

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO –
IFGOIANO-CAMPUS RIO VERDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROQUÍMICA

**INIBIÇÃO DE ACETILCOLINESTERASE E α -AMILASE POR
EXTRATO DAS FOLHAS DE *Mouriri elliptica* MARTIUS**

Autora: Leticia Siqueira da Silva
Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira

RIO VERDE - GO
Novembro – 2016

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO –
IFGOIANO-CAMPUS RIO VERDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROQUÍMICA

**INIBIÇÃO DE ACETILCOLINESTERASE E α -AMILASE POR
EXTRATO DAS FOLHAS DE *Mouriri elliptica* MARTIUS**

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de concentração Agroquímica.

Autora: Leticia Siqueira da Silva
Orientador: Prof. Dr. Paulo Sergio Pereira
Co-orientadora: Prof^{ta} Dra. Mariana Costa Mello
Gonçalves

Silva, Leticia Siqueira da
S586i Inibição de acetilcolinesterase e α -amilase por extrato das folhas de
Mouriri elliptica Martius / Leticia Siqueira da Silva. –
Rio Verde. – 2016.
64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano –
Campus Rio Verde, 2016.
Orientador: Dr. Paulo Sérgio Pereira

Bibliografia

1. Inibição. 2. Produtos agrícolas. 3. Controle de pragas.
2. I. Título.
3. II. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

CDD: 632.9

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**INIBIÇÃO DE ACETILCOLINESTERASE E DE
 α -AMILASE POR EXTRATOS DAS FOLHAS DE
*MOURIRI ELLIPTICA MARTIUS***

Autora: Leticia Siqueira da Silva
Orientador: Paulo Sérgio Pereira

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

APROVADA em 12 de setembro de 2016.

Neire Moura de Gouveia
Prof.^a Dr.^a Neire Moura de
Gouveia
Avaliadora externa
Centro de Ensino Superior
Rezende e Potrich

Agna Rita dos Santos Rodrigues
Prof.^a Dr.^a Agna Rita dos Santos
Rodrigues
Avaliadora interna
IF Goiano/RV



Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira
Presidente da banca
IF Goiano/RV

Dedico este trabalho a Deus, que não dá a você o desejo de fazer algo, que não tenha a capacidade para fazer.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, amor, proteção e cuidado que é dado a cada nascer do sol.

Ao Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado em agroquímica.

A CAPES, pela bolsa concedida.

A minha família, minha mãe Maureni Siqueira Cabral e vó Renilda Siqueira Cabral, pela paciência, colaboração, motivação e cumplicidade nesses anos de estudo. E meu irmão Hugor Alex Siqueira de Moraes, pela amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira, pelo estímulo constante, orientação, confiança e oportunidade.

A Prof^ª. Dr^ª. Agna Rita dos Santos Rodrigues, pela intensa colaboração no projeto, paciência e amizade. Pelo auxílio e ajuda com os materiais para realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Fábio Henrique Dyzy, pelo esclarecimento de dúvidas e ser sempre muito prestativo.

A Dr^ª. Kellen Juliane Telles Nascimento, pela compreensão, apoio e atenção.

Ao Prof. Dr. Alan Carlos da Costa e Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva, por disponibilizarem o uso dos equipamentos dos Laboratórios de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos Vegetais, respectivamente.

Aos colegas de trabalho, Cinthia Alves Porfiro, pela amizade, companheirismo e por não poupar esforços para tornar mais fácil o meu trabalho. E a Ana Cláudia Cardoso Ataiades, por ser sempre tão prestativa, e a Sara Marques Araújo, por sua colaboração.

A todos os servidores, graduandos e pós-graduandos do Instituto Federal Goiano que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

A todos do programa de pós-graduação em Agroquímica.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Leticia Siqueira da Silva, filha de Maureni Siqueira Cabral e Josciney Florêncio da Silva, nasceu na cidade de Cuiabá-MT, no dia 25 de agosto de 1991. Formou-se no colégio Martins Borges no ano de 2008, e no ano seguinte ingressou no curso de graduação em Farmácia pela UniRV. Teve seu primeiro contato com a pesquisa, através do Prof. Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho, com o trabalho de estudos Anatômicos e Histoquímicos de plantas medicinais no ano de 2010 a 2011. No ano de 2010 a 2012, ingressou em um estágio na Farmácia Pague Menos. Formou-se em dezembro de 2012. Trabalhou como farmacêutica na Farmácia Pague Menos de Cuiabá-MT de fevereiro de 2013 a dezembro de 2013. Entrou para o grupo de pesquisa de produtos naturais na UFMT, no Departamento de Ciências Básicas da Saúde no ano de 2013, no ano de 2014 se tornou bolsista EXP-C, vinculada ao projeto Núcleo de sistemas agroecologia orgânicos de produção de plantas medicinais, condimentares e alimentícias não convencionais, para subsidiar a implantação da farmácia viva em Mato Grosso - NAGEPLAM. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Agroquímica em setembro de 2014, sobre a orientação do Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira.

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE DE TABELAS..... | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | x |
| ÍNDICE DE SIMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES..... | xii |
| RESUMO..... | ii |
| ABSTRACT..... | xii |
| 1.INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 1.1 Carbamatos e organofosforados..... | 17 |
| 1.2 Plantas com potencial inseticida..... | 19 |
| 1.3 <i>Mouriri elliptica</i> Martius (Melastomataceae)..... | 22 |
| 1.3.1 Composição química..... | 24 |
| 1.4 Sistema Nervoso Central..... | 25 |
| 1.4.1 Acetilcolinesterase..... | 25 |
| 1.5 Sistema Digestório..... | 27 |
| 1.5.1 α -amilase..... | 27 |
| 1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 29 |
| 2.OBJETIVOS..... | 37 |
| CAPITULO I..... | 38 |
| 3.1 INTRODUÇÃO..... | 39 |
| 3.2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 40 |
| 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 50 |
| 3.4 CONCLUSÃO..... | 61 |
| 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 62 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | | Páginas |
|----------|--|----------------|
| TABELA 1 | Classe dos inseticidas | 16 |
| TABELA 2 | Constante de dissociação (K_i) da acetilcolinesterase por diferentes extratos..... | 58 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | Páginas |
|-----------|--|----------------|
| FIGURA 1 | Estrutura geral dos carbamatos (X= O ou S; R= CH ₃ ou CH ₂ CH ₃)..... | 17 |
| FIGURA 2 | Estrutura geral dos organofosforados (X= O ou S; R= CH ₃ ou CH ₂ CH ₃).. | 18 |
| FIGURA 3 | Estrutura química da Nicotina..... | 19 |
| FIGURA 4 | Estrutura química da Estricnina..... | 20 |
| FIGURA 5 | Estrutura química da Metil-eugenol..... | 21 |
| FIGURA 6 | Estrutura química da Azadiractina..... | 21 |
| FIGURA 7 | <i>Mouriri elliptica</i> Martius..... | 23 |
| FIGURA 8 | Naringenina..... | 24 |
| FIGURA 9 | Kaempferol..... | 24 |
| FIGURA 10 | Quercetina..... | 24 |
| FIGURA 11 | Mircetina..... | 24 |
| FIGURA 12 | Hidrolise da acetilcolinesterase..... | 26 |
| FIGURA 13 | Mecanismo de ação da acetilcolinesterase..... | 27 |
| FIGURA 14 | Caracterização do perfil químico..... | 42 |
| FIGURA 15 | CCDC do extrato metanólico e acetato de etila das folhas de <i>Mouriri elliptica</i> Martius respectivamente. Fase Móvel: BAW..... | 51 |
| FIGURA 16 | CCDC do extrato metanólico da espécie <i>Mouriri elliptica</i> Martius. Fase Móvel: BAW; Revelador A – UV 254nm; B – U 365nm..... | 51 |
| FIGURA 17 | CCDC do extrato acetato de etila da espécie <i>Mouriri elliptica</i> Martius. Fase Móvel: BAW; Revelador: A – UV 254nm; B – UV 365nm..... | 52 |
| FIGURA 18 | CCDC do extrato acetato de etila da espécie <i>Mouriri elliptica</i> Martius. Fases Móveis: A– Hexano:AcOEt (7:3), B – CHCl ₃ :MeOH (9:1) e C – BAW; Revelador: AchE/Naftila/Sal Fast Blue B..... | 52 |
| FIGURA 19 | CCDC do extrato metanólico da espécie <i>Mouriri elliptica</i> Marius. Fases Móveis: A– Hexano:AcOEt (7:3), B – CHCl ₃ :MeOH (9:1) e C – BAW; Revelador: AchE/Naftila/Sal Fast Blue B..... | 53 |
| FIGURA 20 | Porcentagem de inibição do extrato bruto acetato de etila e metanólico sobre a enzima acetilcolinesterase.Os valores foram expressos em média de triplicata. a e b : diferença significativa entre os extratos. A,B,C,D: diferença significativa entre as concentrações de cada extrato..... | 54 |
| FIGURA 21 | IC ₅₀ do extrato bruto e frações do metanol. Doses: E.B - 12,43µg/mL, MF1 – 4,68µg/mL, MF4 – 4,18µg/mL. Cada ponto apresenta a média em triplicata..... | 54 |
| FIGURA 22 | Porcentagem de inibição das frações do extrato metanólico sobre a enzima acetilcolinesterase. Os valores foram expressos em média de todas as doses em triplicata. a e b : diferença significativa entre os extratos..... | 55 |
| FIGURA 23 | Porcentagem de inibição das frações do extrato acetato de etila sobre a enzima acetilcolinesterase. Os valores foram expressos em média de todas as doses em triplicata. a e b : diferença significativa entre os extratos..... | 56 |
| FIGURA 24 | IC ₅₀ do extrato bruto e frações do metanol. Doses: E.B 12,43µg/mL, MF1– 4,68µg/mL, MF4 – 4,18µg/mL. Cada ponto apresenta a média em | |

| | | |
|-----------|---|----|
| FIGURA 25 | triplicata..... | 60 |
| | Porcentagem de inibição do extrato bruto acetato de etila e metanólico sobre a enzima α -amilase. Os valores foram expressos em média de triplicata. a e b : diferença significativa entre os extratos. A,B,C: diferença significativa entre as concentrações de cada extrato..... | 60 |

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

| | |
|---------------------------------|---|
| OP | Organofosforados |
| ACh | Acetilcolina |
| CCDC | Camada delgada |
| α | Alfa |
| % | Por cento |
| IRAC | Comitê de Ação de Resistência a Inseticidas |
| CH ₃ | Metila |
| CH ₂ CH ₃ | Etila |
| spp | Espécies |
| RMN | Espectroscopia por ressonância magnética |
| ¹ H | Hidrogênio |
| COSY | Correlação de espectros |
| gHMQC | Heteronuclear Single Quantum Coherence |
| gHMBC | Heteronuclear MultipleBond Coherence |
| AChE | Acetilcolinesterase |
| Na ⁺ | Sódio |
| mV | Milivolt |
| S | Sul |
| W | Oeste |
| AcOET | Acetato de etila |
| g | Grama |
| rpm | Rotação por minuto |
| cm | Centímetros |
| mL | Mililitro |
| BAW | n-butanol:ácido acético:água |
| Hex | Hexano |
| MeOH | Metanol |
| FM | Fase móvel |
| UV | Ultravioleta |
| HCL | Ácido cloreto |
| pH | Potencial de hidrogênio |
| mg | Miligrama |
| μ g | Micrograma |
| DTNB | 5,5-Dithiobis-(Ácido 2-Nitronbenzóico |
| nm | Nanômetro |
| μ L | Microlitro |
| M | Molar |
| B.O.D | Demanda bioquímica de oxigênio |
| ACTI | Acetiltiocolina |
| IC ₅₀ | Metade da concentração inibitória máxima |
| DNS | Ácido 3,5-dinitrosalicílico |
| K _i | Constante de dissociação |
| \pm | Desvio padrão |
| μ M | Micrômetro |

RESUMO

SILVA, LETICIA SIQUEIRA. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, setembro de 2016.
Inibição de acetilcolinesterase e α -amilase por extrato das folhas de *Mouriri elliptica* Martius.
Orientador: Paulo Sérgio Pereira.

A produção alimentícia tem aumentado devido ao crescimento populacional, sendo necessárias novas fontes para o aumento da quantidade e qualidade dos produtos agrícolas. Neste cenário os vegetais têm desempenhado importante papel no controle de pragas, são fontes de moléculas com propriedades inseticidas. A *Mouriri elliptica* Martius (Myrtales: Melastomataceae) é um arbusto usado na medicina tradicional e seus frutos bem apreciados pela população local. Compostos secundários como taninos, flavonoides e triterpenos são encontrados em sua porção aérea. Com isso, objetivou-se avaliar a inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase e α -amilase por extrato bruto metanólico e acetato de etila das folhas de *M. elliptica*, bem como determinar e quantificar as frações dos diferentes extratos com ação inibitória dessas enzimas. Foram preparados extrato metanólico e acetato de etila da espécie *M. elliptica*, para a realização da caracterização do perfil químico por análises por cromatografia em coluna e em camada delgada CCDC, e para a realização de ensaios *in vitro* de inibidores de acetilcolinesterase e α -amilase. Os resultados obtidos indicam que as folhas dessa espécie vegetal são potencialmente úteis para a agricultura, sendo o extrato metanólico um potente inibidor da acetilcolinesterase, e o acetato de etila um inibidor moderado da α -amilase. As frações MF1 e MF4 do extrato metanólico demonstraram percentual de inibição de 73 e 79% respectivamente sobre a enzima acetilcolinesterase, bem como o extrato acetato de etila uma inibição de 40% da α -amilase. Os estudos realizados contribuíram para o conhecimento da presente espécie que apresenta poucos relatos científicos, a que se pode considerar como fonte promissora de compostos bioativos.

PALAVRAS CHAVES: Inibição, Produtos agrícolas, Controle de pragas.

ABSTRACT

The food production has increased due to population growth, requiring new sources to increase the quantity and quality of agricultural products. In this scenario vegetables have played an important role in pest control, because they are sources of molecules with insecticidal properties. The *Mouriri elliptica* Martius (Myrtales: Melastomataceae) is a shrub used in traditional medicine and its fruits well appreciated by the local population. Secondary compounds such as tannins, flavonoids and triterpenoids are found in its air portion. It aimed to evaluate the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase activity and α -amylase for crude extract methanol and ethyl acetate of *M. elliptica* leaves, and to determine and quantify the fractions of different extracts with inhibitory action of these enzymes. Methanol extract and ethyl acetate were prepared from species *M. elliptica*, for conducting the characterization of the chemical profile for analysis by column chromatography and thin layer CCDC and for conducting tests in vitro of acetylcholinesterase and α -amylase inhibitor. The results indicate that the leaves of this plant species are potentially useful for agriculture, and the methanolic extract a potent acetylcholinesterase inhibitor, and the ethyl acetate moderate inhibitor of α -amylase. The MF1 and MF4 fractions of the methanol extract showed inhibition percentage of 73 and 79% respectively of the enzyme acetylcholinesterase and the ethyl acetate extract an inhibition of 40% of α -amylase. Studies contributed to the knowledge of this species that has few scientific reports, which can be considered as a promising source of bioactive compounds.

KEY WORDS: Inhibition, Agricultural, Pest Control.

1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos, agricultores, organização de saúde pública e meio ambiente têm grandes preocupações com a proteção das culturas alimentares tendo em vista os danos que as pragas podem causar. Existem mais de 1025 variedades de pragas, e dentre estas se destacamos besouros, traças e ácaros (SALLAM, 2014). O custo desse tipo de impacto pode atingir 17,7 bilhões de dólares por ano, afetando a economia mundial (OLIVEIRA et al., 2014).²

O Brasil é o segundo maior produtor de soja (USDA, 2010), e a sua produção poderia ser aumentada caso houvesse melhor controle das pragas (OERKE, 2006). A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga que ataca as plantações de soja e milho. (OLIVEIRA et al., 2007), e a cultura de milho (*Zea mays* L.) faz parte da grande distribuição geográfica do território brasileiro (AGRIANUAL, 2011).

No Cerrado brasileiro é encontrado uma riquíssima diversidade de recursos naturais. Seus frutos são importantes alternativas para a alimentação, renda e emprego para populações locais. O pequizeiro é uma espécie predominante no Cerrado do Estado de Goiás, sendo elementar ao setor econômico goiano. Insetos atacam suas folhas, flores e frutos prejudicando a sua produção (FERREIRA et al., 2009).

Hoje, um dos maiores desafios que o setor agrícola enfrenta é a produção sustentável de alimentos para a população que cresce diariamente (GODFRAY; GARNETT, 2014). Desta forma, torna-se necessário o aumento do uso de agrotóxicos e fertilizantes, de maneira que possa haver a maximização da produtividade evitando as pragas invasoras (KOHLENER; TRIEBSKORN, 2013).

Os agrotóxicos são classificados como compostos que possuem em suas misturas substâncias com capacidade de prevenção, destruição ou controle de qualquer praga, incluindo vetores de doenças humanas e animais, além de espécies indesejadas de plantas (FAO, 2003).

Os agrotóxicos (Tab.1) têm causado danos toxicológicos e ambientais, como por exemplo, a contaminação de produtos agrícolas, problemas de saúde, e há crescente preocupação pública com a contaminação dos alimentos (BEMPAH et al, 2011; FEOLA et al, 2011; PANUWET et al, 2012).

Durante longo tempo, os chineses têm dado preferência aos agrotóxicos no combate de praga de arroz (CHENG, 2009), através do uso irracional, resíduos começaram a aparecer nos alimentos e solos, provocando resistência dos insetos aos agrotóxicos (HEONG, 2009).

Tabela 1. Classe de inseticidas. Fonte: OMOTO e GUEDES, 2015 (Adaptado).

| Algumas classes de inseticidas | |
|---|--|
| Grupo químico ou sítio de ação primário | Integrante ativo |
| 1. Inibidores de acetilcolinesterase | Carbamatos Organofosforados |
| 2. Antagonistas de canais de cloro mediados pelo GABA | Ciclodienos |
| 3. Moduladores de canais de sódio | Piretroides e Piretrinas |
| 4. Agonistas de receptores nicotínicos da acetilcolina | Neonicotinoides Nicotina Sulfoxaflor |
| 5. Ativadores alostéricos de receptores nicotínicos da acetilcolina | Spinosinas |
| 6. Ativadores de canais de cloro | Avermectinas, Milbemicinas |

Por quase meio século, a resistência a inseticidas tem interferido no controle de insetos e manejo de pragas. Devido à necessidade de uma gestão dessas resistências pela indústria, foi formado um Comitê de Ação de Resistência a Inseticidas (IRAC), esse grupo realiza trabalho técnico, fornecem esquema de classificação do modo de ação e diretrizes para a seleção de inseticidas, que está disponível em diferentes formatos, como cartazes, mini livreto e smartphone (SPARK; NAUEN, 2015).

1.1 Carbamatos e Organosforados

Os carbamatos e organofosforados (OP) são aplicados tanto na agricultura, quanto em jardins ao redor das casas. São extremamente tóxicos e pouco seletivos, ameaçam a saúde humana, animais selvagens e aquáticos e ao meio ambiente (GUPTA, 2007). Sua toxicidade pode manifestar de forma nicotínica (hipertensão, taquicardia, fraqueza e midríase); muscarínico (miose e bradicardia) (KING; AARON, 2015) e central (inquietação, coma e morte). A ocorrência da morte pelo uso destes agrotóxicos se deve a paralisia respiratória. (GUPTA, 2007). Esses produtos químicos possuem alta eficácia em grande quantidade de pragas, por isso são bastante utilizados (WANG et al, 2012).

Os carbamatos (Fig.1) são utilizados em quantidades maiores do que os organofosforados. A taxa anual de intoxicação determinada pela Organização Mundial de Saúde chega a 2,9 milhões no mundo todo (BLEECKER, 2008). Seu mecanismo de ação acontece a partir da inibição da acetilcolinesterase presente em sinapses colinérgicas (FRAGA, 2010), e são considerados inibidores reversíveis, regenerando a enzima (ASSIS, 2011). Apresenta ainda, baixa ação residual pela instabilidade química das moléculas. Quando absorvido, são rapidamente distribuídos por todos os tecidos, e em maior proporção em tecidos e órgãos envolvidos no metabolismo xenobiótico (SANTOS, 2009). Seus efeitos de intoxicação são menores quando comparados aos compostos de organofosforados (FRAGA, 2010).

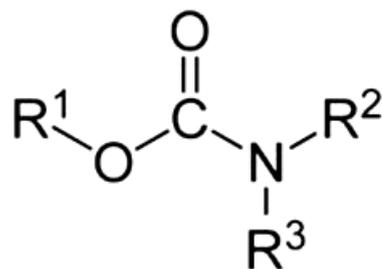


Figura 1. Estrutura geral dos carbamatos (R= CH₃ ou CH₂CH₃).

Em 1932, o primeiro organofosforado, pirofosfato de tetraetila foi sintetizado por Philipe de Clermont. O Ministério da Defesa da Alemanha criou um OP extremamente tóxico, contendo em sua composição tabun, sarin e soman, da série G, antes da Segunda Guerra Mundial. Depois, buscou aprimorar os OPs, tornando os mais seletivos a insetos e menos tóxico para os mamíferos. Mais de 100 variedades estão em uso para proteger as culturas de grãos, jardins e casas (GUPTA, 2007).

Organofosforados (Fig.2) são bastante utilizados desde a proibição dos organoclorados (CUI et al., 2015) e tem alta atividade neurotóxica. A intoxicação por este produto leva várias pessoas à morte anualmente em todo o mundo (GOEL; AGGARWAL, 2007). São ésteres, amidas e derivados de ácidos fosfórico, tióis, fosfônico, fosforotióico, possuem pequena solubilidade em água, sendo hidrolisáveis em ambiente alcalino (ASSIS, 2011). São inibidores da acetilcolina esterase, altera as funções normais do Sistema Nervoso Central, e causa severa paralisia muscular e morte. Na Índia, os OPs são aplicados em insetos, pragas de algodão, vegetais e insetos vetores (BHAGOBATY; MALIK, 2008).

O mecanismo de ação dos OPs causa inativação da enzima acetilcolinesterase, que é responsável pela destruição da atividade biológica do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Quando acumulado em terminações nervosas, a acetilcolina causa estimulação elétrica no nervo, e essa estimulação não para, provocando danos no Sistema Nervoso Periférico e Sistema Nervoso Central. Esta ação leva a distúrbios cognitivos e afetivos, dentre eles estão a diminuição da concentração, memória e processamento de informações (SILVA, 2010). A inibição acontece de forma irreversível, causa acúmulo da acetilcolina nas sinapses do Sistema Nervoso Central e Periférico, provocando alta estimulação de receptores nicotínicos e muscarínicos (CHANGWOO, 2014).

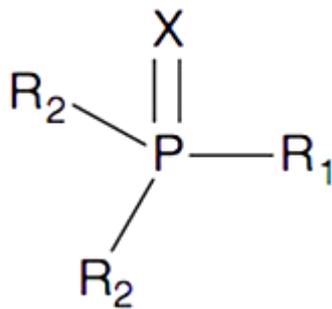


Figura 2. Estrutura geral dos Organofosforados (R= CH₃ ou CH₂CH₃).

1.2 Plantas com potencial inseticida

Métodos mais seguros para a aplicação e utilização dos agrotóxicos são essenciais, para que os efeitos negativos tanto ao meio ambiente, quanto na produção possam ser prevenidos (OLIVEIRA et al., 2014). Para o uso de agrotóxico, é necessária uma regulamentação ambiental que tem se tornado cada vez mais rigorosa por conta dos riscos e problemas associados a sua utilização e pela necessidade de substituição dos agrotóxicos sintéticos (ZOUBIRI; BAALIOUAMER, 2014). Apesar de inseticidas químicos serem a principal alternativa para o controle de pragas, tem-se buscado introduzir medidas sustentáveis, como por exemplo, os inseticidas à base de plantas, que têm provado ser eficaz e seguro para o ecossistema (KHALIQ et al., 2014).

As propriedades ecotoxicológicas dos vegetais têm sido vista como alternativa para o controle de insetos, podendo causar danos em seus parâmetros biológicos, tempo de vida e reprodução (ZOUBIRI; BAALIOUAMER, 2014).

Embora as plantas sejam organismos sésseis, não são indefesos, pelos seus traços estruturais, barreiras e mecanismos químicos de defesa. Os tricomas glandulares presentes em algumas espécies vegetais liberam compostos químicos, que sintetizam e acumulam os metabólitos secundários (MIRESMAILLI; ISMAN, 2014).

No tomateiro, é encontrado terpenos em seus tricomas glandulares (KORTBEEK et al., 2016), essa substância presente no metabolismo das plantas é responsável por combater pragas, proporcionando proteção às plantas contra patógenos e herbívoros. Algumas classes de metabólitos têm sido usadas no combate às pragas, como, por exemplo, o alcaloide nicotina (Fig.3) presente na família Solanaceae e estricnina de *Strychnos* spp. (Fig.4) (MIRESMAILLI; ISMAN, 2014).

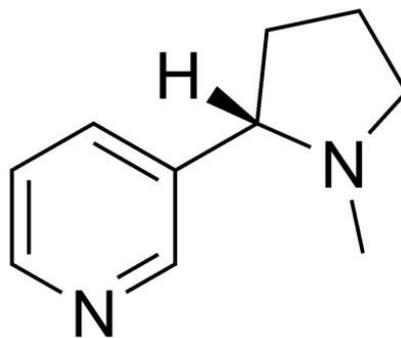


Figura 3. Estrutura química da Nicotina.

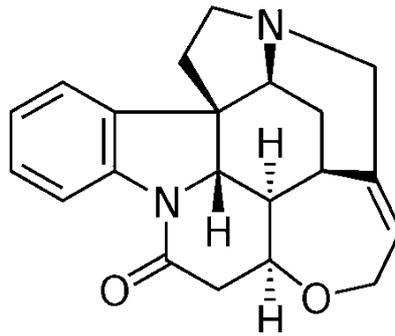
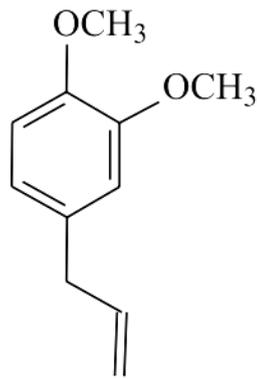


Figura 4. Estrutura química da Estrictina.

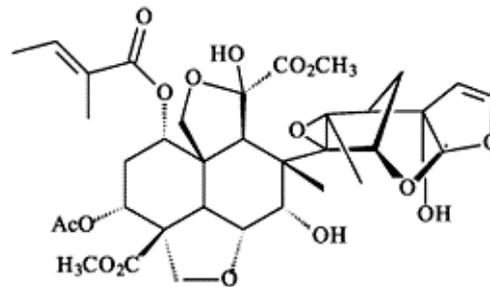
O potencial bioativo dos óleos essenciais, também é bastante explorado no combate a diversas pragas, dentre elas bactérias, protozoários, fungos, vírus (MANSOUR et al., 2015) e insetos, incluindo mosca doméstica, percevejos, baratas e pragas veterinárias (pulgas e moscardos). Atuam ainda, como agentes tóxicos de contato e repelentes (MIRESMAILLI; ISMAN, 2014). Os óleos essenciais são adquiridos a partir de plantas, durante o processo de destilação por arraste por vapor d'água, são líquidos voláteis e lipossolúveis com intenso odor (ROCHA, 2013) e contêm misturas complexas como, por exemplo, os monoterpenos e sesquiterpenos (MANSOUR et al., 2015). Estão presentes em plantas aromáticas, podendo ser sintetizada tanto em brotos, flores, folhas, frutos, sementes, galhos, raízes e cascas (ROCHA, 2013).

O composto metil-eugenol (Fig.5) é um fenilpropeno encontrado em algumas espécies de vegetais, favorável ao meio ambiente que é capaz de reduzir os danos provocados pelas pragas, aumentando os rendimentos das culturas agrícolas (TAN; NISHIDA, 2012). Sua ação inseticida apresenta efeito lento em sua liberação contra *Aedes aegypti* L. (Haemosporida: Plasmodiidae) e *Tribolium castaneum* Herbs (Coleoptera: Tenebrionidae), e alta eficiência contra insetos de pragas de arroz, como o gafanhoto castanho (BPH) e inibição do parasita *Plasmodium falciparum* Welch (Haemosporida: Plasmodiidae) (XU et al., 2015).

Na árvore *Azadirachta indica* A. Juss (Sapindales – Meliaceae) (Fig.6) é encontrada o produto químico azadiractina, extraído a partir de sementes, com ação inseticida, que interrompe o crescimento do inseto, e tem propriedades larvicida em pragas agrícolas (JADEJA;MAHESHWARI;NAIK, 2011). Além de reduzir a produção de ninfas de *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) em plantação de algodão (ANDRADE et al., 2013).



Metil-eugenol

Figura 5. Estrutura química da Metil-eugenol.**Figura 6.** Estrutura química da Azadiractina.

Alguns inseticidas botânicos como, maçã amargo *Citrullus colocynthis* (Cucurbitales – Cucurbitaceae), neem *Azadirachta indica* A. Juss (Sapindales – Meliaceae), datura *Datura alba* Nees (Solanales – Solanaceae) foram testados no Paquistão contra a *Thrips tabaci* (Thysanoptera – Thripidae), praga que se alimenta de folhagem da cebola em várias partes do mundo, e mostraram ser eficientes na redução da população desse inseto (KHALIQ et al., 2014).

Artemisia vestita Wall (Asteraceae) é encontrada em terrenos baldios da China, em sua fitoquímica encontram compostos como flavonoides, monoterpênicos e sesquiterpenoides. Após estudos de suas partes aéreas através da obtenção do óleo essencial, observou-se que essa espécie possui potente atividade inseticida contra o gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Coleoptera –

Curculionidae) (CHU; LIU; LIU, 2010). Através das análises da composição química de extrato das folhas da *Mouriri elliptica*, verificou a presença de compostos secundários como flavonoides e terpenos (ANDREO, 2008), os mesmo compostos encontrados em outras espécies com atividade inseticida comprovada. As famílias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Labiateae e Piperaceae, são bastante estudadas no contexto inseticidas botânicos (MANSOUR et al., 2015).

1.3 *Mouriri elliptica* Martius (Melastomataceae)

Em algumas das regiões brasileiras ocorre abrangência do Cerrado, embora seja um bioma típico de regiões do Centro Oeste. Esse bioma é predominante no estado de Goiás e Tocantins, e está presente em 80% de seu território. Têm solos poucos férteis, e altamente tóxicos, pela grande quantidade de óxidos de alumínio e ferro que são acumulados. E pequenas taxas de nutrientes e água (SOUZA, 2012). Possui potencial econômico por causa de suas diversidades de espécies frutíferas, ornamentais e medicinais, e suas variações climáticas, como a estação chuvosa (outubro a março) e seca (abril a setembro) interfere nas estruturas dos vegetais (CARDOSO, et al 2010). As espécies que sobrevivem nesse ambiente têm particularidades em suas morfologias e fisiologias (SOUZA, 2012).

No Brasil a área do Cerrado é muito rica em espécies de plantas medicinais (MOLEIRO, et al, 2009). Pesquisadores têm mostrado interesse em estudos com plantas, pela comprovação científica que tem se obtido, após a observação da exploração do ambiente por povos tradicionais (MOITA NETO et al., 2010).

No Cerrado brasileiro é encontrado a *Piper aduncum* (Piperales – Piperaceae), óleo essencial das folhas foi analisado sobre a *Aedes aegypti* (Diptera – Culicidae) e após 24 horas pode se observar a atividade larvicida em 100% das larvas (OLIVEIRA et al, 2013). E outras espécies, como *Psychotria prunifolia* (Rosales – Rosaceae) e *Senna obtusifolia* (Fabales – Caesalpinioideae) através de suas folhas mostraram ter ação tóxica sobre ovos, larvas e na fase adulta do inseto *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera – Gelechiidae) (FOUAD el al, 2014). Comunidades dessas áreas do Cerrado possuem uma grande diversidade de vegetais, sendo a *M. elliptica* espécie comumente utilizada (MOLEIRO et al., 2009).

A espécie *M. elliptica* pertence à família Melastomataceae, que possui 150 gêneros, e 4500 espécies. Plantas do gênero *Mouriri* são utilizadas popularmente no combate a distúrbios gastrointestinais, como úlceras e gastrites, na forma de chás de sua porção aérea. Existem poucos relatos científicos sobre esse gênero (ANDRÉO, 2008), mas, no entanto, importantes estudos têm

sido publicados. A casca do caule de *M. myrtilloides* foi testada contra lesões induzidas por DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno) em cultura de órgãos mamários, o que ocasionou uma atividade moderada com inibição de 42,8% das lesões. Podendo ser considerada como quimiopreventivo, pela relação entre a inibição das lesões, com a atividade antimutagênica e indução da atividade da redutase quinona (CALDERON, 2000).

A *M. pusa* possui atividade gastroprotetora, o extrato metanólico de suas folhas foram aplicados em estômago de ratos, causando aumento do número de neutrófilos nessa região da mucosa. Esse fator provoca proteção contra agentes infecciosos locais (VASCONCELOS, 2008). Em ensaios *in vitro* mostrou ação mutagênica, já a *Mouriri elliptica* não induziu a ação mutagênica (MOLEIRO, et al, 2009). A ação mutagênica é a modificação na estrutura e posição de um determinado gene no cromossomo (ASLAM et al., 2016).

M. elliptica (Fig.7) é um arbusto que chega a ter 2 a 7 m de comprimento, sendo distribuídas em zonas tropicais e subtropicais (ANDREO, 2008). Encontra-se em todo o domínio fitogeográfico, exceto na Caatinga (GOLDENBERG et al., 2012). Possui frutos comestíveis que são muito apreciados por habitantes locais, da savana brasileira (SANTOS et al., 2008). É conhecida popularmente como coroa de frade e pusa coroa. Na medicina tradicional, as casca do caule e folhas são usadas no tratamento de úlceras gástricas e gastrites. Estudos mostram que extratos metanólicos de *M. elliptica* têm efeitos gastroprotetores e ação imunológica, possuindo eficácia na cura e combate de úlceras gástricas, pois elimina a *Helicobacter pylori*, bactéria responsável por essa enfermidade (MOLEIRO et al., 2009).



Figura 7. *Mouriri elliptica* Martius.

1.3.1 Composição química

Os flavonoides são numerosa classe de polifenóis encontrados em plantas, com propriedades antioxidantes. A ação antioxidante está relacionada com a eliminação de radicais (KLEIN et al., 2016). Nos estudos realizados por Andreo (2008) no espectro de HMN de ^1H da amostra das folhas de *M. elliptica* observou a presença de um flavonoide, na região de absorção de hidrogênios aromáticos. Indicando a estrutura da Naringenina (Fig.8), para definição das estruturas utilizou os sinais de espectro de RMN ^{13}C e COSY, gHMQC e gHMBC e informações contidas na literatura. Através do processo de purificação e cromatografia realizada na coluna de Sephadex LH-20, tendo como fase móvel o metanol, as frações apresentaram três substâncias, que foram identificadas e isoladas, Kaemferol (Fig. 9), Quercetina (Fig. 10) e Miricetina (Fig.11).

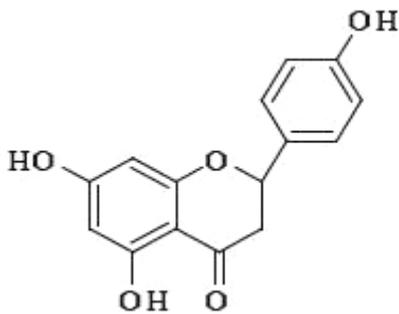


Figura 8. Naringenina.

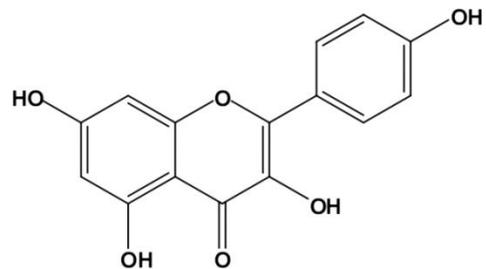


Figura 9. Kaempferol.

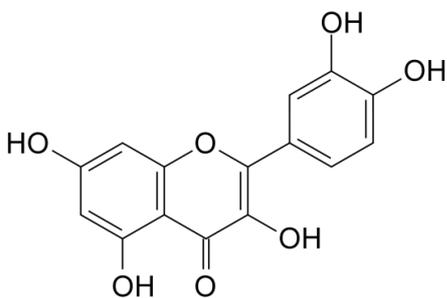


Figura 10. Quercetina.

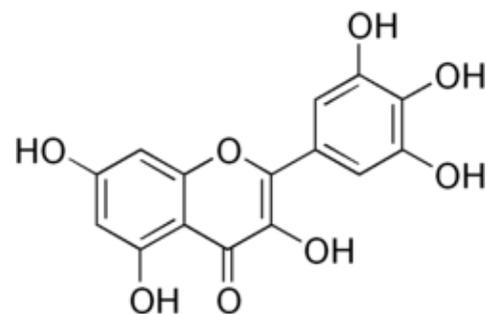


Figura 11. Miricetina.

Essa espécie também mostrou uma fração rica em terpenos, após a purificação das frações foram analisadas por RMC¹³ 30, e as substâncias identificadas foram comparadas com dados presentes na literatura, indicando a presença de triterpenos com esqueletos ursano (majoritário) e oleanano (minoritário). As análises feitas gHMQC e gHMBC foi possível observar o posicionamento das metilas, hidroxilas e do grupo ácido carboxílico. No fracionamento do extrato metanólico das folhas de *M. elliptica*, foi observado a presença de saponinas e taninos em pequenas quantidades, devido a isso não foram estudadas (ANDREO, 2008).

1.3 Sistema Nervoso Central

O Sistema Nervoso é responsável por determinar as atividades do corpo, utilizando o impulso nervoso como resposta, como por exemplo, a transmissão de sinais para a movimentação do corpo, e regulação do funcionamento dos órgãos internos. Sendo dividido em três funções básicas: sensorial, integrativa e motora. As informações sensoriais apresentam receptores sensoriais que identificam estímulos internos e externos. Já a função integrativa executa, analisa e armazena as informações sensoriais transformando em respostas, e as funções motoras realizam respostas motoras apropriadas às informações integrativas (TORTORA; DERRICKSON, 2010).

Dentro do Sistema Nervoso Central são encontrados os neurônios que exercem funções de sensibilidade, atividade muscular e regulação de secreções de glândulas. Tem a capacidade de responder a estímulos e transformá-lo em uma ação. O potencial de ação (impulso nervoso) é um sinal elétrico que se propaga pela membrana de um neurônio (TORTORA; DERRICKSON, 2010).

1.4.1 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima, que quebra ésteres de colina, (especialmente a acetilcolina) responsável pela transmissão de impulsos nervosos em invertebrados e vertebrados. Tem propriedades catalíticas, contém dois sub-sítios, um esterásico e um sítio aniônico (Fig.12). Sua função principal de modulação dos impulsos nervosos responsáveis por comunicação neuronal, pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Quando exposta aos agrotóxicos, carbamatos e organofosforados a sua ação normal é interrompida (ASSIS, 2011).

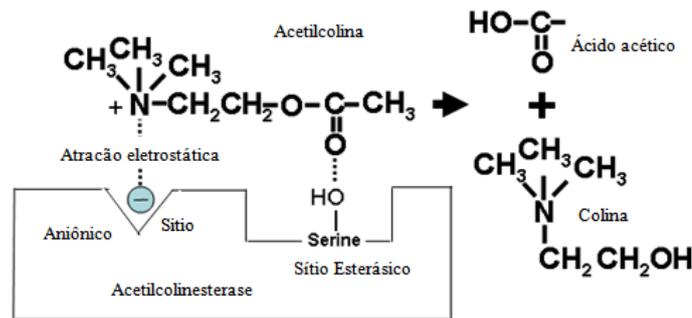


Figura 12. Hidrólise da acetilcolinesterase. Fonte: WIENER et al, 2004.

A acetilcolina é um neurotransmissor colinérgico (FRAGA, 2010). Em algumas sinapses, age como neurotransmissor excitatório ao se ligar aos receptores ionotrópicos, canais de cátion se abrem. E atua também como neurotransmissor inibitório ao se ligar em receptores metabotrópicos acoplados à proteínas G, canais de K^+ se abrem (TORTORA; DERRICKSON, 2010). Sua degradação, armazenamento e produção acontecem em diferentes seres vivos, como bactérias, protozoários, fungos e plantas (FRAGA, 2010).

No Sistema Nervoso, a AChE se comporta como mediador nas sinapses colinérgicas, quebrando o neurotransmissor acetilcolina (Fig.13). A degradação imediata da acetilcolina é essencial para que as transmissões sinápticas colinérgicas ocorram antes da chegada de um novo impulso elétrico (SANTOS, 2009). A retirada da acetilcolina da fenda sináptica é fundamental para o funcionamento normal das sinapses. Caso um neurotransmissor permaneça por um período prolongado na fenda sináptica, o neurônio pós-ganglionar, fibra muscular e célula glandular seriam influenciados (TORTORA; DERRICKSON, 2010).

A hidrólise da ACh ocorre por meio da catálise da AChE, que então é transformada em colina e acetato, com a liberação de um próton. Na membrana pós-sináptica, acontece a ligação ao receptor nicotínico, que permite a abertura de canais de íons Na^+ , e a membrana despolariza, propagando o impulso (SANTOS, 2009). Quando algum estímulo despolariza a membrana, canais de íons de Na^+ abrem-se e ocorre influxo de Na^+ para o interior da célula, o influxo modifica o potencial da membrana de -55 mV para $+30 \text{ mV}$. O interior da célula se torna mais positivo que o exterior (TORTORA; DERRICKSON, 2010).

Se houver inibição da ação AChE, não acontece a hidrólise da ACh nas sinapses, provocando grande acúmulo anormal de ACh, conduzindo a grande estimulação que leva a alterações comportamentais, asfixia, hiperatividade e finalmente a morte. Durante o

envenenamento agudo, o Sistema Nervoso Parassimpático, junções musculares e o Sistema Nervoso Central são afetados (SANTOS, 2009).

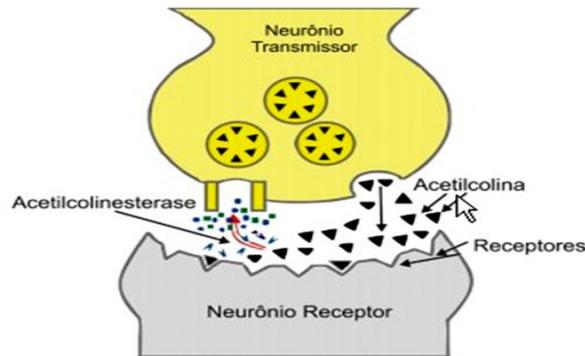


Figura 13. Mecanismo de ação da acetilcolinesterase. Fonte: PETRONILHO et al., 2011.

1.5 Sistema digestório

No Sistema digestório é realizada a digestão dos alimentos que são introduzidos no organismo. Através de processos químicos e mecânicos alimentos são digeridos em partículas menores. Na digestão mecânica, os dentes cortam e trituram os alimentos e após a deglutição são misturadas no estômago com as enzimas digestivas. Enquanto na digestão química, as moléculas presentes nos alimentos são hidrolisadas em moléculas menores. Enzimas digestivas produzidas pelas glândulas salivares e pâncreas catalisam as reações catabólicas que ocorre nesse processo de digestão (TORTORA; DERRICKSON, 2010).

1.5.1 α -Amilase

A α -amilase (α -1-4-glicano-hidrolase) é um importante produto na secreção das glândulas salivares e do pâncreas (ZORZIN, 2014). É uma enzima usada nas indústrias de alimentos, têxtil, fermentação, papel, detergentes e na medicina. São classificados em glicosídeos hidrolases família 13, tem características termoestáveis e acidófilas. Um dos principais meios para obtenção da amilase são os micróbios, pois consegue adquirir grande quantidade da enzima, e microrganismos marinhos tem sido estudado para encontrar novas amilases (SONG; WANG; ZHANG, 2016).

A função da amilase é catalisar a partir da clivagem de ligações α -D-(1-4) glicosídicas á hidrolise inicial do amido em oligossacarídeos mais curtos. Os produtos finais encontrados a partir

da ação da α -amilase são oligossacarídeos de vários tamanhos, é considerada uma enzima chave no sistema digestivo (ZORZIN, 2014). A inibição dessa enzima causa retardo na digestão de hidratos de carbono, reduzindo a concentração da absorção de glicose e, conseqüentemente, uma supressão da hiperglicemia pós-prandial (KUMAR et al, 2011).

Os inibidores da α -amilase têm ganhado destaque pela sua ação sobre o sistema digestivo das pragas, afetando seu crescimento e o desenvolvimento (MEHRABADI et al, 2010). Estudos anteriores aplicados a insetos relataram a importância que os inibidores da α -amilase exercem sobre o sistema biológico no controle de insetos (DIAS et al, 2010). Os inibidores da α -amilase presente no pâncreas dificultam a digestão de carboidratos, causando a redução na taxa da glicose que é absorvida, baixando o nível da glicose no sangue. A acarbose, voglibose e miglitol são inibidores da glicosidases, como por exemplo a α -amilase (ZORZIN, 2014).

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL: Anuário de agricultura brasileira. FNP- Consultoria & Comércio, p. 482, 2011.

ANDRADE, L. H.; OLIVEIRA, J. V.; LIMA, I.M.M.; SANTANA, M.F.; BREDA, M.O. Efeito repelente de azadiractina e óleos essenciais sobre *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) em algodoeiro. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 3, p. 628-634, 2013.

ANDREO, M. A. Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: estudo químico e atividade sobre o sistema gastrintestinal de *Mouriri pusa* Gardner e *Mouriri elliptica* Martius (Melastomataceae). Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. 2008.

ASLAM, R.; BHAT, T.M.; CHOUDHARY, S; ANSARI, M.; SHADWAR, D. Estimation of genetic variability, mutagenic effectiveness and efficiency in M2 flower mutant lines of *Capsicum annum* L. treated with caffeine and their analysis through RAPD markers. **Journal of King Saud University – Science**, 2016.

ASSIS, C. R. D. Acetilcolinesterase cerebral e eritrocitária como biomarcadores in vitro da exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal do Pernambuco. 2011.

BHAGOBATY, R.K.; MALIK, A. Utilization of chlorpyrifos as a sole source of carbon by bacteria isolated from wastewater irrigated agricultural soils in an industrial area of western Uttar Pradesh. **Research Journal of Microbiology**, v. 3, p. 293-307, 2008.

BEMPAH, C.K.; DONKOR, A.; YEBOAH, P.O.; DUBEY, B.; OSEI-FOSU, P. A preliminary assessment of consumer's exposure to organochlorine pesticides in fruits and vegetables and the potential health risk in Accra Metropolis. **Food Chemistry**, v. 128, p. 1058-1065, 2011.

BLEECKER, J.L. Organophosphate and carbamate poisoning. In. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 91, p. 100-101, 2008.

BUENO, A. F.; BATISTELA, M. J.; BUENO, R.C.O.F.; FRANÇA-NETO, J.B.; NISHIKAWA, M. A. N.; LIBERIO FILHO, A. Effects of integrated pest management, biological control and prophylactic use of insecticides on the management and sustainability of soybean. **Crop Protection**, v.30, p. 937-945, 2011.

CALDERON, A. I.; ANGERHOFER, C. K.; PEZZUTO, J. M.; FARNSWORTH, N. R.; FOSTER, R.; CONDIT, R.; GUPTA, M. P.; SOEJARTO, D.D. Forest plot as a tool to demonstrate the pharmaceutical potential of plants in a tropical forest of panama. **Economic Botany**, v. 54, p. 278-294, 2000.

CARDOSO, C.A.L.; COUTINHO, I.D.; KATAOKA, V.M.F.; HONDA, N.K.; COELHO, R.G.; VIEIRA, M.C. Influência da variação sazonal nos teores de flavonóides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, p.322-327, 2010.

CHAGWOO, K.; IN SUNG, M.; DONG, H.K.; SEONG, C.K.; JIN, H. J.; SOO, H. L.; SANG, B.L.; SANG, M. J.; TAE-SIN, K.; KYUNG-WOO, L. Red cell distribution width as a predictor of mortality in organophosphate insecticide poisoning. **American Journal of Emergency Medicine**, v.32, p. 743-745, 2014.

CUI, F.; LI, M. X.; CHANG, H.J.; MAO, Y.; ZHANG, H. Y. , LU, L. X.; YAN, S. G.; LANG, M. L.; LIU, L. QIAO, C. L. Carboxylesterase-mediated insecticide resistance: Quantitative increase induces broader metabolic resistance than qualitative change. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 88-96, 2015.

CHENG, J.A. Rice planthopper problems and relevant causes in China. In: Heong, K.L; Hardy, B. Planthoppers: New Threats to the Sustainability of Intensive Rice Production Systems in Asia. **International Rice Research Institute**, p. 157-177, 2009.

CHU, S.S.; LIU, Q.R.; LIU, Z. L. Insecticidal activity and chemical composition of the essential oil of *Artemisia vestita* from China against *Sitophilus zeamais*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 489-492, 2010.

DIAS, S.C.; SILVA, M.C.M.; TEIXEIRA, F.R.; FIGUEIRA, E.L.Z.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; LIMA, L.A.; FRANCO, O.L.; GROSSI-DE-AS, M.F. Investigation of insecticidal activity of rye α -amylase inhibitor gene expressed in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) toward cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Pest Biochem Physiology**, v. 98, p.39-44, 2010.

JADEJA, G.C.; MAHESHWARI, R.C.; NAIK, S.N. Extraction of natural insecticide azadirachtin from neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed kernels using pressurized hot solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.56, p. 253-258, 2011.

FAO (Food and Agriculture Organization) - Agriculture Database, 2003. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acessado em: 02/09/2016.

FEOLA, G.; RAHN, E.; BINDER, C. R. Suitability of pesticide risk indicators for less developed countries: a comparison. **Agriculture, Ecosystems e Environment**, v. 142, p. 238-245, 2011.

FERREIRA, G. A.; VELOSO, R. S.; VELOSO, N. R.; NASCIMENTO, J. L.; CHAVES, L.J. Biodiversidade de insetos em Pequiizeiro (*Caryocar brasiliense*, Camb.) no cerrado do Estado de Goiás, Brasil. **Agrociencia**, v. 13, p. 14-31, 2009.

FRAGA, A.S. Acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, carboxilesterase e a resistência de peixes neotropicais aos pesticidas organofosforados. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2010.

FOUAD, H. A.; FARONI, L.R.A.; TAVARES, W. S.; RIBEIRO, R.C.; FREITAS, S.S.; ZANUNCIO, J.C. Botanical extracts of plants from the Brazilian Cerrado for the integrated management of *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera:Gelechiidae) in stored grain. **Journal of Stored Products Research**, v. 57, p. 6-11, 2014.

HEONG, K.L. Are planthopper problems caused by a breakdown in ecosystem services? In: Heong, K.L.; Hardy, B. Planthoppers: New Threats to the Sustainability of Intensive Rice Production Systems in Asia. **International Rice Research Institute**, p. 221-231, 2009.

GOEL, A.; AGGARWAL, P. Pesticide poisoning. **The National Medical Journal of India**, v. 20, p. 174-176, 2007.

GOLDENBERG, R.; BAUMGRATZ, J.F.A.; SOUZA, M.L.D'El Rei. Taxonomia de melastomataceae no Brasil: retrospectiva, perspectivas e chave de identificação para os gêneros.

Rodriguésia, p. 145-161, 2012.

GODFRAY, H.C.J; GARNETT, T. Food security and sustainable intensification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 369, 2014.

GUPTA, R.C. Veterinary toxicology. Organophosphate and carbamates. **Elsevier**, p. 477-488, 2007.

KING, A.M.; AARON, C.K. Organophosphate and carbamate poisoning. **Emerg Med Clin N Am**, v. 33, p.133-151, 2015.

KHALIQ, A.; KHAN, A.A.; AFZAL, M.; TAHIR, H. M.; RAZA, A.M.; KHAN, A. M. Field evaluation of selected botanicals and commercial synthetic insecticides against *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) populations and predators in onion field plots. **Crop Protection**, v. 62, p. 10-15, 2014.

KLEIN, E.; RIMARCIK, J.; SENAJOVÁ, E.; VAGÁNEK, A.; LENGYEL, J. Deprotonation of flavonoids severely alters the thermodynamics of the hydrogen atom transfer. **Computational and Theoretical Chemistry**, 2016.

KOHLER, H.R.; TRIEBSKORN, R. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? **Science**, v. 341, p. 759-765, 2013.

KORTBEEK, R.W.J.; RAMIREZ, J.XU.A.; SPYROPOULOU, R.; DIERGAARDE, P.; OTTENBRUGGERMAN, P.; BOTH, M.; NAGEL, R.; SCHMIDT, R.C.; BLEEKER, P.M. Engineering of Tomato Glandular Trichomes for the Production of Specialized Metabolites. **Methods in Enzymology**, v. 576, p. 305-331, 2016.

KUMAR, A.; PRAKASH, O.; KUMAR, S.; NARWAL, S. α -glucosidase inhibitors from plants: a natural approach to treat diabetes. **Pharmacogn**, v. 5, p. 19-29, 2011.

MANSOUR, S. A.; EL-SHARKAWY, A. Z.; ABDEL-HAMID, N. A. Toxicity of essential plant oils, in comparison with conventional insecticides, against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). **Industrial crops and Products**, v. 63, p. 92-99, 2015.

MEHRABADI, M.; BANDANI, A.R.; SAADATI, F. Inhibition of Sunn pest, *Eurygaster integriceps*, α -amylases by α -amylase inhibitors (T- α AI) from Triticale. **Journal Insect Science**, v.10, p. 179, 2010.

MIRESMAILLI, S.; ISMAN, M. B. Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. **Trends in plant science**, v. 19, p. 29-35, 2014.

MOLEIRO, F. C.; ANDREO, M. A.; SANTOS, R.C.; MORAES, T.M.; RODRIGUES, C.M.; CARLI, C.B.A.; LOPES, F.C.M.; PELLIZZON, C.H.; CARLOS, R.Z.; BAUAB, T.M.; VILEGAS, W.; LIMA, C.A.H. *Mouriri elliptica*: Validation of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 359-368, 2009.

MOITA NETO, J.M.; OLIVEIRA, F.C.S.; BARROS, R.F.M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais Oeiras, semiárido piauniense. **Revista Brasileira de Plantas medicinais. Botacatu**, v.12, n.3, p. 282-301, 2010.

OERKE, E.C. Crop losses to pests. **Journal Agricultural Science**, v. 144, p.31-43, 2006.

OLIVEIRA, M.S.S.; ROEL, A.R.; ARRUDA, E.J.; MARQUES, A.S. Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E.SMITH, 1797). (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p 326-331, 2007.

OLIVEIRA, C.M.; AUAD, A.M.; MENDES, S.M.; FRIZZAS, M.R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v.56, p.50-54, 2014.²

OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; BAKSHI, M.; ABHILASH, P.C.; FRACETO, L. F. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. **Biotechnology advances**, v. 32, p. 1550 - 1561, 2014.

OLIVEIRA, G. L.; CARDOSO, S.K.; LARA JÚNIOR, C.R.; VIEIRA, T.M.; GUIMARÃES, E.F.; FIGUEIREDO, L.S.; MARTINS, E.R.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M.A.C. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). **Anais de Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, p. 1227-1234, 2013.

OMOTO, C.; GUEDES, R.N.C. Classificação do Modo de Ação de Inseticidas. Irac – Comitê Brasileiro de ação a Resistência á Inseticidas. 2015.

PANUWET, P.; SIRIWONG, W.; PRAPAMONTOL, T.; BARRY RYAN, P.; FIEDLER, N.; ROBSON, M. G. Agricultural pesticide management in Thailand: status and population health risk. **Environmental Science e Policy**, v. 17, p. 72-81, 2012.

PETRONILHO, E. C.; PINTO, A.C.; VILLAR, J.D.F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química.2011. Disponível em:<http://rmct.ime.eb.br/arquivos/RMCT_3_tri_2011/RMCT_067_E5A_11.pdf>. Acesso em:02/09/2016.

ROCHA, B.C.A. Extração e caracterização do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2013.

SALLAM, M.N. Insect Damage: Damage on Post-Harvest, Compendium on Post-harvest Operations. AGSI/FAO:INPhO, 2014.

SANTOS, P. I. M. Avaliação da toxicidade aguda do inseticida metomil e o seu efeito sobre a atividade de acetilcolinesterase do peixe *Danio rerio*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioecologia aquática da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

SANTOS, F.V.; TUBALDINI, F.R.; COLUS, I.M.S; ANDREO, M.A.; BAUAB, T.M.; LEITE,C.Q.F.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Mutagenicity of *Mouriri pusa* Gardner and *Mouriri elliptica* Martius. **Food na Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2721-2727, 2008.

SILVA, C. R. C. Avaliação do processamento auditivo em trabalhadores rurais expostos ocupacionalmente a agrotóxicos organofosforados. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade do Rio de Janeiro. 2010.

SONG, Q.; WANG, Y.; ZHANG, C.Y.X.H. LaaA, a novel high-active alkalophilic alpha-amylase from deep-sea bacterium *Luteimonas abyssi* XH031. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 90, p. 83-92, 2016.

SOUZA, D. J. O ensino de geografia: a visão fragmentada a respeito do bioma cerrado. Curso de licenciatura em Geografia, Universidade de Brasília. **Instituto de Ciências Humanas**, Brasília, 2012.

SPARKS, T. C.; NAUEN, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 122-128, 2015.

TAN, K.H; NISHIDA, R. Methyl eugenol: its occurrence, distribution and role in nature, especially in relation to insect behavior and pollination. **Journal Insect Science**, v. 12, p. 1-74, 2012.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. Princípios de anatomia e fisiologia. **Guanabara**, v.12, p.409-915, 2010.

USDA-United States Department of Agriculture. Production, Supply and Distribution (PS&D). Disponível em:<<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdHome.aspx>>. Acesso em: 22/09/2016.

VASCONCELOS, P.C.P.; KUSHIMA, H.; ANDREO, M.; LIMA, C.A.H.; VILEGAS, W.; TAKAHIRA, R.K.; PELLIZZON, C.H. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriri pusa* treatment in acetic acid ulcer model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 293-301, 2008.

WANG, Y.; YU, R.; ZHAO, X.; CHEN, L.; WU, C.; CANG, T. Susceptibility of adult *Trichogramma nubilate* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to selected insecticides with different models of action. **Crop Protection**, v. 34, p. 76-82, 2012.

WIENER, S. W.;HOFFMAN, R. S. Nerve Agents: A Comprehensive Review. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 19, p. 22-37, 2004.

XU, H. X.; ZHENG, X. S.; YANG, Y. J.; TIAN, J.C.; LU, Y. H.; TAN, K. H.; HEONG, K. L.; LU, Z. X. Methyl eugenol bioactivities as a new potential botanical insecticide against major insect pests and their natural enemies on rice (*Oriza sativa*). **Crop Protection**, v. 72, p. 144-149, 2015.

ZORZIN, F.M. Avaliação da atividade de inibição de alfa-amilase e padronização do extrato aquoso da folha de *Eugenia dysenterica*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. 2014.

ZOUBIRI, S.; BAALIOUAMER, A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p. 925-938. 2014.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a inibição enzimática da acetilcolinesterase e da α -amilase por extratos brutos metanólico e acetato de etila das folhas de *Mouriri elliptica* Martius. Bem como determinar e quantificar as frações dos diferentes extratos com ação inibitória dessas enzimas, para que possam ser usados para controle de pragas agrícolas.

CAPITULO I

Inibição de acetilcolinesterase e α -amilase por extrato das folhas de *Mouriri elliptica* Martius.

RESUMO

Os vegetais possuem resistência natural aos insetos, e esse método de resistência pode ser utilizado no controle das pragas como nova alternativa para redução do uso de inseticidas químicos, tais como os inibidores da α -amilase, enzima digestiva, e sua inibição prejudica o crescimento e desenvolvimento de espécies de pragas. E os inibidores da acetilcolinesterase que danificam o funcionamento normal do Sistema Nervoso Central e Periférico. Estudos já realizados mostraram que os agrotóxicos botânicos têm vantagens sobre os sintéticos, sendo degradados rapidamente no meio ambiente. Por isso, objetivou-se avaliar a atividade de inibição enzimática dos extratos das folhas de *Mouriri elliptica* Martius em diferentes polaridades e fracionamento. O extrato metanólico e acetato de etila foram caracterizados quanto ao seu perfil químico através de análises por cromatografia em coluna e em camada delgada CCDC e caracterização de inibidores da acetilcolinesterase e α -amilase. Os resultados mostraram que o extrato bruto metanólico e suas frações MF1 e MF4 são potentes inibidores da acetilcolinesterase, com percentual de inibição de 73 e 79%, além de possuírem afinidade significativa com essa enzima. Já o extrato bruto acetato de etila inibiu de forma moderada a α -amilase, cerca de 40%, mostrando a importância dessa espécie vegetal para o setor agrícola, sendo uma fonte promissora de compostos bioativos sobre enzimas presentes nos insetos.

3.1 INTRODUÇÃO

Mesmo havendo grande diversidade de inseticidas sintéticos para o controle de pragas, aplicações repetidas desses compostos ao longo do tempo provocaram uma resistência das pragas e problemas ambientais (PAVELA, 2015), além de resíduos de agrotóxicos presentes nos solos e alimentos, pela utilização incorreta desses produtos (HEONG, 2009).

Atualmente é necessário o surgimento de novos produtos químicos amigáveis para o controle das pragas (PAVELA, 2015), tem-se buscado introduzir medidas sustentáveis, como por exemplo, os inseticidas à base de plantas, que tem provado ser mais eficaz e seguro para o ecossistema (KHALIQ et al., 2014). Os agrotóxicos botânicos tem sido uma das medidas utilizadas para diminuir os danos que os insetos têm causado no arroz (CHENG, 2009), insetos como *Nilaparvata lugens* Stal e *Chilo pressalis* Walker prejudicam culturas de arroz, sendo responsável pela redução significativa na sua produção (XU et al., 2015).

A atividade biológica em plantas é determinada pela presença de alguns compostos como sesquiterpenoides e monoterpenoides, causando interação da planta com o inseto (CHENG et al., 2007). Esses vegetais apresentam em sua composição metabólitos secundários que tem sido usado no combate às pragas, como, por exemplo, o alcaloide nicotina encontrada na família Solanaceae e estriquina de *Strychnos* spp. (MIRESMAILLI e ISMAN, 2014). Compostos químicos de importante ação estão presentes nas folhas de *Mouriri elliptica*, como os taninos, flavonoides, saponinas e terpenos (ANDREO, 2008). O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade de inibição enzimática dos extratos brutos e frações das folhas de *Mouriri elliptica* Martius, obtidos a partir do solvente metanol e acetato de etila sobre a acetilcolinesterase e α -amilase.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Material botânico

As folhas de *M. elliptica* Martius planta nativa do bioma Cerrado, foram coletadas no Município Planalto Verde - Goiás sob a latitude 17° 19' 282" S e longitude 51° 33' 457" W, e identificada pelo herbário do IF-Goiano Campus de Rio Verde, com o número de depósito 156.

3.2.2 Obtenção do extrato bruto

Os extratos foram preparados com as folhas de *M. elliptica* Martius, que foram secas na estufa a 40°C e moídos em moinho. O material moído foi extraído por maceração por 24 horas acetato de etila AcOET (1000 mL – 3x) e, por último o metanol (1000 mL – 3x) em 600 g da amostra, utilizou-se 3 recipientes, o procedimento foi repetido 3x. Os extratos foram filtrados em papel de filtro e concentrados em evaporador rotatório. Em seguida deixados em capela até a evaporação do solvente. Após isso, foram liofilizados e armazenados na geladeira até a sua utilização nos ensaios biológicos e fracionamento. Obteve rendimento de 370,06 g do extrato metanólico e 74,77 g do extrato acetato de etila.

3.2.3 Fracionamento do extrato metanólico

Solubilizou-se 10g do extrato metanólico em 20 mL de água e centrifugado 1000 rpm, a porção sobrenadante foi aplicada em uma coluna cromatográfica (45 cm x 5,5 cm) empacotada com Sephadex LH20, utilizando como fase móvel a água, obtendo o esgotamento do material na coluna após 15 frascos de 100 mL e as frações foram liofilizadas e caracterizadas de acordo com o perfil químico, e reunidas em 4 frações.

3.2.5 Fracionamento do extrato acetato de etila

Solubilizou 10g do extrato acetato de etila em 20 mL de metanol em banho maria, centrifugou-se em 1000 rpm, e a porção sobrenadante (10 mL) foi retirada e aplicada na coluna cromatográfica (45 cm x 5,5 cm) empacotada com Sephadex LH20. Utilizando como fase móvel o metanol, obtendo o esgotamento do material na coluna após 30 frascos de 100 mL, e as frações foram liofilizadas e caracterizadas de acordo com o perfil químico, e reunidas em 4 frações.

3.2.6 Caracterização do perfil químico

Todas as frações foram caracterizadas fitoquimicamente através de CCDC (Fig.14), em placas de sílica gel, com fases móveis Hexano:Acetato de etila (7:3), Clorofórmio:Metanol (9:1) e BAW (n-butanol:ácido acético:água, 4:1:5). As frações foram reunidas segundo o perfil fitoquímico de cada fração, resultando em 4 frações de cada extrato bruto metanólico e acetato de etila, e depois cada uma delas foram testadas em CCDC para observação da atividade enzimática da acetilcolinesterase, através da verificação de halos brancos na placa, selecionou-se apenas algumas amostras para serem purificadas em coluna de sílica gel e Sephadex LH20. A fração AF1 e AF2 de acetato de etila foram aplicadas na coluna de sílica gel, com a fase móvel hexano:acetato de etila (7:3), clorofórmio:metanol (9:1) e metanol, obtendo-se AF1.1, AF1.2, AF1.3, AF1.4 e AF2.1, AF2.2, AF2.3, AF2.4, AF2.5, testadas em CCDC, e aplicadas novamente em coluna de sílica gel apenas as amostras AF1.1 e AF2.5 com diferente fase móvel, adquirindo-se AF1.1-2 e AF2.5-2, que foram testadas na CCDC mostrando o aparecimento de halos brancos, por conta disso essas frações foram usadas nos testes enzimáticos quantitativo para inibição da acetilcolinesterase. A fração MF2 do extrato metanólico foi aplicado na coluna de Sephadex LH20 para a realização do fracionamento, utilizando como fase móvel o metanol, então obteve-se a fração MF2-3.

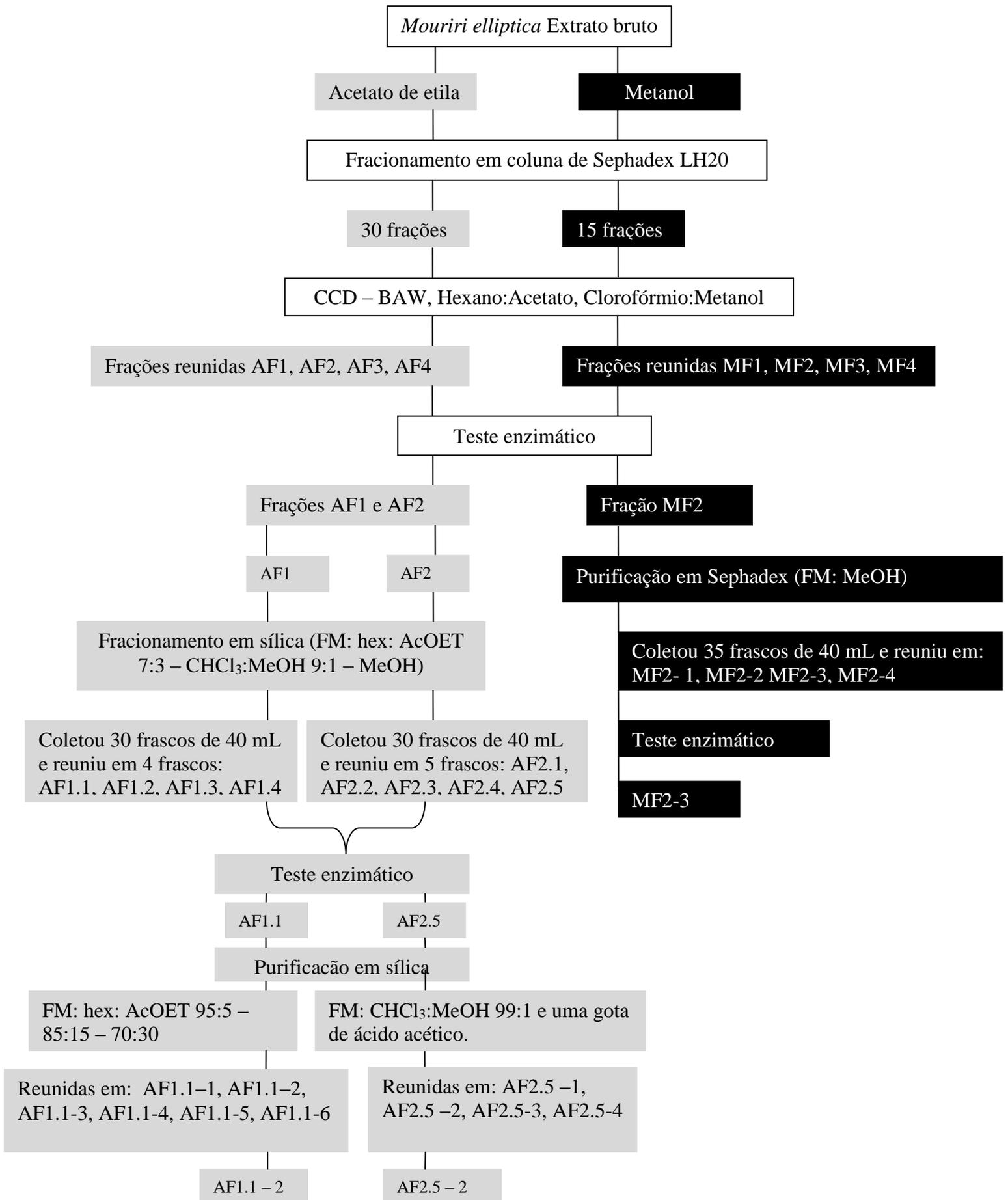


Figura 14. Caracterização do perfil químico

3.2.7 Análises cromatográficas

As amostras das 15 frações de metanol e 30 de acetato de etila foram solubilizadas em metanol para concentração de 1mg/mL, em seguida aplicada em CCDC (10x 20 cm, Si₂₅₀F®) com fase móvel: BAW (n-butanol:ácido acético:água, 4:1:5) e foram visualizadas por lâmpadas de UV (254 e 365 nm) e reveladas através de reações com vanilina sulfúrica. Após esse procedimento, as frações foram reunidas em 4 frações de metanol e 4 de acetato de etila pela colorações observadas na placa.

A caracterização de inibidores de acetilcolinesterase foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por MARSTON et AL (2002), utilizando-se a enzima acetilcolinesterase (500 U) dissolvida em 75mL de tampão Tris-HCL 0,05 M (pH 7.8), sendo adicionado albumina de soro bovina (BSA) (75 mg) a solução para estabilização da enzima (solução preparada). As amostras preparadas anteriormente da fração metanólica e acetato de etila das folhas de *M. elliptica* Martius foram aplicadas em placas de CCDC (5 x 10 cm, Si₂₅₀F®) com fase móveis: Hexano:AcOEt (7:3), Clorofórmio:Metanol (9:1) e BAW (n-butanol:ácido acético:água, 4:1:5).

Após a secagem das placas eluídas, elas foram borrifadas com a solução estoque da enzima e secas novamente, seguindo-se a incubação, em que as placas foram mantidas em câmara climatizada a 37 °C por 20 minutos, para estabilização da enzima. Para a detecção da enzima, soluções de 1-acetato de naftila (25 mg) em etanol (10mL) (A) e sal Fast Blue B (100 mg) em água destilada (40mL) (B), foram utilizadas (soluções já preparadas). Logo após a incubação, 1 mL da solução A e 4 mL da solução B foram misturadas e borrifadas na placa, para a observação de halos brancos de inibição após 10 minutos.

Este teste se baseia na clivagem pela acetilcolinesterase do 1 acetato de naftila, para formar o 1 naftol, o qual reage com o sal Fast Blue B, para dar a coloração púrpura de diazônio. É um método que oferece rápido acesso a informações sobre a atividade e a localização da atividade relacionada a planta, pois os constituintes separados podem ser diretamente detectados nas placas de CCDC, uma vez que as regiões da placa que contêm inibidores da acetilcolinesterase aparecem como marcas brancas no fundo púrpura (MARSTON ET AL, 2002).

3.2.8. Soluções do extrato vegetal

O extrato bruto e frações utilizadas no teste de inibição foram preparados em metanol ou acetato de etila, de acordo com o solvente ao qual foi macerado para a obtenção do extrato bruto. Sendo utilizadas 6 concentrações, a solução final foi de 20µg/mL, e as demais concentrações foram obtidas a partir de diluição seriada.

3.2.9. Ensaio da atividade enzimática da acetilcolinesterase

O ensaio *in vitro* da atividade da acetilcolinesterase foi realizado em microplacas de 96 poços adaptado a partir do método desenvolvido por Ellman (1961). A enzima hidroliza o substrato acetiltiocolina resultando na produção de tiocolina, que reage com o DTNB para produzir 2-nitrobenzoato-5-mecaptotiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato, que pode ser detectado na absorvância de 405 nm. A leitura da placa foi realizada na leitora Elisa.

Foi realizado o controle do solvente metanólico e acetato de etila para ver se o mesmo interferia na inibição, ambos não possuem resultados significados para a inibição enzimática da acetilcolinesterase.

3.2.9.1. Inibidor

Foi adicionando na microplaca 88µL de tampão fosfato 0,1M (pH 7.5), 2µL do inibidor e 10µL da enzima e levados à B.O.D por 10 minutos a 25°C. Após esse tempo foi adicionados nos poços mais 70 µL de tampão fosfato 0,1M (pH 7.5), 10 µL de DTNB, 25 µL ACTI e levado por 60 minutos na B.O.D.

3.2.9.2. Branco do Inibidor

No branco do inibidor foi adicionado 98 µL de tampão fosfato 0,1M (pH 7.5), 2 µL do inibidor e levados à B.O.D por 10 minutos a 25°C. Após esse tempo foi adicionados nos poços mais 70 µL de tampão fosfato 0,1M (pH 7.5), 10 µL de DTNB, 25 µL ACTI e levado por 60 minutos na B.O.D.

3.2.9.3. Enzima (acetilcolinesterase do *Electrophorus electricus* 5U Sigma®)

Para o controle da Atividade 100% da enzima 160 μL de tampão fosfato 0,1M (pH 7.5), 10 μL da enzima, 10 μL de DTNB, 25 μL ACTI e levado por 60 minutos na B.O.D.

3.2.9.3. Branco da enzima

No branco da enzima foi adicionado 170 μL de tampão 0,1M (pH 7.5), 10 μL de DTNB e 25 μL de ACTI, levado por 60 minutos na B.O.D.

3.2.9.4. Controle negativo

Para o controle negativo foi utilizado 88 μL de tampão 0,1M (pH 7.5), 2 μL de eserina e 10 μL da enzima, levado por 10 minutos a 25°C na B.O.D. Após esse tempo foi adicionados nos poços mais 70 μL de tampão fosfato 0,1M (pH 7.5), 10 μL de DTNB, 25 μL ACTI e levado por 60 minutos na B.O.D.

3.2.9.5. Branco do controle negativo

Para o branco do controle negativo foi utilizado 88 μL de tampão 0,1M (pH 7.5), 2 μL de água pura e 10 μL da enzima, levado por 10 minutos a 25°C na B.O.D. Após esse tempo foi adicionados nos poços mais 70 μL de tampão fosfato 0,1M (pH 7.5), 10 μL de DTNB, 25 μL ACTI e levado por 60 minutos na B.O.D.

3.2.10. Análises dos resultados da inibição enzimática da acetilcolinesterase

3.2.10.1. Controle positivo

Como controle positivo de inibição acetilcolinesterase foi utilizado o inibidor eserina, também conhecido como fisostigmina. A curva dose-resposta para eserina foi construída a partir da concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ realizada diluições seriadas obtendo 6 concentrações. A curva de inibição foi obtida plotando a % de inibição versus o logaritmo da concentração de eserina. Os parâmetros de regressão não linear foram traçados para cada curva e os valores de IC50 foram obtidos utilizando o software Sigmaplot.

3.2.10.2 Determinação da porcentagem de inibição

As porcentagens de inibição sobre as enzimas foram calculadas comparando-se a absorbância das amostras (ensaio contendo extrato + enzima + ACTI + DTNB) com o controle da enzima (ensaio contendo tampão + enzima + ACTI + DTNB). Os valores correspondentes à absorbância da enzima forneceram o referencial da atividade máxima da enzima utilizada, para a realização dos experimentos, ou seja, refere-se à capacidade máxima da enzima para a formação dos produtos a partir dos seus substratos, tendo sido considerada a atividade da enzima igual a 100%. Dessa forma, as porcentagens de inibição das amostras foram calculadas de acordo com a seguinte equação: % inibição = $[(C-A) \times 100]/C$, em que: C representa a absorbância do controle da enzima, subtraída do branco da enzima e A representa a absorbância da amostra subtraída do branco do extrato (extrato vegetal + ACTI + tampão + DTNB).

3.2.11. Ensaio da atividade de inibição sobre a α -Amilase

O ensaio foi realizado segundo a metodologia de Bernfeld (1955), adaptado. A ação de inibição foi observada através da formação de maltose resultante da atividade desta enzima sobre o amido presente no meio. A maltose, reduz o DNS produzindo um produto de cor laranja cuja absorbância é determinada a 540 nm. A leitura da placa foi realizada na leitora Elisa. A α -amilase pancreática suína foi dissolvida em tampão de sódio 20 mM (pH 6,9).

Foi realizado o controle do solvente metanólico e acetato de etila para ver se o mesmo interferia na inibição, ambos não possuem resultados significados para a inibição enzimática da α -amilase.

3.2.11.1. Inibidor

Foi adicionado na microplaca 4,8 μ L do tampão fosfato, 4,2 μ L da amostra e 16,5 μ L da enzima. Levado por 10 minutos a 25 °C em banho maria. Após esse tempo foi acrescentado 16,5 μ L de amido, aquecido por 20 minutos a 25 °C. Ao termino desse procedimento foi adicionado 176 μ L de DNS e colocado em banho maria por 10 minutos a 70 °C, e em seguida levado ao banho de gelo até atingir a temperatura ambiente. E por último adicionou-se 500 μ L de água pura e realizou-se a leitura da microplaca.

3.2.11.2. Branco do Inibidor

No branco da amostra foi adicionado na microplaca 21,3 μ L do tampão fosfato, 4,2 μ L da amostra. Levado por 10 minutos a 25 °C em banho maria. Após esse tempo foi acrescentado 16,5 μ L de amido, aquecido por 20 minutos a 25 °C. Ao termino desse procedimento foi adicionado 176

μL de DNS e colocado em banho maria por 10 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, e em seguida levado ao banho de gelo até atingir a temperatura ambiente. E por último adicionou-se $500\text{ }\mu\text{L}$ de água pura e realizou-se a leitura da microplaca.

3.2.11.3. Enzima

Foi adicionado $9\text{ }\mu\text{L}$ do tampão fosfato, $16,5\text{ }\mu\text{L}$ da enzima e $16,5\text{ }\mu\text{L}$ do amido 1%. Foi levado por 20 minutos a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ao término desse procedimento foi adicionado $176\text{ }\mu\text{L}$ de DNS e colocado em banho maria por 10 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, e em seguida levado ao banho de gelo até atingir a temperatura ambiente. E por último adicionou-se $500\text{ }\mu\text{L}$ de água pura e realizou-se a leitura da microplaca.

3.2.11.4. Branco da enzima

Para o branco da enzima foi adicionado $25,5\text{ }\mu\text{L}$ do tampão fosfato e $16,5\text{ }\mu\text{L}$ da $16,5\text{ }\mu\text{L}$ do amido 1%. Foi levado por 20 minutos a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ao término desse procedimento foi adicionado $176\text{ }\mu\text{L}$ de DNS e colocado em banho maria por 10 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, e em seguida levado ao banho de gelo até atingir a temperatura ambiente. E por último adicionou-se $500\text{ }\mu\text{L}$ de água pura e realizou-se a leitura da microplaca.

3.2.11.5. Controle negativo

Para o controle negativo foi adicionado $9\text{ }\mu\text{L}$ do tampão fosfato, $16,5\text{ }\mu\text{L}$ da acarbose e $16,5\text{ }\mu\text{L}$ do amido 1%. Foi levado por 20 minutos a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ao término desse procedimento foi adicionado $176\text{ }\mu\text{L}$ de DNS e colocado em banho maria por 10 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, e em seguida levado ao banho de gelo até atingir a temperatura ambiente. E por último adicionou-se $500\text{ }\mu\text{L}$ de água pura e realizou-se a leitura da microplaca.

3.2.11.6. Branco do controle negativo

Para o controle negativo foi adicionado $25,5\text{ }\mu\text{L}$ do tampão fosfato e $16,5\text{ }\mu\text{L}$ do amido 1%. Foi levado por 20 minutos a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ao término desse procedimento foi adicionado $176\text{ }\mu\text{L}$ de DNS e colocado em banho maria por 10 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, e em seguida levado ao banho de gelo até atingir a temperatura ambiente. E por último adicionou-se $500\text{ }\mu\text{L}$ de água pura e realizou-se a leitura da microplaca.

3.2.12. Análises dos resultados da inibição enzimática da α -amilase

3.2.12.1 Controle positivo

Como controle positivo de inibição da α -amilase foi utilizado o inibidor acarbose. A curva dose-resposta para da acarbose foi construída a partir da concentração de 100 μ g/mL realizada diluições seriadas obtendo 6 concentrações. A curva de inibição foi obtida a partir da % de inibição versus o logaritmo da concentração de acarbose.

3.2.12.2 Determinação da porcentagem de inibição

As porcentagens de inibição da enzima foram calculadas comparando-se a absorbância das amostras (ensaio contendo extrato + enzima+ amido + DNS) com o controle da enzima (ensaio contendo tampão + enzima + amido + DNS). Os valores correspondentes à absorbância do controle da enzima forneceram o referencial da atividade máxima da enzima utilizada para a realização dos experimentos, ou seja, refere-se à capacidade máxima da enzima para a formação dos produtos a partir dos seus substratos, tendo sido considerada a atividade da enzima igual a 100%. Dessa forma as porcentagens de inibição das amostras foram calculadas de acordo com a seguinte equação: % inibição = $[(C-A) \times 100]/C$, em que: C representa a absorbância do controle da enzima, subtraída do branco da enzima e A representa a absorbância da amostra subtraída do branco do extrato (extrato vegetal + tampão + DNS).

3.2.13. Influência dos solventes utilizados na diluição dos extratos vegetais

Para o estudo da atividade de inibição de extratos de plantas com diferentes polaridades foram escolhidos solventes inertes. A quantidade de solvente utilizada para solubilizar as amostras dos extratos vegetais foi avaliada frente à atividade das enzimas acetilcolinesterase e α -amilase nas mesmas condições dos experimentos para determinação enzimática. Foram testados os solventes metanol e acetato de etila durante o ensaio das amostras em microplaca. Observou-se que ambos os solventes não demonstraram atividade de inibição em nenhuma das enzimas.

3.2.14. Constante de KI

A constante de dissociação (K_i) foi obtida através das análises dos resultados da inibição enzimática da acetilcolinesterase, das frações e extrato bruto metanólico e acetato de etila. Os dados foram ajustados na equação de (K_i) e aplicados ao programa software Sigmaplot 10.0, com a média de três repetições ($n=3$) \pm desvio padrão da média. Dessa forma o valor de (K_i) pode ser determinado com valor de significância $p < 0.05$.

3.2.15. Análise estatística

Os resultados apresentados neste estudo correspondem à média de três repetições ($n=3$) \pm desvio padrão da média. O limite de significância para todas as análises estatísticas foi de $p < 0.05$, aplicado pelo teste Tukey, e todas as análises foram realizadas usando o programa Sisvar Versão 5.6 Build 86.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização do perfil químico e teste de bioatividade

A caracterização química de compostos secundários pode ser determinada por vários métodos, neste trabalho os extratos foram obtidos através de solventes com diferentes polaridades, como o metanol e o acetato de etila. Substâncias polares e de média polaridade são extraídas respectivamente nesses tipos de solventes. Para caracterizar esses extratos foram necessárias técnicas cromatográficas, reações químicas e enzimáticas.

Na Figura 15A e 15B mostra o perfil químico por CCDC das frações do extrato metanólico e do acetato de etila respectivamente, eluídas com BAW. Ao aplicar o revelador vanilina sulfúrica nas placas, verificou-se que várias substâncias mostraram reações de coloração indicando taninos (vermelha), flavonoides (amarelo) e terpenos (azul). Através do perfil químico de cada fração, realizou a união delas, transformando cada extrato em 4 frações, para a continuação do método de fracionamento e purificação. Nas figuras 16A, 16B, 17A E 17B notou-se a presença do composto absorvidos sob a luz UV, sendo o flavonoide observado na luz UV 365nm (Fig. 16B). Halos brancos podem ser observados nas figuras 18A, 18B, 18C, 19A, 19B e 19C, indicativo de inibição da acetilcolinesterase.

De acordo com Wagner (2001) a fluorescência na luz UV 365 nm depende da fórmula estrutural, podendo aparecer a coloração amarelo escuro, verde e azul fluorescente. Apenas o extrato metanólico demonstrou o azul fluorescente na fração 2,3,4 e 14 na caracterização do perfil químico da amostra.

As manchas brancas nas placas de CCDC são observadas devido à reação da enzima em converter o acetato α -naftil em α -naftol, o α -naftol irá reagir com fast blue B salt, tornando à placa em uma coloração purpura, enquanto que os inibidores da enzima acetilcolinesterase começam a formar os halos brancos (SAIKAT et al, 2015).

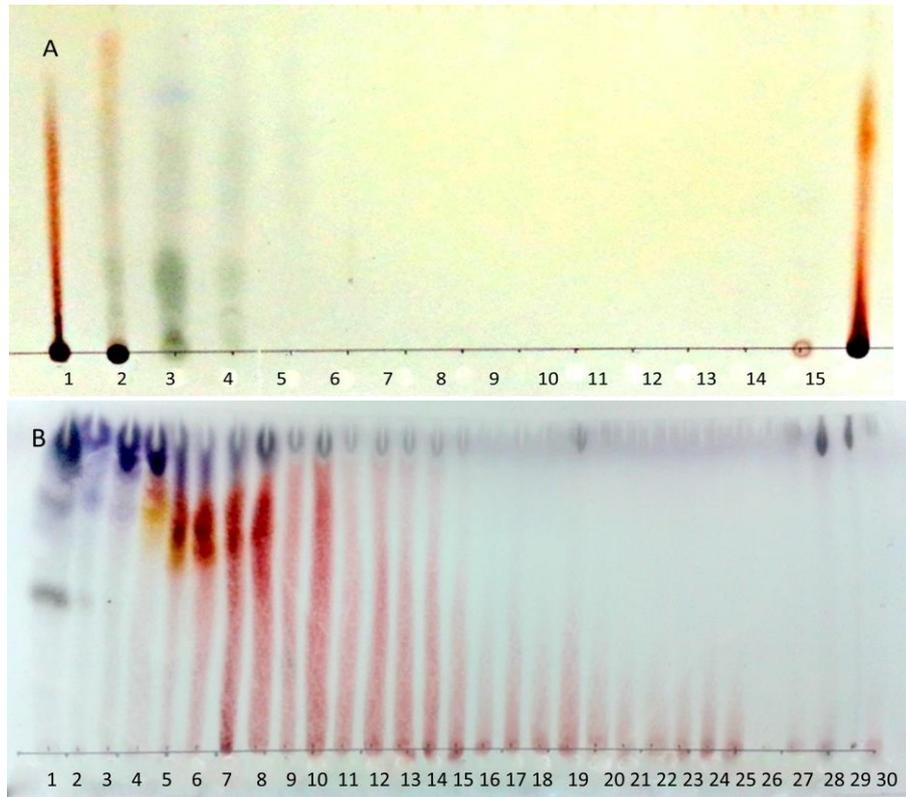


Figura 15. CCDC do extrato metanólico e acetato de etila respectivamente das folhas de *Mouriri elliptica* Martius. Fase Móvel: BAW

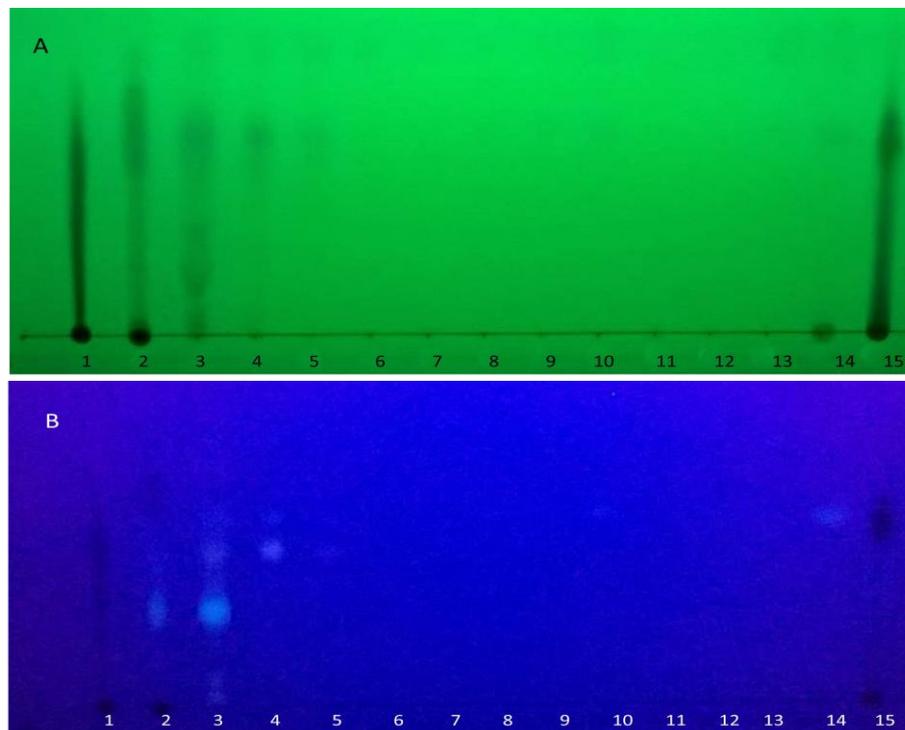


Figura 16. CCDC do extrato metanólico da espécie *Mouriri elliptica* Martius. Fase Móvel: BAW; Revelador A – UV 254nm; B – UV 365nm.

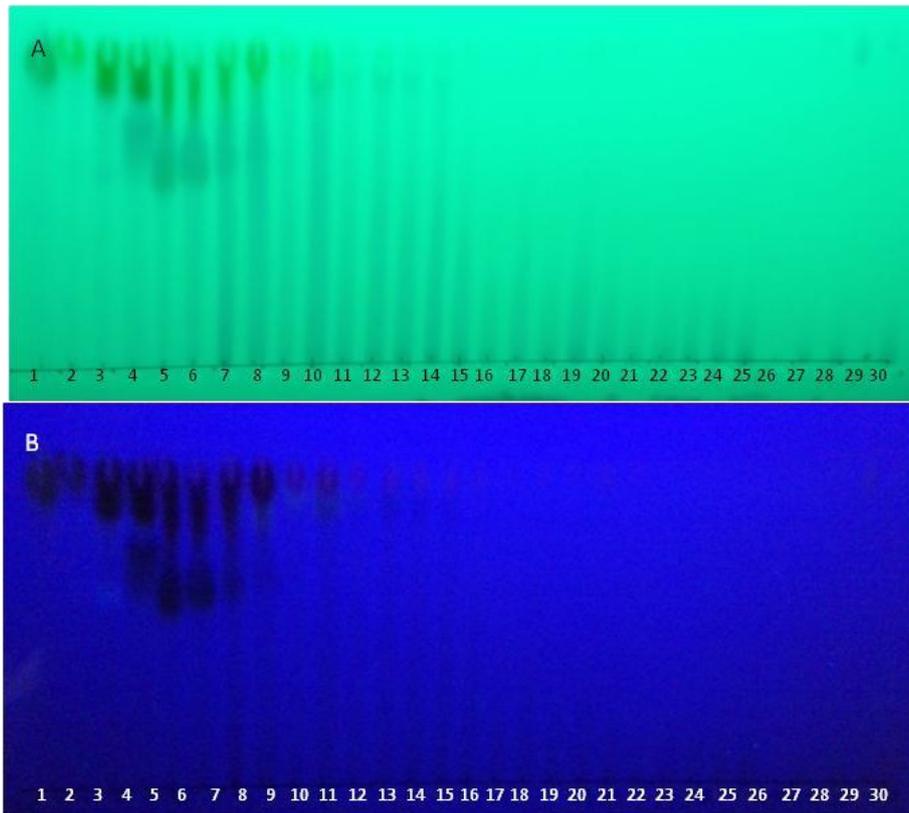


Figura 17. CCDC do extrato acetato de etila da espécie *Mouriri elliptica* Martius. Fase Móvel: BAW; Revelador: A – UV 254nm; B – UV 365nm.

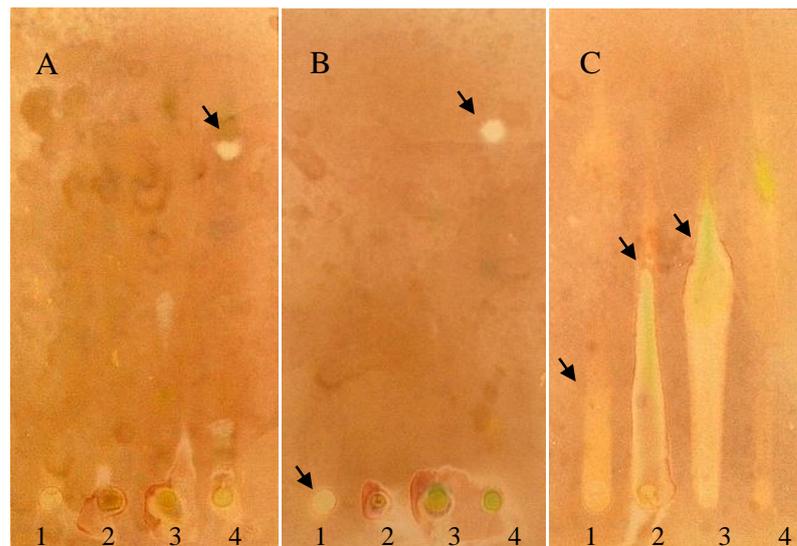


Figura 18. CCDC do extrato acetato de etila da espécie *Mouriri elliptica* Martius. Fases Móveis: A– Hexano:AcOEt (7:3), B – CHCl₃:MeOH (9:1) e C – BAW; Revelador: AchE/Naftila/Sal Fast Blue B.

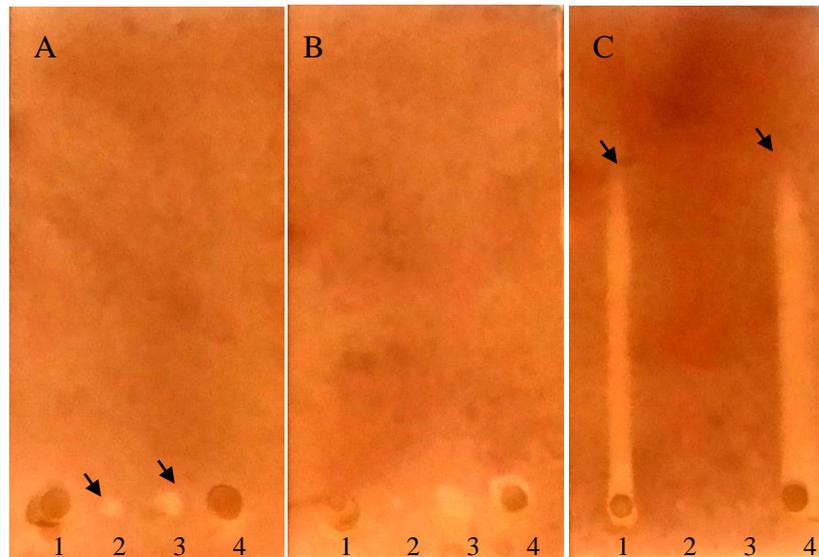


Figura 19. CCDC do extrato metanólico da espécie *Mouriri elliptica* Marius. Fases Móveis: A– Hexano:AcOEt (7:3), B – CHCl₃:MeOH (9:1) e C – BAW; Revelador: AchE/Naftila/Sal Fast Blue B.

3.3.2 Avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase em microplaca

Uma curva dose-resposta foi realizada nas mesmas concentrações dos extratos, usando como controle positivo à eserina, com percentual de inibição equivalente à 86%, com valor de IC₅₀ de 1,37 µg/mL. A eserina (ou fisostigmina) é um inibidor reversível de curta duração da enzima acetilcolinesterase, extraído da espécie vegetal *Physpstigma venenosum* (MUKHERJEE, et al., 2007).

A atividade de inibição pode ser observada tanto no extrato bruto metanólico, quanto no acetato de etila, porém o percentual de inibição do extrato metanólico foi mais significativo. O extrato metanólico teve potente atividade de inibição de 68% e com valor de IC₅₀ de 12,43 µg/mL, enquanto o acetato de etila de 40% de ação sobre a enzima (Fig. 20 e 21).

O potencial de inibição difere entre as diferentes doses de 0.625 a 20 µg/mL utilizadas no ensaio para o extrato metanólico, bem como para o extrato acetato de etila, mostrando que com o aumento da concentração, conseqüentemente o efeito inibitório aumentará. No extrato bruto metanólico quando comparado com a eserina, mostra que o percentual de inibição da eserina apesar de ser maior, não há diferenças significativas, cerca de 18% na dose 20 µg/mL.

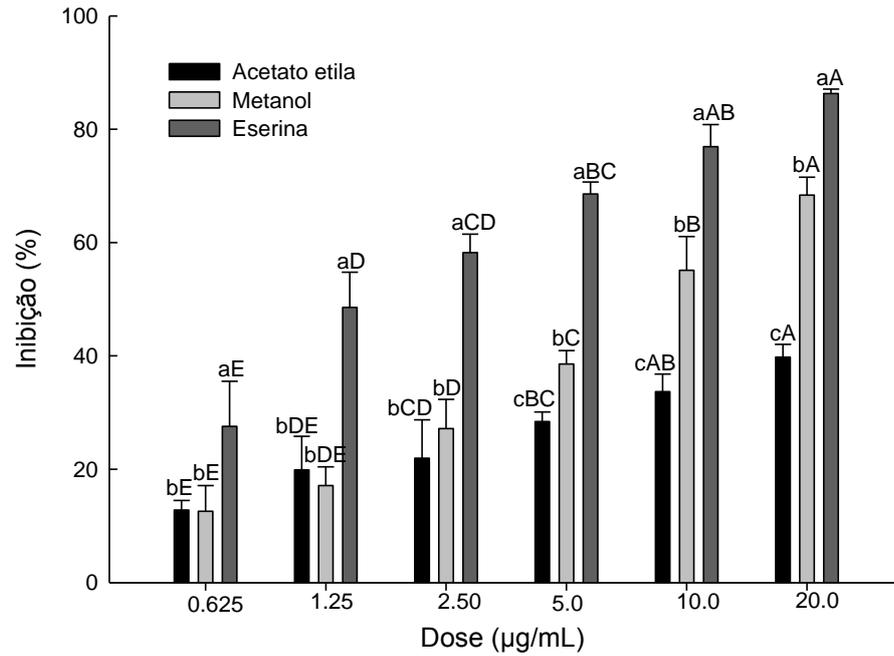


Figura 20. Porcentagem de inibição dos extratos brutos acetato de etila e metanólico sobre a enzima acetilcolinesterase. Os valores foram expressos em média de triplicata. a e b : diferença significativa entre os extratos. A,B,C,D: diferença significativa entre as concentrações de cada extrato, $p < 0.05$ teste Tukey.

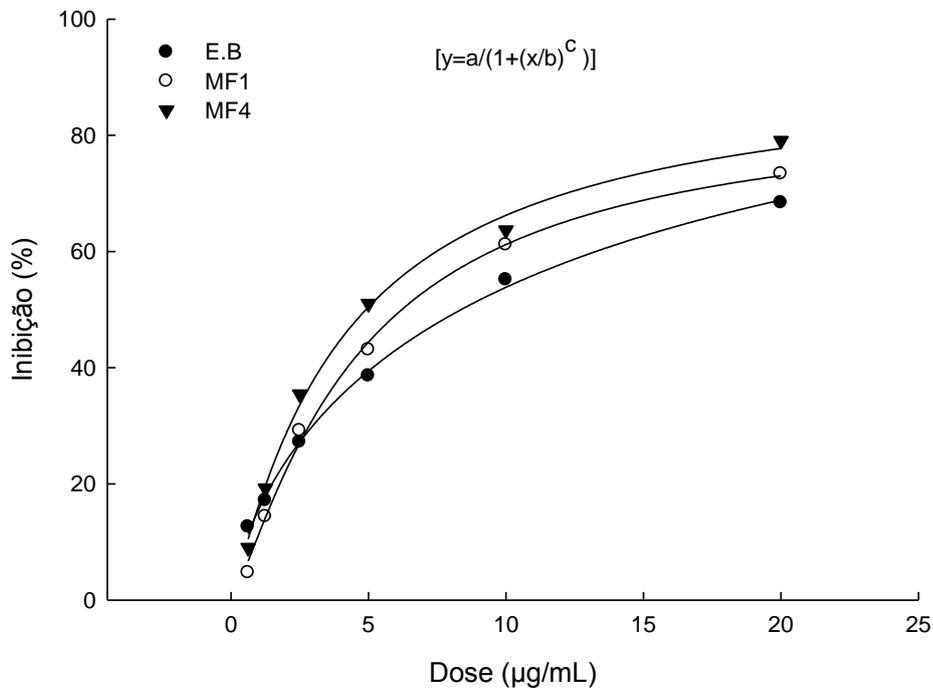


Figura 21. IC₅₀ do extrato bruto e frações do metanol. Doses: E.B - 12,43µg/mL, MF1 - 4,68µg/mL, MF4 - 4,18µg/mL. Cada ponto apresenta a média em triplicata.

As frações de *M. elliptica* também foram avaliadas sobre a enzima acetilcolinesterase. Os resultados mostraram que todos os extratos brutos e frações dessa espécie vegetal foram capazes de influenciar a ação da enzima. As frações MF1 e MF4 (Fig. 22) demonstraram inibição relevante acima de 70 % com respectivo valor de IC₅₀ de 4,68 e 4,18 µg/mL (Fig 21), enquanto o IC₅₀ da eserina foi de 1,37 µg/mL. Já a fração AF3 superior a 40 %, as demais frações inibiram entre 40 a 20 % da atividade da enzima (Fig.23).

Nas figuras 22 e 23 a média das doses de cada extrato é representada no gráfico, mostrando que não há diferença significativa entre o percentual de inibição do extrato bruto e das frações, tanto o extrato metanólico quanto do extrato acetato de etila. Mesmo algumas frações tendo apresentado um percentual de inibição maior do que o extrato bruto, quando analisado estatisticamente, este percentual não é relevante. Sendo viável a utilização do extrato bruto, que é de fácil obtenção quando comparado com as frações, para os próximos estudos de inibição enzimática da acetilcolinesterase. O extrato bruto acetato de etila da *M. elliptica* apresentaram moderado percentual de inibição sobre a acetilcolinesterase.

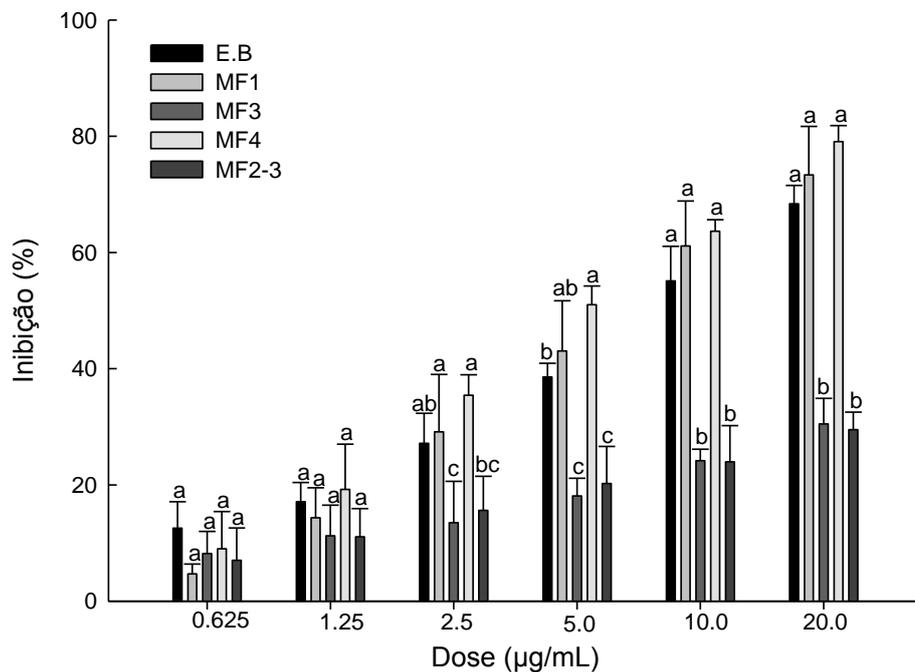


Figura 22. Porcentagem de inibição das frações do extrato metanólico sobre a enzima acetilcolinesterase. Os valores foram expressos em média de todas as doses em triplicata. a e b : diferença significativa entre os extratos, $p < 0.05$ teste Tukey.

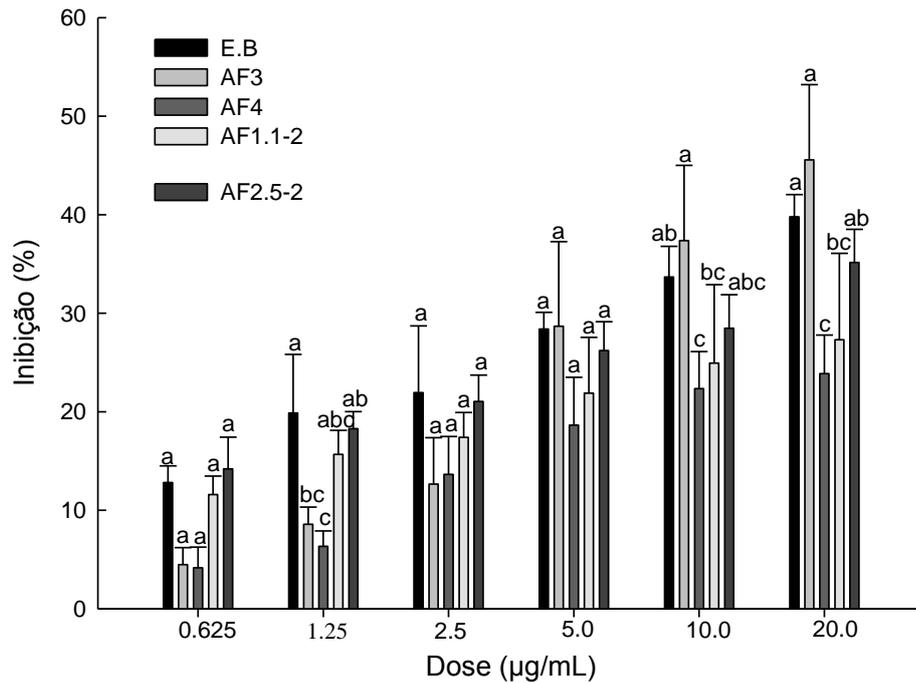


Figura 23. Porcentagem de inibição das frações do extrato acetato de etila sobre a enzima acetilcolinesterase. Os valores foram expressos em média de todas as doses em triplicata. a e b : diferença significativa entre os extratos, $p < 0.05$ teste Tukey.

Espécies vegetais com ação inibitória maior que 50 % são analisados como potentes inibidores da acetilcolinesterase, e valores entre 30 á 50% são classificados com atividade a moderada. Atividade de inibição menores que 30 % são avaliados como baixa atividade inibitória (VINUTHA et al., 2007).

Estudos anteriores mostraram que as folhas de *M. elliptica* possuem saponinas e taninos em pequenas quantidades, terpenos e os flavonoides: naringenina, kaemferol, quercetina e miricetina (ANDREO, 2008). Na literatura tem sido mostrando que vegetais com a mesma constituição química da *M. elliptica* exercem atividade de inibição da acetilcolinesterase, exemplo disso são as espécies *Clinacanthus nutans* (Lamiales:Acanthaceae) (LAU; LEE; CHIN, 2014) e *Rhizopora spp* (WAHYUNI,DARUSMAN, SURYA, 2015). A *Rhizopora spp* apresenta taninos, saponinas, terpenos e flavonoides, e seu extrato metanólico teve maior atividade inibitória do que o extrato hexano e acetato de etila sobre a enzima acetilcolinesterase (WAHYUNI,DARUSMAN, SURYA, 2015).

Alguns compostos flavonoides como a quercetina, tirilósido, quercitrina e quercetina 3-metoxi já foram isolados e estudados sobre sua ação inibitória da acetilcolinesterase. Apresentando os respectivos IC_{50} sobre 19.8; 23.5; 66.9; 37.9 μM (JUNG; PARK, 2007).

Na literatura, existe a descrição de outras espécies vegetais como *Achyrocline tomentosa* (Asterales:Asteraceae), *Eupatorium viscidum* (Asterales:Asteraceae), *Ruprechtia apétala* (Caryophyllales:Polygonaceae) e *Zanthoxylum coco* (Sapindales:Rutaceae) que através de seus extratos obtiveram inibição da acetilcolinesterase com frações orgânicas (CHENG et al., 2007). Na cromatografia de camada delgada na porção acetato de etila pode ser observada a presença de substâncias como os taninos, a qual é descrita com atividade inibitória sobre a acetilcolinesterase. Não há relatos científicos da família *M. elliptica* ou gênero sobre estudos de inibição da enzima acetilcolinesterase.

A afinidade dos extratos e frações com relação à enzima foi analisada através do K_i , uma constante de dissociação. Quanto menor o valor de K_i , mais potente é o inibidor, indicando maior afinidade com a enzima. As amostras obtidas a partir dos extratos metanólicos obteve um valor de K_i baixo, as frações MF3 e MF2.3 mostraram o menor valor de eficiência para (K_i). Já as amostras do acetato de etila demonstraram valores mais altos, sendo as frações AF1.1-2 e AF2.5-2 as que obtiveram maior significância dentro das amostras do extrato acetato de etila, seus respectivos valores 1.369 e 1.580 (K_i). Mas quando analisando estatisticamente pelo o teste tukey é observado que apesar das frações MF3 e MF2.3 terem apresentado os menores valores para K_i , não há diferença estatística entre as outras amostras do extrato metanólico. Para os extratos acetato de etila todas as frações são semelhantes quando comparadas estatisticamente, exceto a fração AF3. Ao comparar os extratos e frações metanólico com o acetato de etila nota-se que todas as amostras do extrato metanólico apresentam melhor afinidade com relação a enzima acetilcolinesterase, indicando excelente eficiência no processo de inibição.

A partir desses dados pode ser observado que a fração MF4 além de ter percentual de inibição acima de 75%, apresentando o melhor percentual de inibição dentre todas as análises realizadas, também teve valor baixo para K_i , mostrando ser uma fração com alta afinidade sobre a enzima acetilcolinesterase.

Em uma inibição enzimática a determinação da natureza do processo de inibição, estima a magnitude do K_i (MARANGONI, 2003). Em que se determina o modelo de inibição, podendo ser uma inibição competitiva e não competitiva (DJERIDANE, et al., 2015). O K_i é um dos parâmetros cinéticos da atividade enzimática, denominado de constante de dissociação (MARANGONI, 2003), no presente estudo o K_i foi calculado para cada tipo de extrato, analisado em triplicata com seus respectivos desvio padrão (Tabela 2).

Tabela 2. Constante de dissociação (K_i) da acetilcolinesterase por diferentes extratos.
(Valores da média ± desvio padrão).

| Extrato | K_i (µg/mL) |
|----------------|------------------------------|
| Ex.B. M. | 0.017 (±0.010) |
| MF1 | 0.022 (±0.018) |
| MF3 | 0.002 (±0.0004) |
| MF4 | 0.015 (±0.005) |
| MF2.3 | 0.002 (±0.0002) |
| Ex. B. A | 3.014 (±2.459) |
| AF3 | 11.456 (±2.723) |
| AF4 | 2.409 (±2.050) |
| AF1.1-2 | 1.369 (±0.969) |
| AF2.5-2 | 1.580 (±0.766) |

3.3.3 Avaliação da inibição da enzima α -amilase na microplaca

A atividade de inibição dos extratos brutos metanólico e acetato de etila foram avaliados sobre a enzima α -amilase. O resultado mostrou que o extrato acetato de etila teve percentual de inibição de 40 % para a maior dose. Enquanto o percentual de inibição para o extrato metanólico foi cerca de 20 % (Fig. 24). O extrato metanólico não teve diferença significativa entre suas concentrações sobre a ação da enzima, enquanto o acetato de etila houve diferença de inibição de concentração para concentração, quando a concentração aumenta, à porcentagem de inibição se tornar maior.

Nos ensaios utilizou a acarbose como controle positivo sobre a atividade da enzima α -amilase, foi construída uma curva dose resposta com as concentrações de acarbose entre 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$, sendo a concentração 0 a amostra sem a acarbose, utilizando como fator controle para a inibição. Ao comparar o controle positivo com o extrato acetato de etila é observado que a 20 $\mu\text{g/mL}$ o acetato de etila inibiu 42%, enquanto o controle positivo a 100 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 50% (Fig.25), mostrando que a amostra utilizada é mais eficiente no processo inibitório do que o controle positivo que tem sido vendido comercialmente.

Na espécie vegetal utilizada para realização dos extratos possuem flavonoides, composto descrito na literatura como um inibidor da enzima α -amilase (TADERA, et al., 2006). Os taninos são encontrados também em sua porção foliar, sendo uma substância que realiza a precipitação de proteínas, formando complexos que são insolúveis, que ligam a enzimas digestivas, como por exemplo α -amilase (ZAJACZ, et al., 2007). A inibição do extrato obtido das folhas de *M. elliptica* se deve em partes pelo alto teor de taninos presente nessa espécie, que foi observado nas análises cromatográficas.

A atividade de inibição dos vegetais sobre a α -amilase está relacionada com compostos secundários, como os compostos fenólicos, taninos e triterpenóides (ALI; HOUGHTON; SOUMYANATH, 2006). Não foi encontrado nenhum estudo para inibição da enzima α -amilase no gênero *Mouriri*. Não foi encontrado nenhum estudo para inibição da enzima α -amilase no gênero *Mouriri*.

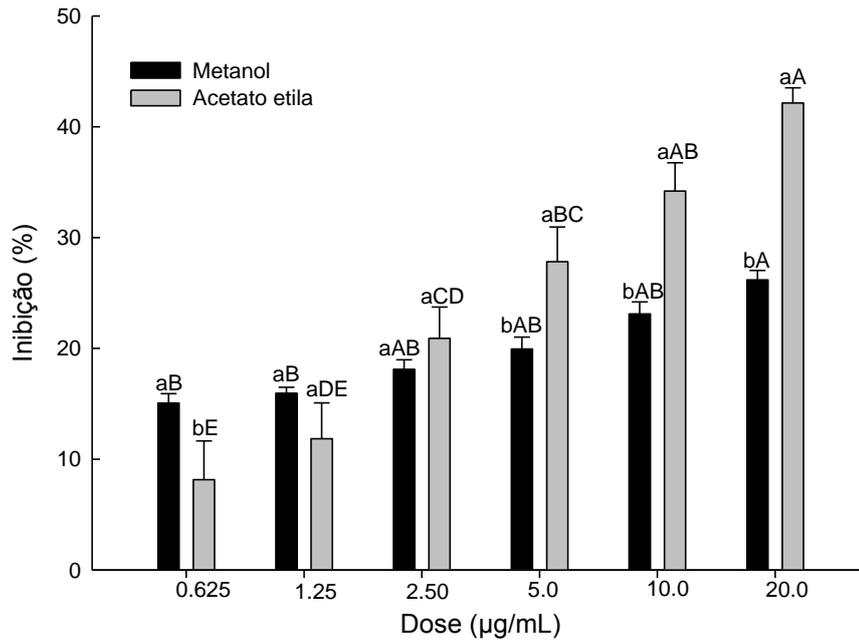


Figura 24. Porcentagem de inibição do extrato bruto acetato de etila e metanólico sobre a enzima α -amilase. Os valores foram expressos em média de triplicata. a e b : diferença significativa entre os extratos. A, B, C: diferença significativa entre as concentrações de cada extrato, $p < 0.05$ teste Tukey.

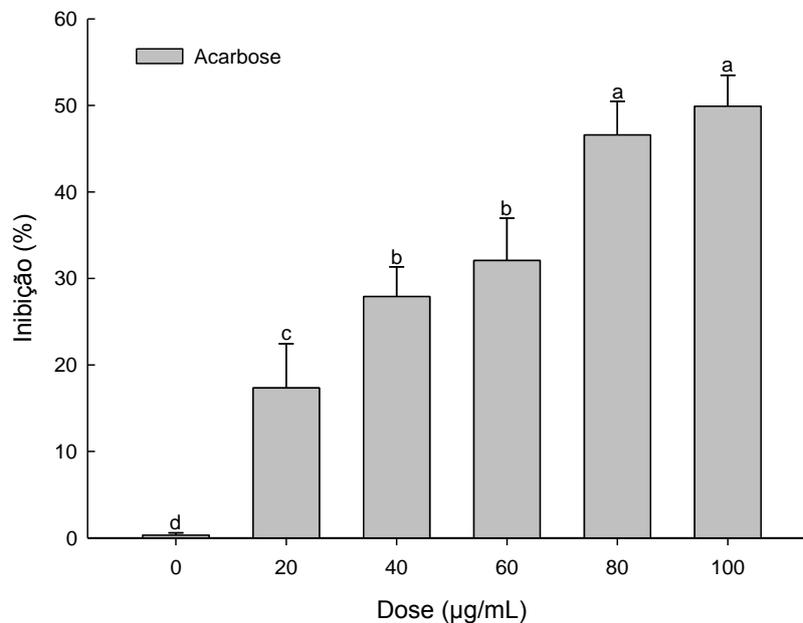


Figura 25. Porcentagem de inibição da acarbose sobre a enzima α -amilase. Os valores foram expressos em média de triplicata. a e b : diferença significativa entre as concentrações, $p < 0.05$ teste Tukey.

3.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que o extrato das folhas de *M. elliptica* inibe as enzimas acetilcolinesterase e α -amilase. Em destaque o extrato bruto metanólico e frações MF1 e MF4 demonstraram ser um potente inibidor da enzima acetilcolinesterase, além do extrato bruto acetato de etila ser capaz de inibir a enzima α -amilase. Ao se associar a inibição enzimática das duas enzimas em um único composto, terá danos no Sistema Nervoso Central e Sistema Digestivo do inseto, efeito que se considera muito promissor, levando o inseto à morte. Baseado nesse presente estudo essa espécie vegetal mostrou ser um agente em potencial para o combate a pragas, podendo ser utilizada no setor agrícola para futuros estudos *in vivo*. As informações obtidas contribuíram para o conhecimento dessa espécie, que carece de informações científicas.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, H.; HOUGHTON, P.J.; SOUMYANATH, A. Alpha-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal Ethnopharmacol**, v. 107, p. 449-455, 2006.

ANDREO, M. A. Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: estudo químico e atividade sobre o sistema gastrointestinal de *Mouriri pusa* Gardner e *Mouriri elliptica* Martius (Melastomataceae). Tese de doutorado apresentada a Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 2008.

BERNFELD, P. Amylases, α and β . **Methods in Enzymology**, p. 149-58, 1955.

CHENG, A., LOU, Y., MAO, Y., LU, S., WANG, L., CHEN, X. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. **Plant Biology**, v. 49, p.179–186, 2007.

CHENG, J.A. Rice planthopper problems and relevant causes in China. In: Heong, K.L.; Hardy, B. Planthoppers: New Threats to the Sustainability of Intensive Rice Production Systems in Asia. Los Banos (Philippines): **International Rice Research Institute**, p. 157-177, 2009.

DJERIDANE, A.; HAMDI, A.; BENZANIA, W.; CHEIFA, K.; LAKHDARI, I.; YOUSFI, M. The *in vitro* evaluation of antioxidative activity, α -glucosidase, α -amylase enzyme inhibitory of natural phenolic extracts. **Diabetes e Metabolic Syndrome: Clinical Research e Reviews**, v.9, p. 324-331, 2015.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES JUNIOR, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

JUNG, M.; PARK, M. Acetylcholinesterase inhibition by Flavonoids from *Afrimonia pilosa*. **Molecules**, v. 12, p. 2130-2139, 2007.

HEONG, K.L. Are planthopper problems caused by a breakdown in ecosystem services? In: Heong, K.L.; Hardy, B. Planthoppers: New threats to the Sustainability of Intensive Rice Production

Systems in Asia. Los Banos (Philippines): **International Rice Research Institute**, p. 221-231, 2009.

KHALIQ, A.; KHAN, A.A.; AFZAL, M.; TAHIR, H. M.; RAZA, A.M.; KHAN, A. M. Field evaluation of selected botanicals and commercial synthetic insecticides against *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) populations and predators in onion field plots. **Crop Protection**, v. 62, p. 10-15, 2014.

LAU, K.W.; LEE, S.K.; CHIN, J.H. Effect of the methanol leaves extract of *Clinacanthus nutans* on the activity of acetylcholinesterase in male mice. **Journal of Acute Disease**, v.3, p. 22-25, 2014.

MARANGONI, A. G. Enzyme kinetics. **Wiley-Interscience**, p.65, 2003.

MARSTON, A. KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K.A. A rapid CCD bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochem Anal**, v.13, p.51-54, 2002.

MIRESMAILLI, S.; ISMAN, M. B. Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. **Trends in Plant Science**, v. 19, p. 29-35, 2014.

MURHERJEE, P.K.; KUMAR, V.; HOUGHTON, P.J. Screening of Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Phytother Research**, v. 21, p. 1142-1145, 2007.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. **Industrial Crops**, v. 76, p. 174-187, 2015.

SAIKAT, D.; GANGOPADHYAY, M.; BHATTACHARYA, N.; KHANRA, R.; DUA, T.K. Bioautography and its scope in the field natural product chemistry. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.2, p.75-84, 2015.

TADERA, K.; MINAMI, Y.; TAKAAMATSU, K. MATSUOKA, T. Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. **Journal Nutritional Science and Vitaminol**, v. 52, p.149, 2006.

VINUTHA, B.; PRASHANTH, D.; SALMA, K.; SREEJA, S.L.; PRATITI, D.; PADMAJA, R.; RADHIKA, S.; AMIT, A.; VENKATESWARLU, K.; DEEPAK, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 359-363, 2007.

WAHYUNI, W.T.; DARUSMAN, L.K.; SURYA, N.K. Potency of *Rhizopora* spp. Extracts as Antioxidant and Inhibitor of Acetylcholinesterase. **Procedia Chemistry**, v. 16, p. 681 – 686, 2015.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis. Editora: Springer-Verlag, 2^o ed., p.195, 2001.

XU, H.X.; ZHENG, X.S.; YANG, Y.J.; TIAN, J.C.; LU, Y.H.; TAN, K.H.; HEONG, K.L.; LU, Z.X. Methyl eugenol bioactivities as a new potential botanical insecticide against major insect pests and their natural enemies on rice (*Oriza sativa*). **Crop Protection**, v. 72, p.144-1449, 2015.

ZAJACZ, A.; GYEMANT, G., VITTORI, N.; KANDRA, L. Aleppo tannin: structural analysis and salivary amylase inhibition. **Carbohydr Research**, v. 342, p. 717, 2007.