

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg em
linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster*

Flávio Henrique Barbosa

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Biotecnologia, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel
em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg em
linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster*

Flávio Henrique Barbosa

Prof^a. Dr^a. Cássia Regina da Silva

Orientadora

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Biotecnologia, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel
em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg em
linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster*

Flávio Henrique Barbosa

Prof^a. Dr^a. Cássia Regina da Silva

Orientadora

IBTEC

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Coordenador do Curso de Biotecnologia

Uberlândia - MG

Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg em
linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster*

Flávio Henrique Barbosa

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Presidente da Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Cássia Regina da Silva

Uberlândia, de de

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao grupo do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LABITOX), que forneceu a estrutura, materiais e equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho, assim como possibilitou uma incrível experiência em um ambiente profissional respeitado e dedicado as suas atividades.

Agradeço a colaboração de todo o grupo do Laboratório de Genética (LABGEN) da Universidade Federal de Uberlândia, em especial à técnica responsável Tamiris Sabrina Rodrigues, que me acompanhou e pôde me passar parte do seu conhecimento, contribuindo de maneira essencial para minha formação.

De forma particular gostaria de agradecer a minha orientadora, professora doutora Cássia Regina da Silva, a quem cultivo grande apreço, admiração e respeito. Seus conselhos, instruções e correções, sempre foram de grande importância para minha formação, e sua própria trajetória profissional é uma inspiração.

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória de um composto natural, o óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg, extraído das folhas secas no período de chuva e de seca, administrado como tratamento crônico a larvas no estágio L3 de *Drosophila melanogaster* transgênica, linhagem GMR-GAL4 > UAS-eiger, a qual superexpressa o gene eiger nos olhos. O gene eiger codifica a proteína (Eiger) ortóloga ao TNF- α humano, uma citocina pró-inflamatória que ativa a via de morte celular c-Jun N-terminal quinase. Nessa linhagem, os olhos das moscas não se desenvolvem durante sua metamorfose. O tratamento realizado foi capaz de recuperar parcialmente o desenvolvimento dos olhos das moscas, sinalizando seu efeito potencial como anti-inflamatório.

Palavras chave: Óleo essencial; Atividade anti-inflamatória; *Drosophila melanogaster*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Produtos naturais e aplicações potenciais	1
1.2. <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg	2
1.3. <i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.4. Detecção de atividade anti-inflamatória em <i>Drosophila melanogaster</i>	7
2. OBJETIVOS	9
2.2. Objetivo geral	9
2.3. Objetivos específicos	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Modelo experimental	9
3.1.1. Preparo do meio de postura	11
3.1.2. Oviposição	11
3.1.3. Tratamento das larvas L3	11
3.1.4. Contagem das pupas	12
3.1.5. Coleta de moscas adultas	12
3.1.6. Captura de imagem e mensuração da área dos olhos	12
3.2. Análise estatística	13
4. RESULTADOS	13
4.1. Teste de veículos	13
4.2. Tratamento com óleo essencial de <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg	14
5. DISCUSSÃO	17
6. CONCLUSÃO	19
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial e evolução científica do século XXI tem se pautado nos pilares da sustentabilidade. Tendo em vista o avanço nos conhecimentos genéticos e de práticas de biologia molecular, caminhamos em busca do conhecimento e bioprospecção daquilo que há de mais interessante na nossa biodiversidade, em termos econômicos, sociais e ambientais, visando aplicar os potenciais biológicos que a natureza nos fornece afetando-a minimamente, utilizando-nos de técnicas como por exemplo a de DNA recombinante.

Com isto em mente, a exploração científica dos biomas e das espécies pertencentes a esses é crucial para a descoberta de novos produtos com aplicação em diferentes áreas. Portanto, os produtos naturais são parte da revolução científico-industrial que vem ocorrendo na nossa sociedade, e sendo assim, a tendência é que cada vez mais tenhamos estudos voltados à exploração dos potenciais destes bioprodutos.

1.1. Produtos naturais e aplicações potenciais

O Brasil, sendo um país tropical, apresenta uma extensa biodiversidade ainda pouco explorada. O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, e apresenta a maior biodiversidade dentre as savanas em todo o mundo (KLINK; MACHADO, 2005). A Mata Atlântica, apesar de imensamente degradada, conserva um material genético de extrema relevância devido a diversidade existente nos locais preservados (CADAVAL et al., 2006). A exploração científica de produtos naturais tem demonstrado que derivados de plantas apresentam potenciais para utilização na indústria alimentícia, de nutrição animal, farmacêutica, de cosméticos, entre outras (CLARDY; WALSH, 2004).

Óleos essenciais fazem parte da ampla variedade de produtos naturais com aplicações vastas. Estes são misturas de compostos voláteis, originários do metabolismo secundário de plantas, e que apresentam diferentes atividades biológicas que podem ser aplicadas

terapeuticamente (TUREK; STINTZING, 2013). A presença de terpenos, flavonoides, carotenoides, dentre outras moléculas, fornece um amplo campo para busca de novos compostos com capacidade farmacológica (RAUT; KARUPPAYIL, 2014), sendo essencial o desenvolvimento de estudos que esclareçam tanto a composição destes produtos, como também os mecanismos pelos quais estes agem *in vivo*.

1.2. *Psidium myrtoides* O. Berg

O gênero *Psidium*, da família das *Myrtaceae*, é amplamente distribuído no território brasileiro, em especial no cerrado e mata atlântica. As espécies pertencentes a tal gênero têm importância social na alimentação e medicina popular das comunidades locais (FRANZON; SOUSA-SILVA, 2009), tendo comprovadamente atividade terapêutica como anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiana, etc. (GUNN et al., 2016; ALVARENDA et al., 2015), sendo assim um alvo para estudos da composição fitoquímica e atividades biológicas dos seus compostos.

Dentro desse contexto encontra-se o Araçá-roxo (*Psidium myrtoides* O. Berg), espécie endêmica do Brasil, cuja distribuição vai desde a região Nordeste até Sul, presente na caatinga, cerrado e mata atlântica (REFLORA, 2018). No trabalho realizado por Dias (2019), foi realizada a extração de óleo essencial desta espécie, utilizando material vegetal (folhas secas) extraídas de um exemplar da planta presente no Jardim Indaia, na cidade de Uberlândia, estado de Minas Gerais, Brasil, em setembro de 2017 (período de seca) e em fevereiro de 2018 (período de chuva). Foi utilizado o método de hidrodestilação em um aparelho de Clevenger para a obtenção do óleo, e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa para caracterização e análise dos compostos. A porcentagem relativa dos compostos presentes nos óleos essenciais extraídos em época chuvosa e seca são apresentados na **Tabela 1** e **Tabela 2**, a seguir.

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial obtido das folhas secas (OESC-FC30) de *Psidium myrtooides* O. Berg no período de chuva. Adaptado de DIAS, 2019.

	Composto	% Relativa no óleo essencial
1	α -Copaeno	7,11
2	Trans-cariofileno	27,38
3	Trans- α - bergamoteno	1,89
4	Aromadandreno	0,39
5	α -humuleno	16,18
6	Ishwarane	0,51
7	δ - selineno	1,97
8	α - Selineno	2,81
9	δ -cadineno	0,7
10	Trans-Cadina- 1,4-dieno	1,88
11	α -cadineno	1,97
12	Elemol	1,39
13	<i>Trans</i> -nerolidol	1,65
14	(-)-Espatuleno	0,91
15	Óxido de cariofileno	11,41
16	Epóxido de Humuleno II	4,29
17	Muurorola – 4,10 (14) dien- 1- β -ol	1,39
18	Muurorolol< α >	0,98
19	Intermedeol <neo>	4,16
20	β -Bisabolol	2,18
21	α -Bisabolol	8,1
22	Eudesm-7(11)- en-4-ol	0,75
Total		100

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial obtido das folhas secas (OESS-FC22) de *Psidium myrtooides*

O. Berg no período de seca. Adaptado de DIAS, 2019.

	Composto	% Relativa no óleo essencial
1	α -Copaeno	6,97
2	Trans-cariofileno	21,62
3	Aromadandreno	1,34
4	α -humuleno	17,40
5	Ishwarane	0,93
6	δ -selineno	1,79
7	α -Selineno	2,70
8	δ -cadineno	0,76
9	Trans-Cadina- 1,4-dieno	2,14
10	α -cadineno	1,66
11	Elemol	1,75
12	<i>Trans</i> -nerolidol	2,28
13	(-)-Espatuleno	1,20
14	Óxido de cariofileno	13,59
15	Globulol	0,35
16	Epóxido de Humuleno II	6,09
17	Cubenol	3,79
18	Muuorola – 4,10 (14) dien- 1- β -ol	0,22
19	Cariofila – 4(12), 8(13)-dien-5- α -ol	0,24
20	Selina-3,11-dien-6- α -ol	0,29
21	Muurolool< α >	1,50
22	Intermedeol <neo>	1,17
23	Não identificado	1,30
24	β -Bisabolol	2,23
25	α -Bisabolol	5,89
26	Eudesm-7(11)- en-4-ol	0,73
Total		99,93

O óleo volátil extraído de Araçá-roxo é composto majoritariamente por *trans*-cariofileno, α -humuleno, α -copaeno, óxido de cariofileno e α -bisabolol (DIAS et al., 2018), tais compostos são conhecidamente bioativos, o óleo de Araçá-roxo apresentou, em outros estudos, atividade antifúngica (FERNANDES et al., 2018) e antibiótica (DIAS et al., 2018). Estudos também mostraram a inibição de bactérias patogênicas da microbiota bucal, sendo este um fator que vem potencializar a utilização deste óleo ou derivados do mesmo em produtos voltados à higiene bucal (DIAS et al., 2018). Desta forma, faz-se necessária a realização de novos projetos em busca de esclarecer outras possíveis atividades que possam enriquecer ainda mais o potencial deste produto, como atividade anti-inflamatória por exemplo.

Podemos observar que há diferença na composição dos óleos extraídos em diferentes épocas do ano, principalmente quanto à proporção de cada molécula, conforme apresentado nas tabelas 1 e 2. Como a potencial atividade biológica está atrelada aos componentes do óleo, é possível que o composto obtido no período chuvoso apresente também alguma diferença em relação ao obtido no período de seca no que se refere a atividades biológicas.

Os óleos essenciais em geral contém moléculas que conferem poder antioxidante e anti-inflamatório aos mesmos (MIGUEL, 2010). No óleo obtido das folhas secas de Araçá-roxo observa-se a presença de moléculas como o α -bisabolol, *trans*-cariofileno, α -humuleno, entre outras, que apresentam atividade biológica como antioxidantes e anti-inflamatórios (KAMATOU; VILJOEN, 2010; FERNANDES et al., 2007). Modelos para testes destes compostos *in vivo* tradicionais utilizam mamíferos, normalmente roedores, para tais experimentos. Entretanto, tem-se atualmente a visão de redução de utilização de mamíferos, e modelos alternativos vem se estabelecendo desde a década de 90. Um destes modelos é a *Drosophila melanogaster*, um díptero com enorme potencial para a ciência devido a seu genoma, que conserva semelhanças com mamíferos (ADAMS et al., 2000).

1.3. *Drosophila melanogaster*

A mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*), um inseto holometábolo pequeno encontrado na natureza em frutas em decomposição, vem sendo amplamente utilizado nas ciências biológicas desde que seu genoma foi sequenciado e foram observadas regiões conservadas homólogas ao genoma humano. Isto a torna um organismo precioso para o entendimento de diversas doenças humanas e mecanismos genéticos por trás destas, pois cerca de 75% dos genes associados a doenças possuem ortólogos funcionais nesse modelo animal (KETCHUM et al., 2000).

A *Drosophila* possui um ciclo de vida rápido, levando cerca de 10 dias para ir da fase embrionária até a fase adulta num ambiente controlado a 25°C. O estágio inicial de desenvolvimento ocorre dentro dos ovos, que eclodem em larvas. O período larval se divide em três estágios (1º, 2º, 3º). Ocorre então uma fase intermediária entre a fase larval e a fase adulta da mosca, passando a formar uma pupa, que eclode num indivíduo adulto (**Figura 1**). As moscas geram grande número de descendentes em um único cruzamento, além de serem de fácil manutenção e baixo custo (DUFFY, 2002).

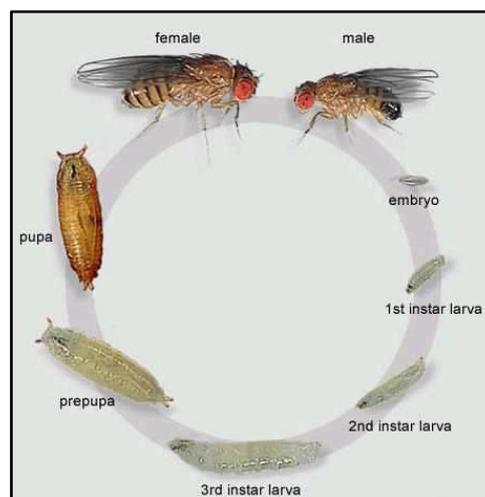


Figura 1: Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*
<<http://drosophila-m.blogspot.com/2007/11/ciclo-de-vida.html>>.

Existem atualmente bancos de estoque de *Drosophila melanogaster*, como o *Bloomington* nos Estados Unidos, que mantém disponíveis linhagens de moscas transgênicas, mantidas e classificadas conforme sua aplicação e construção gênica (COOK et al., 2010).

A utilização do sistema de expressão gênica GAL4/UAS possibilita a obtenção de organismos transgênicos que se aplicam a diferentes áreas de estudo. Neste sistema, é inserido no genoma da mosca a sequência para produção de GAL4, um fator de transcrição de levedura, e uma sequência de ativação antecedente (UAS), que atua como região promotora de um gene de interesse. No indivíduo transgênico, ocorrerá a expressão de GAL4 em algum tecido determinado por um gene repórter, e então o fator de transcrição irá se ligar em UAS e promover a expressão do gene de interesse (DUFFY, 2002).

1.4. Detecção de atividade anti-inflamatória em *Drosophila melanogaster*

Utilizando o sistema GAL4/UAS foi possível desenvolver modelos para estudar as mais diferentes condições fisiológicas e estabelecer testes de tratamentos farmacológicos. Dentre as linhagens transgênicas disponíveis, encontra-se a *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger. Esta mosca tem fenótipo de olho reduzido, devido ao não desenvolvimento da região ocular ao longo da metamorfose da mosca (IGAKI et al., 2002). Este fenótipo se dá pela superexpressão de eiger na região ocular devido à sequência repórter GMR (Glass Multiple Reporter) (LI et al., 2012). Eiger é uma citocina ortóloga ao TNF- α humano, logo induz um processo de morte celular mediado pela via ortóloga a via c-Jun N-terminal quinase (JNK) (BASLER, 2002).

A inflamação é a primeira resposta do organismo a um dano tecidual. Esta reação tem por objetivo destruir, remover ou isolar os estímulos lesivos e iniciar o reparo do local afetado, portanto, é um mecanismo de defesa. Citocinas inflamatórias são necessárias para que todo o processo ocorra, desde sua ativação até os reparos teciduais após a inflamação.

Estes mediadores podem ser controlados para ajudar no tratamento de doenças onde essa resposta está exacerbada, aliviando sintomas como dor, calor e vermelhidão, e possibilitando que o organismo repare os danos gerados pela inflamação (ROBBINS, 2008).

O TNF- α (Fator de Necrose Tumoral) faz parte do conjunto de moléculas envolvidas na resposta inflamatória. Esta citocina é capaz de se ligar a receptores (TNF-R) presentes na membrana da maioria das células do organismo, desencadeando vias bioquímicas, como a JNK, mediando a morte celular (CHEN; GOEDDEL, 2002). No tecido inflamado, altos níveis de TNF- α são encontrados devido a seus papéis centrais como mediador da atividade inflamatória e imunidade, ativando também a via NF- κ B (PASPARAKIS et al., 1996).

Sendo assim, a linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger viabiliza-se para estudos de morte celular e inflamação, sendo um modelo para testes de compostos anti-inflamatórios, visualizando-se recuperação parcial da região dos olhos das moscas quando tratadas com alguma molécula anti-inflamatória, indicando inibição da ativação da via JNK de morte celular (RODRIGUES, 2017).

A busca de novas moléculas com capacidade anti-inflamatória em produtos naturais deve ser explorada. Dado todo este contexto, levando em conta a composição química do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg, torna-se necessário testar a atividade anti-inflamatória de tal óleo *in vivo*, utilizando-se nesse estudo o modelo de *Drosophila melanogaster* transgênica, caracterizando assim um estudo sobre a atividade biológica de um composto natural, utilizando um modelo em acordo com os entendimentos atuais de redução de utilização de roedores.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do óleo essencial das folhas secas de Araçá-roxo extraídas em período de chuva e de seca, utilizando linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger como organismo modelo de inflamação, com superexpressão do gene eiger nos olhos.

2.2. Objetivos específicos

- Selecionar veículo a ser utilizado para o tratamento da linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-Eiger.
- Definir as concentrações para o tratamento das moscas com óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg extraído em período de seca e de chuva;
- Verificar, por meio de teste de sobrevivência, a toxicidade do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg extraído em período de seca e de chuva, para a linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger;
- Avaliar a inibição da ação apoptótica de Eiger nos olhos das moscas tratadas, em comparação com moscas não tratadas, através de quantificação da área dos olhos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética (LABGEN) e no Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LABITOX) do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

O óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg foi obtido por Dias (2019), extraído de folhas secas coletadas em período de seca e de chuva no Jardim Indaia na cidade de Uberlândia, Estado de Minas Gerais, Brasil, em setembro de 2017 às 11:00 a.m, e em fevereiro de 2018 às 11:00 a.m.

3.1. Modelo experimental

Foi utilizado como modelo experimental a linhagem de *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger, cedida gentilmente pelo professor Dr. Carlos Ueira do Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia. As moscas foram mantidas no Laboratório de Genética em estufa BOD na temperatura de 25 °C com fotoperíodo de 12:12 horas de claro escuro.

As moscas permaneceram em frascos de vidro, autoclavados, contendo meio de cultivo a base de fubá. O meio é preparado aquecendo uma mistura de água (150 mL), levedura (2,7 g) farinha de soja (1,5 g), fubá (10,95 g), ágar (0,9 g), xarope de glicose (11,55 g), e solução ácida e solução de Nipagin com função bactericida e fungicida, respectivamente. Este meio serviu de substrato para alimentação, suporte e expansão da linhagem. O preparo foi realizado a cada 14 dias e as moscas transferidas para os frascos contendo novo meio no dia posterior.

Para a realização dos testes com o óleo essencial utilizou-se o modelo de tratamento no qual as larvas na fase L3 são coletadas e então transferidas para um meio preparado com o tratamento. O óleo essencial utilizado foi extraído das folhas secas de *Psidium myrtoides* O. Berg nos períodos de seca e de chuva por Dias (2019), como citado anteriormente, em trabalho realizado no Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia. A **Figura 2** demonstra a sequência de eventos do teste para detecção de atividade anti-inflamatória.

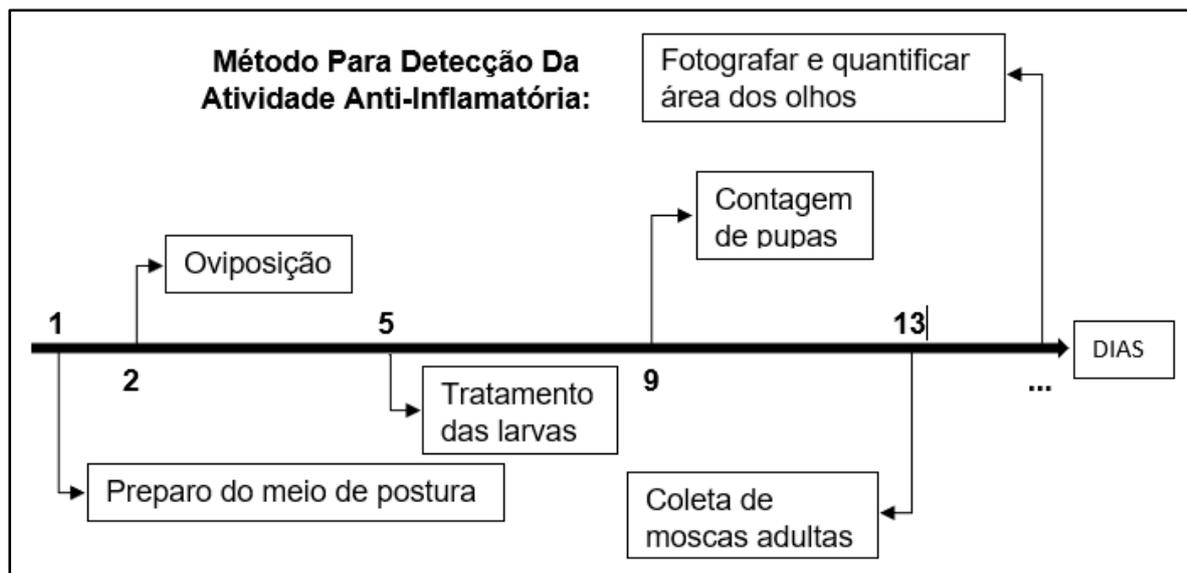


Figura 2: Cronograma de eventos para tratamento e análise da linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger.

3.1.1. Preparo do meio de postura

O meio de postura foi preparado com fermento biológico fresco suplementado com sacarose. Foram utilizados frascos de vidro para sustentar o meio, nos quais foi preparada uma base de ágar 4%. O fermento foi aquecido a 42°C em banho-maria e açúcar refinado foi adicionado até a mistura tornar-se líquida e homogênea. Uma colher de sopa desta mistura foi colocada em cada frasco para oviposição, e os mesmos foram guardados até o dia posterior. Foram utilizados 3 frascos de oviposição em cada teste realizado.

3.1.2. Oviposição

As moscas da linhagem modelo foram transferidas para os frascos de postura às 08:00 horas, e retiradas às 16:00 horas, portanto realizando 8 horas de oviposição.

3.1.3. Tratamento das larvas L3

Ao atingir a fase L3, 72 horas após a oviposição, as moscas foram coletadas. Água destilada foi utilizada para solubilizar o meio de postura com as larvas, e coletou-se com auxílio de uma peneira e pincel escolar. A diferença no tempo de vida das larvas, decorrentes das 8 horas de oviposição, é um período considerável, dado o curto ciclo de vida destes

organismos, por isso, o tratamento é realizado as 12:00 h, sendo este o horário médio de nascimento das moscas, portanto foram tratadas as larvas no estágio L3 com diferença no tempo de vida de 4 horas para mais ou para menos.

O meio de tratamento foi preparado com 2g de purê de batata instantâneo Yoki, dissolvido em 5 mL de solução contendo água ultrapura (MiliQ) + veículo + solução de tratamento, em *Vials* (frascos) de acrílico.

Inicialmente, foi testada a toxicidade nas moscas de diferentes solventes para o óleo essencial (Tween 80, dimetilsulfóxido ou DMSO e etanol) buscando verificar qual seria o ideal para prosseguimento dos testes. As concentrações de cada solvente foram determinadas com base em outros estudos com *Drosophila* no qual utilizou-se cada um destes compostos. Foram utilizadas as concentrações de 0,2%; 0,1%; 0,05%; 0,025%; 0,0125% de Tween 80 (IDAOMAR et al., 2001), 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25% de DMSO (CVETKOVIĆ et al., 2016), e 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625% de etanol (GEER et al., 1988).

O teste com o óleo essencial iniciou-se com a fração extraída em período de chuva. Como não haviam testes anteriores com este óleo em *Drosophila melanogaster*, as concentrações de tratamento foram determinadas com base em estudos que realizaram testes de óleos essenciais de outras plantas em outras linhagens de *Drosophila melanogaster* (IDAOMAR et al., 2001). Desta forma, foram testadas as concentrações de 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mg/mL de meio. Após a obtenção dos resultados realizou-se o teste nas mesmas concentrações para a fração do óleo essencial extraída no período de seca.

Foram utilizadas 40 larvas em cada tratamento, contadas e colocadas separadamente em *Vials* contendo o composto teste, com volume total de 5 mL de meio de purê de batata. Foram também preparados *Vials* controles, contendo apenas água, e um contendo água + Tween 80. Os recipientes foram tampados e guardados na estufa BOD.

3.1.4. Contagem das pupas

As larvas que passaram para o estágio de pupa após o tratamento foram contadas para obtenção de dados de padrão de sobrevivência das moscas, e este parâmetro permitiu definir o veículo utilizado e avaliar a toxicidade do tratamento.

3.1.5. Coleta de moscas adultas

Após a eclosão das moscas, as mesmas foram anestesiadas com éter etílico, contadas e então fixadas em etanol 70%, conservando assim a morfologia do olho das moscas para serem fotografados posteriormente.

3.1.6. Captura de imagem e mensuração da área olhos

O olho direito e esquerdo de cada mosca foi fotografado com auxílio de um microscópio estereoscópico (Nikon SMZ 800) com zoom de 3X, acoplado a uma câmera digital e utilizando o software IC Capture. As fotos foram utilizadas para mensurar a área dos olhos das moscas, que foi quantificada utilizando-se o software ImageJ. Para isso, definiu-se a escala de tamanho no programa através da foto de uma lâmina graduada, e então a área de cada olho foi selecionada e mensurada. Apenas regiões vermelhas foram consideradas como olho, e, portanto, esta região foi a selecionada.

3.2. Análise estatística

O Graph Pad Prism foi o software utilizado para se obter os dados estatísticos do trabalho. Testes de variância e de comparação múltipla foram necessários para a comparação entre o grupo controle não tratado (água) e os demais tratamentos, para assim averiguar diferença estatística que comprove atividade do composto utilizado ($p < 0,05$ teste *Kruskal-Wallis* para múltiplas comparações).

4. RESULTADOS

4.1 Teste de veículos

As moscas submetidas a tratamento com os veículos Tween 80, DMSO e etanol, foram contadas na fase de pupas e após a eclosão dos adultos. Foram tratadas 40 larvas no terceiro estágio (L3). Os resultados são apresentados no **Gráfico 1**.

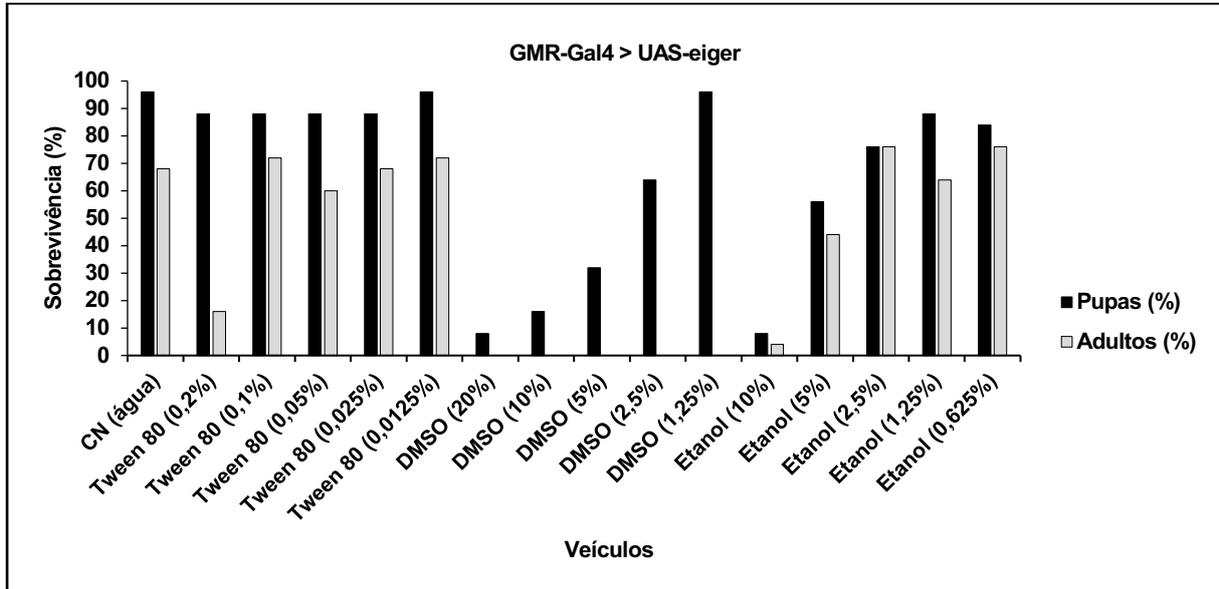


Gráfico 1: Sobrevivência da linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger submetida a tratamento com diferentes opções de solventes para o óleo essencial de araçá-roxo.

Pode ser observado que o tratamento com Tween 80 nas concentrações utilizadas não interfere na sobrevivência das larvas e na formação de pupas, porém a concentração de 0,2% deste composto promoveu redução na quantidade total de moscas adultas. O composto DMSO foi tóxico para as larvas e pupas em todas as concentrações utilizadas nesta linhagem durante este estudo. O etanol foi letal na dose de 10%, afetou levemente a sobrevivência da linhagem em 5%, e não foi observado alteração no padrão de sobrevivência em doses menores que 2,5%.

4.2 Tratamento com óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg

O tratamento com a fração de óleo essencial extraído das folhas de *Psidium myrtoides* O. Berg no período de chuva (FC 30) foi realizado com 40 larvas L3, e foi verificado o parâmetro de sobrevivência das moscas, conforme o **Gráfico 2**. O resultado de área dos olhos

para esta mesma fração é demonstrado no **Gráfico 3**, que traz a análise estatística de comparação entre o grupo controle (água) com os demais grupos com significância $p < 0,05$.

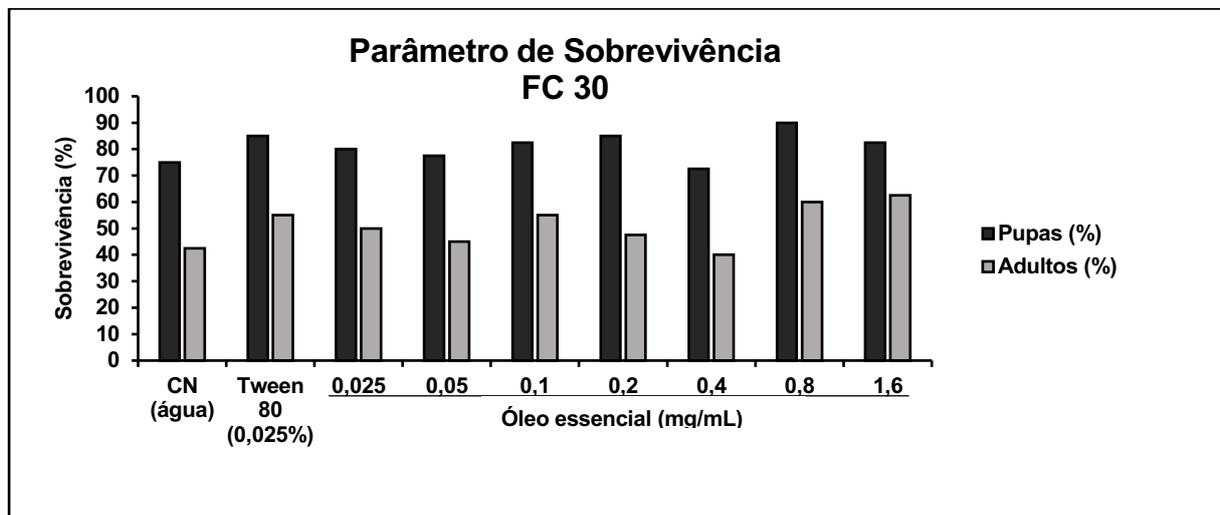


Gráfico 2: Sobrevivência da linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger submetida a tratamento com óleo essencial de *Psidium myrtooides* O. Berg extraído em período de chuva (FC 30) em diferentes concentrações e dos grupos controle (água e Tween 80).

Pode ser observado que, em comparação as moscas que não foram tratadas, identificadas como controle negativo (água), não houve alteração no padrão de sobrevivência das moscas tratadas com o óleo essencial ou apenas com o veículo.

Moscas tratadas apenas com o veículo não apresentaram recuperação ocular, comprovando que o mesmo não interfere na via induzida à superexpressão nesta linhagem. Os tratamentos nas concentrações de 0,025 mg/mL, 0,05 mg/mL, e 0,1 mg/mL não foram eficazes para uma recuperação visível, já as moscas tratadas com as concentrações de 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,8 mg/mL e 1,6 mg/mL apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$ teste *Kruskal-Wallis* para múltiplas comparações) quando comparadas as moscas do controle negativo, conforme apresentado no Gráfico 3. O painel de imagens a seguir (**Figura 3**) demonstra parte dos resultados obtidos.

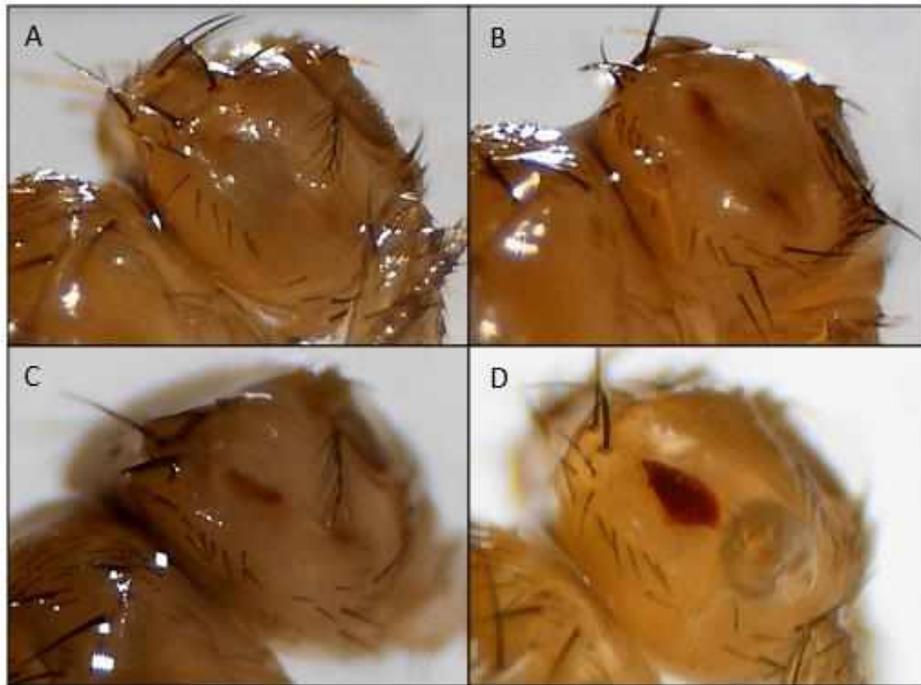


Figura 3: (A) Controle negativo – água; (B) Controle negativo – água + veículo; (C) 0,025 mg/mL; (D) 1,6 mg/mL.

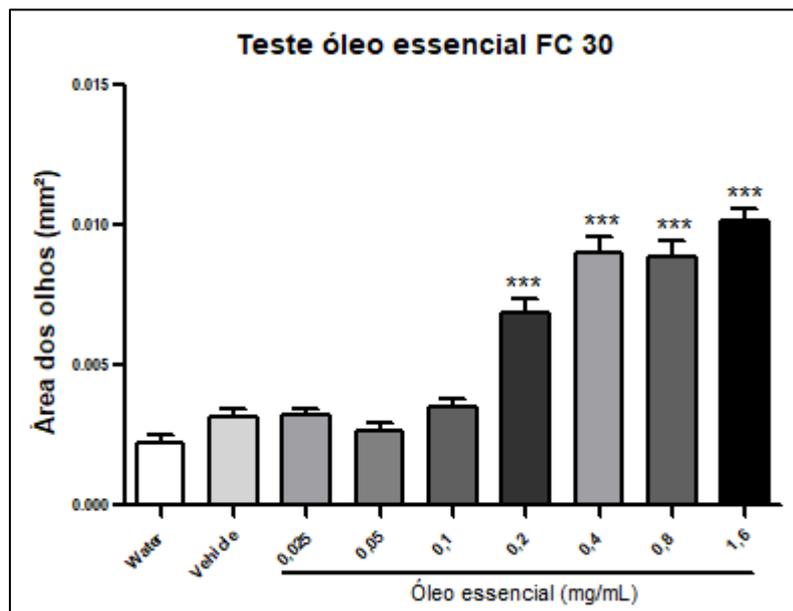


Gráfico 3: Quantificação da área dos olhos de moscas tratadas com óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg extraído em período de chuva (FC 30), tratadas com veículo e não tratadas (controle negativo – water). *** Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$ teste *Kruskal-Wallis* para múltiplas comparações).

A outra fração utilizada (FC 22), extraída no período de seca, foi analisada da mesma forma que a anterior, com o objetivo de se verificar possíveis diferenças nas atividades

intrínsecas ao composto. O **Gráfico 4** demonstra o parâmetro de sobrevivência da linhagem, enquanto o **Gráfico 5** refere-se a análise da área dos olhos das moscas deste tratamento.

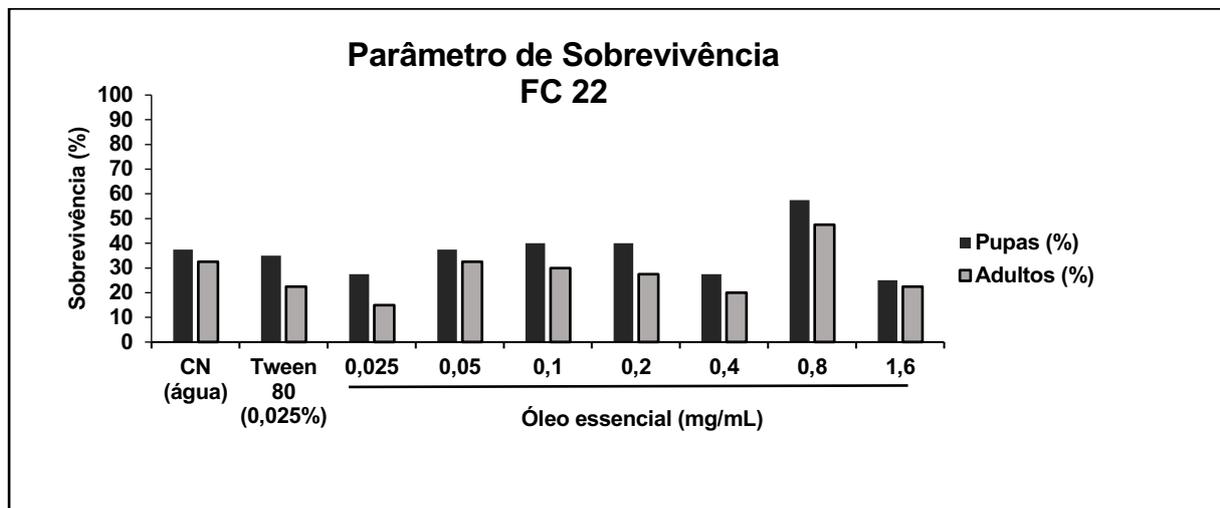


Gráfico 4: Sobrevivência da linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger submetida a tratamento com óleo essencial de *Psidium myrtooides* O. Berg extraído em período de seca (FC 22) em diferentes concentrações e dos grupos controle (água e Tween 80).

A sobrevivência das moscas tratadas comparadas ao controle negativo manteve-se estável, entretanto a linhagem como um todo teve menor sucesso para atingir a fase adulta, indicando a possibilidade de interferência por contaminação do meio que pode fragilizar a linhagem, portanto indica-se refazer este teste.

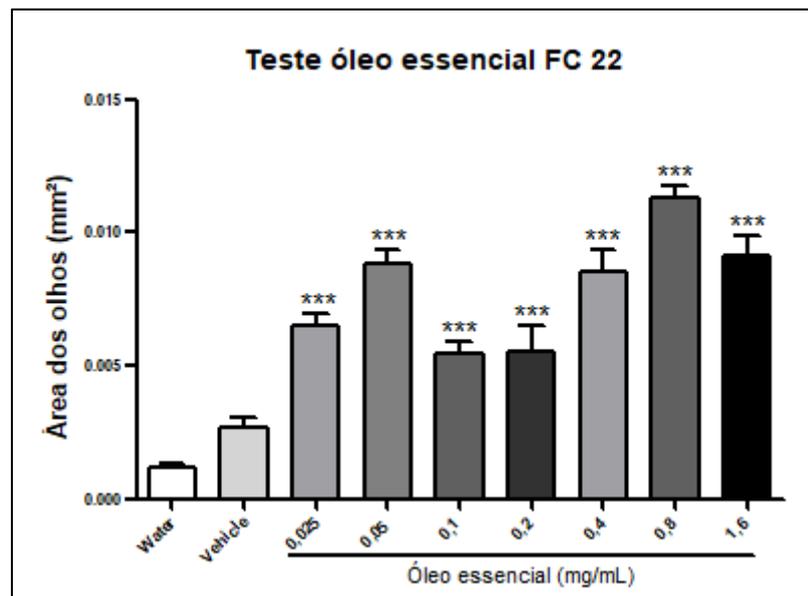


Gráfico 5: Quantificação da área dos olhos de moscas tratadas com óleo essencial de *Psidium myrtooides* O. Berg extraído em período de seca (FC 22), tratadas com veículo e não tratadas (controle negativo – water). *** Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$ teste *Kruskal-Wallis* para múltiplas comparações).

A fração do óleo essencial FC 22 apresentou um padrão de recuperação dos olhos das moscas diferente do observado para a FC 30. Em todas as concentrações de tratamento utilizadas, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$ teste *Kruskal-Wallis* para múltiplas comparações) no tamanho dos olhos das moscas comparadas com o controle negativo. Novamente foi testado apenas o veículo para comprovar que o mesmo não interferiu no teste, e foi observado o esperado. A Figura 4 traz o painel de imagens das moscas tratadas com esta fração do óleo essencial.

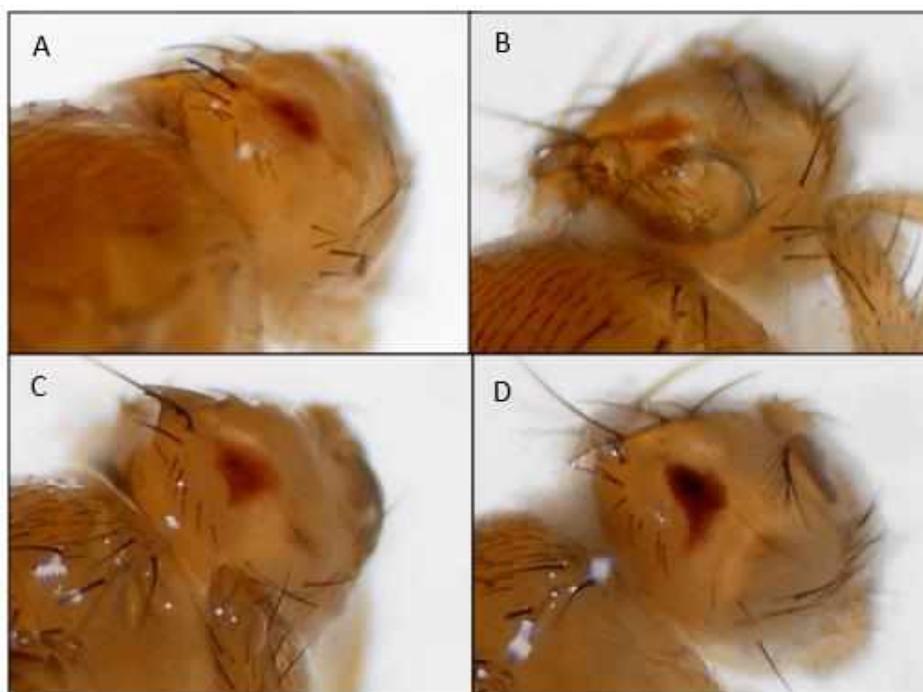


Figura 4: (A) Controle negativo – água; (B) Controle negativo – água + veículo; (C) 0,025 mg/mL; (D) 1,6 mg/mL

5. DISCUSSÃO

Diversos produtos naturais apresentam potenciais biológicos de interesse à utilização humana, o que torna este um extenso campo para pesquisa e aplicação biotecnológica. No presente trabalho foi avaliada a potencial ação anti-inflamatória do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg, sendo esta atividade confirmada em teste com a utilização de linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster*. A caracterização química deste óleo essencial

demonstra que o mesmo possui moléculas com potencial anti-inflamatório, vindo este trabalho confirmar tal atividade e somar aos resultados obtidos em diferentes trabalhos que utilizaram o mesmo composto (FERNANDES et al., 2018).

A escolha de Tween 80 como veículo padrão para tratamento da linhagem foi realizada com base nos resultados obtidos do teste de sobrevivência da linhagem utilizada, considerando também a capacidade do veículo de solubilizar o óleo essencial, sendo confirmado nos testes posteriores não haver interferência do Tween 80 no desenvolvimento da linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger. Isto nos leva a conclusão de que os resultados apresentados para o tratamento desta linhagem com o óleo essencial devem-se ao fato de os metabólitos secundários deste óleo apresentarem potencial anti-inflamatório.

O óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg não apresentou toxicidade para a linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-Eiger, verificado pelo teste de sobrevivência da linhagem. Desta forma podemos afirmar que este é um composto de baixo risco e baixa toxicidade, sendo um ótimo produto para utilização em estudos posteriores e busca por novas moléculas terapêuticas.

Foi observada recuperação parcial da área dos olhos nas moscas adultas tratadas com o óleo essencial comparadas as moscas não tratadas, tanto para o óleo extraído no período de chuva como no de seca. Isto demonstra que a atividade de morte celular induzida pela superexpressão de Eiger nos olhos das moscas foi reduzida através da exposição crônica das larvas L3 ao óleo essencial, sinalizando que o tratamento tem capacidade de inibir a ativação da via c-Jun N-terminal quinase induzida pela citocina.

Contudo, não foi observado o mesmo padrão de recuperação para as duas frações de óleo testadas. Trata-se de um produto natural, e existem várias moléculas constituintes dos óleos voláteis (BAKKALI et al., 2008). As alterações climáticas ao longo do ano interferem

no metabolismo secundário das plantas, tornando a composição fitoquímica destas, diferente no período chuvoso em relação ao período de seca (CHAVES, 2012).

Conforme a **Tabela 1** e **Tabela 2** demonstram, a composição química dos óleos essenciais extraídos no período de chuva e de seca é diferente, tanto na quantidade de cada metabólito secundário quanto em sua composição. A quantidade de α -bisabolol por exemplo apresentou um aumento de 72% no período de chuva em relação ao período seco, enquanto a muuorola-4,10(14)dien-1- β -ol teve um acréscimo de 84% nesse mesmo período. A presença das moléculas de globulol, cubenol, cariofila-4(12),8(13)-dien-5- α -ol, e selina-3,11-dien-6- α -ol ocorrem exclusivamente durante o período de seca, sendo neste período também observado um acréscimo de 70% na quantidade de aromadandreno. Estas diferenças na composição dos óleos extraídos em diferentes estações justifica as diferenças de perfil dos gráficos de recuperação dos olhos das moscas tratadas com o óleo de diferentes épocas, indicando que as moléculas cujas concentrações diferem devem ser melhor analisadas para uma compreensão mais apurada de suas atividades biológicas e possíveis aplicações terapêuticas anti-inflamatórias.

Como existem moléculas sabidamente anti-inflamatórias presentes no composto testado, e sabendo que o ortólogo de Eiger, TNF, é uma citocina pró-inflamatória que ativa a via NF- κ B (IGAKI; MIURA, 2014) em mamíferos, podemos afirmar que a recuperação observada da região ocular das moscas tratadas com óleo essencial confirma o potencial anti-inflamatório deste produto, um fator importante a ser somado às demais descobertas recentes sobre o mesmo óleo essencial.

6. CONCLUSÃO

A busca por novos compostos e moléculas com potencial terapêutico nos produtos naturais é um dos campos de pesquisa mais amplos e importantes neste século, devido a

imensa biodiversidade no nosso planeta, subutilizada e extremamente degradada. O óleo essencial de Araçá-roxo tem demonstrado potencial para aplicação em produtos industrializados por suas atividades antifúngica (FERNANDES et al., 2018) e antibiótica (DIAS et al., 2018), e este trabalho vem fomentar o potencial deste composto dando luz a mais uma atividade biológica para o mesmo.

O tratamento com óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg foi capaz de recuperar parcialmente a área dos olhos da linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster* GMR-GAL4 > UAS-eiger em todas as concentrações testadas para a fração extraída no período de seca, e nas concentrações acima de 0,2 mg/mL do óleo extraído no período chuvoso do ano, sendo assim, confirma-se a atividade anti-inflamatória investigada neste trabalho.

No mais, o modelo de experimento utilizado, alternativo à experimentação com mamíferos, demonstrou ser de ampla capacidade, barato, rápido, tornando este um modelo crucial para o desenvolvimento científico.

Desta forma, tem-se a perspectiva de aprofundamento das pesquisas a partir dos resultados apresentados no presente trabalho, devendo-se realizar testes posteriores em modelos mais apurados para comprovação do potencial anti-inflamatório do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg em mamíferos, além de avaliação da atividade das moléculas deste óleo isoladamente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, n. 5461, p. 2185–2195, 2000.
- ALVARENDA, F. . et al. Atividade Antinociceptiva e Antimicrobiana da Casca do Caule de *Psidium Cattleianum* Sabine. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1125–1133, 2015.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BASLER, K. Evolution of TNF Signaling Mechanisms: JNK-Dependent Apoptosis Triggered by Eiger, the. **Current**, v. 12, n. 02, p. 1263–1268, 2002.
- CADAVAL, L. et al. Mata Atlântica brasileira: Os desafios para a conservação da biodiversidade de um hotspot mundial. n. January, p. 28, 2006.
- CHAVES, T. P. Variação sazonal na produção de metabólitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do semiárido brasileiro. **UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**, p. 0–77, 2012.
- CHEN, G.; GOEDDEL, D. V. TNF-R1 Signaling : A Beautiful Pathway The Fas Signaling Pathway : More Than a Paradigm. **Science**, v. 296, n. May, p. 1634–1635, 2002.
- CLARDY, J.; WALSH, C. Clardy & Walsh, 2004. **Nature**, v. 432, n. December, p. 829–837, 2004.
- COOK, K. R. et al. New research resources at the Bloomington *Drosophila* Stock Center. **Fly**, v. 4, n. 1, p. 88–91, 2010.
- CVETKOVIĆ, V. J. et al. Toxicity of dimethyl sulfoxide against *Drosophila melanogaster*. **Biologica Nyssana**, v. 6, n. 2, p. 91–95, 2016.
- DIAS, A. L. B. et al. Chemical composition and in vitro antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae). **Natural Product Research**, n. April, p. 1–5, 2018.
- DIAS, R. F. C. Estudo da composição química e atividades biológicas do óleo volátil da *Psidium myrtoides* O . Berg (Araçá-roxo) Estudo da composição química e atividades biológicas do óleo volátil da *Psidium myrtoides* O . Berg (Araçá-roxo). **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**, 2019.
- DUFFY, J. B. GAL4 system indrosophila: A fly geneticist’s swiss army knife. **Genesis**, v. 34, n. 1–2, p. 1–15, 2002.
- FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, 27 ago. 2007.
- FERNANDES, H. R. et al. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial das folhas do *Psidium myrtoides* O . Berg) contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. p. 26–28, 2018.

- FRANZON, R. C.; SOUSA-SILVA, L. Z. DE O. C. C. E. B. P. J. C. Araças do Gênero. **Araças do Gênero Psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos**, p. 48, 2009.
- GEER, B. W. et al. Induction of alcohol dehydrogenase by ethanol in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Nutrition**, v. 118, n. 3, p. 398–407, 1988.
- GUNN, J. et al. 2, 3, v. 7, n. 3, p. 1–57, 2016.
- IDAOMAR, M. et al. Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 513, n. 1–2, p. 61–68, 2001.
- IGAKI, T. et al. Eiger, a {TNF} superfamily ligand that triggers the {D}rosophila {JNK} pathway. **Embo J.**, v. 21, n. 12, p. 3009–3018, 2002.
- IGAKI, T.; MIURA, M. The *Drosophila* TNF ortholog Eiger: Emerging physiological roles and evolution of the TNF system. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 3, p. 267–274, 2014.
- KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 1, p. 1–7, 2010.
- KETCHUM, K. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, n. March, p. 2185–2195, 2000.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147–155, 2005.
- LI, W. Z. et al. A broad expression profile of the GMR-GAL4 driver in *Drosophila melanogaster*. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 11, n. 3, p. 1997–2002, 2012.
- MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252–9287, 2010.
- PASPARAKIS, B. M. et al. the Humoral Immune Response. v. 184, n. October, 1996.
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.
- RODRIGUES, T. S. **AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO PEPTÍDEO SINTÉTICO pm26TGF- β 1, MIMÉTICO DE TGF- β 1 HUMANO, NA APOPTOSE INDUZIDA POR TNF- α EM *Drosophila melanogaster***. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2017.
- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40–53, 2013.