) Wasp uses venom cocktail to manipulate the behavior of its cockroach prey. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 189:497-508 doi:10.1007/s00359-003-0432-0

- Libersat F, Pflueger H-J (2004) Monoamines and the Orchestration of Behavior. *BioSci* 54:17-25 doi:10.1641/0006-3568(2004)054[0017:Matoob]2.0.Co;2
- Martinelli AH, Kappaun K, Ligabue-Braun R, Defferrari MS, Piovesan AR, Staniscuaski F, Demartini DR, Dal Belo CA, Almeida CG, Follmer C, Verli H, Carlini CR, Pasquali G (2014) Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. *Biochim Biophys Acta* 1840:935-944 doi:10.1016/j.bbagen.2013.11.010
- Nagy PM, Aubert I (2013) B6eGFPChAT mice overexpressing the vesicular acetylcholine transporter exhibit spontaneous hypoactivity and enhanced exploration in novel environments. *Brain Behav* 3:367-383
- Newman DJ, Cragg GM (2016) Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* 79:629-661 doi:10.1021/acs.jnatprod.5b01055
- Osborne RH (1996) Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. *Pharmacol Ther* 69:117-142
- Papaefthimiou C, Theophilidis G (2001) An in vitro method for recording the electrical activity of the isolated heart of the adult *Drosophila melanogaster* *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 37:445-449
- Papaefthimiou C, Theophilidis G (2011) 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 Physiol* 57:316-325 doi:10.1016/j.jinsphys.2010.11.022
- Pennington TD (1991) The genera of Sapotaceae. Royal Botanic Gardens: Bronx, New York: Kew & New York Botanical Garden:1-13
- Peterson RT, Nass R, Boyd WA, Freedman JH, Dong K, Narahashi T (2008) Use of nonmammalian alternative models for neurotoxicological study. *Neurotoxicology* 29:546555
- Quarles W (1992) Botanical pesticides from Chenopodium. *IPM Practitioner* 14:1-11
- Santos DS, Carvalho EL, Lima JC, Breda RV, Oliveira RS, Freitas TC, Salamoni SD, Domingues MF, Piovesan AR, Boldo JT, Assis DR, Costa JC, Dal Belo CA, Pinto PM (2016) Bothriurus bonariensis scorpion venom activates voltage-dependent sodium channels in insect and mammalian nervous systems. *Chem Biol Interact* 258:1-9 doi:10.1016/j.cbi.2016.08.008
- Schechtman LM (2002) Implementation of the 3Rs (refinement, reduction, and replacement): validation and regulatory acceptance considerations for alternative toxicological test methods. *ILAR J* 43:S85-S94

- Seccon A, Rosa DW, Freitas RA, Biavatti MW, Creczynski-Pasa TB (2010) Antioxidant activity and low cytotoxicity of extracts and isolated compounds from *Araucaria angustifolia* dead bark. *Redox Rep* 15:234-242
doi:10.1179/135100010X12826446921789
- Sparg SG, Light ME, van Staden J (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol* 94:219-243 doi:10.1016/j.jep.2004.05.016
- Sturmer GD, Freitas TC, A. HM, Assis DR, Vinade L, Pereira AB, Franco JL, Dal Belo CA (2014) Modulation of dopaminergic neurotransmission induced by sublethal doses of the organophosphate trichlorfon in cockroaches. *Ecotoxicol Environ Saf* 109:56-62
doi:10.1016/j.ecoenv.2014.08.006
- Vieira PB, Silva NL, Silva GN, Silva DB, Lopes NP, Gnoatto SC, Silva MV, Macedo AJ, Bastida J, Tasca T (2016a) Caatinga plants: Natural and semi-synthetic compounds potentially active against *Trichomonas vaginalis*. *Bioorg Med Chem Lett* 26:22292236
doi:10.1016/j.bmcl.2016.03.061
- Vieira PB, Silva NLF, Menezes CB, Silva MV, Silva DB, Lopes NP, Macedo AJ, Bastida J, Tasca T (2017) Trichomonocidal and parasite membrane damaging activity of bidesmosic saponins from *Manilkara rufula*. *PLoS One* 12:e0188531
doi:10.1371/journal.pone.0188531
- Vieira PB, Silva NLF, Silva DB, Lopes NP, Silva AG, Silva MV, Bastida J, Macedo AJ, Tasca T (2016b) The Caatinga endemic *Manilkara rufula* possesses remarkable activity against *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Exp Parasitol*
doi:10.1016/j.exppara.2016.12.006
- Weisel-Eichler A, Haspel G, Libersat F (1999) Venom of a parasitoid wasp induces prolonged grooming in the cockroach. *J Exp Biol* 202:957-964
- Wiesbrook M (2004) Natural indeed: are natural insecticides safer and better than conventional insecticides. *Ill Pest Rev* 17:333-370
- Wigglesworth VB (1972) Digestion and nutrition. In: *The principles of insect physiology*. Springer, pp 476-552
- Wildman M, Ott SR, Burrows M (2002) GABA-like immunoreactivity in nonspiking interneurons of the locust metathoracic ganglion. *J Exp Biol* 205:3651-3659

Legends

Figure 1. Locomotion and Track Plots Evaluated in Control (DMSO) and CEMR Treatments. In (a) the total distance travelled, (b) immobile episodes, (c) stopping time and (d) representative images of real experiments with the track plots in green. The data are expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by One-way Anova followed by the Dunnett's post test where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Tukey post test were applied to compare meaningful results among treatments where # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ (n=36).

Figure 2. Effect of CEMR on Brain Acetylcholinesterase Activity (AChE). The cockroach brain homogenate was prepared 30 min. after injection with the CEMR treatments. The data are expressed as mU AChE/mg protein of brain homogenate. The data were expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by One-way Anova followed by the Dunnett's post test where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (n=6).

Figure 3. Effects of CEMR on the Cockroach's Heart Frequency. In (a) the negative chronotropic effect of CEMR (25 and 50 $\mu\text{g/g}$ of animal) when compared to the control and in (b) the effect of octopamine (15 $\mu\text{g/g}$ of animal) and phentolamine (0.1 $\mu\text{g/g}$ of animal) in the cockroach's heart frequency. The dotted lines represent the time of initiation of CEMR treatment (Start) and washing and withdrawal of the treatment with saline + DMSO (Wash). The graph represents the mean \pm S.E.M of four experiments. The data were analyzed by twoway Anova followed by the Bonferroni's post test where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (n=6).

Figure 4. Grooming Behavior and Aminergic Modulation Induced by CEMR. The graph shows in (a) a strong decrease of leg and antenna grooming for all treatments with CEMR, except for the treatment of 24 $\mu\text{g/g}$ of animal, in which the antenna did not undergo significant modulations. In (b) the modulation of octopamine (15 $\mu\text{g/g}$ of animal) and phentolamine (0.1 $\mu\text{g/g}$ of animal) in grooming behavior is observed, as well as the modulation of CEMR, 15 min after injection of octopamine. The results are expressed as mean \pm S.E.M. of the total time of grooms (in seconds) for 30 min. The data were analyzed by One-way Anova followed by the Dunnett's post test where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Tukey post test were applied aiming to compare significances between treatments where ##### $p < 0.0001$. (n=30).

Figure 5. Neuromuscular Blockade Induced by CEMR at Nerve-Muscle preparation (CNP). In the graph it is possible to observe a neuromuscular blockade induced by all the concentrations tested. Statistical analyses were performed by Two-way Anova followed by the Bonferroni's post test where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Data are expressed as percentage of control (n=6).

Figure 6. Neuromuscular Blockade Induced by AFMR and MFMR at Nerve-Muscle Preparation (CNP). In (a) a small neuromuscular blockade induced by MFMR (40 $\mu\text{g/g}$ of animal) was observed, as opposed to that observed in (b), where AFMR (40 $\mu\text{g/g}$ of animal) induced a decrease of the contraction force around $66 \pm 7\%$. In (c) and (d), MFMR and AFMR (40 $\mu\text{g/g}$ of animal) were synergistically tested. Statistical analyses were performed by Two-way Anova followed by the Bonferroni's post test where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Tukey post test were applied to compare meaningful results among treatments where # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ (n=6).

Figures

Figure 1

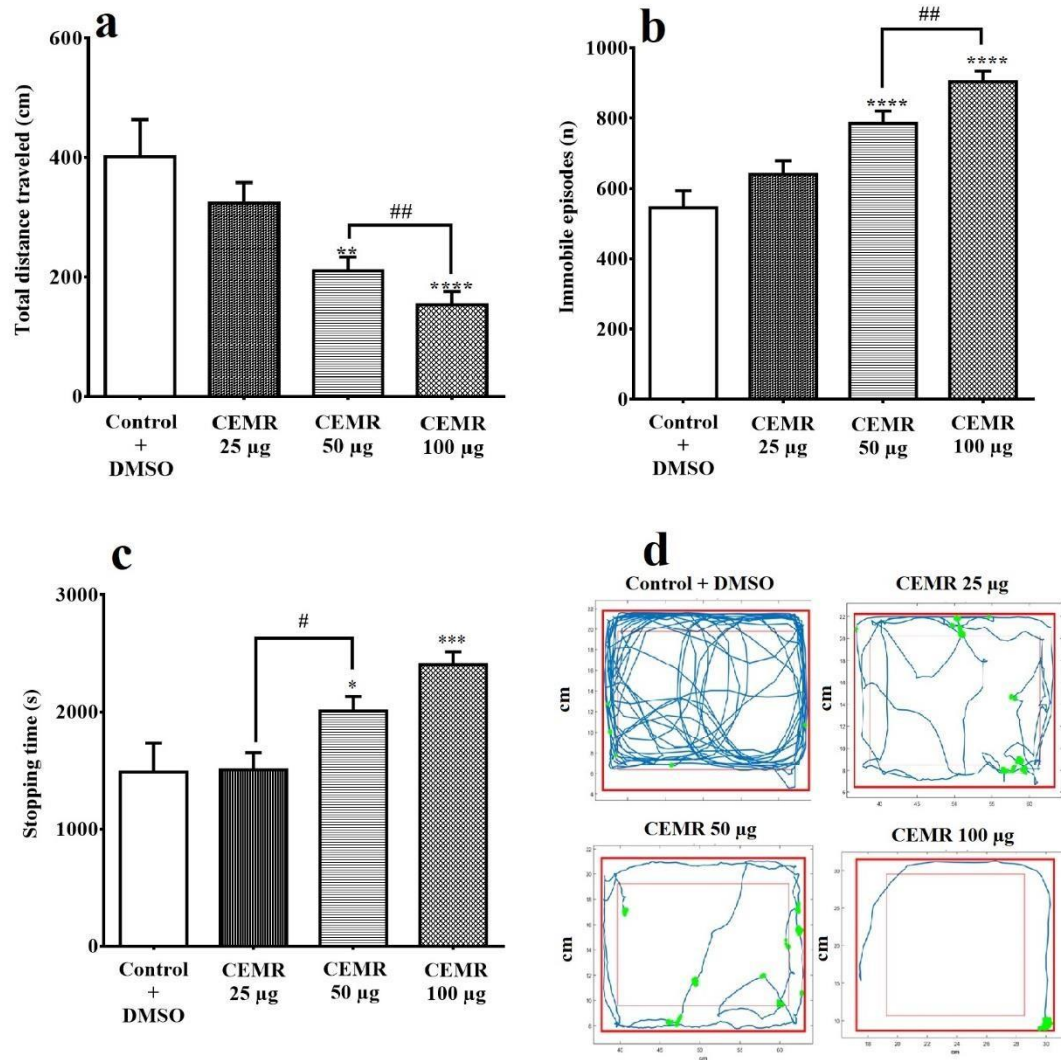


Figure 2

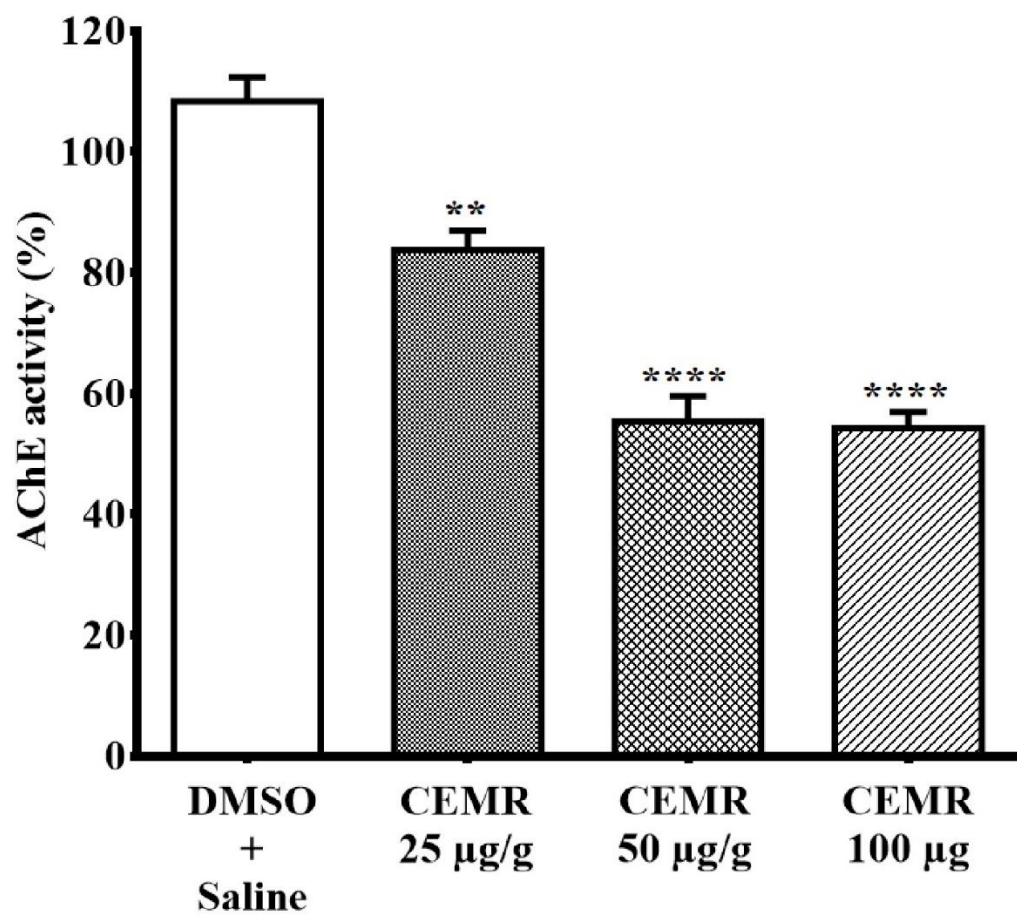


Figure 3

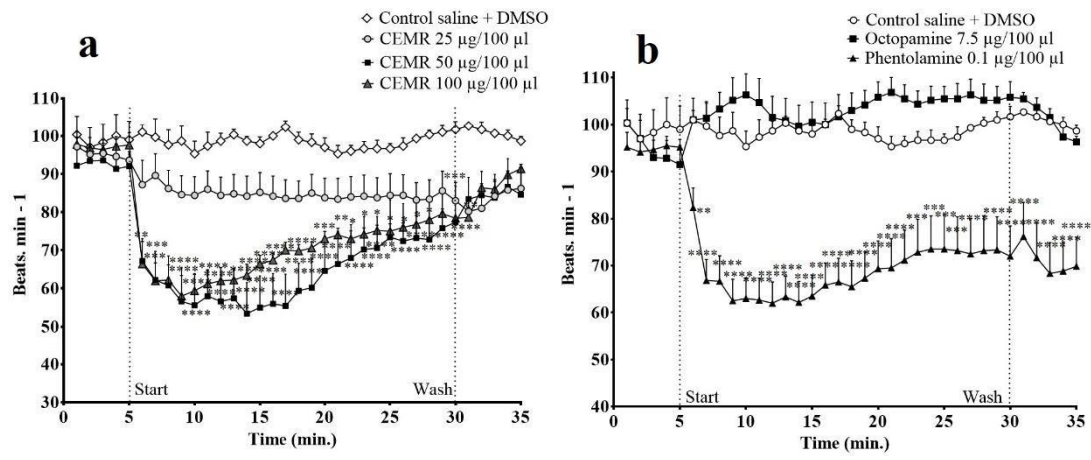


Figure 4

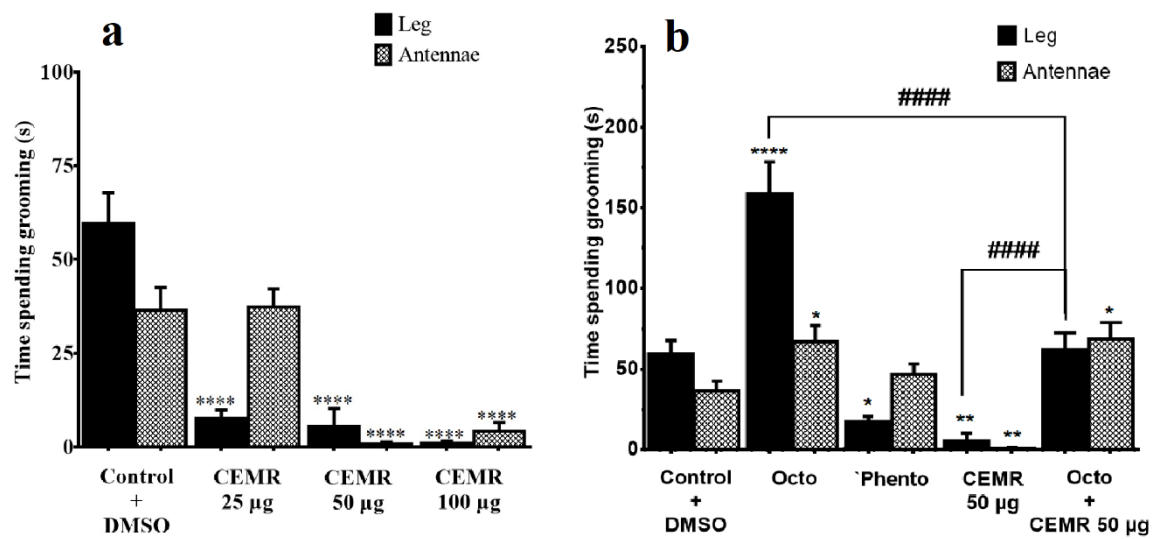


Figure 5

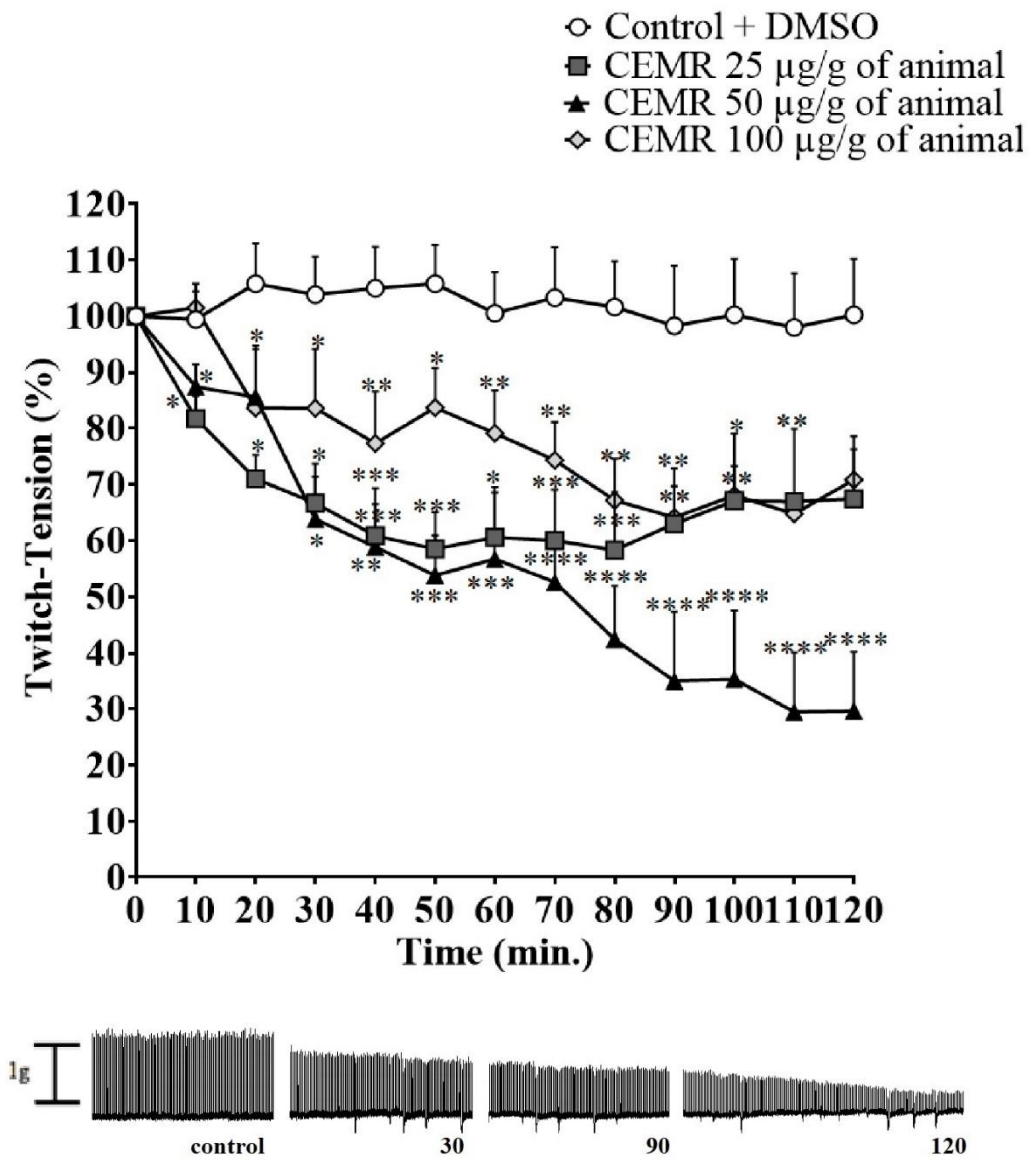
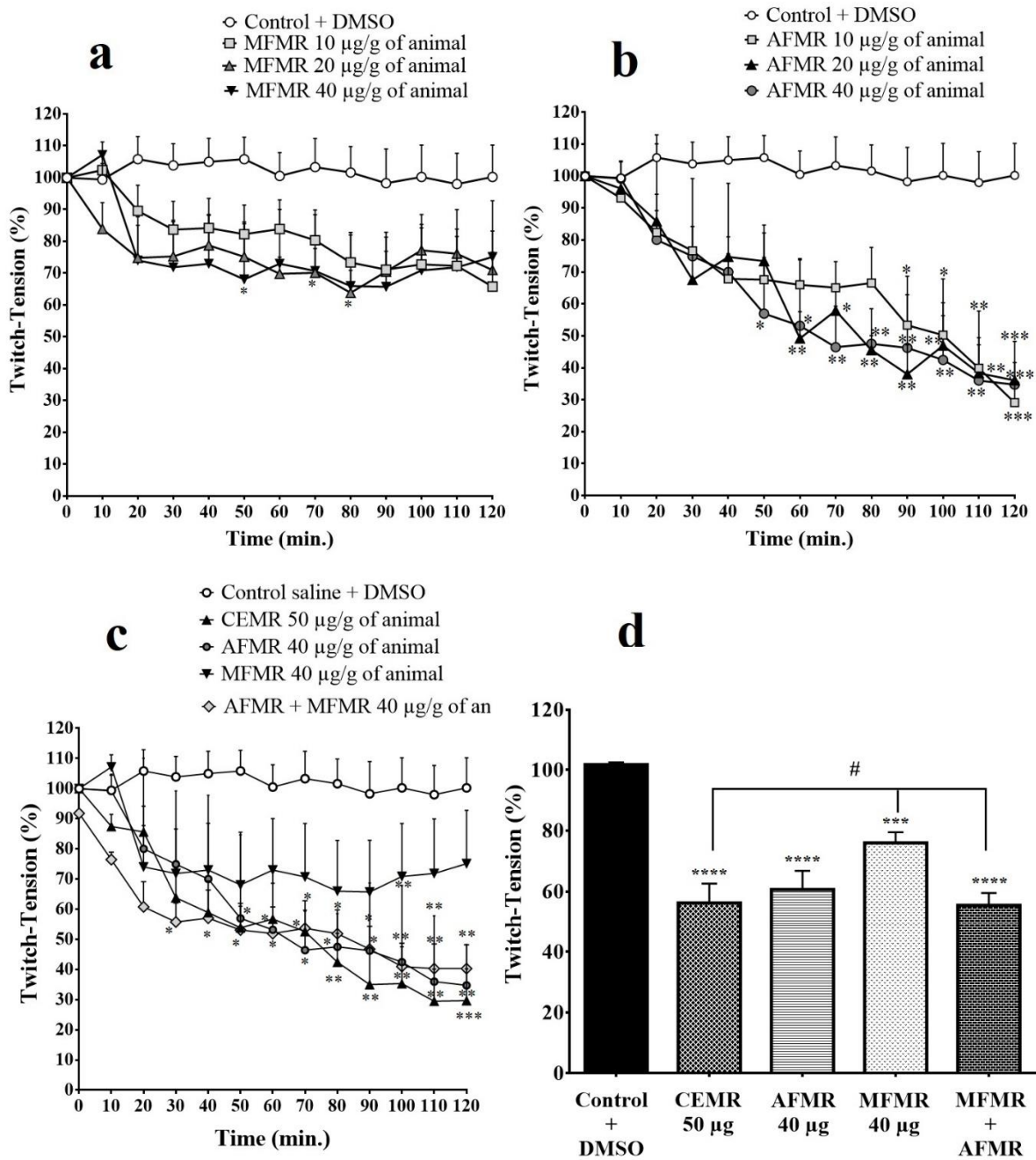


Figure 6



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os dados obtidos e apresentados no presente trabalho, podemos considerar que:

- O extrato bruto de *M. rufula* (EBMR) afetou significativamente a locomoção dos insetos, diminuindo a distância percorrida pelos mesmos, bem como aumentando os episódios em que os animais permaneceram imóveis.
- A via colinérgica foi afetada por EBMR, o qual inibiu significativamente a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE).
- A frequência cardíaca das baratas foi afetada significativamente por EBMR (50 e 100 µg/g de animal). Considerando os resultados obtidos com octopamina (15 µg/g de animal) e fentolamina (0,1 µg/g de animal) sobre a frequência cardíaca dos insetos, é possível sugerir o envolvimento da via octopaminérgica nos efeitos observados.
- EBMR diminuiu significativamente o comportamento de *grooming* (perna e antena) dos insetos. O *grooming* de perna foi fortemente afetado pela concentração de 50 µg/g de animal. A injeção de EBMR (50 µg/g de animal) 15 minutos após a injeção de octopamina (15 µg/g de animal) demonstra novamente o envolvimento da via octopaminérgica.
- EBMR induziu uma diminuição da contração muscular dos insetos. Ensaio semelhante com as frações aquosa (FAMR) e metanólica (FMMR) de *M. rufula* demonstraram que FAMR é a principal responsável pelos efeitos observados, bem como a saponina Mi-saponin C, principal composto encontrado em FAMR.
- O presente estudo contribuiu para caracterizar a atividade entomotóxica de *M. rufula*, demonstrando o potencial biotecnológico desta espécie.

REFERÊNCIAS

- ADEDARA, I. A. et al. Biochemical and behavioral deficits in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* model of methylmercury exposure. **Toxicology Research**, v. 4, n. 2, p. 442-451, 2015.
- AGRA, M. D. F. **Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil**. João Pessoa, Editora União, 1996.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- AKHTAR, N.; ALI, M.; ALAM, M. S. Gallic acid esters from the stem bark of *Mimusops elengi* L. **Natural Products Research**, v. 24, n. 10, p. 962-72, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20496236>>.
- ALBUQUERQUE, U. D. **A etnobotânica no nordeste brasileiro**. Tópicos atuais em Botânica. Embrapa/Sociedade Botânica do Brasil. Brasília/São Paulo, p. 241-249, 2000.
- ALMEIDA JR, E. B. **Diversidade de *Manilkara Adans. (Sapotaceae)* para o Nordeste do Brasil**. 2010. 158 (Doutorado). Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- ALVES, H. M. **A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos**. Cadernos Temáticos de química nova na escola, v. 3, p. 11-15, 2001.
- ARCOVERDE, J. H. V. et al. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1297-1301, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.900497>>.
- AUGUSTIN, J. M. et al. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 72, n. 6, p. 435-457, 2011.
- BONILLA-RAMIREZ, L.; JIMENEZ-DEL-RIO, M.; VELEZ-PARDO, C. Acute and chronic metal exposure impairs locomotion activity in *Drosophila melanogaster*: a model to study Parkinsonism. **Biometals**, v. 24, n. 6, p. 1045-57, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21594680>>.
- BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.
- BREER, H.; SATTELLE, D. B. Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors. **Journal of Insect Physiology**, v. 33, n. 11, p. 771-790, 1987.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 131-4, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006081>>.

CARRAZONI, T. et al. Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. **Toxicology**, v. 368-369, p. 162-171, 2016.

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

CORNWALL, P. The cockroach a laboratory insect and an industrial pest. **London: Hutchinson & Company**. 391p, 1968.

COUTINHO, C. F. et al. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 15, 2005.

CULL-CANDY, S. G.; MILEDI, R. Junctional and extrajunctional membrane channels activated by GABA in locust muscle fibres. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 211, n. 1185, p. 527-35, 1981.

DAHM, P. Toxic effects produced in insects by organophosphorus compounds. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 44, n. 1-2-3, p. 215, 1971.

DE GEYTER, E. et al. Novel advances with plant saponins as natural insecticides to control pest insects. **Pest Technologies**, v. 1, n. 2, p. 96-105, 2007.

DELPUECH, J.; BARDON, C.; BOULÉTREAU, M. Increase of the behavioral response to kairomones by the parasitoid wasp *Leptopilina heterotoma* surviving insecticides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, n. 2, p. 186-191, 2005.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. Ed. da Universidade Estadual Paulista, 1996.

DIANTONIO, A. Glutamate receptors at the *Drosophila* neuromuscular junction. **International Review of Neurobiology**, v. 75, p. 165-179, 2006.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v. 7, n. 1, 2006.

ESKANDER, J. et al. Saponins from the seeds of *Mimusops laurifolia*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 16, p. 1793-9, 2006.

FERNANDES, C. P. et al. Triterpene esters and biological activities from edible fruits of *Manilkara subsericea* (Mart.) Dubard, Sapotaceae. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23509702>>.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 42, n. 1, p. 1-11, 1984.

FORZZA, R. et al. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

FUSSNECKER, B. L.; SMITH, B. H.; MUSTARD, J. A. Octopamine and tyramine influence the behavioral profile of locomotor activity in the honey bee (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 10, p. 1083-1092, 2006.

GAL, R.; LIBERSAT, F. A wasp manipulates neuronal activity in the sub-esophageal ganglion to decrease the drive for walking in its cockroach prey. **PLOS ONE**, v. 5, n. 4, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010019>>.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2002.

GARDA, A. A. et al. Herpetofauna of protected areas in the caatinga I: Raso da Catarina Ecological Station (Bahia, Brazil). **Check List**, v. 9, n. 2, p. 405-414, 2013.

GIULIETTI, A. M. et al. **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga**. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação, p. 48-90, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. **Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites**. Química Nova, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, E. C. et al. Plantas da caatinga de uso terapêutico: levantamento etnobotânico. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, v. 5, n. 2, 2008.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. The insects: an outline of entomology. **John Wiley & Sons**, 2014.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16105678>>.

HAMPEL, S. et al. A neural command circuit for grooming movement control. **Elife**, v. 4, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26344548>>.

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

ISHAAYA, I.; BIRK, Y. Soybean saponins. IV. The effect of proteins on the inhibitory activity of soybean saponins on certain enzymes. **Journal of Food Science**, v. 30, n. 1, p. 118-120, 1965.

KAMAL, Z. et al. Anticholinesterase and antioxidant investigations of crude extracts, subsequent fractions, saponins and flavonoids of *Atriplex laciniata* L.: potential effectiveness in Alzheimer's and other neurological disorders. **Biological Research**, v. 48, n. 1, p. 21, 2015.

KERKUT, G.; HORN, N.; WALKER, R. Long-lasting synaptic inhibition and its transmitter in the snail *Helix aspersa*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 30, n. 6, p. 1061-1074, 1969.

KIILL, L. H. P. Caatinga: patrimônio brasileiro ameaçado. **Embrapa Semiárido-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2009.

LANGLEY, K.; GRANT, N. J. Are exocytosis mechanisms neurotransmitter specific? **Neurochemistry international**, v. 31, n. 6, p. 739-757, 1997.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; DA SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária UFPE, 2003.

LEWIS, S.; SMALLMAN, B. The estimation of acetylcholine in insects. **The Journal of physiology**, v. 134, n. 1, p. 241-256, 1956.

LIBERSAT, F.; PFLUEGER, H.-J. Monoamines and the Orchestration of Behavior. **BioScience**, v. 54, n. 1, p. 17-25, 2004. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1641/00063568\(2004\)054\[0017:MATOOB\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1641/00063568(2004)054[0017:MATOOB]2.0.CO;2)>.

LÓPEZ, M. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 284-288, 2010.

MA, J. et al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 983-986, 2003.

MARCEL, V. et al. Two invertebrate acetylcholinesterases show activation followed by inhibition with substrate concentration. **Biochemical Journal**, v. 329, n. 2, p. 329-334, 1998.

MARCUSSI, S. et al. **Escorpiões: biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas**. Ribeirão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas (FUNPEC), 2011.

MARDER, E. et al. Invertebrate central pattern generation moves along. **Current Biology**, v. 15, n. 17, p. R685-99, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139202>>.

MISRA, G.; MITRA, C. *Mimusops manilkara*, constituents of fruit and seed. **Phytochemistry**, v. 8, n. 1, p. 249-252, 1969.

MUSTARD, J. A.; PHAM, P. M.; SMITH, B. H. Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 4, p. 422-430, 2010.

NICOLAUS, L. K.; LEE, H. Low acute exposure to organophosphate produces long-term changes in bird feeding behavior. **Ecological Applications**, v. 9, n. 3, p. 1039-1049, 1999.

ORCHARD, I.; RAMIREZ, J. M.; LANGE, A. B. A Multifunctional Role for Octopamine in Locust Flight. **Annual Review of Entomology**, v. 38, n. 1, p. 227-249, 1993. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.en.38.010193.001303>>.

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

PAPAEFTHIMIOU, C.; THEOPHILIDIS, G. 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**, v. 57, n. 2, p. 316-25, 2011.

PENNINGTON, T. D. The genera of Sapotaceae. **Royal Botanic Gardens: Bronx, New York.: Kew & New York Botanical Garden**, p. 1-13, 1991.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones**. 1997.

RAYMOND-DELPECH, V. et al. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. **Invertebrate Neuroscience**, v. 5, n. 3-4, p. 119-133, 2005.

RHOORRI-FRIH, B. et al. Pentacyclic triterpenes from *Manilkara bidentata* resin. Isolation, identification and biological properties. **Fitoterapia**, v. 88, p. 101-108, 2013.

RIZZINI, C. **Fitogeografia brasileira**. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, RJ, 1997.

SACHS, B. D. The development of grooming and its expression in adult animals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 525, p. 1-17, 1988.

SAHU, N. P. et al. Triterpenoid saponins from *Mimusops elengi*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1145-9, 1997.

SANTOS, D. S. et al. *Bothriurus bonariensis* scorpion venom activates voltage-dependent sodium channels in insect and mammalian nervous systems. **Chemico-biological Interactions**, v. 258, p. 1-9, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27544632>>.

SARASWATI, S. et al. Tyramine and octopamine have opposite effects on the locomotion of *Drosophila* larvae. **Developmental Neurobiology**, v. 58, n. 4, p. 425-441, 2004.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SPRUIJT, B. M.; HOL, T.; ROUSSEAU, J. Approach, avoidance, and contact behavior of individually recognized animals automatically quantified with an imaging technique. **Physiology & Behavior**, v. 51, n. 4, p. 747-752, 1992.

SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A.; GISPEN, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 3, p. 825-52, 1992.

STURMER, G. D. 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.

TAYLOR, D. P.; NEWBURGH, R. W. The synthesis and content of neurotransmitters and their effect on cyclic nucleotide accumulation in the central nervous system of *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry**, v. 9, n. 3, p. 265-272, 1979. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0020179079900040>>.

TRENTIN, D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327-35, 2011.

VIEIRA, P.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M. Inseticidas de origem vegetal. In: FERREIRA, JTB; CORRÊA AG; VIEIRA, PC (Eds), **Produtos naturais no controle de pragas**. São Carlos: EdUFSCar: 23 p. 2001.

VIEIRA, P. B. et al. **Trichomonocidal and parasite membrane damaging activity of bidesmosic saponins from *Manilkara rufula***. PLoS One, v. 12, n. 11, p. e0188531, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29190689>>.

VIEIRA, P. B. et al. The Caatinga endemic *Manilkara rufula* possesses remarkable activity against *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **Experimental Parasitology**, 2016.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. Thin layer chromatography in phytochemistry. **CRC Press**, 2008.

WANG, H. et al. Profiles and α -amylase inhibition activity of proanthocyanidins in unripe *Manilkara zapota* (Chiku). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 3098-3104, 2012.

WINK, M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. **Medicines (Basel)**, v. 2, n. 3, p. 251-286, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28930211>>.