



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL,
ANTINOCICEPTIVA E ANTIOXIDANTE DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Eupatorium ayapana* Vent
(Asteraceae)**

ADEMAR SOARES MELO

Belém - PA

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL,
ANTINOCICEPTIVA E ANTIOXIDANTE DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Eupatorium ayapana* Vent
(Asteraceae)**

Autor: Ademar Soares Melo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane do Socorro Ferraz Maia

Co-Orientador: Prof. Dr. Pergentino José Cunha Souza

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Belém - PA

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

Melo, Ademar Soares

Avaliação neurocomportamental, antinociceptiva e antioxidante do Extrato Hidroalcoólico de *Eupatorium ayapana* Vent (Asteraceae) / Ademar Soares Melo; orientadora, Cristiane do Socorro Ferraz Maia, co-orientador, Pergentino José da Cunha Sousa. — 2012.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), 2012.

1.*Eupatorium ayapana*- Pesquisa. 2. Ansiedade. 3.Depressão. 4.Nocicepção
5.Estresse oxidativo. 6.Ratos 7.Camundongos– experimento. I. Título.

CDD: 615. 3210072

ADEMAR SOARES MELO

**AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL, ANTINOCICEPTIVA E
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Eupatorium
ayapana* Vent (Asteraceae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 30/03/2012

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Cristiane do Socorro Ferraz Maia
ORIENTADORA

Prof^a. Dr^a. Marta Chagas Monteiro- UFPA

Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger- UFSC

Belém -PA

2012

Eu dedico este trabalho as minhas filhas e principalmente a minha mãe que sempre me apoiou em todos os momentos.

Ademar Melo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me abençoar colocando pessoas queridas ao meu redor, que me fazem melhorar a cada dia como ser humano.

A minha mãe, Léa Soares Melo, por seu amor e dedicação imensuráveis.

As minhas filhas amadas, Aline Gabriele e Ana Clara, que me impulsionam a querer ser sempre um bom exemplo de honestidade e persistência em uma vida cheia de aprovações a serem conquistadas.

A Margareth Tavares, uma mulher muito especial, um presente que veio dar cores a minha vida e me fazer crescer como pessoa. Agradeço por seu amor e carinho.

Aos meus quatro irmãos, os quais são meus grandes amigos, Roberto, Rubens, Ronaldo e Alberto.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cristiane do Socorro Ferraz Maia, uma Professora querida pelos alunos e uma pesquisadora dedicada e incansável. Agradeço por seus ensinamentos inestimáveis, conselhos, paciência e confiança demonstrada a este aluno no decorrer do curso.

Ao Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Souza, por sua co-orientação.

A Prof^a. Dr^a. Marta Chagas, uma pessoa excepcional, pela imensa contribuição a este trabalho, pelos ensinamentos, e pelo espaço cedido no Laboratório de Microbiologia sempre que foi necessário.

A Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Baetas, pela grande contribuição a este trabalho, por sua participação na Banca de Qualificação, por seus ensinamentos e correções devidas e acatadas, e a utilização do Laboratório de Bromatologia.

Ao Prof. Dr. José Luis Vieira, por orientações dadas, quando solicitado e por ter cedido o Laboratório de Toxicologia para experimentos do Estresse Oxidativo.

Aos amigos Fabrício, Bruno e Andressa pelo grande apoio no decorrer do curso

Aos amigos Fábio Oliveira e Gedeão, pela ajuda e solicitude sempre que necessária.

Ao sr. João, por seu apoio nos testes de nocicepção e no cuidado dos animais.

A Thaysa, Amanda e Kelly, por sua grande ajuda nos testes de Estresse Oxidativo.

Aos alunos da Iniciação Científica. Agradeço a Sabrina, Joseane, Rui, João, Tiago, Everton e Jonny.

Ao Instituto Evandro Chagas e ao Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA, pelo fornecimento de animais.

Faça as coisas o mais simples que
você puder, porém não as mais
simples.

Albert Einstein

RESUMO

O *Eupatorium ayapana* Vent., da família Asteraceae, conhecida popularmente como japana é utilizada em infusões, decocção, banhos e chá, com ação sedativa, febrífuga, estimulante e tônica, utilizada também no combate à insônia, dor de cabeça, dor de garganta, diarreia, etc., sendo muito utilizada pela população amazônica. Este estudo avaliou a ação de diferentes doses do extrato hidroalcoólico de *Eupatorium ayapana* Vent (EHAEA) sobre o comportamento de ratos Wistar, na faixa etária de 2 meses. Foram utilizados 8 grupos de ratos machos (n= 7-10), divididos em controle, droga padrão de ação ansiolítica (diazepam), droga padrão de ação antidepressiva (fluoxetina) e 5 doses do extrato (100, 200, 400, 600, 800 mg/Kg), que foram solubilizados com tween 80 a 1%. A administração do extrato foi realizada de forma aguda por gavagem. No teste de toxicidade oral realizado, verificou-se que o extrato não é tóxico. Os testes comportamentais utilizados foram: o campo aberto, o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e o nado forçado. Após os testes comportamentais foi realizada a coleta de sangue na região do plexo retro-orbital dos ratos, para avaliação dos níveis de estresse oxidativo como: Capacidade Antioxidante Total, malondialdeído (MDA) e NO, e também a ação antioxidante total do EHAEA. Os resultados obtidos no teste do campo aberto demonstraram atividade do tipo ansiolítica, resultado confirmado com o teste do LCE. No teste do Nado Forçado, o EHAEA demonstrou ação do tipo antidepressiva. Nos testes de nocicepção, o qual se utilizou camundongos, ocorreu atividade antinociceptiva no teste de contorção abdominal induzido, nas doses de 200, 400, 600 e 800 mg/Kg. Na avaliação da bioquímica oxidativa, observou-se que não ocorreu dano oxidativo nos grupos tratados com o EHAEA, os níveis de NO permaneceram inalterados nas doses de 200, 400 e 600 mg, e a capacidade antioxidante total mostrou-se aumentada. Com estes resultados apresentados, o presente trabalho pretende contribuir com futuros trabalhos, haja vista, serem escassos os trabalhos na área comportamental, de nocicepção e estresse oxidativo com esta espécie vegetal, e que estudos posteriores possam reforçar o uso do extrato da japana na medicina popular.

Palavras-chave: *Eupatorium ayapana*; ansiedade; depressão; nocicepção; estresse oxidativo, ratos, camundongo.

ABSTRACT

The *Eupatorium ayapana* Vent., Family Asteraceae, popularly known as japana is used in infusions, decoctions, baths and tea, with sedative, febrifuge, stimulant and tonic, also used to combat insomnia, headache, sore throat, diarrhea, etc., commonly used by the Amazonian population. This study evaluated the effect of different doses of hydroalcoholic extract of *Eupatorium ayapana* Vent (EHAEA) on the behavior of Wistar rats, aged 2 months. We used eight groups of rats (n = 7-10) that were divided into control, standard drug action anxiolytic (diazepam), standard drug action antidepressant (fluoxetine) and five doses of the extract (100, 200, 400, 600, 800 mg/kg) which were solubilized with 1% tween 80. The administration of the extract was performed acutely by gavage. In oral toxicity test, it was found that the extract is not toxic. The behavioral tests were used: the open field, the elevated plus maze (EPM) and forced swimming. After the behavioral tests were performed to collect blood in the retro-orbital plexus of rats to assess the levels of oxidative stress such as Total Antioxidant Capacity, MDA and NO, and also the total antioxidant EHAEA. The results obtained in the open field test showed anxiolytic-like activity, a result confirmed in the LCE. In the forced swimming test, the EHAEA showed antidepressant action of any kind. In tests of nociception, which was used mice occurred in antinociceptive abdominal writhing test in doses of 200, 400, 600 and 800 mg/kg. In evaluating the biochemical oxidation, it was observed that there was no oxidative damage in the treated groups EHAEA, NO levels were unchanged at doses of 200, 400 and 600 mg total antioxidant capacity was shown to be increased. With these results, this paper aims to contribute to future work, have seen, are few studies in the behavioral area, in nociception and oxidative stress in this plant species, and that further studies may enhance the use of the extract in folk medicine japana .

Keywords: *Eupatorium ayapana*; anxiety; depression; nociception; oxidative stress; rats, mice.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Folha de <i>Eupatorium ayapana</i> Veut.....	23
Figura 02	<i>Eupatorium ayapana</i> Veut.....	24
Figura 03	Etapas da Peroxidação lipídica	35
Figura 04	Dano oxidativo em macromoléculas biológicas.....	37
Figura 05	Reações importantes para a produção e defesa contra radicais livres em neurônios.....	37
Figura 06	Mecanismo de transmissão e percepção da dor.....	40
Figura 07	Arena para a realização do teste do campo aberto.....	48
Figura 08	Labirinto em cruz elevado.....	49
Figura 09	Teste do nado forçado: Ilustração representativa do tanque cilíndrico para indução do nado forçado.....	51
Figura 10	Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formalina 1%.....	55
Figura 11	Procedimento para determinação da capacidade antioxidante total.....	58
Figura 12	Procedimento para determinação das concentrações de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	59
Figura 13	Procedimento para detecção de óxido nítrico.....	60
Figura 14	Efeito do tratamento oral com o EHAEA no teste de campo aberto (número total de quadrantes cruzados) em ratos adultos.....	62
Figura 15	Efeito do tratamento oral com o EHAEA no teste do campo aberto (% de quadrantes centrais cruzados/quadrantes totais cruzados) em ratos adultos.....	63
Figura 16	Efeito do tratamento com o EHAEA no teste de campo aberto (% tempo no quadrante central/tempo total) em ratos adultos.....	64
Figura 17	Efeito do tratamento com o EHAEA no teste do campo aberto (número de exploração vertical- <i>rearing</i>) em ratos adultos.....	65
Figura 18	Efeito do tratamento com o EHAEA no teste do campo aberto	66

	quanto ao número de <i>groomings</i> em ratos adultos.....	
Figura 19	Efeito do tratamento com o EHAEA no teste do campo aberto (número de bolo fecal) em ratos adultos.....	67
Figura 20	Efeito do tratamento com o EHAEA no teste do LCE (% EBA) em ratos adultos.....	68
Figura 21	Efeito do tratamento com o EHAEA nas entradas nos braços fechados no teste do LCE (EBF) em ratos adultos.....	69
Figura 22	Efeito do tratamento com o EHAEA no teste do LCE (%TBA) em ratos adultos.....	70
Figura 23	Efeito do tratamento com o EHAEA no teste do nado forçado (tempo de imobilidade) em ratos adultos.....	71
Figura 24	Efeito do tratamento oral com o EHAEA (100, 200, 400, 600 e 800 mg/Kg) ou indometacina (5 mg/Kg) sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraperitoneal de solução de ácido acético 0,6%.....	72
Figura 25	Efeito do tratamento com o EHAEA (200, 400, 600 e 800 mg/Kg, v.o.) ou morfina (10mg/Kg, s.c.) sobre o estímulo nociceptivo térmico induzido em camundongos.....	73
Figura 26	Efeito do tratamento com o EHAEA (200, 400, 600 e 800 mg/Kg, v.o.) sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de solução de formalina a 1%, na 1ª fase, no teste da formalina.....	74
Figura 27	Efeito do tratamento com o EHAEA (200, 400, 600 e 800 mg/Kg, v.o.) sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de solução de formalina a 1%, na 2ª fase.....	75
Figura 28	Efeito do pré-tratamento com o naloxona no EHAEA (200, 400, 600 e 800 mg/Kg, v.o.) sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de solução de formalina a 1% na 1ª fase.....	76
Figura 29	Dosagem da capacidade antioxidante total (TEAC), nos grupos tratados com o EHAEA (200 e 400 mg/Kg); grupo controle salina e controle basal, com resultados expressos em	77

	$\mu\text{mol/L}$	
Figura 30	Níveis de MDA encontrados no plasma dos animais tratados com o EHAEA (100, 200, 400, 600 e 800 mg/Kg); grupo control salina; grupo basal, resultados expressos em nmol/L.....	78
Figura 31	Concentração de nitritos e nitratos presentes nos grupos tratados com o EHAEA (100, 200, 400, 600 e 800 mg/Kg); grupo controle salina e grupo controle basal, os resultados foram expressos em mmol/L.....	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 01	Principais atividades farmacológicas do EHAEA em diversos países.....	26
Quadro 02	Estrutura química de constituintes isolados de <i>Eupatorium ayapana</i>	28
Quadro 03	Produção e características das principais espécies reativas formadas no organismo.....	35
Quadro 04	Reagentes utilizados.....	45
Quadro 05	Esquema dos testes comportamentais.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbância
ABTS	2,2-Azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato]
ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
ALE	Atividade locomotora espontânea
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância de uma Via
AR	Avaliação de Risco
BK	Bradicinina
CEPAN-IEC	Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo animais do Instituto Evandro Chagas
CA	Capacidade Antioxidante
CID	Código Internacional de Doenças
d. C.	depois de Cristo
DZP	Diazepan
EHA	Extrato Hidroalcóolico
EHAEA	Extrato hidroalcoólico de <i>Eupatorium ayapana</i> Vent
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMEA	Extrato metanólico de <i>Eupatorium ayapana</i> Vent
EPM	Erro Padrão da Média
ERNs	Espécies Reativas do Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
FXT	Fluoxetina
GPS	Global Positioning System
INeC/USP	Instituto de Neurociências e Comportamento
Kg	Kilograma
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
MDA	Malondialdeído
MG	Miligrama
N	Número
NC	Número de quadrantes Centrais

NN	Nitritos e Nitratos
NO	Óxido Nítrico
NT	Número de quadrantes Totais
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pará
PGE	Prostaglandinas
RPM	Rotação por minuto
s. c.	sub-cutânea
SF	Soro fisiológico
SNC	Sistema Nervoso Central
TC	Tempo no quadrante Central
TNF	Teste do Nado Forçado
TT	Tempo Total
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TEAC	Capacidade Antioxidante Total
UFPA	Universidade Federal do Pará
v.o.	via oral

SUMÁRIO

1-	INTRODUÇÃO.....	18
1.1-	Plantas medicinais na medicina popular.....	18
1.2-	<i>Eupatorium ayapana</i>	20
1.2.1-	Família Asteraceae.....	20
1.2.2-	Gênero <i>Eupatorium</i>	21
1.2.3-	Espécie <i>Eupatorium ayapana</i> Vent.....	23
1.2.4-	Etnofarmacologia e Etnobotânica.....	25
1.2.5-	Fitoquímica.....	26
1.3-	Considerações gerais sobre transtornos do SNC.....	29
1.3.1-	Ansiedade.....	29
1.3.2-	Depressão.....	30
1.3.3-	Depressão X Estresse Oxidativo.....	32
1.4-	Estresse Oxidativo.....	32
1.4.1-	Radical livre.....	33
1.4.2-	Espécies reativas ao oxigênio (EROs) e ao nitrogênio (ERNs).....	33
1.4.3-	Peroxidação Lipídica.....	35
1.4.4-	Sistemas de Defesa Antioxidante.....	37
1.5-	Dor e Nocicepção.....	38
2-	OBJETIVOS.....	42
2.1-	Gerais.....	42
2.2-	Específicos.....	42
3-	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1-	Material vegetal.....	43
3.1.1-	Coleta do material botânico.....	43
3.1.2-	Preparo do material vegetal.....	43
3.1.3-	Preparação do extrato hidroalcoólico.....	44
3.2-	Avaliação Farmacológica	44
3.2.1-	Animais	44
3.2.2-	Drogas e Reagentes.....	45
3.2.3-	Avaliação da Toxicidade Oral Aguda.....	45

3.2.4-	Avaliação dos efeitos Neurocomportamentais.....	46
3.2.4.1-	Protocolo Experimental.....	46
3.2.4.2-	Teste do Campo Aberto.....	46
3.2.4.3-	Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	48
3.2.4.4-	Teste do Nado Forçado.....	50
3.2.5-	Avaliação da atividade Antinociceptiva.....	53
3.2.5.1-	Protocolo Experimental.....	53
3.2.5.2-	Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6%.....	53
3.2.5.3-	Teste da Placa Quente.....	54
3.2.5.4-	Teste da Formalina a 1%.....	54
3.2.6-	Bioquímica Oxidativa.....	56
3.2.6.1-	Avaliação da Capacidade Antioxidante Total.....	56
3.2.6.2-	Dosagem dos Níveis de Malondialdeído.....	58
3.2.6.3-	Dosagem de Nitratos e Nitritos.....	59
3.3-	Análise estatística.....	60
4-	RESULTADOS.....	61
4.1-	Toxicidade Oral Aguda.....	61
4.2-	Avaliação dos efeitos Neurocomportamentais.....	61
4.2.1-	Teste do Campo Aberto.....	61
4.2.2-	Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	67
4.2.3-	Teste do Nado Forçado.....	70
4.3-	Avaliação da Atividade Antinociceptiva.....	71
4.3.1-	Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6%.....	71
4.3.2-	Teste da Placa Quente.....	72
4.3.3-	Teste da Formalina a 1%.....	73
4.4-	Bioquímica Oxidativa.....	76
4.4.1-	Avaliação da Capacidade Antioxidante Total.....	76
4.4.2-	Dosagem do Malondialdeído.....	78
4.4.3-	Dosagem de Nitratos e Nitritos	79
5-	DISCUSSÃO.....	80
6-	CONCLUSÃO.....	89

7-	BIBLIOGRAFIA.....	91
ANEXO	Parecer da Comissão de Bioética.....	108

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1- Plantas medicinais na medicina popular

O uso de plantas como remédios pela humanidade é tão antigo quanto a história do homem. No momento, em que o primeiro “ser humano” surgiu no planeta, as plantas já existiam há mais de 400 milhões de anos e sua utilização aconteceu há 50 mil anos atrás. Há registros antigos, como desenhos em cavernas, escritos e em símbolos, que revelam uma ligação íntima do homem com a natureza, principalmente com as plantas (SOARES, 2000). O processo de evolução da “arte de cura” aconteceu de forma empírica em processos de descoberta por tentativas, com erros e acertos (MORS, 1992).

O conhecimento sobre as plantas sempre tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. As primitivas civilizações desde cedo se aperceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate à doença, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo. Toda essa informação foi sendo, de início, transmitida oralmente às gerações posteriores, para depois, com o aparecimento da escrita, passar a ser compilada e guardada como um tesouro precioso (CALIXTO, 2005).

O uso dos produtos naturais se iniciou há milhares de anos por populações de vários países com o intuito de tratar diversas patologias. Eram utilizados pela população como forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos. As plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial. Mesmo com os grandes avanços observados na medicina moderna, nas últimas décadas, elas continuam sendo utilizadas e, estima-se que cerca de 25% a 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005).

O emprego de plantas medicinais para a manutenção e a recuperação da saúde tem ocorrido ao longo dos tempos desde as formas mais simples de tratamento local até as formas tecnologicamente sofisticadas de fabricação industrial. Mas, apesar das enormes diferenças entre as duas maneiras de uso, em ambos os casos o ser humano percebeu, de alguma forma, a existência de algo nas plantas que tem a propriedade de provocar reações benéficas ao organismo (LORENZI e MATOS, 2008).

O Brasil é possuidor de uma flora rica, composta de uma infinidade de espécies com aplicações terapêuticas e sendo o mais rico do mundo em espécies vegetais, e que muito pode contribuir para o avanço da medicina mundial. De toda a cobertura vegetal existente no planeta, cerca de 2/3 das espécies estão distribuídas nas florestas tropicais de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento da Ásia, África e América do Sul. Somente o Brasil detém aproximadamente 60.000 espécies, representando um total de 20% de toda a flora mundial, e supõe-se que existiam mais de 10.000 que ainda não catalogadas na Floresta Amazônica (ALBAGLI, 2001).

Estas plantas são frequentemente utilizadas com o intuito de substituir ou auxiliar as terapias convencionais no tratamento de várias doenças. Entre outros fatores, a preferência na utilização destas, decorre da facilidade de obtenção e do baixo custo. Porém, sabe-se que as plantas medicinais apresentam ampla diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas (FARNSWORTH et al. 1985; SIMÕES et al. 2003), havendo assim, a necessidade de aprofundamento no conhecimento das propriedades farmacológicas das espécies vegetais e suas possíveis utilizações no desenvolvimento de medicamentos.

Apesar da preferência das grandes indústrias farmacêuticas pelo desenvolvimento de medicamentos pela via sintética, nas últimas décadas observa-se ainda grande interesse do mercado pelo potencial terapêutico das plantas medicinais (CALIXTO et al. 2000).

No Brasil, grande parte da diversidade vegetal ainda não foi explorada e poderia, eventualmente, tornar-se uma fonte valiosa de produtos químicos com utilização terapêutica ou industrial (SOUZA et al. 2007).

Neste ensejo, destacam-se algumas espécies de interesse medicinal, tais como inúmeras *Vernonia*, muitas das quais conhecidas como Boldo ou Jalapa e amplamente usadas; *Gnaphalium* e *Achyrocline*, conhecidas popularmente como Macela ou Macela-do-campo; *Calendula*, gênero Calêndula, *Calendula officinalis*; as importantes Carquejas, com ampla distribuição no território brasileiro, das quais se destaca a *Baccharis trimera*; as várias espécies de *Artemisia*, popularmente conhecidas como Artemisia e Losna; a Camomila, *Matricaria chamomila*; *Achillea millefolium*, conhecida como Mil-folhas, Novalgina e Anador; a famosa Arnica, do gênero *Arnica*; várias espécies do gênero *Bidens*, muitas conhecidas como Picão e Carrapicho, especialmente *Bidens pilosa* e *Bidens bipinnatus*; os inúmeros Guacos e Guacos-de-quintal, do gênero *Mikania*, especialmente a *Mikania glomerata*; o Mentrasto, *Ageratum conyzoides*, e inúmeras plantas de pequeno porte, e diante todo este arsenal da flora brasileira estudada, encontra-se o gênero *Eupatorium*, amplamente usada na medicina popular (DI STASI, 2006), onde a espécie de *Eupatorium ayapana* foi a planta de escolha para este trabalho.

1.2- *Eupatorium ayapana*

1.2.1- Família Asteraceae

A família Asteraceae (Dicotyledonae) - Ivan Martinov, foi descrita inicialmente como Compositae por Paul Dietrich Giseke. Essa família compreende 1.528 gêneros, com aproximadamente 22.750 espécies cosmopolitas, encontradas em todo o planeta, exceto na Antártida (Mabberley, 1997), sendo a maior família botânica do grupo das angiospermas. Inclui espécies arbustivas, herbáceas, arbóreas, trepadeiras e ervas; a grande maioria dos gêneros é constituída de plantas de pequeno porte. Os gêneros estão distribuídos em três grandes subfamílias, sendo os mais importantes os encontrados nas subfamílias Cichorioideae e Asteroideae.

Asteraceae é a maior família de angiospermas, compreendendo 25.000 espécies pertencentes a 1.600 gêneros dispostos em 17 tribos e três subfamílias (BREMER, 1994). No Brasil, a família está representada por aproximadamente 196 gêneros e cerca de 1.900 espécies (BARROSO et al. 1991).

A família Asteraceae apresenta ampla variação em suas características. Hábito herbáceo a arbóreo, às vezes trepadeira, caule geralmente subcilíndrico, não-alado, às vezes alado, indumento variado ou ausente. Folhas geralmente simples, alternas ou opostas, às vezes rosuladas basais ou verticiladas. Capítulos solitários ou em capitulescências laxas, às vezes congestas ou fundidas. (BARROSO et al. 1991).

A família Asteraceae pode ser considerada uma das mais importantes fontes de espécies vegetais de interesse terapêutico, dado o grande número de plantas pertencentes a ela que são usadas popularmente como remédios, muitas das quais amplamente estudadas dos pontos de vista químico e farmacológico (DI STASI, 2006).

1.2.2- Gênero *Eupatorium*

O gênero *Eupatorium* foi descrito por Carl Linnaeus, que o denominou assim em homenagem ao rei Eupator, o primeiro a usar a planta como medicamento contra uma doença hepática (DI STASI, 2006).

Muitas espécies do gênero *Eupatorium* já foram avaliadas quanto aos seus componentes químicos voláteis e atividades biológicas, (ALBUQUERQUE et al. 2001; ALBUQUERQUE et al. 2004; DING et al. 1994; HABTEMARIAM, 2000; MONGELLI et al. 1996; MONGELLI et al. 2000; PAOLINI et al. 2005; SHARMA et al. 1998; SOUZA et al. 2007; TORI et al. 2001).

O gênero *Eupatorium* apresenta variados constituintes químicos como terpenos (monoterpenos, diterpenos, triterpenos e sesquiterpenos), lactonas, flavonóides e alcalóides pirrolizidínicos (ZHANG et al. 2008).

Flavonóides foram isolados de *Eupatorium coelestinum* (LE VAN & Pham, 1979), *E. adenophorum* (LI et al. 1997), *E. leucolepis* (HERZ e PALANIAPPAN, 1982), *E. angustifolium* (MESQUITA et al. 1986), *E. littorale* (SATO et al. 1985), *E. salvia* (GONZALEZ et al. 1990), *E. odorata* (HAI et al. 1995), *E. subhastatum* (FERRARO et al. 1987 e 1988), *E. tinifolium* (D'AGOSTINO et al. 1990a e 1990b), *E. buniifolium* (MUSCHIETTI et al. 1994), *E. cannabinum* (STEVENS et al. 1995) *E. ternbergianum* (D'AGOSTINO et al. 1994) e *E. erythropappum* (TALAPATRA et al.

1985). Flavonóides glicosilados foram isolados de *E. tinifolium* (D'AGOSTINO et al. 1991) e *E. glandulosum* (NAIR et al. 1993 e 1995). Outros glicosídeos foram determinados nas espécies *E. micranthum* (HERZ et al. 1978), *E. guayanum* (SAGAREISHVILI et al. 1981), *E. altissimum* (D'AGOSTINO et al. 1990) e *E. adenophorum* (LI-RONGTAO et al. 1997). Alcalóides pirrolizidínicos foram determinados em *E. cannabinum* (SCHIMIO et al. 1987; PAGANI, 1990), *E. japonicum*, *E. fortunei*, *E. chinese* (ZHAO et al. 1987; Liu et al. 1992), *E. portoricense* (WIEDENFELD et al. 1995) e *E. rotundifolium* (HENDRIKS et al. 1988; EDGAR et al. 1992). Nas folhas de *E. odoratum* foram encontrados taninos, fenóis e saponina, e o óleo essencial das folhas contém alfa-pineno, cânfora, limoneno, cariofileno e cadinol (INYA-AGHA et al. 1987).

Diterpenóides foram isolados de *E. laevigatum* (LOPES et al. 1986b); triterpenóides de *E. odoratum* (TALAPATRA et al. 1977), e sesquiterpenóides de *E. recurvens* (Herz et al. 1979), *E. quadrangularis* (HUBERT et al. 1987), *E. deltoideum* (QUIJANO et al. 1980), *E. laevigatum* (BAUER et al. 1978), *E. cannabinum* (ZDERO e BOHLMANN, 1987), *E. fortuna* (HARUNA et al. 1986), *E. mikanioides* (HERZ et al. 1980) e *E. rufescens* (RUECKER et al. 1996). A presença de sesquiterpenolactonas foi caracterizada em *E. cannabinum* (STEFANOVIC et al. 1986), *E. altissimum* (JAKUPOVIC et al. 1987), *E. quadrangularae* (HUBERT et al. 1987) e *E. fortunei* (HARUNA et al. 1986). Monoterpenos glicosilados foram obtidos de *E. tinifolium* (D'AGOSTINO et al. 1990). Os principais constituintes do óleo essencial de *E. adenophorum* são p-cimeno e acetato de bornila (DING et al. 1991), enquanto em *E. stoechadosmum* foram descritos como componentes principais a acetofenona e os derivados do timol (NGUYEN et al. 1993). Uma grande quantidade de terpenos (geranial, naginatacetona, p-cimeno, β -himachaleno) ou ésteres fenólicos foi identificada nos óleos essenciais de *E. adenophorum*, entre outras espécies (DING et al. 1994).

1.2.3- Espécie *Eupatorium ayapana* Vent.



Figura 01: Ilustração de *Eupatorium ayapana* V. **Fonte:** <http://www.stuartxchange.org/Ayapana.html>

A *Eupatorium ayapana* Vent. é uma planta bastante delicada, ereta, perene, com folhas aromáticas, opostas, longas, com 5 a 8 centímetros, lisas, lanceoladas, acuminadas, triplinervadas; cresce de 20 a 30 cm de altura; corola com tubo interno glabro; androceu com anteras levemente sagitadas; fruto do tipo aquênio alongado, anguloso, estriado e diminuto, com papilho do mesmo tamanho (TAYLOR, 2006). Pertence à família Asteraceae e aparece na literatura com outros sinônimos, como: *Eupatorium triplinerve* Vahl e *Ayapana triplinervis* (Vahl) R. M. King & Robinson. A espécie é conhecida na região amazônica especialmente pelo nome de Japana, mas são comuns outras denominações, como: Ayapana, Ayapana Chá (Inglaterra); Ayapan, Aypan, Bishallakarani (Bangladesh); Aiapana, Iapana, Japana, Japana Branca, Japana Roxa, Erva-de-Cobra, Erva-Santa (Brasil); Aiapana, dipana, Thé de

L'amazone (Guiana Francesa); Sekrepatowiwiri (Suriname) e Herbe à Thé, Herbe Vulnérable (Antilhas do Oeste da França) (GAUVIN-BIALECKI e MARODON, 2009).

Na figura abaixo a espécie *Eupatorium ayapana*.



Figura 02- *Eupatorium ayapana* Vent.

1.2.4- ETNOFARMACOLOGIA E ETNOBOTÂNICA

A Etnobotânica é uma área de pesquisa interdisciplinar inserida na Etnobiologia e atualmente pode ser definida como a “inter-relação entre populações humanas e o ambiente botânico” (ALBUQUERQUE, 2002). Estudos etnobotânicos de registro de plantas, seus usos e formas terapêuticas por grupos humanos tem oferecido a base para diversos estudos, especialmente no campo da Fitoquímica e Farmacologia, inclusive como ferramenta para o descobrimento de novas drogas (ELISABESTKY, 1999). Apesar de ensaios randômicos também serem realizados na busca de compostos ativos em extratos vegetais, uma abordagem promissora é a etnofarmacológica, a qual, orientada pelos usos populares da flora medicinal, tem maior facilidade na eleição das espécies submetidas à triagem química e

farmacológica e com chance de descoberta de novos princípios ativos (CORDELL e COLVARD, 2005).

As formas de preparo da espécie são diversas, tais como: chás, infusões e decocção das folhas secas ou frescas. No método da decocção, pode-se ainda utilizar a planta inteira. A infusão de suas folhas com as de arruda (*Ruta graveolens*), jambu (*Spilanthes acmella*) e abacate (*Persea* sp.) é usada internamente contra hemorróidas e verminoses. O sumo das folhas também é bastante usado para banhos. As raízes são insumos para compressas, decoctos, além de extratos (DI STASI, 2002; BOSE et al. 2006; SCUDELLER, 2009; ZHANG et al. 2008; BERG e SILVA, 1988; LEÃO et al. 2007; RODRIGUES et al. 2010). Em outras regiões do Brasil, a espécie possui vários usos das folhas, como tônico, estimulante, sudorífico, estomáquico, digestivo, antidiarréico e antidisentérico, além de se reconhecer nela poderosa ação contra tétano, cólera, angina, infecções da boca e contra veneno de cobras (CORRÊA, 1984).

Os índios Shipibo-Conibo do Peru usam a folha e o caule da planta para dor no estômago, cólica, edema e como depurativo. Eles preparam uma pasta das folhas para uso externo em feridas e hemorragias. Para hemorragias internas, picada de cobra e vômito, bebem o suco das folhas. Na medicina natural peruana acredita-se que a planta seja sudorífica, cicatrizante, adstringente, tônico estomacal, estimulante, febrífuga, antidiarreica e antitumoral. As folhas são preparadas em infusões, decocção, banhos, para a inflamação do trato urinário e para o tétano. Uma infusão das folhas e do caule é utilizada como estimulante digestivo. Acredita-se que o *Eupatorium ayapana* V., seja antineoplásica, sendo por isso utilizada para tumores cancerígenos no Peru e na Argentina. Uma infusão de toda a planta também é utilizada na Argentina para estimular a menstruação (TAYLOR, 2006).

A espécie *Eupatorium ayapana* faz parte da composição de produtos cosméticos e farmacêuticos por seu efeito protetor contra os raios solares e os radicais livres (GRAEFF, 1997). As folhas de *E. ayapana* possuem atividade antimicrobiana (GUPTA et al. 2002).

No quadro abaixo, os diversos usos de *Eupatorium ayapana* em vários países.

PAIS	EFEITO FARMACOLÓGICO
Argentina	Estimular a menstruação; combater tumores
Brasil	Como adstringente; emoliente; sedativo; estimulante e tônico; sudorífico; anti-anginoso; cólera; tosse; diarreia; infecções do ouvido; febre; anti-úlcero; gengivites; dor de cabeça; indigestão; insônia; úlcera bucal; náusea e vômito; úlceras de pele; picada de cobra; ferimentos; dor de garganta.
Bangladesh	Hemoestático; antiséptico; estimulante cardíaco; emético; diaforético e laxante; usado como anti-úlcero e anti-hemorragico.
EUA	Para cólera; indigestão; e complicações respiratórias.
Guianas	Febre; digestivo; laxante; sudorífico; para resfriados; diarreia; dor de cabeça; hipertensão; anti-úlcero; úlcera bucal; náuseas e vômitos.
Ilhas Mauricius	Anti-escorbuto; emético; diaforético; estimulante e tônico; problemas intestinais; resfriado; diarreia; dispepsia; febre; flatulência; dor de cabeça; e anti-úlcero.
Índia	Cardiotônico; diaforético; emético; hemostático; laxante; estimulante e tônico.
Filipinas	Combater febre; como sudorífico e tônico.
Peru	Como adstringente; anti-neoplásico; cicatrizante; depurativo; febrífugo; hepatoprotetor; sudorífico; hemostático; estimulante e tônico; anti-inflamatório do trato urinário; anti-diarreico; estomatites; anti-edematoso; picada de cobra; náusea e vômitos; usado em ferimentos.
Trinidad	Gripe; constipação; pneumonia; e febre amarela.

Quadro 01- Principais atividades farmacológicas do EHAEA em diversos países. **Fonte:** TAYLOR, 2006.

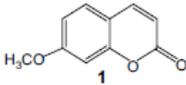
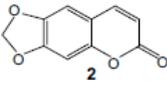
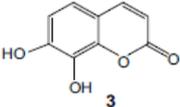
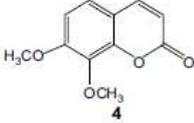
1.2.5- Fitoquímica

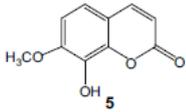
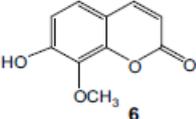
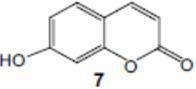
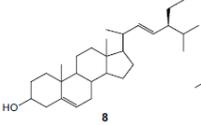
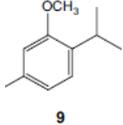
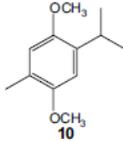
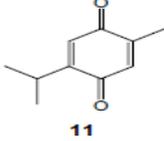
O conhecimento preliminar dos constituintes fitoquímicos facilita o estudo de espécies vegetais, por indicar a natureza das substâncias presentes, facilitando a

escolha das técnicas fitoquímicas a serem utilizadas no processo (MACIEL et al. 2002).

As principais classes de metabólitos secundários que podem ser detectadas com a aplicação de testes analíticos padrões são: ácidos graxos, terpenóides, esteróides, fenóis, alcalóides, cumarinas e flavonóides (MACIEL et al. 2002). Dessa forma, as plantas medicinais podem ser classificadas por categorias, de acordo com sua ação sobre o organismo, podendo ser: estimulantes, calmantes, emolientes, fortificantes, de ação coagulante, diuréticas, sudoríferas, hipotensoras, de função reguladora intestinal, colagogas, depurativas, remineralizantes e reconstituintes (ARNOUS et al. 2005).

Estudos acerca da espécie *Eupatorium ayapana* apontam classes de constituintes isolados do extrato das folhas, sendo eles: cumarinas, esteróides, carotenóides e vitaminas (GUPTA et al. 2002). Os constituintes fitoquímicos mais produzidos pela espécie são as cumarinas, sendo sete bem caracterizados e identificados. São eles: aiapanina, aiapina, dafnetina, dafnetina dimetil-éter, dafnetina-7-metil éter, hidrangetina e umbeliferona.

CONSTITUINTE	ESTRUTURA
Ayapanina (CUMARINA)	
Aiapina (CUMARINA)	
Dafnetina (CUMARINA)	
Dafnetina dimetil- éter (CUMARINA)	

Dafnetina-7-metil- éter (CUMARINA)	
Hidrangetina (CUMARINA)	
Umbeliferona (CUMARINA)	
Estigmasterol (ESTERÓIDE)	
Timol metal-éter	
Timoquinol dimetil-éter	
Timoquinona	

QUADRO 02 - Estrutura química de constituintes isolados de *Eupatorium ayapana* **Fonte:** (BIALECKI, 2009; TAYLOR, 2006).

Outros constituintes químicos importantes são os depsídeos e depsídonas, que tem sido reconhecidos por apresentarem propriedades antioxidantes (HIDALGO et al. 1994), antitumorais (YAMAMOTO et al. 1995) analgésicas (OKUMA et al. 1995).

Muitas plantas investigadas atualmente são capazes de atuar no SNC, desencadeando mudanças no comportamento, humor, pensamento e sensações (SOUZA et al. 2008). Por este motivo, muitas espécies podem ser promissoras fontes de fármacos para a cura das patologias associadas ao SNC. Dentre as muitas doenças que acometem o homem atualmente, temos a depressão que está sendo considerada como o mal do século XXI, caracterizando inclusive o homem contemporâneo. Sua prevalência na população geral alcança números entre 4% e

25%, o que já alerta sobre a gravidade e expansão da enfermidade (PARANHOS, 2009).

1.3 Considerações gerais sobre transtornos do SNC.

1.3.1- Ansiedade

A ansiedade é um doloroso desconforto da mente sobre um suposto futuro acontecimento, ou antecipação de uma doença. É usado como sinônimo de medo. É possível que a síndrome de ansiedade ocorra como um fenômeno secundário a outro diagnóstico (WINOKUR, 1988).

Na literatura é descrito dois tipos de ansiedade: a ansiedade normal e a ansiedade patológica. A ansiedade um dos sentimentos mais experimentados pela espécie humana e aflige o homem desde a mais remota antiguidade, sendo difícil de ser definida ou compreendida, uma vez que não existem limites claros entre aquilo que pode ser considerado como estado normal ou patológico (NUTT, 1984; PRATT, 1992). As tentativas de se definir ansiedade remontam a Epiceto que, no século X d.C., a definiu como o “medo do medo”. Na tentativa de caracterizar o que seria “ansiedade”, um sentimento que envolveria uma ambiguidade psicológica (KIERKEGAARD, 1884): uma “simpatia antipatizante e uma antipatia simpatizante” e a comparava à angústia que resulta do conflito entre o medo e a liberdade (PESSOTI, 1978).

A ansiedade normal se apresenta com uma sensação difusa, vaga, tendo, como exemplo, aperto do tórax, batimentos cardíacos acelerados, sudorese, cefaléia. Considera-se a ansiedade como um sinal de alerta, um aviso de uma ameaça para que a pessoa execute algumas providências (TOSCANO, 2005).

A primeira tentativa de sistematizar o conceito de ansiedade pode ser atribuída a Sigmund Freud, que em 1920 escreveu: “Como nós sabemos, o desenvolvimento da ansiedade é a reação do ego ao perigo e o sinal preparatório para a fuga; não é um grande salto imaginar que também na ansiedade neurótica o ego está tentando uma fuga das exigências da sua libido, e está tratando esse perigo interno como se ele fosse externo”. Como foi mencionado anteriormente,

diferentemente das outras desordens psiquiátricas, a ansiedade é uma emoção normal que serve como uma resposta útil à vigilância, a uma ameaça ou a um estímulo aversivo, e pode existir tanto na forma de patologia como ser normalmente vivenciada (NUTT, 1990).

As bases neurais que envolvem o fenômeno da ansiedade têm sido amplamente investigadas. A amígdala tem sido apontada como uma das estruturas relacionadas ao medo e à ansiedade. Da amígdala, partem as vias que se projetam para o hipotálamo e para a matéria cinzenta periaquedutal. Além disso, o septo, o hipocampo e as projeções noradrenérgicas e serotoninérgicas ascendentes, provenientes respectivamente do lócus ceruleus e dos núcleos da rafe, também tem sido implicados nesse processo (GRAY, 1992; GRAEFF, 1993).

A ansiedade é um sintoma comum da depressão, afetando até 90% dos pacientes deprimidos e frequentemente complica o tratamento da depressão, devido a ansiedade e a depressão serem duas modalidades sintomáticas da mesma afecção. As escalas para avaliação de depressão e ansiedade não separam nitidamente os dois tipos de manifestações. A mesma falta de nitidez é mostrada em outras escalas que foram usadas para identificar esses dois quadros emocionais (MELLO, 1992).

1.3.2- Depressão

A depressão é um transtorno de humor, e se caracteriza pelo aumento do cansaço, redução de concentração, atenção, auto-estima e autoconfiança. A pessoa com depressão pode ter sentimentos de inutilidade, pensamento auto-lesivos ou suicidas, perturbação do sono e apetite e comprometimento do pragmatismo. A depressão pode assumir diferentes níveis: leve, moderada ou grave. No caso de depressão grave, podem ou não surgir sintomas psicóticos. A diferenciação de gravidade da depressão se faz pela avaliação da quantidade, tipo e gravidade dos sintomas apresentados (CID-10, 1993).

Mudanças extremas e persistentes do humor, que afetam diretamente as atividades cotidianas de um indivíduo, caracterizam um transtorno afetivo. Segundo o Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Norte-Americana de Psiquiatria, em sua quarta versão (DSM-IV), os distúrbios afetivos podem ser classificados em

distúrbios depressivos (depressão maior, distímia e tipos não-especificados) e distúrbios bipolares. A depressão maior é um dos distúrbios psiquiátricos mais frequentemente observados e se caracteriza por um ou mais episódios depressivos com pelo menos duas semanas de humor deprimido ou perda de interesse na maioria das atividades (anedonia), ou ambos. Para fins diagnósticos, pelo menos mais quatro sintomas devem estar presentes, incluindo sentimento de desamparo e culpa, alterações no apetite e de sono, fadiga, alterações motoras (retardo ou agitação), alterações da libido, dificuldade de concentração e raciocínio, e pensamentos suicidas (APA, 2000).

O tratamento da depressão se baseia, principalmente, na teoria monoaminérgica, onde a depressão seria causada por uma deficiência na transmissão de monoaminas (noradrenalina, dopamina e serotonina) no SNC (SCHILDKRAUT, 1965; COPPEN, 1969). O uso de muitos fármacos para o tratamento da depressão corrobora com esta teoria, pois eles agem aumentando a concentração de monoaminas na fenda sináptica. Os principais antidepressivos utilizados na clínica são os inibidores da monoaminoxidase (IMAO), os inibidores não seletivos da recaptação de monoaminas, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e os inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina. Alguns estudos verificaram o papel do aminoácido excitatório glutamato nos distúrbios afetivos (MAURI et al. 1998; AUER et al. 2000; BERMAN et al. 2000). As drogas antagonistas do glutamato apresentam efeito antidepressivo em modelos animais de depressão, e em humanos alguns resultados começam a ser promissores (TRULLAS e SKOLNICK, 1990; MAJ et al. 1991; MANTOVANI et al. 1999; SKOLNICK, 1999; BERMAN et al. 2000). Outra hipótese seria que a depressão levaria a diminuição de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o qual está relacionado com a plasticidade neuronal (DUMAN et al. 1997).

A depressão encontra-se em quarto lugar entre as principais causas de ônus para o estado, respondendo por 4,4% entre as demais doenças no percurso da vida. Ocupa o primeiro lugar quando considerado o tempo vivido com incapacitação ao longo da vida (11,9%). Considerando a faixa etária entre os 15 e os 44 anos de idade, a depressão ocupa a segunda posição, com 8,6% do custo com tratamento, e a porcentagem de anos vividos com incapacitação eleva-se para 16,4%. A depressão está associada a altos custos sociais e financeiros (OMS, 2001). Maes et

al. (2000), tem associado o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da depressão.

1.3.3- Depressão X Estresse Oxidativo

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são importantes fatores de danos em vários processos patológicos e toxicológicos, dentre eles destacam-se os distúrbios psiquiátricos (MAES et al. 2000). Há descrições na literatura da co-relação de estresse oxidativo aumentado e sintomas de depressão em pacientes, evidenciado pela diminuição das defesas antioxidantes e pelo aumento da peroxidação lipídica no plasma de pacientes (TSUBOI et al. 2006; SARANDOL et al. 2007). Logo, o uso de antioxidantes poderia ser um coadjuvante ou até mesmo um tratamento de escolha para a depressão.

1.4- Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é definido como desequilíbrio entre a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs), consideradas oxidantes, e os agentes antioxidantes, com o consequente aumento no organismo dos agentes oxidantes (CUNHA-OLIVEIRA, 2007). Um importante processo que vem sendo relatado na patogênese de algumas condições que afetam o sistema nervoso central (SNC), como é o caso das doenças neurodegenerativas: epilepsia, Alzheimer e Parkinson (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985; REZNICK e PACKER, 1993). Este fato torna-se facilmente compreensível, visto que o SNC é altamente sensível ao estresse oxidativo, em face do alto consumo de oxigênio e do alto conteúdo lipídico, principalmente de ácidos graxos poliinsaturados, os quais servem de substrato para a peroxidação lipídica; aos altos níveis de ferro e da baixa defesa antioxidante (HALLIWELL, 1996).

1.4.1- Radical livre

Os radicais livres são agentes oxidantes caracterizados como espécies atômicas ou moleculares que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa, tornando-as espécies altamente reativas que agem como eletrófilos (GILLHAN et al. 1997). São considerados exemplos de radicais livres os metais de transição como ferro, cobre e manganês e o oxigênio molecular por possuir dois elétrons não pareados, localizados em diferentes orbitais e que possuem o mesmo número de spin (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984; BERGERENDI et al. 1999). As células estão continuamente produzindo radicais livres como parte dos processos metabólicos, que são capazes de gerar estresse oxidativo em decorrência de suas propriedades oxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

As camadas eletrônicas de um elemento químico são denominadas K, L, M e N, e seus subníveis, s, p, d, f. De maneira simples, o termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (HALLIWELL et al. 1990). É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas.

Existem, entretanto, outras moléculas que não são necessariamente radicais livres, mas são agentes oxidantes (OPARA, 2006). Estas substâncias são classificadas de maneira ampla como EROs ou ERNs (HALLIWELL, 1996).

1.4.2- Espécies reativas ao oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs)

As EROs/ERNs podem causar lesões de neurotoxicidade ao reagirem com biomoléculas como os lipídios e ácidos nucleicos (NAZIROG, 2006). Assim, a presença de ácidos graxos poliinsaturados, alvos de EROs no cérebro e medula espinal torna esses órgãos mais sensíveis a lesões oxidativas (GUZMAN et al. 2006).

As células presentes em uma atmosfera rica em oxigênio estão constantemente expostas aos possíveis danos causados por EROs, que podem ser

originadas tanto exógena quanto endogenamente. EROs é um termo bastante amplo que abrange não somente radicais de oxigênio como radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), mas também derivados do oxigênio que não são radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), ozônio (O_3) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (DI MASCIO et al. 2006).

O termo espécies reativas do nitrogênio (ERNs) engloba os radicais: óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-), que podem ocasionar danos às células. Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA), outros são reativos apenas com os lipídios (BARREIROS et al. 2006).

Dentre essas espécies reativas de nitrogênio, o $\text{NO}\cdot$ apresenta-se abundante no organismo humano e atua como sinalizador molecular em uma série de processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, regulação da pressão arterial, relaxamento da musculatura lisa e regulação do sistema imune. O $\text{NO}\cdot$ tem vida média de apenas alguns segundos e é solúvel tanto no ambiente lipídico quanto no aquoso. Ao reagir com o oxigênio e água, libera ânions nitrito e nitrato. Sua reação com o $\text{O}_2\cdot^-$ promove a liberação de peróxido nitrito ($\text{ONOO}\cdot^-$), que é um potente agente oxidante capaz de causar fragmentação de DNA e oxidação lipídica (CARR et al. 2000).

Espécie reativa	Características	Fontes Produtoras
Ânion superóxido $\cdot\text{O}_2^-$	- Estado de redução univalente do O_2 - Oxidação de ferroproteínas	Cadeia de transporte elétrons Xantina oxidase NADPH oxidase
Peróxido de hidrogênio H_2O_2	- Estado divalente do O_2 - Lipossolúvel	Superóxido dismutase Glutaciona oxidase
Radical hidroxil	- Estado de redução trivalente	Reação de Fenton Decomposição do peroxinitrito.

$\cdot\text{OH}$	- Elevada reatividade	
Radical peroxil $\text{RO}\cdot$	- Radical orgânico	Peroxidação lipídica
Óxido nítrico $\text{NO}\cdot$	- Gás reativo - Rápida difusão - Baixo tempo de meia vida	Óxido nítrico sintase Redução dos estoques de nitrato/nitrito
Peroxinitrito $\text{OONO}\cdot$	- Gás de elevada reatividade - Rápida difusão - Baixo tempo de meia vida	Formado pela entre o $\cdot\text{O}_2^-$ e o $\text{NO}\cdot$

Quadro 03: Produção e características das principais espécies reativas formadas no organismo.

Fonte: FERREIRA e MATSUBARA, 1997.

1.4.3- Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é um processo fisiológico que ocorre nas membranas celulares. Além de ser um fator de renovação da membrana, este processo é primordial na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose e pinocitose (HALLIWELL, 1992).

É uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, na tabela abaixo, onde L representa o lipídio.

$\text{LH} + \text{OH}\cdot$ (ou $\text{LO}\cdot$)	\longrightarrow	$\text{L}\cdot + \text{H}_2\text{O}$ (ou LOH)	Iniciação
$\text{L}\cdot + \text{O}_2$	\longrightarrow	$\text{LOO}\cdot$	Propagação
$\text{LH} + \text{LOO}\cdot$	\longrightarrow	$\text{L}\cdot + \text{LOOH}$	Propagação
$\text{LOO}\cdot + \text{L}\cdot$	\longrightarrow	LOOL	Terminação
$\text{LOO}\cdot + \text{LOO}\cdot$	\longrightarrow	$\text{LOOL} + \text{O}_2$	Terminação

Figura 03 – Etapas da Peroxidação lipídica

Fonte: FERREIRA e MATSUBARA, 1997.

A peroxidação lipídica que ocorre na membrana é causada pela ação de uma espécie reativa que retira um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono, caracterizando a etapa de

iniciação. Este radical é estabilizado por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. Este dieno conjugado reage com O_2 e forma o radical peroxila, que fica propenso a retirar átomo de H de outro ácido graxo poliinsaturado, caracterizando a reação em cadeia da etapa de propagação. A combinação do radical peroxila com o $H\bullet$ abstraído, gera LOOH. A última etapa da peroxidação lipídica, a etapa de terminação instala-se com a neutralização dos radicais formados por ação de antioxidantes lipossolúveis (α -tocoferol, α -caroteno). Todas estas modificações oxidativas alteram a fluidez e a permeabilidade da membrana, promovendo expansão do líquido intracelular e iminência de ruptura da membrana da célula e das organelas, com conseqüente morte celular (SIES e STAHL, 1995).

Os aldeídos insaturados, como o malondialdeído (MDA) tem a capacidade de se ligarem covalentemente a grupos nucleofílicos presentes em DNA, peptídeos e proteínas, causando modificações nas funções dessas moléculas, o que sugere a implicação desses compostos em vários processos degenerativos (HALLIWELL e CHIRICO, 1993). Por este motivo, o MDA tem sido, frequentemente, utilizado como marcador de peroxidação lipídica nos tecidos (SJODIN et al, 1990).

Assim o estresse oxidativo pode resultar de uma situação em que ocorre uma diminuição nos níveis das defesas antioxidantes tanto enzimáticas quanto não enzimáticas do organismo, de uma elevada produção de espécies reativas ou de uma combinação de ambos os fatores. Esse quadro de estresse oxidativo pode causar danos a todas as estruturas celulares, incluindo DNA, lipídios e proteínas de membranas biológicas. Por isso, a determinação dos níveis de EROs/ERNs bem como das defesas antioxidantes celulares servem como medidas efetivas para a avaliação de estresse oxidativo e dano celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; DAWSON e DAWSON, 1996).

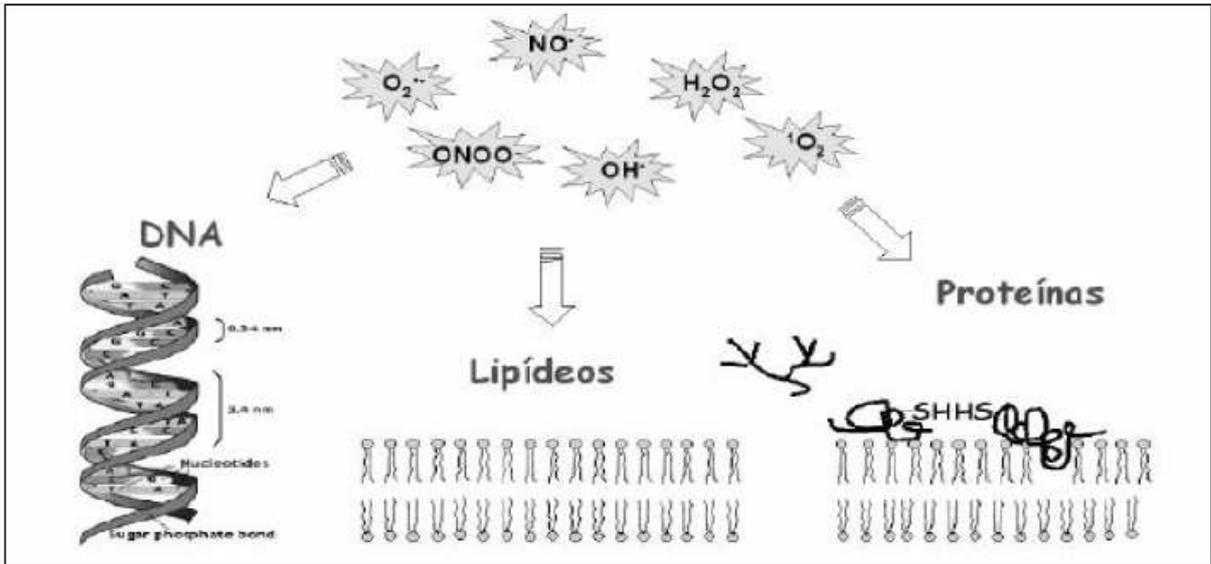


Figura 04- Dano oxidativo em macromoléculas biológicas. **Fonte:** adaptado de Torres, 2003.

As células possuem um sistema antioxidante específico, enzimático ou não-enzimático, capaz de responder ao aumento do peróxido de oxigênio (H_2O_2) formado durante o processo de oxidação por EROS (HALLIWELL et al. 1990).

1.4.4- Sistemas de Defesa Antioxidante

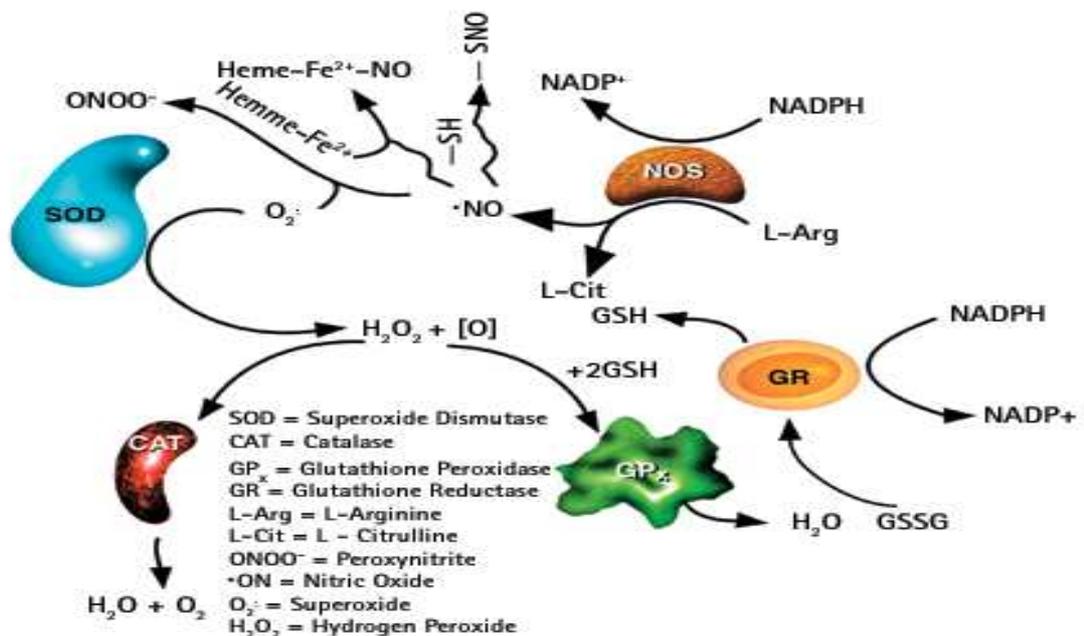


Figura 05- Reações importantes para a produção e defesa contra radicais livres em neurônios.

Fonte: www.merckbiosciences.com

Uma substância antioxidante é aquela capaz de diminuir ou inibir a oxidação mesmo presente em baixas concentrações em relação a seu substrato. Desta forma, estes compostos protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Dessa forma, os antioxidantes podem, teoricamente, prolongar a fase de iniciação ou então inibir a fase de propagação, mas não podem prevenir completamente a oxidação (JORDÃO, J.R. et al. 1998; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; BARREIROS et al. 2006).

Os sistemas de defesas celulares localizam-se nos compartimentos hidrofílicos e hidrofóbicos. As enzimas citoprotetoras em sua grande maioria encontram-se dentro das células e os antioxidantes nos meios intra e extracelulares (MARSHALL E BANGERT, 1995).

As defesas enzimáticas são representadas principalmente pelas enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GSH-Px), glutaciona redutase e glutaciona S-transferase, e as não-enzimáticas pelas vitaminas A, E e C, flavonóides, ubiquinonas e pela GSH (JI e FU, 1992; MIEYAL et al. 1995; ALEXI et al. 1998; GIANNI et al. 2004).

Em 2004, Wang e col. propuseram o envolvimento do $O_2^{\bullet-}$ no fenômeno doloroso através do desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória aguda induzida por carragenina.

A utilização de outros antioxidantes, como a vitamina E, também mostra a redução da hiperalgesia observou-se que a administração intraperitoneal diária de pequenas doses de vitamina E em animais com dor neuropática produz analgesia. Este efeito pode estar relacionado à dessensibilização do corno dorsal da medula espinal, e também provável efeito antioxidante de *scavenger* da vitamina E (KIM et al. 2006).

1.5- Dor e Nociceção

O conceito de dor hoje mundialmente usado é o da Associação Internacional de Estudos da Dor (IASP) e afirma que a dor é uma “Experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano presente ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. Deste modo, a sensação de dor protege o corpo de uma

possível ameaça ou lesão. A transdução do estímulo doloroso ocorre nas terminações nervosas das fibras C não-mielinizadas e nas fibras A δ mielinizadas. A maioria dos nociceptores responde a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, razão pela qual são chamados de nociceptores polimodais (YUNJONG LEE et al. 2005).

Os componentes sensoriais da dor são denominados nocicepção e inclui o processo de reconhecimento e detecção do estímulo, a geração de um potencial de ação a partir dessa estimulação e a transmissão dessa informação até os centros de reconhecimento da dor. Além disso, em condições patológicas podem ocorrer alterações na capacidade de percepção de estímulos nocivos, fazendo com que estímulos inócuos sejam percebidos como nocivos (alodínia) ou desenvolvendo uma sensibilidade aumentada a estímulos dolorosos (hiperalgesia) (LOESER e TREEDER, 2008).

Vários mediadores químicos conhecidos presente no local lesado podem estimular os nociceptores e, portanto, promover a dor. Dentre os mediadores inflamatórios incluídos neste grupo estão a histamina e a bradicinina (BK). A BK atua através de receptores ligados à proteína G, produzindo uma variedade de efeitos pró-inflamatório que inclui vasodilatação e edema (MAYER, 2007). A bradicinina também estimula atividade enzimática da fosfolipase A₂ ligada à membrana que, por sua vez, provoca a desesterificação da membrana levando à liberação do ácido araquidônico livre (ácido eicosatetraenóico) e à biossíntese subsequente de prostaglandinas (por exemplo, PGE₂ e prostaciclina, PGI₂) pela cicloxigenase (COX). As prostaglandinas são potentes vasodilatadoras e importantes mediadores na dor inflamatória (WIENECKE, 2008).

A percepção de estímulos nocivos ocorre através de receptores sensoriais especializados, os nociceptores, localizados em quase todo o organismo (BASBAUM E JESSELL, 2000). Os nociceptores constituem a parte terminal periférica de fibras que conduzem os potenciais de ação propagados até o corno dorsal da medula espinal e porção caudal do nervo trigêmeo. Essas fibras são os axônios de células sensoriais primárias, conhecidas como neurônios aferentes primários, localizadas em gânglio dorsal da medula espinal.

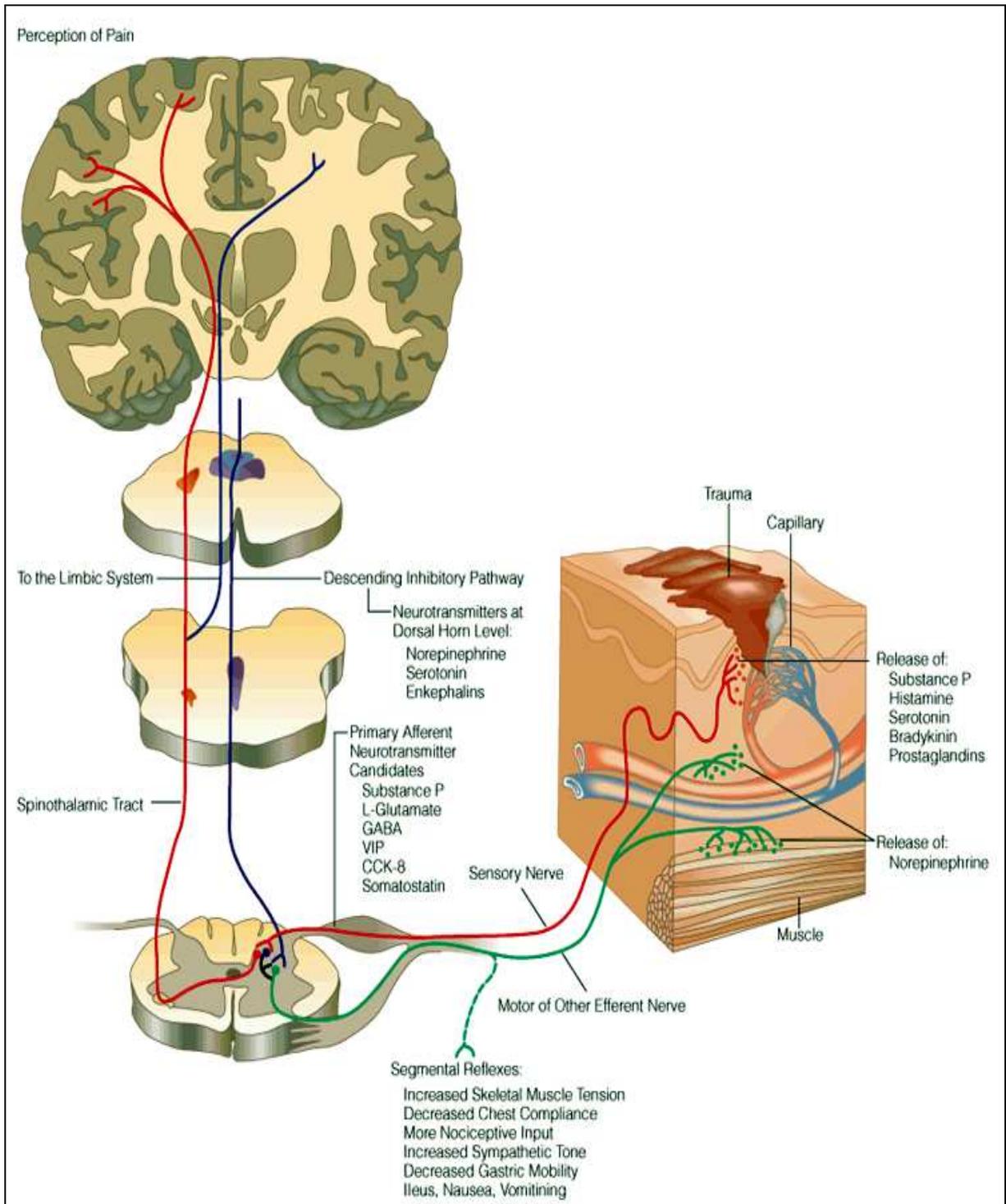


Figura 06 - Mecanismo de transmissão e percepção da dor. Diagrama esquemático mostrando o corno dorsal da medula espinhal que recebe as informações sensoriais oriundas dos terminais periféricos de fibras nervosas nociceptivas ascendentes (cor vermelha) e fibras descendentes (cor azul). **Fonte:** <http://www.coventrypainclinic.org.uk/aboutpain-painmechanisms.html>

O mecanismo fisiopatológico envolvido nas doenças neurocomportamentais e que ocasionam dor são muito discutidas. O desequilíbrio do estado redox celular,

caracterizado como estresse oxidativo já foi observado em diferentes tipos de estados patológicos, como artrite reumatóide, lesão da isquemia-reperfusão, diabetes, bem como nas doenças de Alzheimer e Parkinson. Nestes quadros, as EROs foram apontadas como mecanismos de lesão celular, bem como mantenedoras do processo patológico. Da mesma forma, foi evidenciado que o tratamento com substâncias antioxidantes promove uma melhora do quadro clínico em humanos, bem como em modelos animais (PEREZ et al. 2003; HACIMUFTUOGLU et al. 2006).

A importância do conhecimento de espécies da Amazônia, como a japana, para a elucidação das atividades biológicas, com o objetivo de elucidar e comprovar seu uso popular constitui fator primordial para o desenvolvimento de novos fármacos a partir de plantas, e também contribuem para o Programa RENISUS, que visa o uso racional de plantas, através do Sistema único de Saúde. Para o fortalecimento desta política, é necessária a descoberta de atividades biológicas da flora brasileira, assim como o estabelecimento das possíveis toxicidades inerentes ao uso etnofarmacológico. Por isto, o estudo da Japana nos seus efeitos neurocomportamentais, nociceptivos e antioxidantes, contribuem para o desenvolvimento sustentável e a Saúde Pública.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos comportamentais no SNC, antinociceptivos e efeito antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas e talos de *Eupatorium ayapana* Vent, em roedores.

2.2. Objetivos Específicos

- a. Obter o extrato hidroalcoólico de *E. ayapana* Vent;
- b. Avaliar a toxicidade oral aguda do EHAEA.
- c. Avaliar os efeitos neurocomportamentais do EHAEA em ratos, tratados de forma aguda, através dos testes relacionados à atividade locomotora espontânea, ansiedade e depressão;
- d. Avaliar a atividade antioxidante total;
- e. Dosar malondialdeído;
- f. Dosar de nitrito e nitrato presentes;
- g. Avaliar a ação antinociceptiva através de modelos experimentais de nocicepção química e térmica, em camundungos;

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

3.1.1 Coleta do material botânico

A espécie foi coletada na vila de São Raimundo, município de Acará (PA) em março de 2010. A região se encontra a 01°32.684' de latitude e à 048°23.984' de longitude, coordenadas geográficas obtidas com a utilização de um equipamento do tipo GPS (Global Positioning System). A identificação botânica do material vegetal utilizado foi realizada no laboratório de Botânica, por especialista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), responsável pela confecção da *exsicata* e confirmação da classificação botânica da amostra como *E. ayapana* Vent. Este documento encontra-se disponível no Laboratório de Botânica – Herbário da EMBRAPA.

3.1.2 Preparo do material vegetal

Após a coleta, o material foi separado em: folhas e talos, talos e raízes. Posteriormente, seguiu para a lavagem com água, para a retirada de impurezas e em seguida, com álcool a 10%, para a retirada de microorganismos. Após a lavagem, o material foi seco à temperatura ambiente por 48 horas e após este período, seguiu para estufa de circulação de ar a 45°C por 6 dias. O material seco foi pulverizado em moinho de martelos e facas na Central de Extração da Faculdade de Química da Universidade Federal do Pará.

Para a detecção de alguns componentes específicos e indispensáveis na utilização do material vegetal seco, foi feita a escolha mais comum devido à sua maior estabilidade química, porém exige cuidados especiais, como a operação de estabilização e secagem, a fim de interromper os processos metabólicos que ocorrem mesmo após a coleta da planta, como ações enzimáticas e reações de hidrólise e crescimento microbiano (HARBORNE, 1997; BACCHI, 1996) e se faz

importante, ainda, o processo de moagem, que tem por finalidade reduzir mecanicamente o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões, preparando-o, assim para a extração (DEY e HARBORNE, 1991).

3.1.3- Preparação do Extrato Hidroalcoólico

O material vegetal após ter sido pulverizado foi submetido à maceração por cinco dias, processo no qual foi utilizado como solvente, solução de etanol a 70% (92°GL). Para remoção do solvente após extração, o macerado foi concentrado em evaporador rotativo (Laborata 4000, Heidolph) em temperatura de 45°C, pressão de 160 Atm e rotação de 120 RPM, levado a estufa à temperatura de 60°C.

3.2- Avaliação Farmacológica

3.2.1- Animais

Ratos da linhagem Wistar, machos da espécie *Rattus norvegicus* (150-250 g), n=7-10 por grupo, e camundongos da linhagem Swiss machos e fêmeas da espécie *Mus musculus* (25-35 g), n=7-10 por grupo, foram utilizados nos modelos experimentais. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas e do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, mantidos em caixa de polipropileno e acondicionados em condições padronizadas de temperatura, com ciclo claro/escuro de 12 h cada, com água e ração *ad libitum*.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Bioética em Pesquisa envolvendo animais do Instituto Evandro Chagas (CEPAN-IEC), parecer de aprovação Nº 056/2009 (Anexo I), obedecendo a critérios de acordo com as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais.

3.2.2- Drogas e Reagentes

Foram utilizados os reagentes listados no quadro abaixo.

Drogas/reagentes	Origem
Álcool etílico P.A.	Synth, Brasil
Diazepan	União química, Brasil
Fluoxetina	EMS, Brasil
Indometacina	Sigma, EUA
Naloxona	Sigma, Brasil
Morfina	Dimorf ® Cristália, SP
Formaldeído P.A.	VETEC Química Fina Ltda, Brasil
Água destilada	Destilação própria
Ácido acético P.A.	VETEC Química Fina Ltda, RJ
S F de cloreto de sódio 0,9%	Fresenius Kabi Brasil Ltda, CE
Tween 80	Sigma, Brasil

Quadro 04: Reagentes utilizados

3.2.3- Avaliação da toxicidade oral aguda

Os estudos toxicológicos têm a finalidade de avaliar a idéia errônea de que produtos fitoterápicos, por serem naturais, são isentos de efeitos tóxicos ou adversos, e que o uso popular de plantas medicinais serve como validação da eficácia destes medicamentos (LAPA, 1999; LAPA, 2001; CRAVEIRO et al. 2008; MARLIÈRE et al. 2008; SILVEIRA et al. 2008).

Para a avaliação da toxicidade oral aguda utilizou-se as diretrizes de guias para testes de substâncias químicas da OECD número 423, onde foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), fêmeas, divididos em grupos de 7 animais, com peso de 20-30 g. Cada grupo foi mantido em jejum de 12 h e, em seguida, receberam, através de cânula orogástrica, por gavagem as doses 2000 mg/Kg e 5000 mg/kg do EHAEA, diluído em Tween 80 a 1% em solução salina 0,9%, doses estas mais propensas a causar mortes.

Os animais foram observados inicialmente por um período de 4 h para avaliação de possíveis alterações comportamentais. Segundo o teste descrito por MALONE e ROBICHAUD (1962), os parâmetros comportamentais observados foram: alerta, atividade motora espontânea, locomoção, falta de apetite, apatia, resposta ao tato, secreção nasal, piloereção, estereotipia, agressividade, ataxia, sudorese, micção, diarreia e convulsão. Após este período, os animais foram tratados com ração e água *ad libitum*, e observados por um período adicional de 24, 48 e 72 h, seguidos de observação por um período total de 14 dias com o intuito de verificar a possível ocorrência de óbito (OECD, 2001).

3.2.4- Avaliação dos Efeitos Neurocomportamentais

3.2.4.1- Protocolo Experimental

Os experimentos comportamentais foram realizados em local próprio, com níveis de ruído e de iluminação adequados aos experimentos. Uma hora antes do início dos experimentos, os animais foram levados à sala de teste para aclimação e habituação ao ambiente.

Com o objetivo de evitar as variações circadianas que poderiam interferir com os resultados, todos os experimentos foram conduzidos entre 08:00 e 12:00 h. A seleção dos animais no momento do teste foi realizada de modo randomizado, sendo que o experimentador não teve conhecimento prévio do grupo em teste.

Os animais depois de um período de ambientação foram tratados com o extrato das folhas/talos de *Eupatorium ayapana* V. (solubilizado em salina 0.9% + Tween 80 a 1%) nas doses de 100, 200, 400, 600 e 800 mg/Kg, através de gavagem (v.o.), 1 hora antes dos testes. O grupo controle recebeu veículo (salina 0,9 % + Tween 80 a 1%) no mesmo volume dos grupos tratados com o extrato (10 ml/Kg, v.o.). Como droga padrão nos testes do campo aberto e labirinto em cruz elevado foi utilizado o DZP (1 mg/Kg, v.o), e no teste do nado forçado a Fluoxetina (10 mg/Kg, v.o.). Os ratos foram observados em ambiente fechado e isento de ruídos, com iluminação adequada, de baixa intensidade e temperatura constante de (25 ± 1°C). Os testes foram realizados de forma sequencial no campo aberto (5 min.),

LCE (5 min.) e nado forçado (5 min.). Foi utilizado álcool a 10% para a remoção de resíduos e odor do animal nos equipamentos do campo aberto e LCE. No teste do nado forçado, foi realizada a troca da água do recipiente para cada animal.

3.2.4.2- Teste do campo aberto

Para este teste, foi utilizada uma arena em madeira (100x100x40cm), pintada com material não permeável de cor preta, com assoalho dividido por linhas brancas em 25 quadrantes iguais de 20x20 cm (figura 06).

O campo aberto é uma metodologia que possibilita avaliar a “emocionalidade” do animal, pois se sabe que a ambulação e o comportamento de levantar são atividades ligadas, principalmente, a uma boa coordenação motora, enquanto que o comportamento de limpeza e a defecação estão associados muito mais ao estado emocional do animal (CARLINI et al. 1984).

Os animais foram colocados individualmente no quadrante central do campo aberto, sendo então permitido o livre deslocamento dentro do aparato por 5 minutos, tempo no qual foram contabilizados os seguintes indicadores, de acordo com o protocolo padronizado (PANDOLFO et al. 2007):

- a) Locomoção Total;
- b) Número de quadrantes centrais cruzados (locomoção central);
- c) Número de quadrantes periféricos cruzados (locomoção periférica);
- d) Percentual da locomoção central em relação a locomoção total;
- e) Tempo na área central;
- f) Frequência do comportamento de levantar-se (*rearing*);
- g) Autolimpeza corporal (*grooming*);
- h) Bolo fecal.

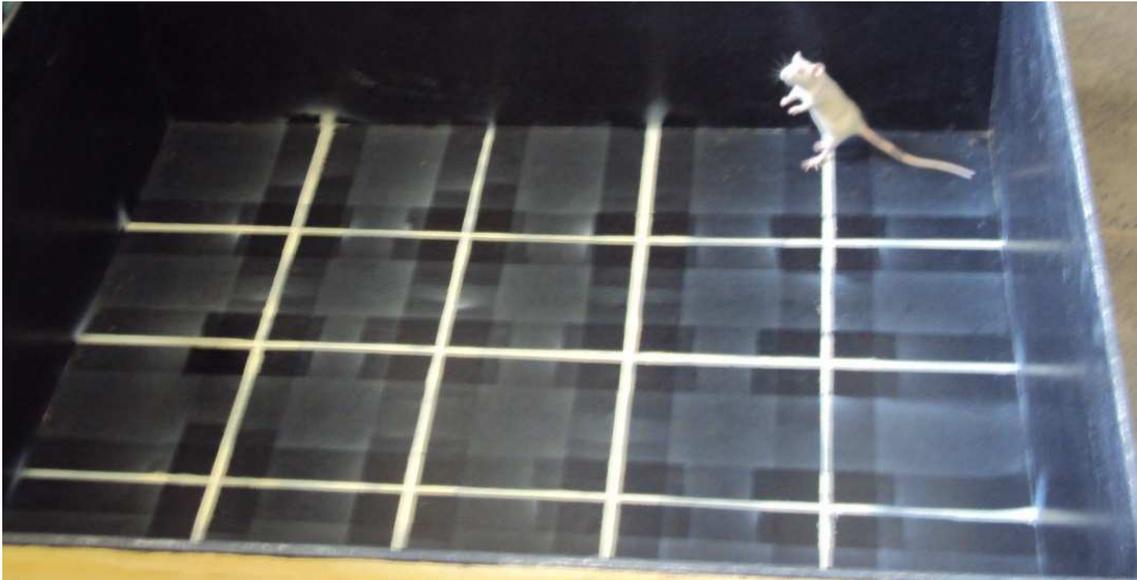


Figura 07- Arena para a realização do teste do campo aberto.

Não foi considerada locomoção quando o animal colocou uma, duas ou três patas em um dos quadrantes, com retorno ao quadrante original. A percentagem de número de quadrantes centrais percorridos foi calculada utilizando a seguinte fórmula: (PANDOLFO et al. 2007)

$$\text{NQC} / \text{NQC} + \text{NQP} \times 100 \quad (1)$$

NQC: número de quadrantes centrais

NQP: número de quadrantes periféricos

3.2.4.3- Teste do labirinto em cruz elevado

O teste foi realizado em um aparato feito no próprio laboratório, que consiste em quatro braços dispostos em cruz, sendo dois abertos oposto, e dois fechados também opostos, elevados do chão em 50 cm.

Um dos modelos mais amplamente usados na pesquisa e validados para ansiedade em ratos (PELLOW et al. 1985) e camundongos (LISTER, 1990) é o labirinto em cruz elevado, que é baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos. Foi derivado do trabalho de Montgomery (1955) e a premissa básica é que ambientes novos evocam curiosidade e medo criando desta forma um típico conflito de aproximação/esquiva.

O LCE é um dos principais modelos usados no estudo da ansiedade. Surgiu dos experimentos com exploração e medo realizados no laboratório de Montgomery no século passado, nos anos 50. Nesses trabalhos, observou-se uma menor utilização dos braços abertos em relação aos braços fechados e levantou-se a hipótese de que a estimulação provocada pela novidade (o ambiente novo) produzia reações de conflito entre medo e curiosidade, verificadas em comportamentos como tendências à esquiva e aproximação, respectivamente (MONTGOMERY, 1955; MONTGOMERY e MONKMAN, 1955). Nesses estudos, o ambiente novo provocaria um aumento tanto do impulso para explorar como do medo, originando um conflito entre explorar e proteger-se. Este modelo experimental é muito utilizado, não somente para o estudo de drogas ansiolíticas e/ou ansiogênicas, assim como para o estudo dos mecanismos neurobiológicos da ansiedade (LOPES et al. 1996; PELLOW e FILE, 1988).



Figura 08: Labirinto em cruz elevado.

Fonte: <http://www.inec-usp.org>

- a) Número de entradas no braço aberto
- b) Tempo no braço aberto
- c) Número de entradas no braço fechado
- d) Tempo no braço fechado
- e) Percentual de entradas nos braços fechados e abertos
- f) Percentual de tempo nos braços fechados e abertos

As percentagens (%) da EBA e TBA foram calculadas respectivamente de acordo com as fórmulas (PELLOW et al. 1985):

$$(EBA/EBA+EBF) \times 100 \quad (2)$$

$$(TBA/TBA+TBF) \times 100 \quad (3)$$

3.2.4.4- Teste do nado forçado

Após o teste do LCE, os animais foram avaliados no teste do nado forçado (PORSOLT et al. 1978) e foram colocados em um cilindro Plexiglass (30 cm de diâmetro e 50 cm de altura), contendo 40 centímetros de volume de água a uma temperatura de 23 ± 1 °C por 5 minutos (figura 08).

Esse teste é usado para reproduzir aspectos relevantes da depressão humana nas espécies de roedores. Animais que mostram níveis elevados de imobilidade nesse teste assumem um estado patológico do tipo depressivo, o que pode ser explorado pela pesquisa pré-clínica da depressão, além de ser um modelo muito utilizado para as avaliações dos antidepressivos (ALCARO et al. 2002; PETIT-DEMOULIERE et al. 2005).

Os ratos geralmente exibem quatro tipos de comportamentos em um tempo de 5 minutos: fuga; imobilidade contínua (permanecer flutuando, mantendo somente os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da água); nado (circulação em todo o cilindro, nadando de um quadrante para o outro); e *climbing* (“subida”, que é definido como movimentos ascendentes ao longo dos lados do cilindro).

Nos dois primeiros minutos foi observada a fuga, e neste período não foi mensurado nenhum parâmetro, visto que esta fase é considerada a habituação ao teste. Nos três últimos minutos seguintes foi mensurado:

- a) o comportamento do animal de permanecer flutuando, mantendo somente os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da água (*imobilidade contínua*);
- b) a circulação do animal em todo o cilindro, nadando de um quadrante para o outro (nado);
- c) movimentos de “subida” do animal, que consiste em movimentos ascendentes ao longo dos lados do cilindro (*climbing*).

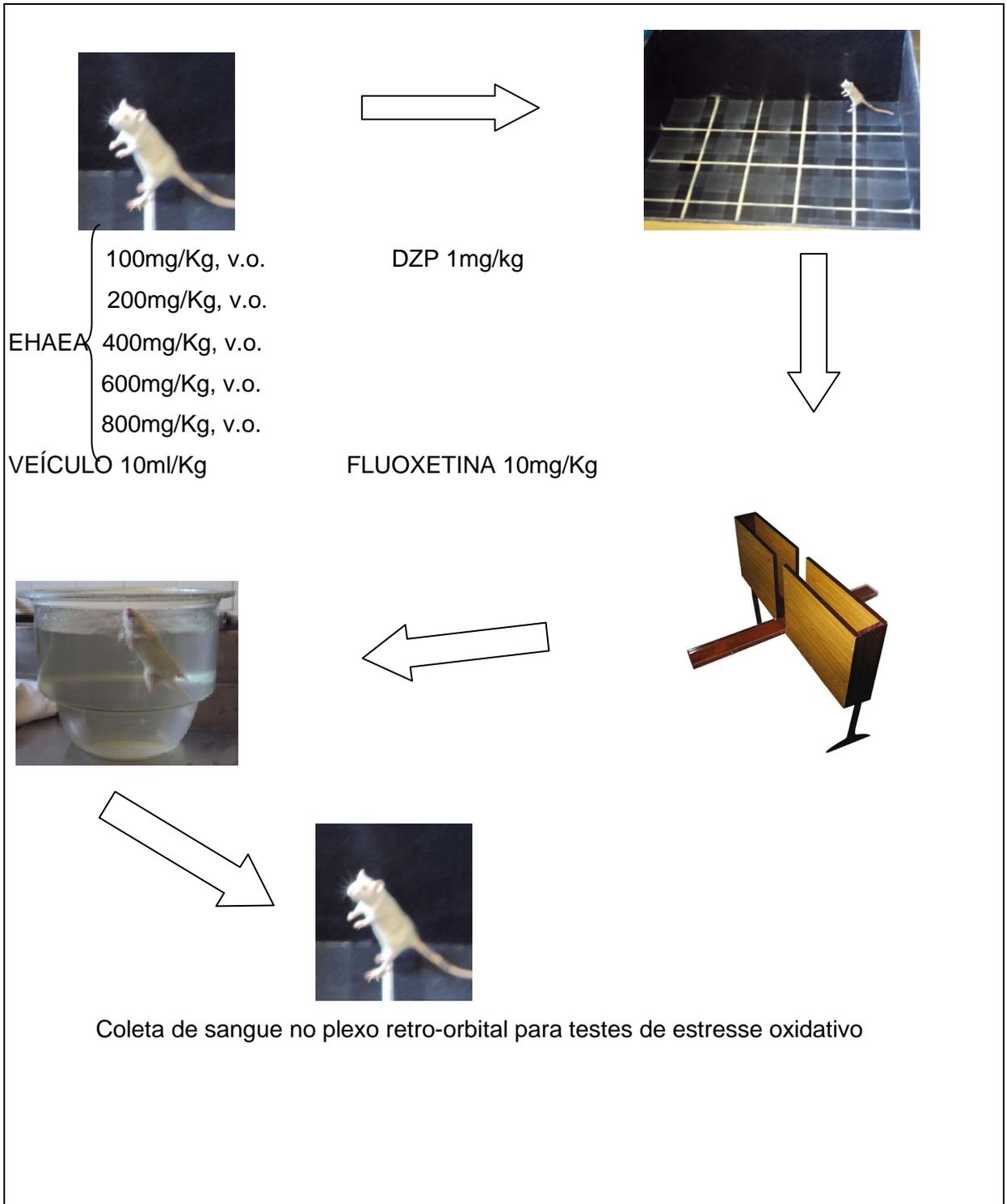


Figura 09- Teste do nado forçado: Ilustração representativa do tanque cilíndrico para indução do nado forçado. (Fonte: INEC/USP).

As avaliações foram realizadas por um experimentador que não tinha conhecimento prévio a que grupo pertencera cada animal. A redução do tempo do nado ou da subida, e aumento do tempo da imobilidade foram definidos como indicativo de comportamentos relacionados à depressão (CRYAN et al. 2002; KIRBY e LUCKI, 1998).

Após os ensaios comportamentais, foi realizada a coleta de um volume de aproximadamente 2,0 ml de sangue na região do plexo retro-orbital de cada animal

para realização das dosagens da bioquímica oxidativa: capacidade antioxidante total; malondialdeído; nitritos e nitratos presentes.



QUADRO 05- Esquema dos testes comportamentais

3.2.5- Avaliação da Atividade Antinociceptiva

3.2.5.1- Protocolo experimental

Os camundongos foram divididos em grupos (n=7-10) e tratados com o veículo ou com o extrato hidroalcoólico das folhas/talos de *Eupatorium ayapana* nas doses de 200, 400, 600 e 800 mg/kg, 1 hora (v.o.) antes da aplicação da formalina. O grupo controle recebeu veículo (solução salina 0,9 % + Tween 80 a 1%) no mesmo volume dos grupos tratados com o extrato.

Para administração oral das drogas utilizou-se uma seringa de 1 mL montado uma cânula oral (0,1cm x 4cm). É importante ressaltar que antes dos testes os camundongos foram mantidos em jejum por 12 horas, assim como durante os experimentos.

3.2.5.2- Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6%.

As contorções abdominais, descritas de acordo com método já padronizado (KOSTER et al. 1959), foram induzidas em camundongos (n=7), com peso de 25-30 g, através da administração de ácido acético 0.6% (i.p.), em volume de 0,1 mL a cada 10 g de peso do animal. A reação do animal a esse estímulo é o desenvolvimento de movimentos repetidos de contração da parede abdominal, rotação do corpo e extensão das patas traseiras. Este conjunto de reação é denominado contorção abdominal, e a intensidade da nocicepção foi quantificada como o número total de contorções abdominais durante o período de observação de 20 minutos iniciando-se 10 minutos após a administração do ácido acético 0,6% (i.p.). Os animais, durante o tempo de observação, foram contidos em funis de vidro com diâmetro de aproximadamente 22 cm.

Os animais foram divididos em 6 grupos, sendo, o controle somente com o veículo (solução salina 0,9% + Tween 80 a 1%); o controle com a droga padrão (indometacina); e 4 doses do EHAEA(200, 400, 600, e 800 mg/kg, solubizados com Tween 80 a 1%). As doses do EHAEA foram administradas uma hora antes da aplicação do agente nociceptivo. O grupo controle recebeu apenas o veículo

(solução salina 0,9% + Tween 80 a 1%, v.o., grupo controle), uma hora antes da administração do ácido acético. A droga padrão, indometacina (5 mg/kg, v.o.), foi administrada 60 minutos antes da administração do ácido acético.

3.2.5.3 Teste da Placa Quente

Foi utilizado o modelo conhecido como placa quente (MACDONALD et al. 1946). Os animais foram pré-testados no dia anterior ao teste para se obter o valor de latência basal, com um tempo de corte de 30 segundos para minimizar danos ao tecido. No teste, os camundongos foram colocados sobre uma placa de alumínio (Ugo Basile) aquecida a temperatura fixa ($50 \pm 0.5^\circ \text{C}$) e foi anotado o tempo, em segundos, que o animal manifestou alguma reação em resposta ao estímulo térmico. Esta reação é esterotipada e consiste em pular ou lambear as patas posteriores. Os experimentos foram iniciados 60 minutos após a administração do EHAEA (200, 400, 600 e 800 mg/kg, v.o.) e do grupo controle (salina 0.9% + Tween 80 a 1%). Um grupo foi tratado com morfina (10 mg/kg, s.c.) 45 minutos antes dos animais serem colocados na placa aquecida. Todos os grupos foram constituídos por 7 animais.

3.2.5.4- Teste da Formalina

Este modelo é amplamente utilizado para avaliar comportamentos nociceptivos em roedores (ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK, 1994). A injeção de formalina provoca uma resposta nociceptiva em duas fases (DUBBUISSON; DENNIS, 1977) permitindo avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (1ª fase), observada de 0-15 minutos, onde há estimulação direta dos neurônios nociceptivos, e a inflamatória 15-30 minutos (2ª fase), esta fase parece ser dependente da combinação de uma reação inflamatória no tecido periférico lesionado, com mudanças funcionais no corno dorsal da medula (HUNSKAAR, HOLE, 1987; TJOLSEN et al. 1992).



Figura 10- Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formalina 1%.

No dia do experimento os animais foram colocados sob funis de vidro (diâmetro de 22 cm) 30 minutos antes da administração da formalina, para ambientação. Após a administração intraplantar de formalina (20 μ L de solução de formalina 1%) o tempo que cada camundongo passou lambendo a pata traseira foi cronometrado em duas fases, sendo a primeira de 0-5 minutos, e a segunda de 15-30 minutos após a administração de formalina. Os animais foram divididos em 6 grupos, sendo o controle com veículo (salina 0,9% + Tween 80 a 1%, 0,1ml/10g), o controle com a droga padrão (morfina 4mg/Kg, s.c.), e 4 doses do EHAEA (200, 400; 600 e 800 mg/kg, v.o.) que foram administradas 60 minutos antes da injeção de formalina. O grupo controle recebeu apenas veículo (salina 0,9% + Tween 80 a 1%, v.o., 0,1ml/10g) uma hora antes da administração de formalina e outro grupo de animal recebeu a droga padrão morfina (4mg/kg, s.c.) 30 minutos antes da formalina (HUNSKAAR & HOLE, 1985).

Com o objetivo de verificar a participação do sistema opióide, foi realizada a co-administração do antagonista naloxona (0,4 mg/kg, s.c.) 15 minutos antes da administração do EHAEA em todas as doses ; um grupo somente a naloxona (0,4mg/Kg s.c.) e outro grupo com naloxona (0,4mg/Kg, s.c., 45 minutos antes da formalina) e morfina (4mg/Kg, s.c., 30 minutos antes da formalina). Todos os grupos foram constituídos por 7 animais.

3.2.6- Bioquímica Oxidativa

Após os testes comportamentais, os animais (ratos Wistar, n=7-10) foram anestesiados com éter, e então foi realizada a coleta de sangue na região do plexo retro-orbital de cada animal, com o auxílio de um capilar de hematócrito heparinizado em tubos de *ependorf* com heparina, em seguida o plasma foi coletado após o sangue ter sido centrifugado a 2500 RPM por 15 minutos, o qual foi utilizado nos testes de bioquímica oxidativa.

3.2.6.1 Avaliação da Capacidade Antioxidante Total

Para determinação deste parâmetro foi realizado o teste TEAC (capacidade antioxidante Trolox equivalente), que consiste na inibição do cátion $ABTS^{+\bullet}$ (radical 2,2-Azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato], sal de diamônio), por antioxidantes presentes na amostra (VASCONCELOS et al. 2007).

Na metodologia utilizada (Rufino et al. 2007), inicialmente são preparadas as seguintes soluções estoques: 7 mmol de ABTS e 2,45 mmol de persulfato de potássio. A partir da mistura destas duas soluções (88 μ L de solução ABTS e 5 μ L de persulfato de potássio) foi originada uma solução de radical $ABTS^{+\bullet}$, que ficou em repouso em ausência de luz por 12 horas, originando uma solução azul marinho.

Após este período, foi preparada uma solução trabalho, onde, 1 ml de solução de radical $ABTS^{+\bullet}$ foi misturado com etanol (P.A.) até a absorbância chegar próximo aos 0,7 em 734nm. O percentual de inibição de $ABTS^{+\bullet}$ é determinado em função do tempo.

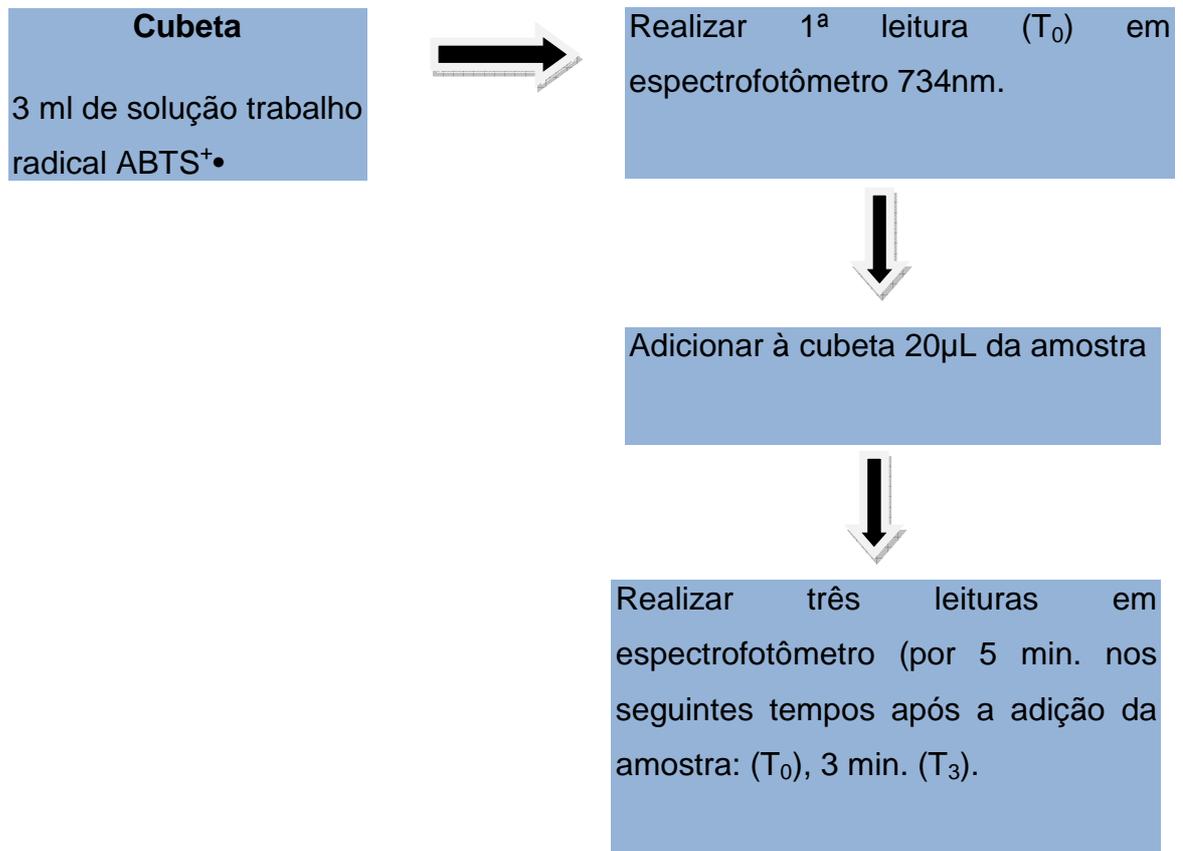


Figura 11: Procedimento para determinação da capacidade antioxidante total

A avaliação da capacidade antioxidante total foi realizada pelo método proposto por MILLER et al. (1993), modificado por RE et al. (1999), que se baseia na exposição da amostra (na qual se encontram os antioxidantes) a um radical livre produzido em quantidades controladas. A incubação do ABTS⁺• com a enzima metahemoglobina peroxidase produz o radical ABTS^{®+}, o qual possui uma cor azul esverdeada estável, com leitura espectrofotométrica em 730nm. A adição da amostra produz a inibição na produção de radical ABTS^{®+}, levando à diminuição na absorvância em 730 nm.

Protocolo de dosagem:

Deve-se misturar bem e ler a absorbância (A1) em 730nm. Adicionar 20µL de substrato e disparar o cronômetro simultaneamente. Ler a absorbância em 730nm após exatamente três minutos (A3). As cubetas devem ser mantidas à 37°C e as leituras realizadas em espectrofotômetro com fluxo contínuo.

3.2.6.2- Dosagem do Malondialdeído (MDA)

A quantificação de MDA nos sistemas biológicos é um parâmetro importante para avaliação do estresse oxidativo celular (PILZ, MEINEKE, GLEITER, 2000; SIM, et al. 2003). O método introduzido por YAGI (1976) tem sido amplamente utilizado. O princípio deste método consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo o produto detectado através de leitura espectrofotométrica na região do visível. Embora este método ainda seja amplamente utilizado, ele não é específico para detecção dos produtos de peroxidação lipídica (STEGHENS et al. 2001), uma vez que quantifica a soma das diferentes substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, denominadas TBARS. No entanto para este estudo foi utilizada outra metodologia.

A dosagem do malondialdeído foi realizada segundo o método proposto por KOHN e LIVERSEDGE (1944), modificado por PERCÁRIO, et al. (1994). O método se baseia na reação de duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma molécula de MDA, formando um complexo TBA-MDA-TBA de cor rósea, com absorbância em 535nm.

Deve-se misturar bem e incubar a 95°C por uma hora. Após este procedimento, resfriar em água corrente, homogeneizar em vórtex e centrifugar a 2000 rpm por 15 minutos. Colher 3 mL do sobrenadante para leitura espectrofotométrica em 530 nm.

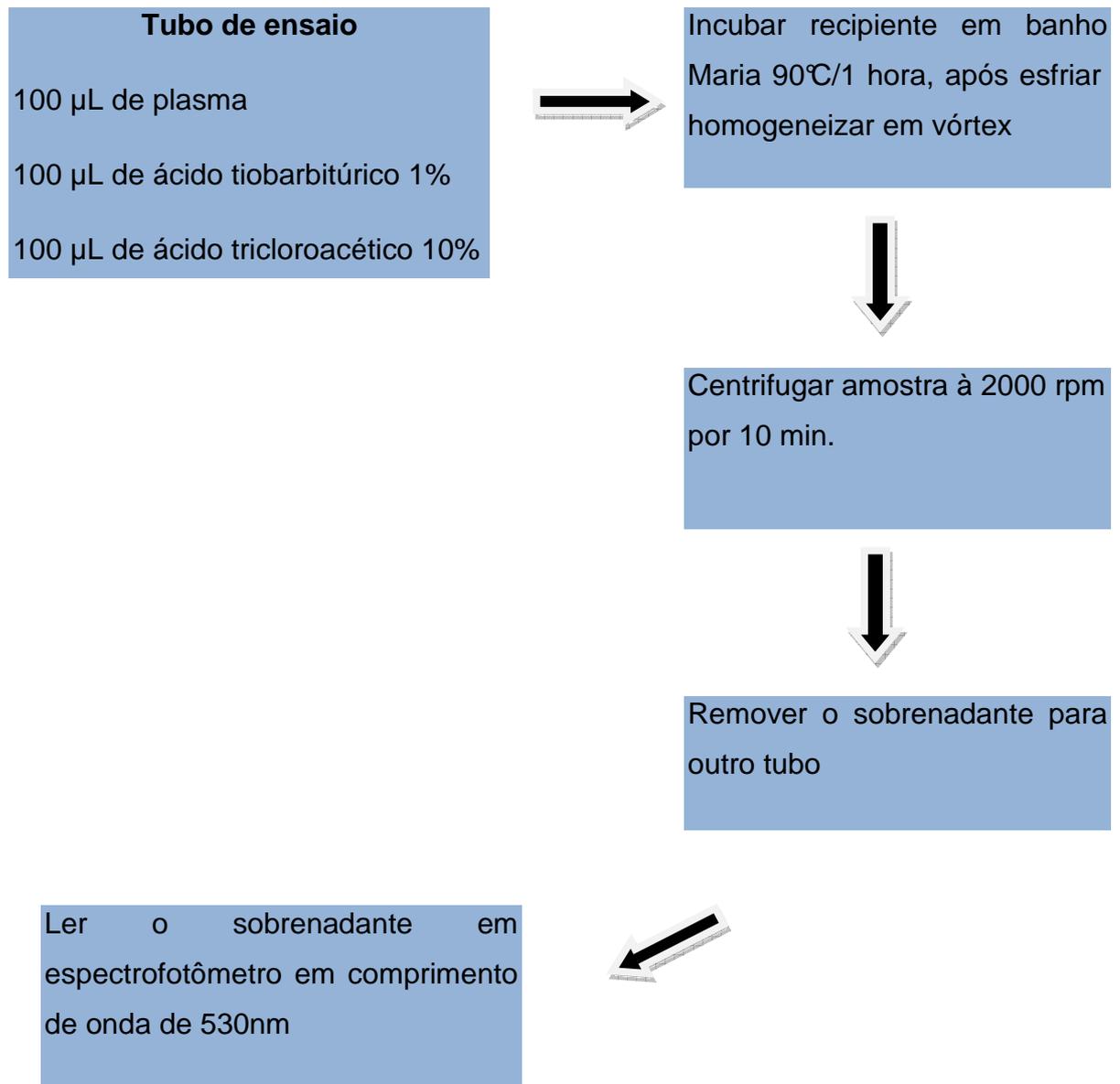


Figura 12- Procedimento para determinação das concentrações de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

3.6.2.3- Dosagem de Nitrato e Nitritos

Para a dosagem de nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) deve-se adicionar reagente de Griess na amostra (plasma) em proporção 1:1, ou seja, para cada 100µL de amostra, adicionar 100µL do reagente em placa de ELISA. Depois de adicionado o reagente, aguardar 10 minutos e realizar a leitura em leitor de ELISA a 540 nm.

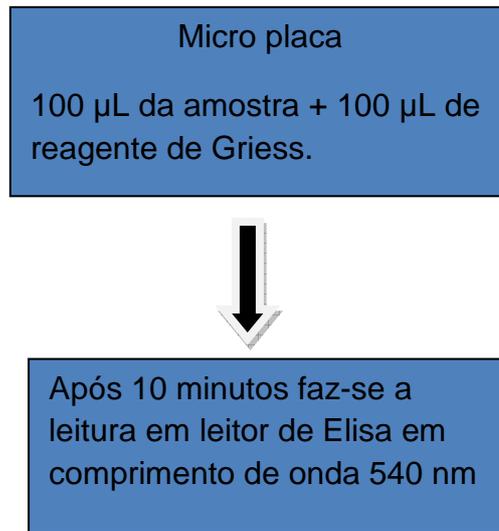


Figura 13- Procedimento para detecção de óxido nítrico.

3.3- Análise estatística.

Os dados experimentais foram expressos como média \pm EPM e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Turkey, para comparações *post hoc* utilizando o programa Graph Prisma 5.0.

Em todas as análises estatísticas, considerou-se o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,05$). Os asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) caracterizam o grau de significância.

RESULTADOS

4. RESULTADO

4.1- Teste de toxicidade oral aguda

Os animais tratados com o EHAEA na dose de 2000 mg/Kg, v.o., apresentaram letargia e sonolência, 30 e 60 minutos após a administração do extrato, não havendo outras alterações nos animais até o 14^o dia.

Com a dose de 5000 mg/Kg, v.o., o sintoma de letargia e sonolência foi mais proeminente em: 30, 60 e 90 minutos, em relação à dose de 2000 mg/Kg.

No período de observação de 24 h, nas doses acima citadas, os animais coçavam o focinho, labiam as patas, movimentavam-se e alimentavam-se normalmente. Não houve nenhuma alteração no 2^o e 3^o dias de observação, assim como nos demais dias seguindo-se até o 14^o dia. Portanto, o EHAEA, administrado por gavagem (v.o), de acordo com os efeitos farmacológicos gerais observados nos camundongos, apresentou uma baixa toxicidade oral aguda. Haja vista, que nenhum dos animais tratados com EHAEA morreu.

4.2- Testes neurocomportamentais

4.2.1- Teste do campo aberto

No teste do campo aberto que avalia a atividade locomotora, foram medidos os seguintes parâmetros: locomoção total (n^o total de quadrantes cruzados); percentual do tempo no quadrante central em relação ao tempo total; percentual do número de quadrantes centrais cruzados em relação ao número total de quadrantes cruzados; número de levantamentos (exploração vertical); número de auto-limpeza (grooming) e número de bolo fecal. Os resultados foram expressos como o número de quadrantes cruzados (locomoção espontânea total), tempo no quadrante central pelo tempo total (TC/TT X 100), número de quadrantes centrais cruzados pelo total de quadrantes cruzados, número de *rearing* e de *grooming*.

Na figura 14, observa-se que houve diminuição da locomoção nas doses, de 200, 400, 600 e 800mg/Kg em comparação com o controle [EHAEA 200mg ($F_{(6,45)}=4,474$; $p<0,05$); EHAEA 400mg ($F_{(6,45)}=5,099$; $p<0,05$); EHAEA 600mg ($F_{(6,45)}=6,266$; $p<0,05$); EHAEA 800mg ($F_{(6,45)}=5,322$; $p<0,05$)], sugestivo de um possível efeito sedativo do extrato, e aumento na locomoção da droga padrão, em comparação com o controle.

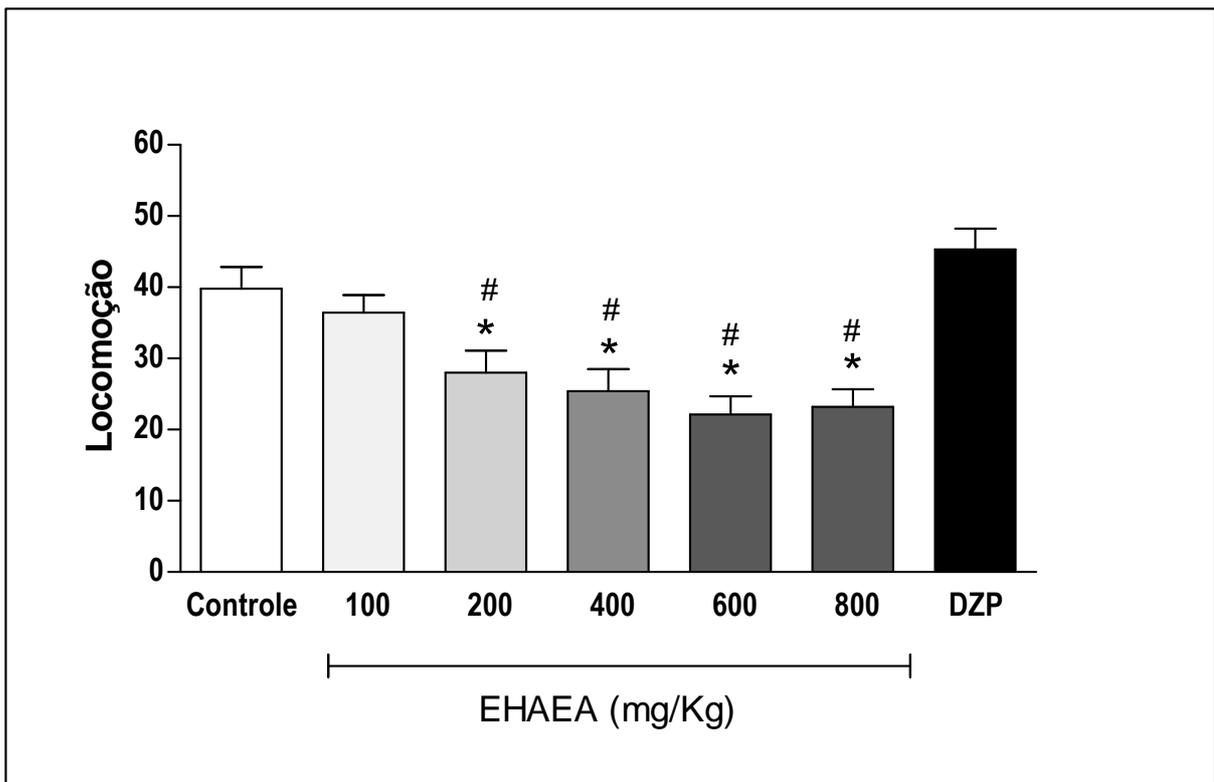


Figura 14- Efeito do tratamento oral com o EHAEA no teste de campo aberto (número total de quadrantes cruzados) em ratos adultos. Cada barra apresenta a média \pm E.P.M de $n=7-10$ animais. * $p<0,05$ representa a diferença significativa em relação ao controle. # $p<0,05$ representa a diferença significativa em relação ao controle positivo (DZP). (ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test).

Na figura 15, houve significância na dose de 600 e 800mg/Kg [EHAEA 600mg ($F_{(6,36)}=5,870$; $p<0,05$); ($F_{(6,36)}=5,771$; $p<0,05$)], e da droga padrão em comparação ao controle [DZP ($F_{(6,36)}=14,01$; $p<0,05$)], demonstrando que os animais aumentaram a deambulação na área central em relação a área total.

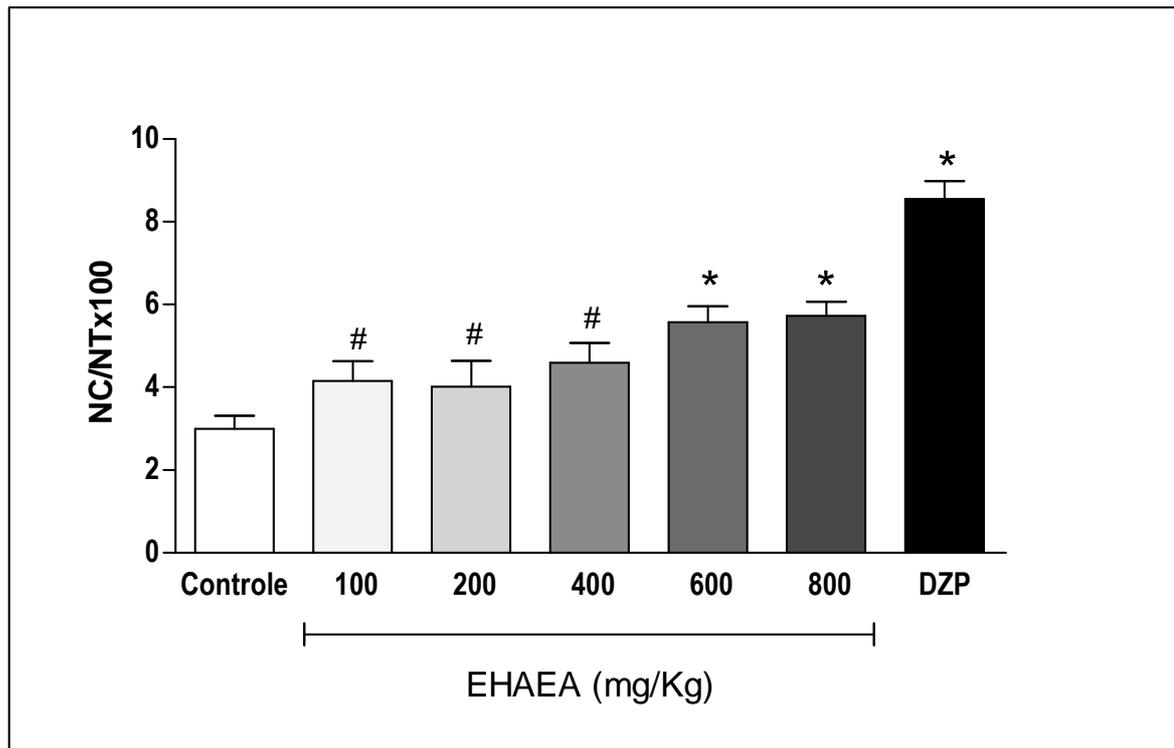


Figura 15- Efeito do tratamento oral com o EHAEA no teste do campo aberto (% de quadrantes centrais cruzados/quadrantes totais cruzados) em ratos adultos. Cada barra apresenta a média \pm E.P.M. de $n=7-10$ animais. * $p<0,05$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle. # $p<0,05$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle positivo (DZP). (ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test).

Na figura 16, que demonstra o tempo de permanência dos animais na área central, onde não houve aumento significativo nas doses usadas em comparação ao controle, no entanto houve significância com relação a droga padrão [DZP ($F_{(7,48)}=7,81$; $p<0,05$)]. Todas as doses do extrato que foram utilizadas apresentaram diferença em comparação a droga padrão o qual teve o tempo aumentado na área central, como o esperado, exercendo sua ação ansiolítica. [EHAEA 100mg ($F_{(7,48)}=5,89$; $p<0,05$); EHAEA 200mg ($F_{(7,48)}=5,69$; $p<0,05$); EHAEA 400mg ($F_{(7,48)}=5,70$; $p<0,05$); EHAEA 600mg ($F_{(7,48)}=4,69$; $p<0,05$); EHAEA 800mg ($F_{(7,48)}=3,37$; $p<0,05$); DZP($F_{(6,37)}=10,53$; $p<0,05$)].

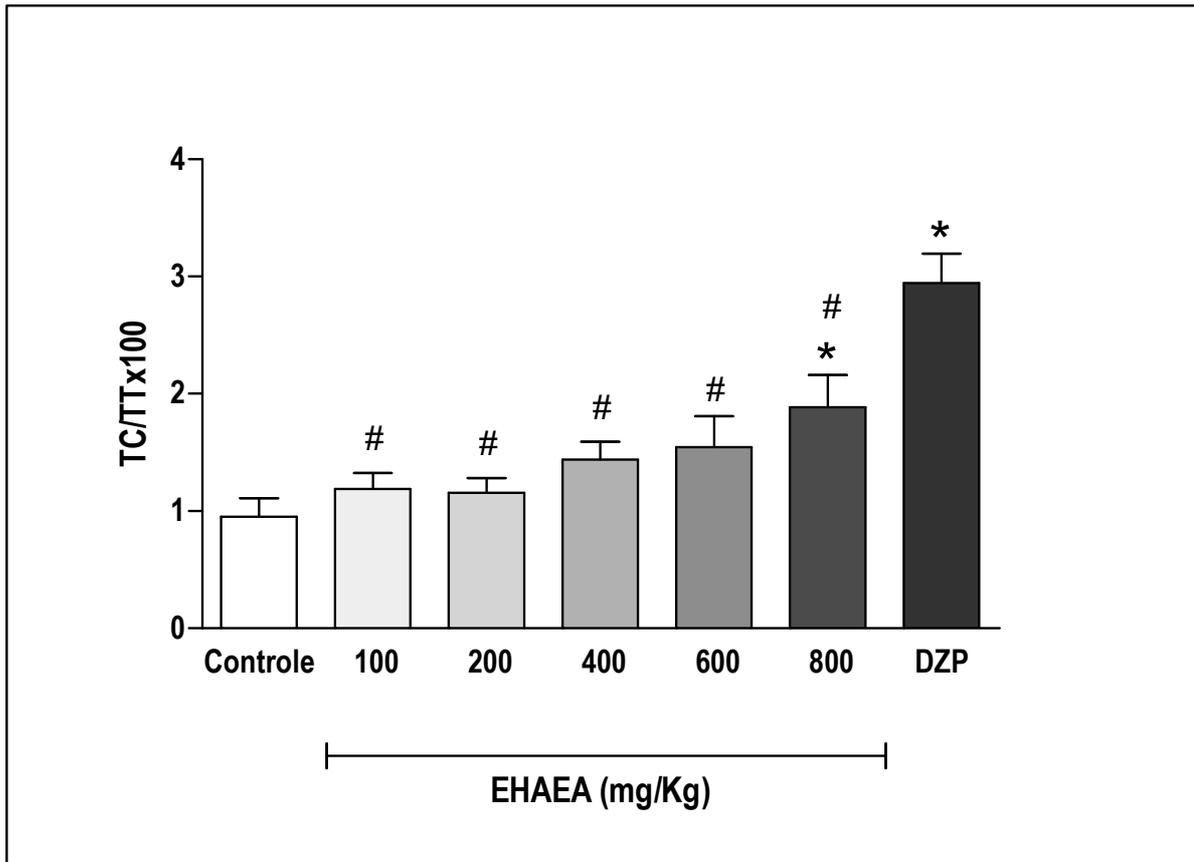


Figura 16- Efeito do tratamento com o EHAEA no teste de campo aberto (% tempo no quadrante central/tempo total) em ratos adultos. Cada barra apresenta a média \pm E.P.M. de $n=7-10$ animais. * $p<0,05$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle. # $p<0,05$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle positivo (DZP). (ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test).

O número de *rearing*, comportamento nato utilizado pelos ratos para exploração vertical do ambiente desconhecido, também foi considerado parâmetro para análise do estudo comportamental. Os resultados observados na figura 17 demonstram que houve diferença significativa entre todas as doses do extrato em relação ao controle, havendo uma diminuição do número de levantar dos ratos tratados com o EHAEA nas doses de 600mg/Kg e 800mg/Kg próximo ao padrão positivo. [EHAEA 100mg ($F_{(6,33)}= 11,53$; $p<0,001$); EHAEA 200mg ($F_{(6,33)}= 12,77$; $p<0,001$); EHAEA 400mg ($F_{(6,33)}= 14,52$; $p<0,001$); EHAEA 600mg ($F_{(6,33)}= 17,94$; $p<0,001$); EHAEA 800mg ($F_{(6,33)}= 16,01$; $p<0,001$); DZP ($F_{(6,33)}= 16,51$; $p<0,001$)].

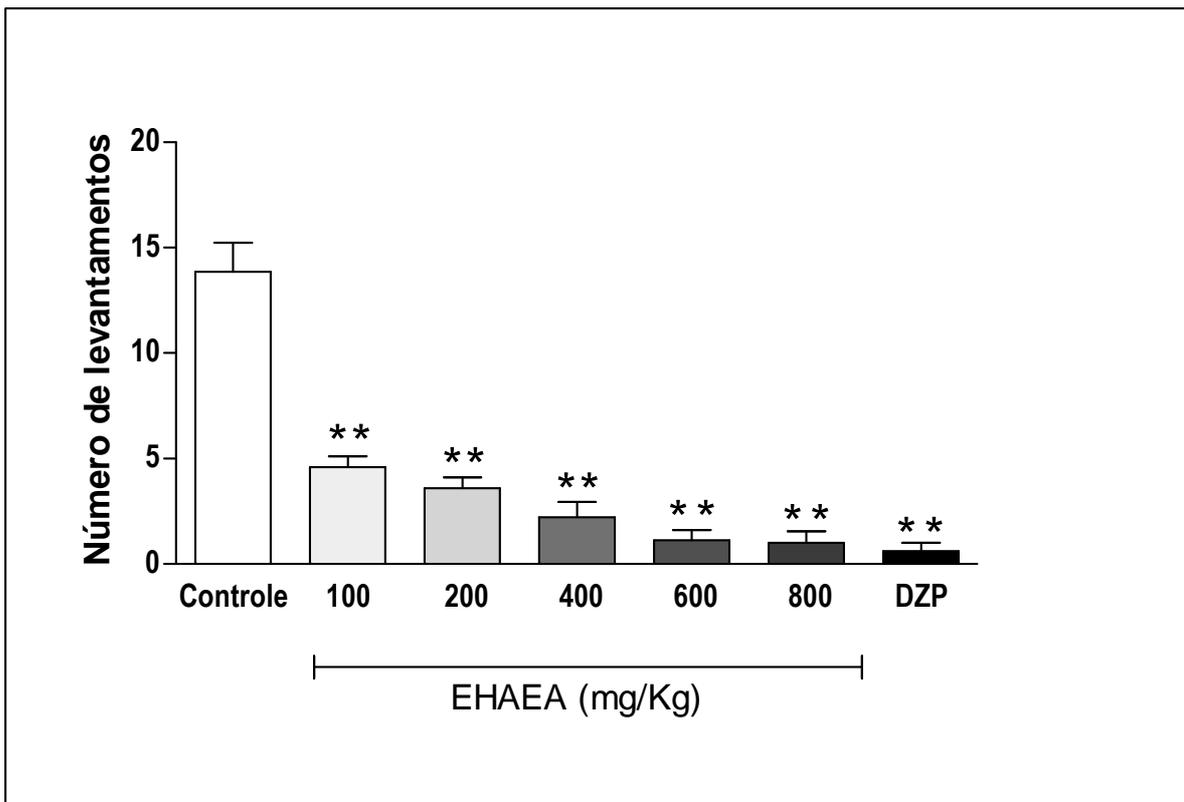


Figura 17- Efeito do tratamento com o EHAEA no teste do campo aberto (número de exploração vertical- *rearing*) em ratos adultos. Cada barra apresenta a média \pm E.P.M. de $n=7-10$ animais. *** $p<0,0001$ representa a diferença significativa em relação ao controle (salina). (ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test).

Na figura 18 avaliou-se o número de auto-limpeza conhecido como *grooming*, como medida de avaliação do nível de estresse e perturbação do animal. A partir dos dados obtidos foi possível verificar que em todas as doses do extrato, assim como, com a droga padrão, houve diminuição deste parâmetro quando comparados ao controle. O resultado do controle positivo foi mais pronunciado como esperado, pelo fato de que drogas ansiolíticas diminuem este comportamento estereotipado do animal. [EHAEA 100mg ($F_{(6,37)}= 4,324$; $p<0,05$); EHAEA 200mg ($F_{(6,37)}= 5,847$; $p<0,05$); EHAEA 400mg ($F_{(6,37)}= 6,60$; $p<0,05$); EHAEA 600mg ($F_{(6,37)}= 6,204$; $p<0,001$); EHAEA 800mg ($F_{(6,37)}= 7,016$; $p<0,001$); DZP($F_{(6,37)}= 10,53$; $p<0,001$)].

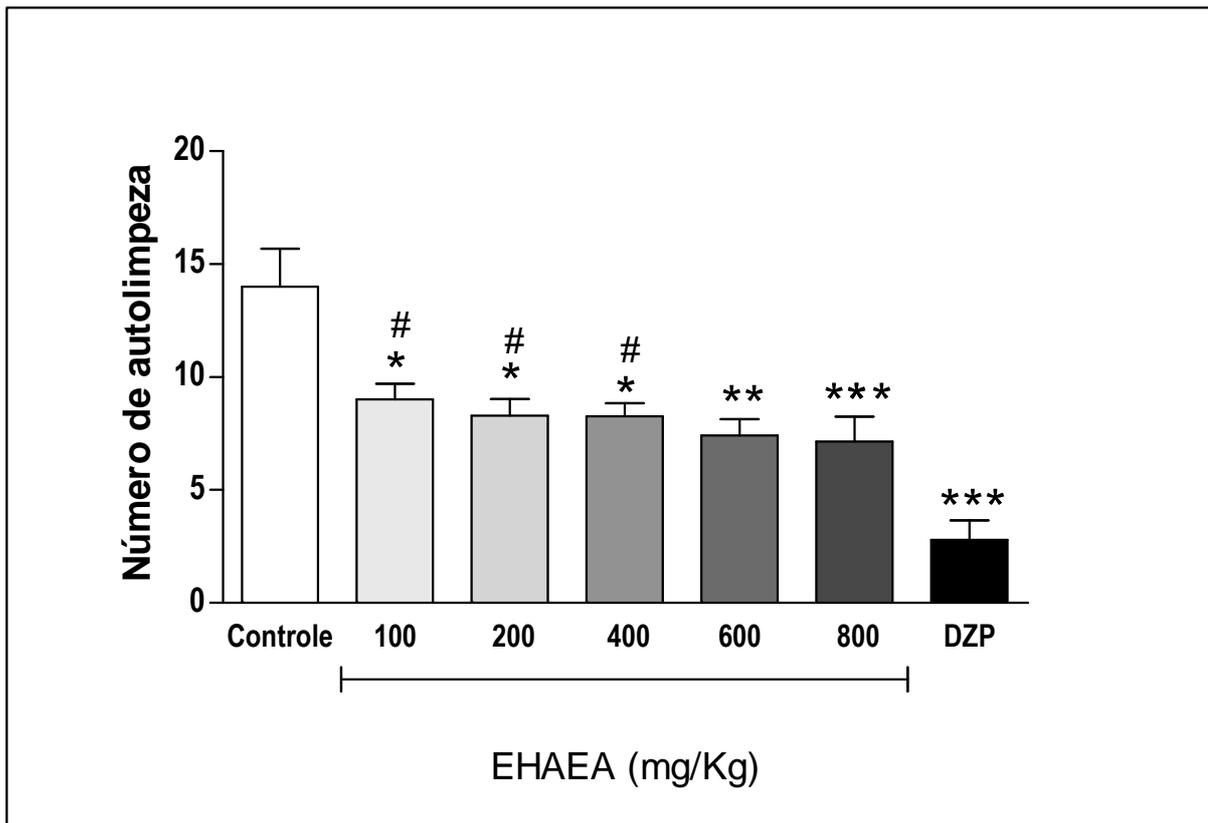


Figura 18- Efeito do tratamento com o EHAEA no teste do campo aberto quanto ao número de *groomings* em ratos adultos. Cada barra apresenta a média \pm E.P.M. de $n=7-10$ animais. * $p<0,05$; ** $p<0,001$; *** $p<0,0001$ representam a diferença significativa em relação ao grupo controle. (ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison Test").

A contagem do número de bolos fecais foi utilizada como parâmetro comportamental, pois é um comportamento nato dos ratos expressar ansiedade ao ambiente desconhecido, também foi considerado parâmetro para análise deste estudo comportamental. Os resultados observados na figura 19 demonstram que houve diferença significativa entre todas as doses do extrato em relação ao controle, com a diminuição do número de bolos fecais dos ratos tratados com o EHAEA em todas as doses de forma dose-dependente, assim como uma diminuição significativa do padrão positivo, ficando evidenciado, portanto, a diminuição de ansiedade. [EHAEA 100mg ($F_{(6,45)}= 3,27$; $p<0,05$); EHAEA 200mg ($F_{(6,45)}= 5,24$; $p<0,05$); EHAEA 400mg ($F_{(6,45)}= 5,73$; $p<0,05$); EHAEA 600mg ($F_{(6,45)}= 6,51$; $p<0,05$); EHAEA 800mg ($F_{(6,45)}= 7,73$; $p<0,001$); DZP ($F_{(6,45)}= 10,68$; $p<0,001$)].

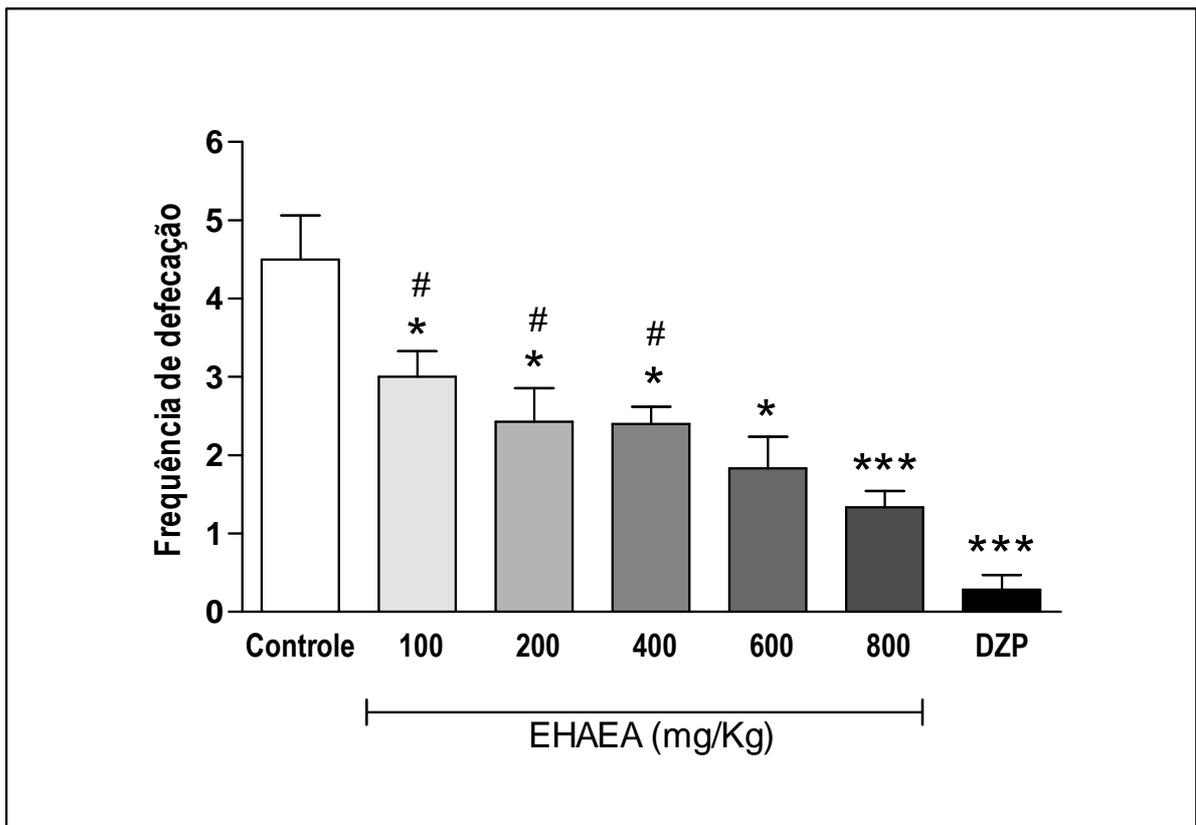


Figura 19- Efeito do tratamento com o EHAEA no teste do campo aberto (número de bolo fecal) em ratos adultos. Cada barra apresenta a média \pm E.P.M. de $n=7-10$ animais. * $p<0,05$; *** $p<0,0001$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (salina); # $p<0,05$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle positivo (DZP). + $p<0,05$ representa a diferença significativa em relação a dose do EHAEA 800mg/Kg. (ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test).

4.2.2- Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Neste teste, o efeito ansiolítico foi definido pelo aumento na proporção das entradas nos braços abertos, relativo ao número total de entradas em ambos os braços, e no tempo de exploração naqueles braços, relativo ao tempo total experimental.

Na figura 20, houve aumento no percentual de entrada no braço aberto nas doses usadas de 400, 600, 800mg/Kg e ao grupo controle positivo em comparação ao grupo controle [EHAEA 400mg ($F_{(7,31)}= 4,80$; $p<0,05$); EHAEA 600mg ($F_{(7,31)}= 6,32$; $p<0,05$); EHAEA 800mg ($F_{(7,31)}= 6,01$; $p<0,05$); DZP($F_{(6,31)}= 10,43$; $p<0,05$)],

havendo também significância da droga padrão em relação as doses do extrato de 100,200 e 400mg/Kg, onde o DZP teve seu percentual de entrada no braço aberto aumentado, [EHAEA 100 ($F_{(7,31)}= 5,23$; $p<0,05$); EHAEA 200 ($F_{(7,31)}= 4,93$; $p<0,05$); EHAEA 400 ($F_{(7,31)}= 5,80$; $p<0,05$)].

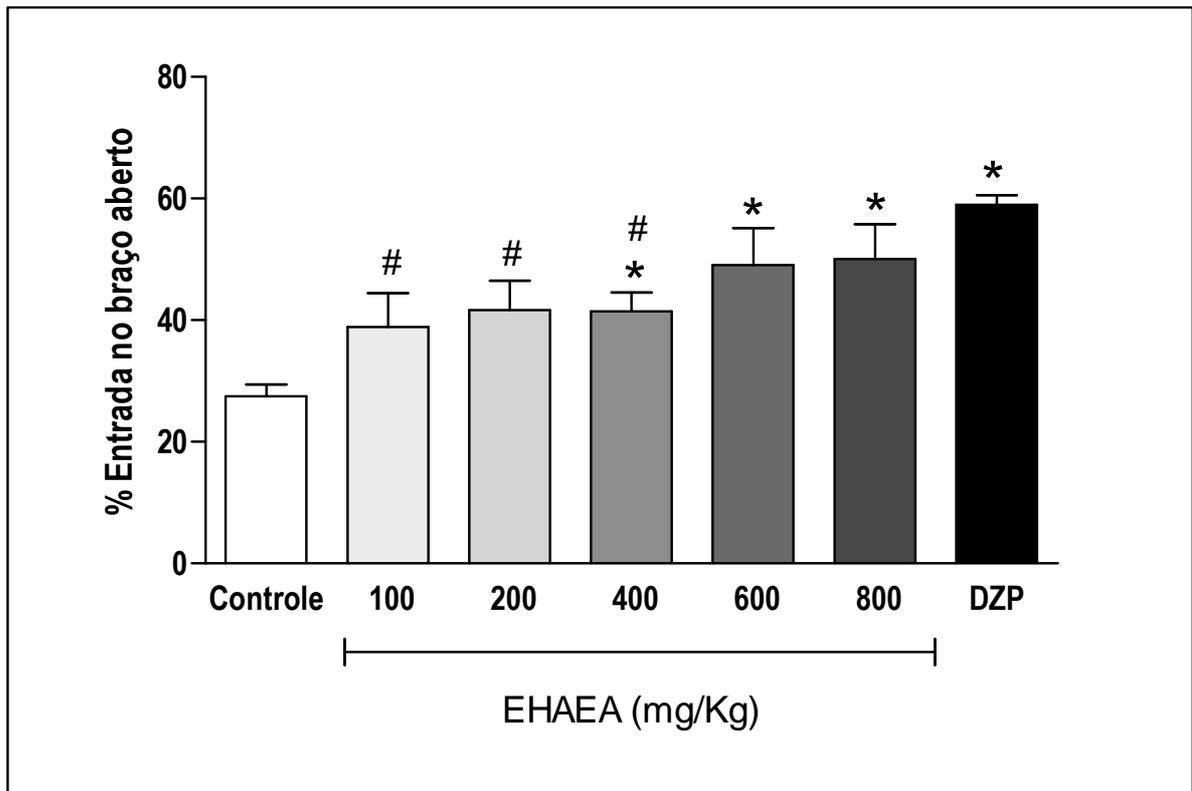


Figura 20- Efeito do tratamento com o EHAEA no teste do LCE (% EBA) em ratos adultos. Cada barra apresenta a média \pm E.P.M. de $n=7-10$ animais. * $p<0,05$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (salina). # $p<0,05$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle positivo (DZP). (ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test).

Na figura 21, que demonstra uma diminuição nas estradas nos braços fechados em todas as doses do EHAEA em comparação ao grupo controle [($F_{(6,27)}= 4,97$; $p<0,05$)], havendo também significância com relação a droga padrão [DZP ($F_{(6,27)}= 9,59$; $p<0,05$)], onde teve seu percentual de entrada no braço fechado diminuído, como o esperado, exercendo sua ação ansiolítica

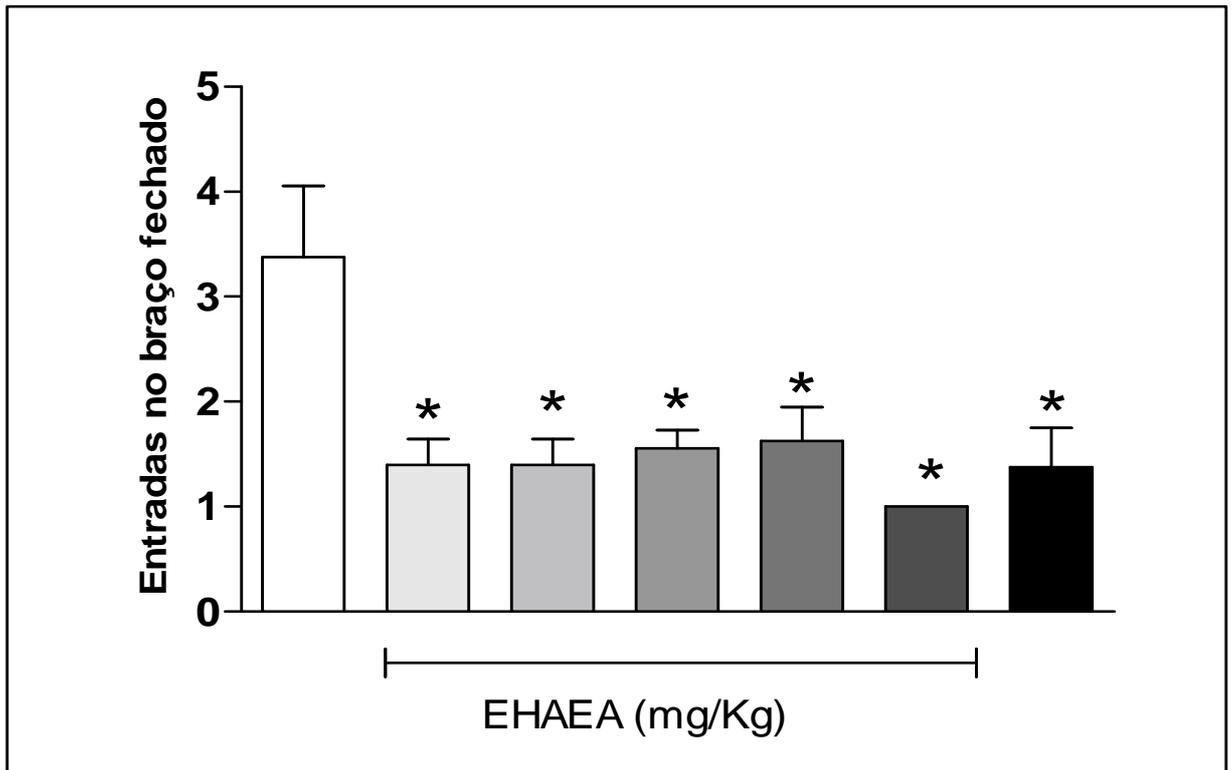


Figura 21- Efeito do tratamento com o EHAEA nas entradas nos braços fechados no teste do LCE (Nº EBF) em ratos adultos. Cada barra apresenta a média \pm E.P.M. de $n=7-10$ animais. * $p<0,05$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (salina). (ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test).

A figura 22 demonstra o percentual de tempo de permanência nos braços abertos, onde, nas doses utilizadas do extrato em comparação ao grupo controle não houve aumento significativo. Houve aumento significativo no percentual de tempo de permanência no braço aberto da droga padrão em comparação ao grupo controle, [DZP ($F_{(6,70)}= 8,81$; $p<0,05$)]. Também, observou-se diferença em todas as doses usadas em comparação a droga padrão [EHAEA 100mg ($F_{(6,70)}= 10,00$; $p<0,05$); EHAEA 200mg ($F_{(6,70)}= 9,37$; $p<0,05$); EHAEA 400mg ($F_{(6,70)}= 10,26$; $p<0,05$); EHAEA 600mg ($F_{(6,70)}= 9,70$; $p<0,05$); EHAEA 800mg ($F_{(6,70)}= 6,25$; $p<0,05$)].

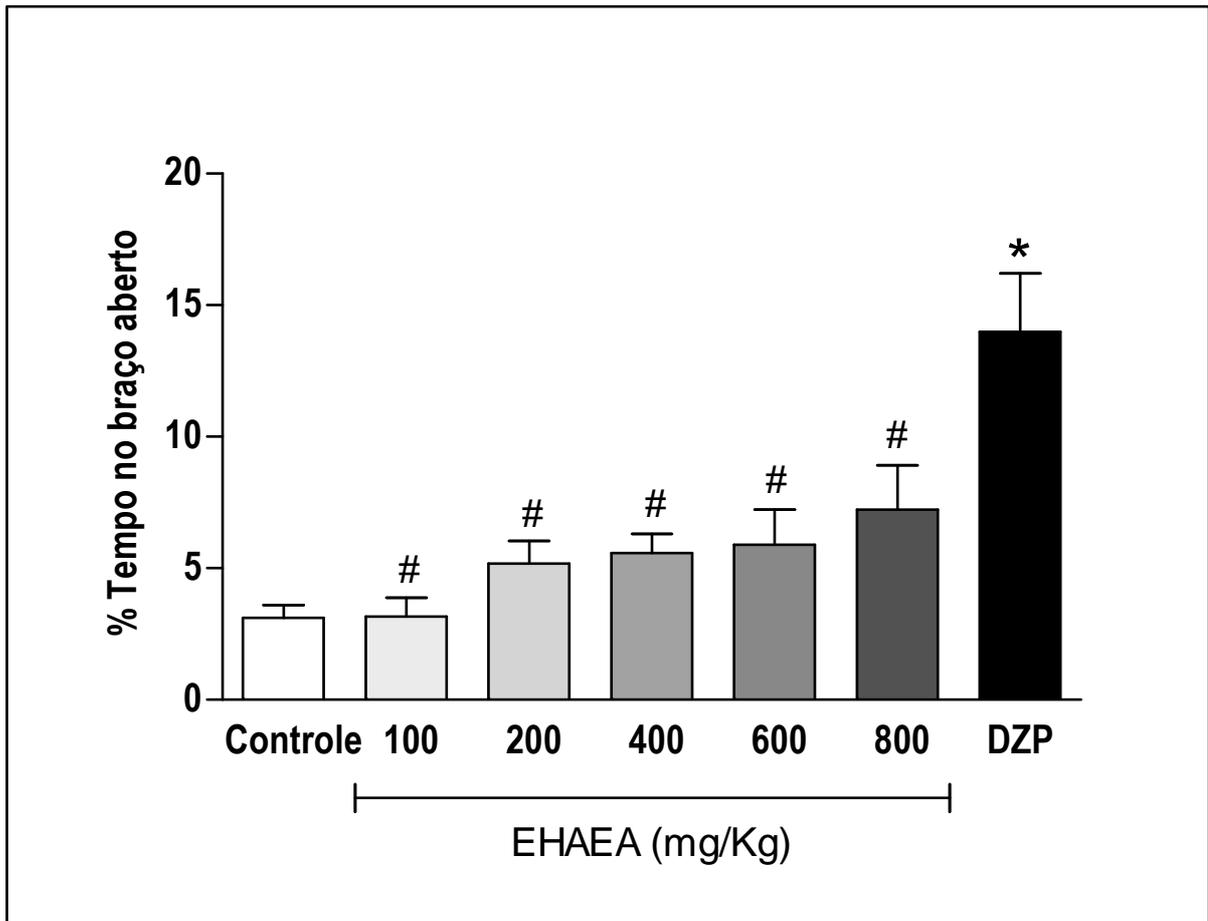


Figura 22- Efeito do tratamento com o EHAEA no teste do LCE (% TBA) em ratos adultos. Cada barra apresenta a média \pm E.P.M. de $n=7-10$ animais. * $p<0,05$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (salina). # $p<0,05$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle positivo. (ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test).

4.2.3 Nado forçado

No teste do nado forçado foi avaliado o tempo de imobilidade do animal em comparação ao grupo controle e ao grupo do controle positivo com fluoxetina.

Na figura 23, observa-se uma diminuição do tempo de imobilidade nas doses de [EHAEA 200mg ($F_{(6,41)}= 6,06$; $p<0,05$); EHAEA 400mg ($F_{(6,41)}= 8,84$; $p<0,05$); EHAEA 600mg ($F_{(6,41)}= 8,58$; $p<0,05$); EHAEA 800mg ($F_{(6,41)}= 7,91$; $p<0,05$)], sugestivo de efeito do tipo antidepressivo do extrato. A fluoxetina, droga padrão de

ação antidepressiva, baixou significativa o tempo de imobilidade, como o esperado na dose utilizada de 10mg/Kg [(F_(6,41)= 11,70; p<0,001)].

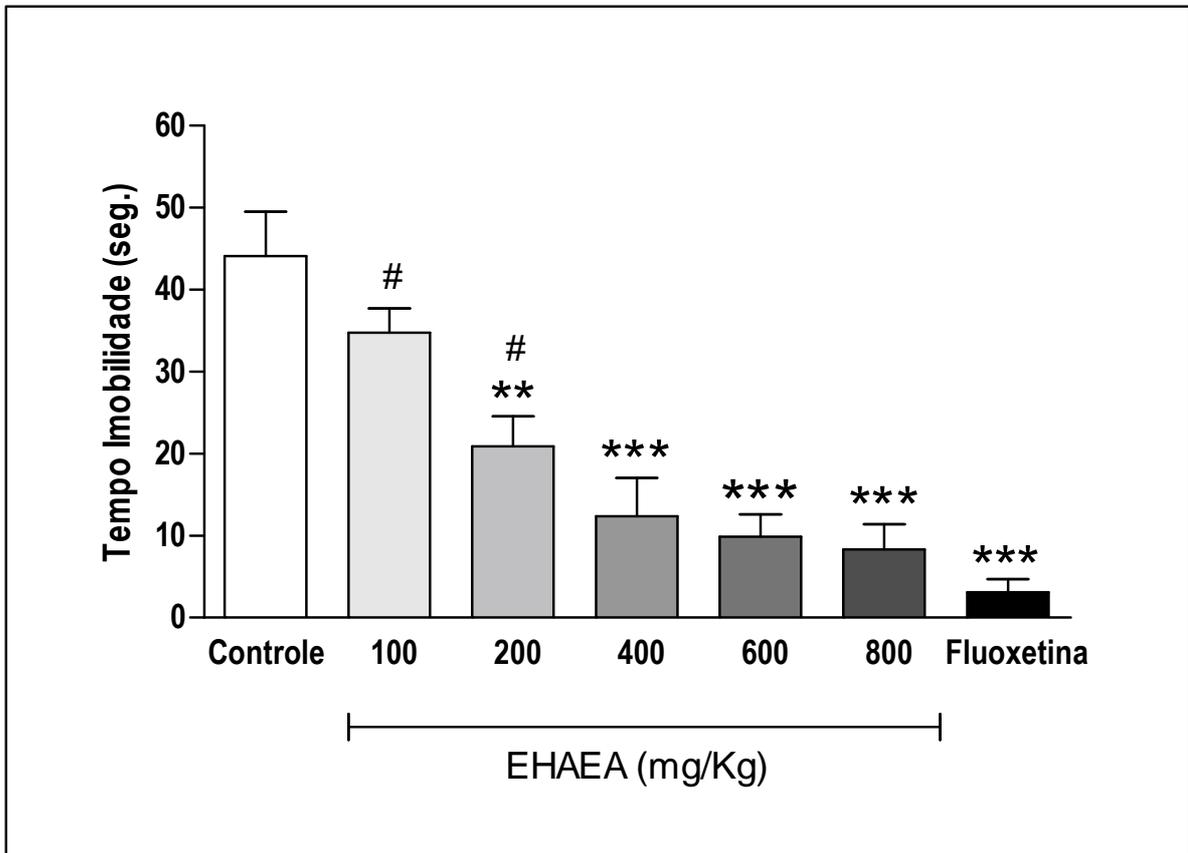


Figura 23- Efeito do tratamento com o EHAEA no teste do nado forçado (tempo de imobilidade) em ratos adultos. Cada barra apresenta a média ± E.P.M. de n=7-10 animais. **p<0,001; ***p<0,0001 representa a diferença significativa em relação ao controle. #p<0,01 representa a diferença significativa da dose de 100 e 200 mg/Kg em comparação as outras doses e a fluoxetina. (ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison Test").

4.3- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

4.3.1- Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6%

Os resultados da Figura 24 demonstram que o tratamento com o EHAEA (200, 400, 600, 800mg/kg, v.o.) diminuem o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% de forma significativa e dose-dependente em comparação ao grupo controle (salina). O controle positivo, um antiinflamatório não-esteroidal (indometacina, 5mg/Kg) também diminui o número de contorções de maneira significativa.

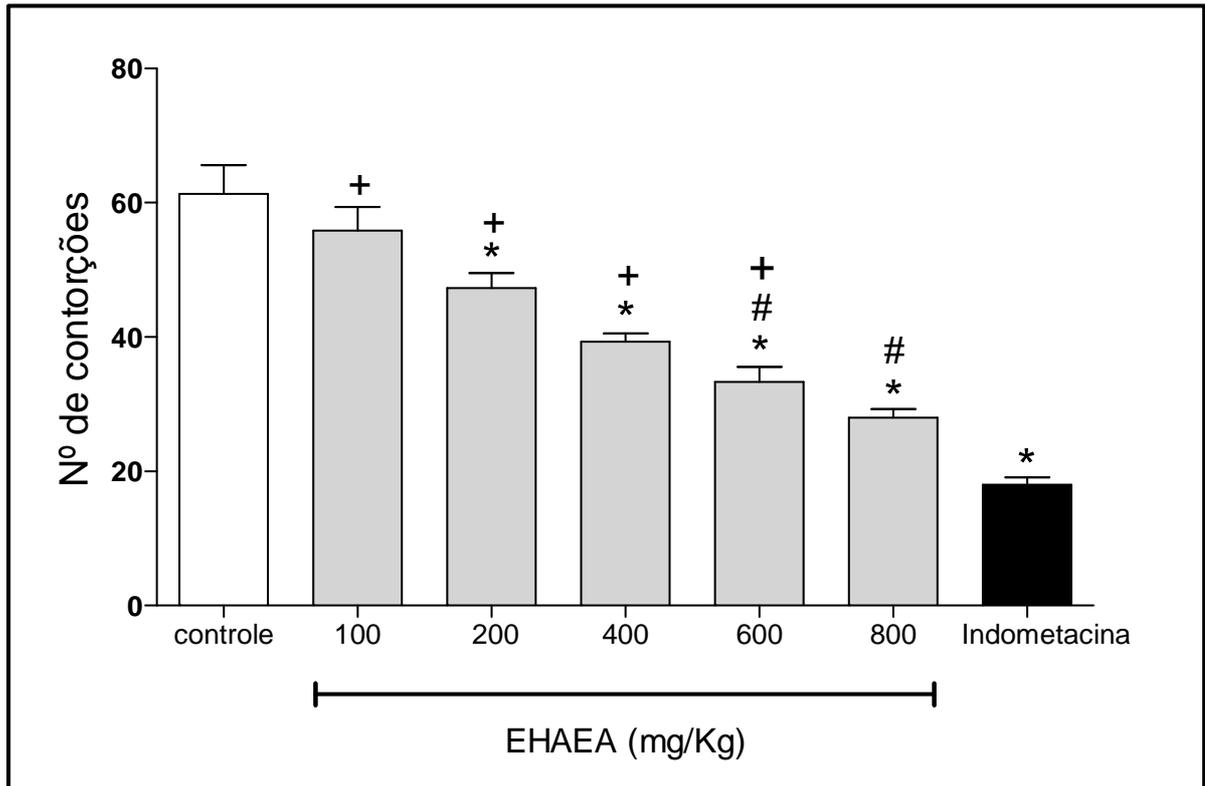


Figura 24- Efeito do tratamento oral com o EHAEA (100, 200, 400, 600 e 800 mg/Kg) ou indometacina (5mg/Kg) sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraperitoneal de solução de ácido acético 0,6%. Cada coluna representa a média ± E.P.M. de 7-10 animais. O eixo das abscissas expressa o número de contorções abdominais registrados durante um período de 20 minutos. No eixo das ordenadas estão representados os grupos utilizados; *, $P < 0,05$, significativo em relação ao grupo controle; +, $P < 0,05$, significativo em relação ao grupo indometacina; #, $P < 0,05$, significativo em relação a dose de 200 mg/Kg do EHAEA. ANOVA *one-way* seguido de teste de Bonferroni.

4.3.2- Teste da Placa Quente

Os resultados da Figura 25 demonstram que o EHAEA (200, 400, 600, 800mg/kg, v.o.) não altera o período de latência no teste da placa quente. No

entanto, o tratamento com morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 10 mg/kg, s.c.) aumentou o período de latência de resposta dos animais no teste avaliado.

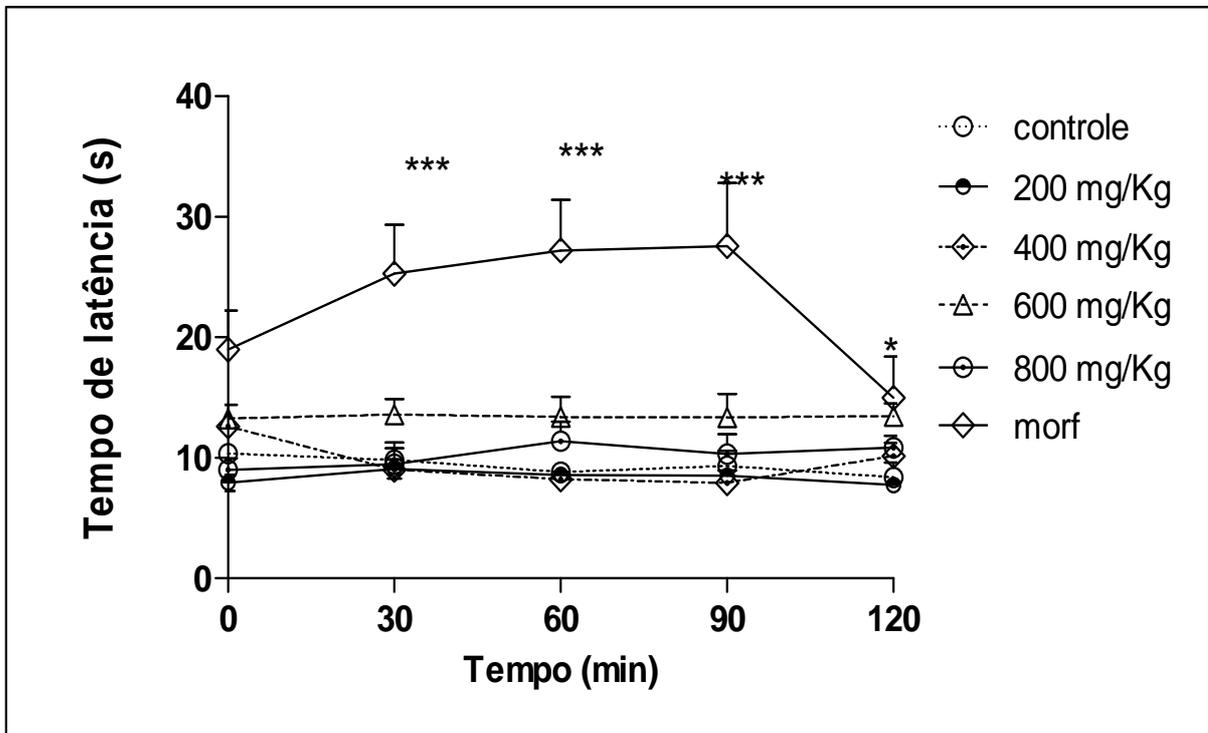


Figura 25- Efeito do tratamento com o EHAEA (200, 400, 600 e 800 mg/Kg, v.o.) ou morfina (10mg/Kg, s.c.) sobre o estímulo nociceptivo térmico induzido em camundongos. Cada valor representa a média \pm E.P.M. (7-10 animais por grupo). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$, significativo em relação ao grupo controle; ANOVA one-way seguido de teste de Bonferroni.

4.3.3- Teste da formalina

Os resultados da Figura 26 demonstram que o EHAEA reduziu o tempo de lambida na 1ª fase nas doses de 400, 600 e 800 mg/Kg, quando comparado ao grupo controle. A morfina, um agonista opióide, utilizado como controle positivo, reduziu de maneira significativa o tempo da lambida na 1ª fase. A naloxona, um antagonista opióide (0,4 mg/kg, s.c.), não apresentou diferença estatística quando comparada ao grupo controle. A naloxona também, quando administrada 15 minutos antes da morfina reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado por este opióide.

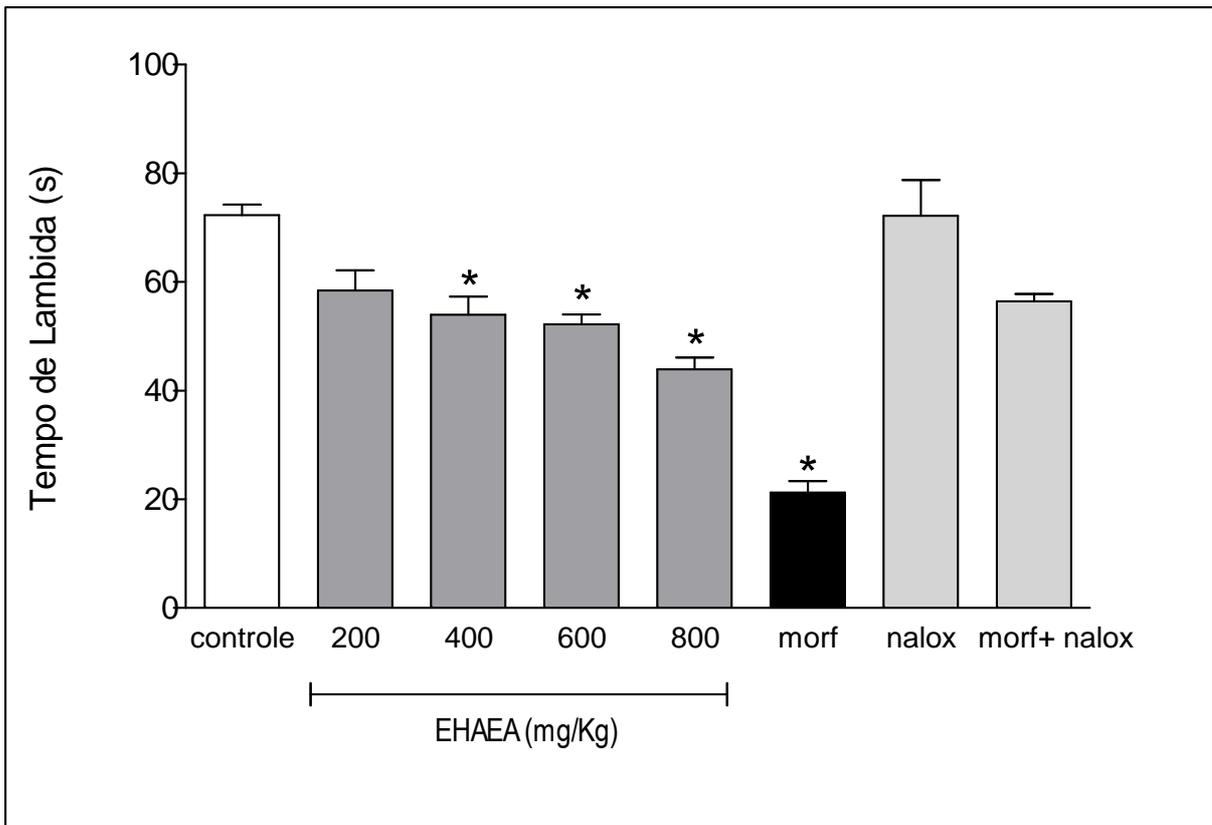


Figura 26- Efeito do tratamento com o EHAEA (200, 400, 600 e 800 mg/Kg, v.o.) sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de solução de formalina a 1%, na 1ª fase, no teste da formalina. Cada Coluna representa a média ± E.P.M. (7-10 animais por grupo). O eixo das abscissas expressa o tempo de lambidas na pata registrados durante um período de 0-5 minutos. No eixo das ordenadas estão representados os grupos utilizados; * $P < 0,05$, significativo em relação ao grupo controle (salina 0,9%); ANOVA one-way seguido de teste de Bonferroni. Naloxona (nalox); morfina (morf).

O EHAEA não reduziu o tempo de lambida, na 2ª fase, em nenhuma dose usada em comparação ao grupo controle salina. A morfina, um agonista opióide, utilizado como controle positivo, reduziu de maneira significativa o tempo da lambida na 2ª fase. A naloxona, um antagonista opióide (0,4 mg/kg, s.c.), não apresentou diferença estatística quando comparada ao grupo controle. A naloxona também, quando administrada 15 minutos antes da morfina reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado por este opióide.

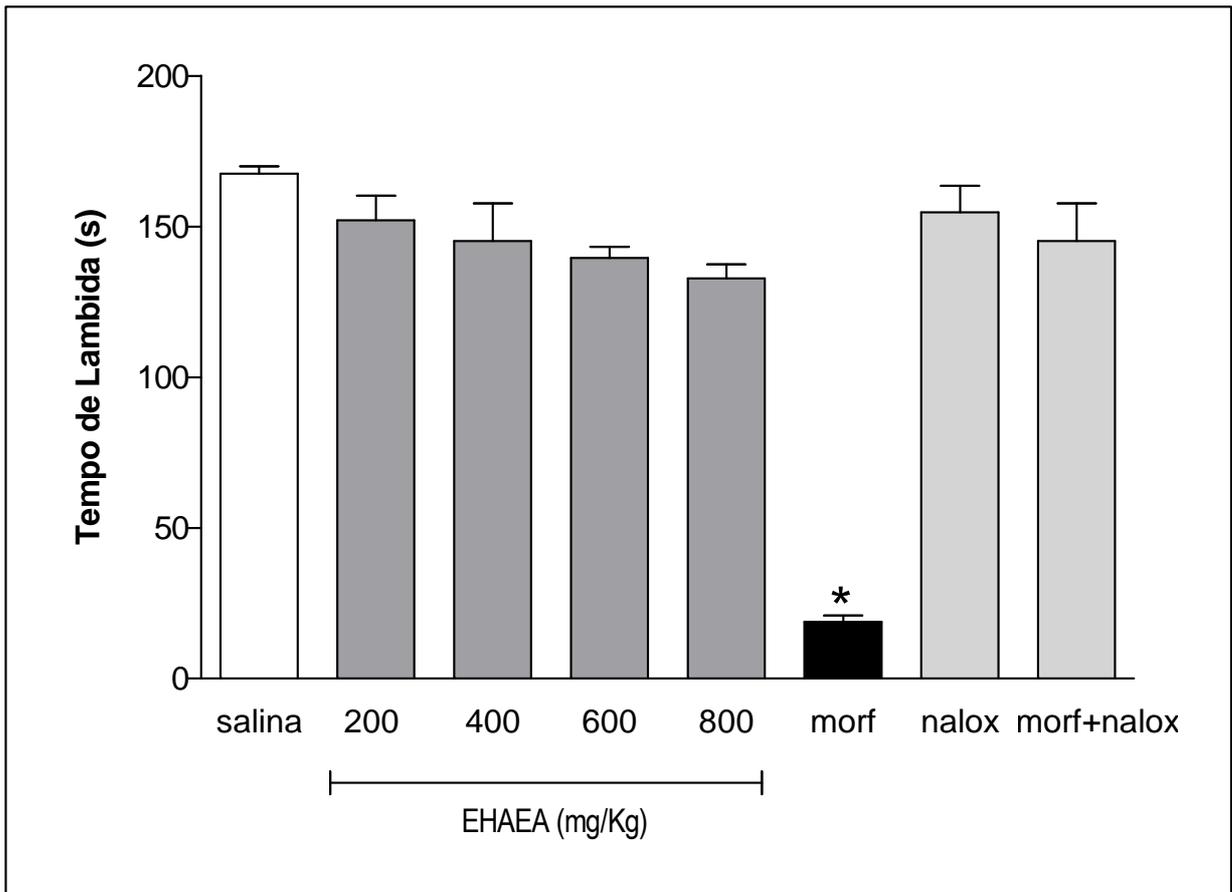


Figura 27- Efeito do tratamento com o EHAEA (200, 400, 600 e 800 mg/Kg, v.o.) sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de solução de formalina a 1%, na 2ª fase. Cada Coluna representa a média ± E.P.M. (7-10 animais por grupo). O eixo das abscissas expressa o tempo de lambidas na pata registrados durante um período de 15-30 minutos. No eixo das ordenadas estão representados os grupos utilizados; *, $P < 0,05$, significativo em relação ao grupo controle (salina 0,9%); ANOVA one-way seguido de teste de Bonferroni.

Os resultados da Figura 28 demonstram que a naloxona não reverteu o efeito do EHAEA, onde houve uma redução no tempo de lambida na 1ª fase quando comparado ao grupo controle.

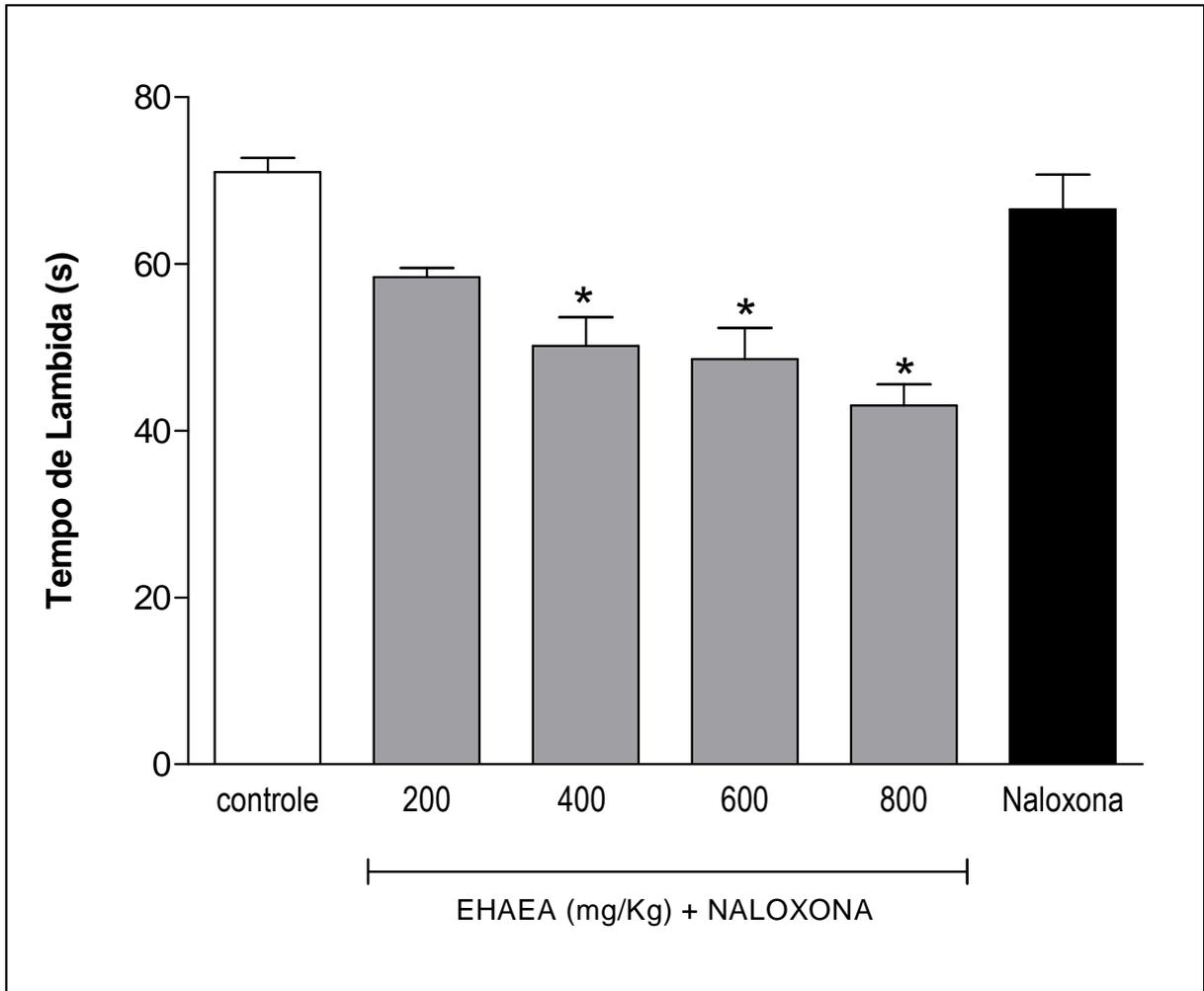


Figura 28- Efeito do pré-tratamento com o naloxona no EHAEA (200, 400, 600 e 800 mg/Kg, v.o.) sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de solução de formalina a 1% na 1ª fase. Cada Coluna representa a média \pm E.P.M. (7-10 animais por grupo). O eixo das abscissas expressa o tempo de lambidas na pata registrados durante um período de 0-5 minutos. No eixo das ordenadas estão representados os grupos utilizados; *, $P < 0,05$, significativo em relação ao grupo controle (salina 0,9%); ANOVA one-way seguido de teste de Bonferroni.

4.4- Resultado bioquímica oxidativa

4.4.1- Avaliação da capacidade antioxidante (CA) total

A Figura 29 apresenta os resultados referentes à capacidade antioxidante total (TEAC). Os resultados demonstraram que os animais submetidos ao estresse comportamental e pré-tratados com salina apresentaram níveis de TEAC

aumentados significativamente quando comparados ao grupo basal, animais que não passaram por testes de comportamento. Similares, aos dados obtidos com os animais pré-tratados com o EHAEA, nas doses de 200 e 400mg/Kg. Desta forma, pode-se observar que o EHAEA não alterou os níveis de antioxidantes totais induzidos pelo estresse comportamental nestes animais salina.

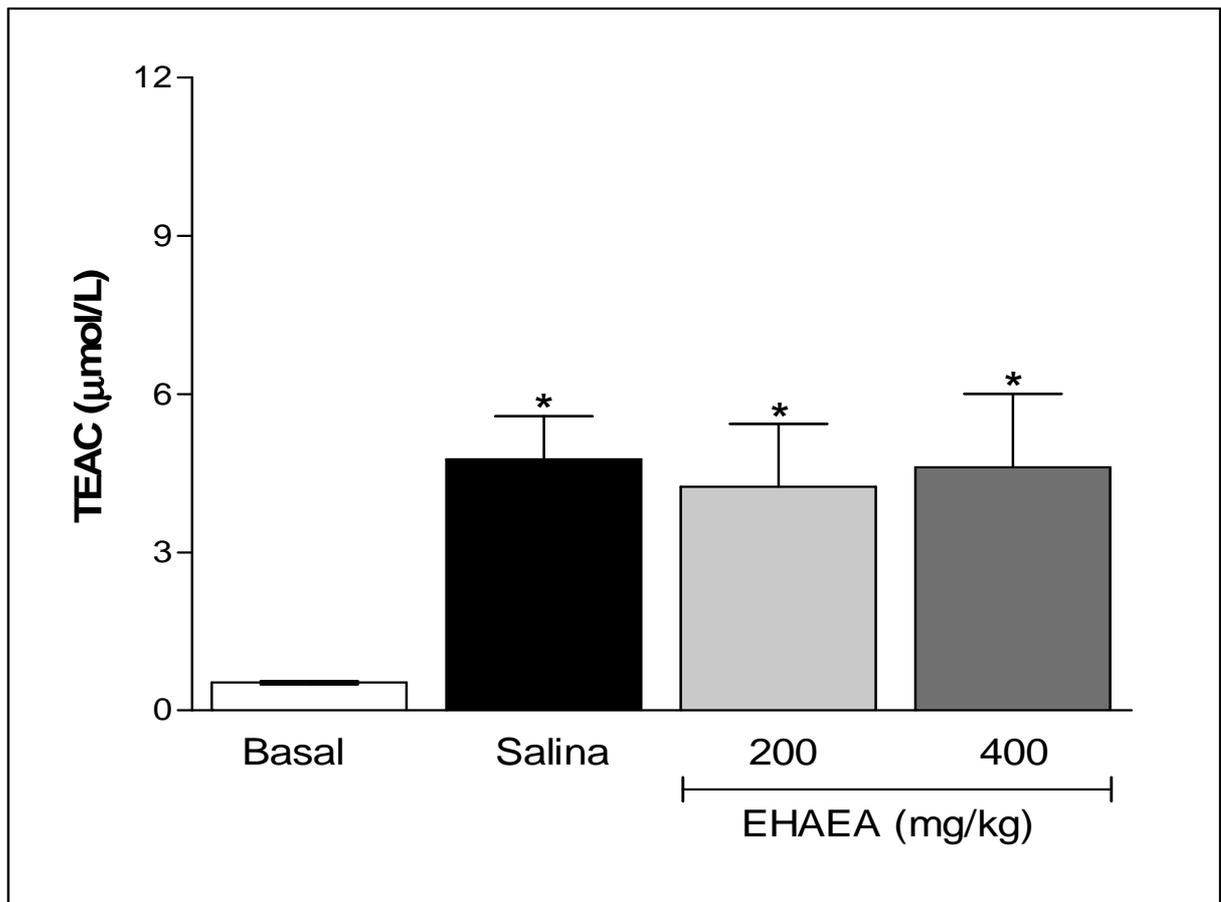


Figura 29 – Dosagem da capacidade antioxidante total, pelo método de TEAC, nos grupos pré-tratados com o EHAEA (200 e 400mg/Kg); grupo controle salina e grupo controle basal, com resultados expressos em $\mu\text{mol/L}$. Cada barra apresenta a média \pm E.P.M. (7-10 animais por grupo). * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo basal; ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test.

4.4.2- Dosagem do Malondialdeído (MDA)

Na Figura 30, estão os resultados dos níveis de MDA presentes na amostra, onde se pode observar um aumento significativo deste composto no grupo salina em comparação ao grupo basal. No entanto, o pré-tratamento com o EHAEA em todas as doses usadas foi capaz de reverter esse aumento de MDA observados nos animais salina.

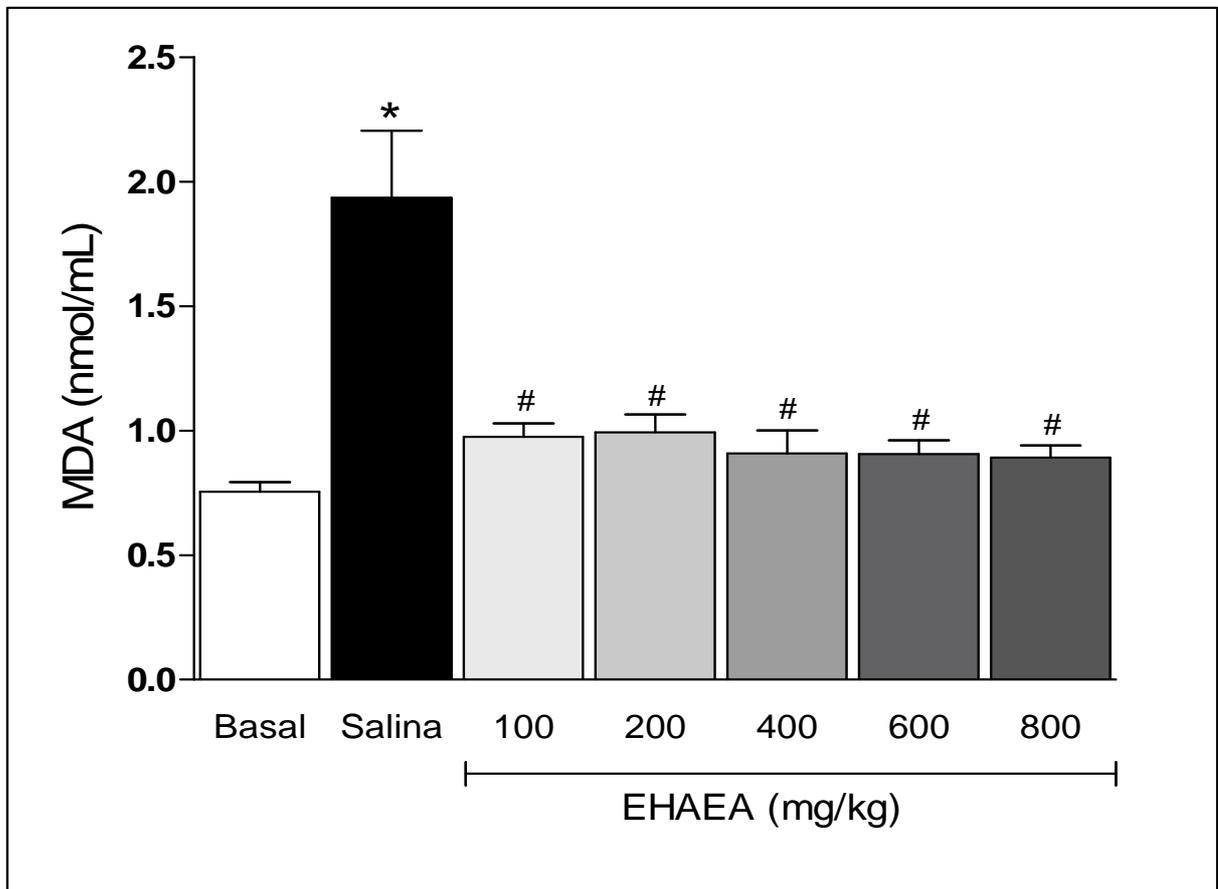


Figura 30 – Níveis de MDA encontrados no plasma dos animais pré-tratados com o EHAEA (100, 200, 400, 600 e 800mg/Kg); grupo controle salina e grupo controle basal. Cada barra apresenta a média \pm E.P.M. (7-10 animais por grupo); * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle basal; ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test.

4.4.3- Dosagem de Nitratos e Nitritos

Na Figura 31, têm-se os resultados da dosagem de nitritos e nitratos presentes no plasma, nos quais se observou um aumento significativo dos níveis de NO no animais do grupo salina quando comparados ao grupo basal. Entretanto, o pré-tratamento com o EHAEA na dose de 100mg/Kg reverteu esse aumento, e a dose 800mg/Kg potencializou a produção de NO observada nos animais salina.

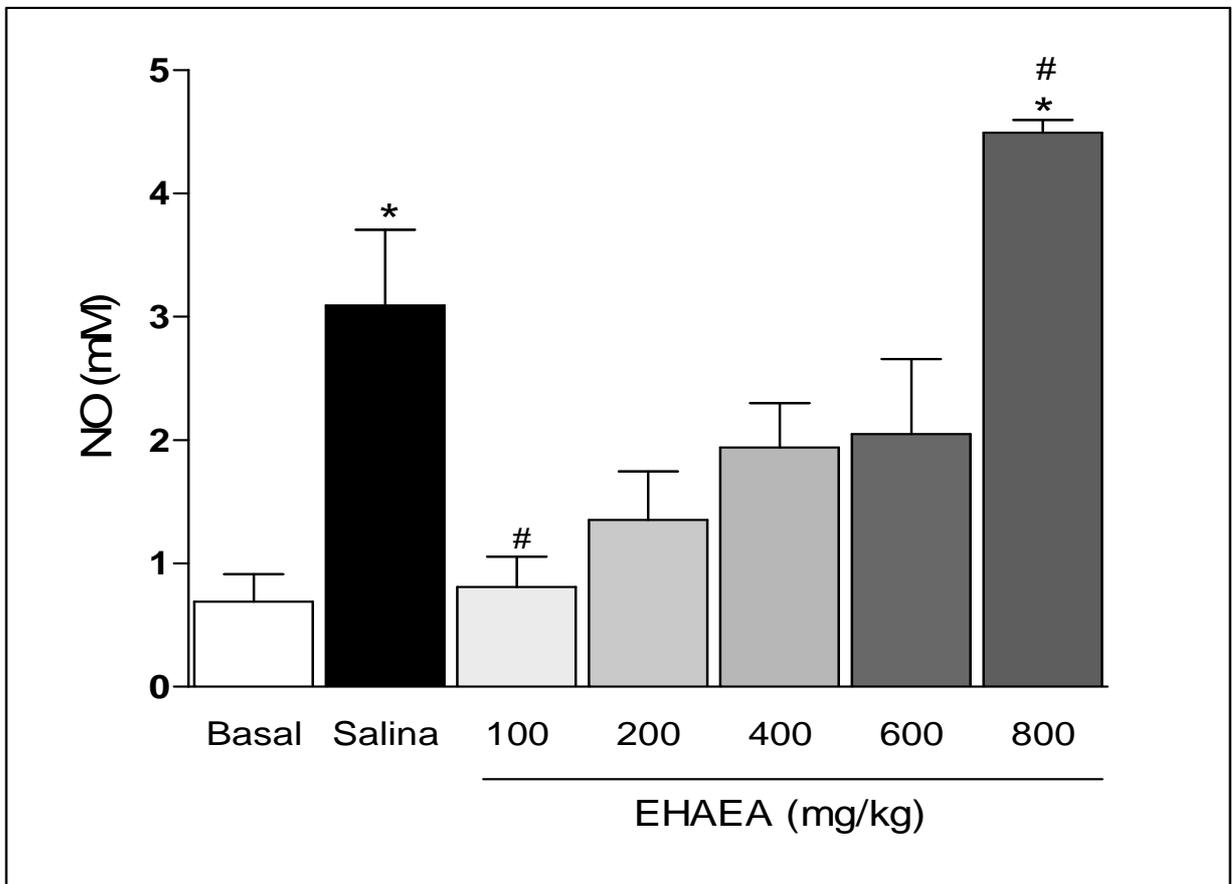


Figura 31 – Concentração de nitritos e nitratos presentes nos grupos pré-tratados com o EHAEA (100, 200, 400, 600 e 800 mg/Kg); grupo controle salina e grupo controle basal, os resultados foram expressos em mmol/L. Cada barra apresenta a média ± E.P.M. (7-10 animais por grupo). * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle basal. ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test.

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

Os produtos naturais exercem importante papel na medicina popular e também na medicina moderna, sendo fontes de compostos com importantes atividades biológicas.

Neste trabalho, objetivou-se estudar o extrato das folhas/talos de *Eupatorium ayapana* Vent., procurando investigar suas propriedades farmacológicas utilizadas popularmente, em modelos experimentais de atividade comportamental, antinociceptiva e antioxidante, com o intuito de comprovar estas propriedades, através do uso de seu extrato hidroalcoólico.

Sabe-se que as plantas possuem múltiplas ações farmacológicas, por conterem numerosos constituintes, de natureza química diversa, e que tem sido uma importante fonte de recursos na medicina moderna. Desta maneira, pesquisadores se utilizam desta rica fonte medicinal para estudar drogas ansiolíticas e antidepressivas efetivas e seguras, na busca de fármacos para estas patologias (PETROV e STANEVA, 1963).

Para os testes foram utilizados modelos animais que são fundamentais para a pesquisa com plantas, favorecendo a compreensão e o desenvolvimento de terapias eficazes, oferecendo assim maior grau de controle experimental e permitindo técnicas de manipulações que seriam impossibilitadas em outras circunstâncias (THRANE et al. 1996).

No teste de toxicidade oral aguda com o EHAEA não houve morte de nenhum animal nas doses de 2000 mg/Kg e 5000 mg/Kg, os quais apresentaram como efeito sonolência e letargia em sua locomoção em ambas as doses. Resultado este que vem de encontro ao trabalho de BOSE et al. (2006), que em testes de toxicidade oral aguda utilizando doses de 100-1600 mg/Kg, constatou que o extrato metanólico de *Eupatorium ayapana* não é tóxico.

O teste do campo aberto é utilizado como medida da ambulação e de emocionalidade em roedores (BROADHURST, 1958; BROADHURST, 1978; ALBONETTI e FARABOLLINI, 1984; ALBONETTI e FARABOLLINI, 1992), além de ser utilizado para estudar os efeitos de ansiolíticos e outras classes de drogas sobre

o comportamento em um novo ambiente. Desta forma, a locomoção, *rearing* e *grooming* em roedores, observada no campo aberto, são os parâmetros comportamentais mais usados para descrever influências dos eventos da vida ou da administração de drogas (MONTGOMERY, 1955; ARAKAWA & IKEDA, 1991; REX et al. 1996).

Nos resultados obtidos em relação à atividade locomotora, houve uma diminuição no número de quadrantes totais cruzados nas doses de 200, 400, 600 e 800 mg/Kg, ou seja, uma diminuição da atividade locomotora espontânea. O controle positivo apresentou um aumento significativo em relação ao grupo controle. A diminuição da atividade motora, no campo aberto, sugere um efeito sedativo, obtido por doses maiores de compostos que atuam no SNC, como benzodiazepínicos, que em doses baixas tem efeito ansiolítico e em doses maiores causam sedação (DONALD et al.1981; STERU et al. 1987).

Outro parâmetro utilizado para verificação da ação do tipo ansiolítica, observa-se a relação de quadrantes centrais cruzados por quadrantes totais, o qual mostrou significância nas doses de 600 800 mg/Kg em comparação ao grupo controle salina, sendo mais um indicativo de efeito do tipo ansiolítico. Deste modo, em um ambiente desconhecido, o animal tende a se locomover com mais frequência na periferia da caixa onde as paredes lhe conferem segurança enquanto que animais tratados com drogas ansiolíticas tendem a explorar mais a área central (PRUT e BELZUNG, 2003).

A atividade de *rearing* também está relacionada com a hiperatividade dopaminérgica. Estudos apontam que o aumento da atividade dopaminérgica elícita um maior comportamento de *rearing* (SWANSON et al. 1997). Em alguns estudos o *rearing* tem sido descrito como um aspecto de comportamento exploratório (JOHANSSON e AHLENIUS, 1989), mas outros sugerem que agentes ansiolíticos diminuem o número de *rearing* (HUGHES 1972; STOUT, 1994).

O EHAEA reduziu significativamente o número de *rearing*, em todas as doses utilizadas. A atividade de *rearing* em roedores é também mencionada como um comportamento estereotipado complexo (DANDIYA et al. 1969). Assim sendo, a redução de *rearing*, provocada pelo EHAEA, pode também ser devido à redução de excitabilidade do SNC.

Todos os animais utilizam uma significativa parte do tempo no comportamento de *grooming* (MACFARLAND e REEDER, 1974). Embora vários neurotransmissores possam modular a expressão deste comportamento (MOOD et al. 1988; TRABER et al. 1988), a dopamina está particularmente envolvida (COOLS et al. 1988; DRAGO et al. 1999; SERAFIM et al. 2001). *Grooming* normalmente processa uma direção cefalocaudal e consiste da lambedura das patas, lambedura e limpeza da cabeça, das costas e da genitália com movimentos repetitivos usando as patas (KALUEFF, 2002; KRUK et al. 1998; VAN ERP et al. 1994).

Nos resultados obtidos, houve redução significativa do número de *grooming* no teste do campo aberto, com todas as doses utilizadas do EHAEA. A literatura mostra que o aumento do *grooming* é notado em roedores apreensivos (ARCHER, 1973) e outros autores citam que drogas ansiolíticas, sedativas ou depressoras reduzem o *grooming* em campo aberto (BARROS et al. 1994; DUNN et al. 1981; MOODY et al. 1993), mostrando novamente a ação do tipo ansiolítica do EHAEA.

Em outro teste, utilizado como parâmetro para se avaliar o efeito do tipo ansiolítico do EHAEA, contabilizou-se o número de bolos fecais deixados pelos animais, durante avaliação no campo aberto, o qual nos deu uma diminuição significativa do número de bolos fecais em comparação ao grupo controle, evidenciando ação do tipo ansiolítica do EHAEA, pois quando os roedores são expostos a um ambiente novo, eles apresentam um alto grau de defecação causado por ativação do sistema nervoso autônomo, sendo que inicialmente se propunha que um baixo grau de ambulação também parecia uma resposta de medo dos animais expostos a um ambiente novo (HALL, 1934). O termo emocionalidade foi utilizado para expressar o fato do animal ficar imóvel quando exposto a um ambiente novo (LISTER, 1990). Nesta linha, vários estudos mostraram uma correlação inversa entre ambulação e defecação (CAROLA et al. 2002), corroborando com os resultados deste trabalho.

Desta forma, no teste do campo aberto, o aumento da deambulação central nos ratos tratados com japana, vinculada a uma diminuição do número de *rearing*, mais a diminuição do número de bolo fecais em todas as doses administradas do EHAEA vem confirmar a ação do tipo ansiolítica deste extrato, haja vista, que o *rearing* está relacionado com os níveis de excitabilidade do SNC (CUNHA & MASUR, 1978). PEREZ et al. (1998), e ainda referindo ao fato de que a redução da

atividade locomotora espontânea é resultante de uma diminuição na excitabilidade do SNC e sedação (OZTURK et al. 1996). Outro teste utilizado para os efeitos ansiolíticos é o teste do LCE, que deriva da observação de que roedores apresentam alto nível de exploração em ambientes fechados e, diante da escolha de um tipo de ambiente, evitam aqueles ambientes que não apresentam paredes, ou seja, os ambientes abertos (RODGERS et al. 1997). No LCE o animal é colocado no centro do labirinto com o focinho voltado para o braço fechado, tendo livre escolha de exploração dos dois ambientes. As passagens forçadas ou voluntárias do animal dentro dos braços no LCE estão associadas com mudanças comportamentais e hormonais indicativas de aumento da ansiedade (HOGG, 1996). Compostos ansiolíticos como o diazepam, reduzem a aversão natural do animal pelos braços abertos, aumentando a capacidade exploratória do animal nos braços abertos. Roedores submetidos ao tratamento com ansiolíticos cruzam mais vezes pelos braços abertos e permanecem mais tempo nestes braços quando comparados aos animais controle (THRANE et al. 1996).

Estudos mostraram que ratos testados no LCE aos 2 meses de idade apresentaram baixos níveis de ansiedade, enquanto aqueles testados aos 4 meses de idade ou mais, apresentaram níveis de ansiedade significativamente mais elevados, independentemente do sexo. No entanto, aos 3 meses de idade, ratos machos apresentam níveis de ansiedade significativamente maiores do que fêmeas (IMHOF et al. 1993). Os animais utilizados neste presente estudo estavam na faixa etária de 2 meses.

No teste do LCE, modelo usado para avaliar ansiedade, foi observado aumento do percentual de entradas nos braços abertos nas doses de 400, 600 e 800mg/Kg (Figura 22), e sabendo que o aumento do tempo e das entradas do animal nos braços abertos é considerado indicativo da ação ansiolítica de drogas (PELLOW, et al. 1985), logo podemos inferir que o EHAEA nas doses de 400, 600 e 800 mg/Kg apresentou um efeito do tipo ansiolítico, confirmando os resultados obtidos no campo aberto. Corroborando com o resultado anterior, o parâmetro onde se verificou o número de entradas no braço fechado mostrou que houve diferença significativa entre os grupos tratados com EHAEA comparados a salina no número de entradas no braço fechado, onde os animais tratados entraram menos nos braços fechados.

Uma das dificuldades mais comumente encontradas na avaliação da ansiedade está na superposição desta com sintomas depressivos. Muitos pesquisadores têm dificuldade em separar ansiedade e depressão e sugerem que os dois construtos podem ser componentes de um processo de estresse psicológico geral (CASTILLO et al. 2000; ANDRADE e GORENSTEIN, 1998). Desta forma, o EHAEA também foi avaliado quanto a sua atividade do tipo antidepressiva, no TNF, o tratamento agudo com as doses do EHAEA nas doses de 200, 400, 600 e 800 mg/Kg, achou-se relevante testar seus efeitos em modelos experimentais para a depressão, haja vista que a mesma é usada popularmente de forma contraditória, como estimulante e para combater insônia, sugerindo assim uma ação no SNC. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, o extrato da planta apresentou atividade depressora central em doses a partir de 200mg/kg, assim como letargia nos testes toxicológicos.

Kokate (1971) apud Taylor (2006) a partir de estudos etnofarmacológicos com o óleo essencial de *Eupatorium ayapana*, verificou ação do tipo antidepressiva. Taylor, (2006), afirma atividade calmante, sedativa e analgésica do óleo essencial das flores *Eupatorium ayapana*, vindo corroborar com o resultado obtido no experimento, onde houve uma redução no tempo de imobilidade dos animais quando comparados com o grupo controle, evidenciando assim, uma ação do tipo antidepressiva.

Processos dolorosos crônicos são causados por lesões que danificam os neurônios eferentes primários ou medula espinhal. Essas lesões resultam em um aumento da sensibilidade como hiperalgesia ou alodínia, estímulos que são frequentemente difíceis de tratar com fármacos tradicionais ou processos cirúrgicos (ARNER et al. 1998). Devido a isso, há necessidade de fármacos com maior especificidade, menor toxicidade e com indicação para modalidades de dor ainda de difícil tratamento, como as de origem neurogênicas (MILLAN, 1999).

Existem modelos que podem ser utilizados para avaliar os efeitos nociceptivos de diferentes compostos. No entanto, de uma forma geral, esses modelos possuem características peculiares que devem ser consideradas, tais como simplicidade, reprodutibilidade, validade dos resultados obtidos e principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos (BESSON, 1999; LE BARS et al. 2001).

No teste das contorções abdominais a injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%, é descrita como um modelo para avaliar a dor de visceral de origem inflamatória, com pouca especificidade, mas boa sensibilidade, podendo ser considerado uma ferramenta para avaliação da atividade analgésica e antiinflamatória de novos produtos (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001).

O EHAEA, nas doses de 200, 400, 600 e 800 mg/kg (v.o.), apresentou redução de forma significativa e dose-dependente das contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% (figura 24), o que sugere que o mesmo seja eficaz na dor visceral.

O teste da placa quente é considerado um teste sensível a fármacos que atuam em nível supraespinhal de modulação da resposta dolorosa (YAKSH; RUDY, 1977). O EHAEA não apresentou atividade antinociceptiva.

O teste da formalina a 1%, representa um modelo de estudo de dor moderada e tônica (HUNSKAAR et al. 1985). Este teste apresenta duas fases distintas, as quais refletem dois tipos diferentes de dor. A primeira fase tem sido atribuída ao efeito direto e imediato do agente flogístico sobre fibras aferentes nociceptivas do tipo C (ABBADIE et al. 1997), que induzem a um comportamento de dor verificado através da lambida ou mordida na pata injetada (SHIBATA et al. 1989; TJOLSEN et al. 1992), enquanto a segunda fase representa um tipo de dor inflamatória (HUNSKAAR et al. 1985; HUNSKAAR e HOLE, 1987), refletindo o estímulo contínuo proveniente da primeira fase (JI e WOOLF, 2001). A entrada de estímulos nociceptivos no SNC ativa as vias descendentes inibitórias analgésicas e comportamentalmente, pode ser observada uma interfase entre cinco a quinze minutos após a aplicação de formalina, período no qual praticamente não é observada resposta nociceptiva (MILLAN, 2002).

Fármacos anti-inflamatórios, esteroidais e não-esteroidais, reduzem a resposta dos animais apenas na segunda fase do teste da formalina, sendo exceções o ácido acetilsalicílico e o paracetamol, os quais são eficazes em ambas as fases (HUNSKAAR; HOLE, 1987). No presente estudo, o EHAEA reduziu o tempo de lambida na 1ª fase nas doses de 400, 600 e 800 mg/Kg, quando comparado ao grupo controle, esta fase é inibida por fármacos que induzem um efeito analgésico principalmente por ação no SNC (PUIG e SORKIN, 1995). Na 2ª fase não ocorreu diminuição no tempo de lambida estando os resultados obtidos

neste teste de acordo com aqueles encontrados na placa quente, onde o EHAEA não apresentou atividade antinociceptiva.. Contudo, este efeito não envolve diretamente a ativação dos receptores opióides uma vez que agonistas opióides, diferentemente do EHAEA, são eficazes em reduzir a resposta dos animais nas duas fases do teste da formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987), resultado este mostrado na figura 28, onde a naloxona não antagonizou o efeito do EHAEA nas doses utilizadas, evidenciando assim, o não envolvimento de receptores opióides. O mecanismo exato da antinocicepção pelo EHAEA na 1ª fase permanece por ser estabelecido, Segundo Hunkstaar (1987) a primeira fase é de caráter neurogênico, sendo sensível a analgésicos opióides e a alguns agonistas das vias descendentes.

Quanto aos modelos de dor crônica, empregando o mesmo *scavenger* (KIM et al. 2004), foi observado a reversão da alodinia decorrente de constrição crônica de nervo, em modelo de dor neuropática a atividade da enzima SOD foi relatada uma diminuição, em medula espinal (GUEDES et al. 2006). Em outro estudo, foi mostrado que a injúria causada por este modelo de dor neuropática provocou o aumento na atividade da enzima GPx e na concentração de GSH, requerido para sua atividade. Ao passo que houve aumento na concentração dos metabólitos do óxido nítrico, molécula sabidamente envolvida nos processos nociceptivos (GUEDES et al. 2009).

Várias doenças, incluindo câncer, doenças cardíacas, inflamação e doenças degenerativas, como as doenças de Parkinson e de Alzheimer, envolvem danos oxidativos a componentes celulares. Os EROs, como os ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxila, e ERN, como óxido nítrico e peroxinitrito têm um papel importante no estresse oxidativo relacionado à patogênese dessas doenças. Entretanto, em condições normais nosso organismo é capaz de controlar sua ação através do sistema de defesa antioxidante. Sabe-se, entretanto, que os antioxidantes podem eliminar diretamente as EROS e ERN e frear as reações oxidativas mediadas por radicais, sendo de primeira importância na prevenção de doenças (APATI, et al. 2003; CHIANG, et al. 2004; TEPE et al. 2005; YU et al. 2005). Em situações de equilíbrio as EROs são neutralizadas pelos antioxidantes, porém em algumas situações pode ocorrer um desequilíbrio entre formas oxidantes e antioxidantes, gerando estresse oxidativo (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Os dados de NO apresentados neste estudo mostraram que o EHAEA na dose de 100mg/Kg foi extremamente eficaz na inibição deste composto pró-oxidante *in vivo*, no entanto uma dose maior (800 mg/Kg) potencializou este efeito. Além disso, nesse estudo também foi mostrado o resultado de dano oxidativo, medido através da mensuração do MDA do plasma de animais, no qual se observou que o EHAEA manteve o MDA em níveis basais nas duas doses utilizadas (200 e 400 mg/Kg) em comparação ao grupo salina, que são animais exposto a situação de estresse (testes comportamentais), mantendo assim, níveis de MDA similares ao grupo basal.

A partir destes dados, em conjunto, pode-se sugerir que o EHAEA tem efeito antioxidante *in vivo*, visto que diminuiu a produção de espécies reativas no plasma, como o NO, além de proteger os animais de dano tecidual, representada pela diminuição da peroxidação lipídica (MDA) induzida pelo estresse. Resultado compatível foi mostrado com o extrato metanólico das folhas de *Eupatorium ayapana* (EMEA), onde, POMBYA et al. (2006), em que os animais estimulados tetracloreto de carbono (agente oxidante) e pré-tratados com doses de 100, 200 e 300 mg/Kg de EMEA apresentaram níveis reduzidos de MDA quando comparados aos animais pré-tratados com salina, mostrando que o EMEA diminuiu a peroxidação lipídica. Com isso, estes autores sugeriram que o EMEA protege os animais de dano tecidual hepático através de mecanismos antioxidantes. Outra avaliação abordada no artigo de POMBYA et al. (2006), foi a dosagem de enzimas antioxidantes, como SOD e CAT neste modelo, no qual foi mostrado que o EMEA nas doses de 100 e 200 mg/Kg não alterou significativamente os níveis das enzimas SOD e CAT nos animais tratados com o tetracloreto e pré-tratados com o EMEA.

Tão importante quanto a mensuração da atividade de enzimas antioxidantes individual, é a avaliação da capacidade antioxidante (CA) total ou —"status" antioxidante total que tem se mostrado relevante para a análise de agentes antioxidantes em amostras biológicas de animais e humanas. A análise da CA, que pode ser medido pelo método de TEAC, pode fornecer informações biológicas gerais do sistema antioxidante total do organismo, visto que detecta a presença de agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos ao invés da determinação das concentrações destes antioxidantes de forma individual (GHISELLI et al.2000). Nesse sentido, os dados de TEAC apresentados nesse estudo, mostraram que o

EHAEA, nas doses de 200 e 400 mg/Kg, não alterou os níveis de CA nos animais submetidos ao estresse comportamental, semelhantes aos dados relatados por POMBYA et al. (2006), que avaliaram o efeito do extrato metanólico em antioxidantes enzimáticos, conforme relatado acima.

Além disso, muitas proteínas como a ceruloplasmina, transferrina, e pequenas moléculas antioxidantes tais como, vitaminas C e E, e ácido úrico contribuem para os níveis aumentados de TEAC no plasma (RAHMAN et al. 2000). Com isso, pode-se sugerir que o aumento observado de TEAC nos animais submetidos ao estresse pode estar associado a um aumento nos níveis de algumas proteínas e moléculas antioxidantes acima mencionadas.

CONCLUSÃO

6- CONCLUSÃO

O estudo do efeito neurocomportamental do EHAEA em vários modelos neurocomportamentais, antinociceptivos e antioxidantes permitiu as seguintes conclusões:

A baixa toxicidade aguda, observada do EHAEA, cujo parâmetro mais evidente foi a letargia, que parece está relacionada com a aparente ação sedativa em seu uso popular.

No teste do Campo aberto foi observada uma redução na locomoção total dos ratos, devido provavelmente a sua ação sedativa, evidenciada em seu uso popular; O parâmetro onde se contabiliza o cruzamento de quadrantes centrais pelo número de quadrantes totais, mostrou que os animais deambularam mais pela região central, sugerindo assim um efeito do tipo ansiolítico; Houve diminuição significativa do número de *rearing* em todas as doses utilizadas, assim como no número de *grooming*, e bolo fecal, confirmando a ação do tipo ansiolítica do EHAEA.

No teste do LCE o EHAEA apresentou ação do tipo ansiolítica, mostrado no parâmetro de percentual de entradas no braço aberto, onde houve aumento nas doses de 400, 600 e 800 mg/Kg; e diminuição do número de entradas nos braços fechados dos animais tratados com o EHAEA em todas as doses.

No teste do nado forçado o efeito do tipo antidepressivo foi observado com a redução no tempo de imobilidade dos animais.

No teste antinociceptivo de contorção abdominal induzido por ácido acético 0,6%, foi observado uma ação antinociceptiva do EHAEA, e, no teste da formalina houve redução no tempo de lambida na 1ª fase, nas doses de 400, 600 e 800 mg/Kg, não havendo reversão do efeito com o uso da naloxona.

A capacidade antioxidante total mostrou-se aumentada de forma significativa nos animais tratados com o EHAEA em comparação ao grupo basal; Assim como uma melhor proteção contra o dano oxidativo nos grupos tratados com o EHAEA; E os níveis de NO permaneceram inalterados nas doses de 200, 400 e 600 mg, em comparação ao controle basal.

Estudos complementares são necessários para investigar as possíveis vias de sinalização que possam estar envolvidas e/ou alteradas, e que possibilitem explicar as respostas biológicas encontradas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

7- BIBLIOGRAFIA

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **HerbalGram**. 1993; 28: 13-20.

ALBAGLI, S. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. **Parcerias Estratégicas**, 12: 5-19, 2001.

ALBONETTI, M. E.; FARABOLLINI, F. Social stress by repeated defeat: effects of social behavior and emotionality. **Behavioural Brain Reserch**, v. 62, p. 187-193, 1984.

ALBONETTI, M. E.; FARABOLLINI, F. Behavioural response to a single and repeated restraint in male and female rats. **Behavioural Proc.**, v. 28, p. 97-110, 1992.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SOUZA, E. B.; MESQUITA, E. F.; NUNES, E. P.; CUNHA, A. N.; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents from leaves of *Vernonia chalybaea* Mart. And *Eupatorium ballotaefolium* HBK. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, n. 5, p. 376-377, 2001.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R. et al. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils from *Eupatorium betonicaeforme* (D.C.). Baker (Asteraceae). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6708-6711, 2004.

ALCARO A.; CABIB S.; VENTURA R.; PUGLISI-ALLEGRA S. Genotype- and experience-dependent susceptibility to depressive-like responses in the forced-swimming test. **Psychopharmacology**, 164: 138- 143, 2002.

ALEXI, T.; HUGHES, P.E.; FAULL, R.L.M.; WILLIAMS, C.E. (1998). 3-Nitropropionic

acid's lethal triplet: cooperative pathway of neurodegeneration. **Neuro Report**, 9: R57-R64.

ALICI, H.A.; OZMEN, I.; CESUR, M.; SAHIN, F. Effect of the spinal drug tramadol on the fatty acid compositions of rabbit spinal cord and brain. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. Tokyo, v. 26, p. 403–1406, 2003.

ALONSO, J. R. Tratado de Fitomedicina – Bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: ISIS Ediciones S.R.L., pág. 798-802, 1998.

ANDRADE, L. H. S. G.; GORENSTEIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Revista de Psiquiatria Clínica**, 1998.

APÁTI, P.; SZENTMIHALYI, K.; KRISTO, S. T.; PAPP, I.; VINKLER, P; SZOKE, E.; KERY, A. Herbal remedies of Solidago – correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 8, n. 32(4-5), p. 1045-1053, 2003.

ARAKAWA, O.; IKEDA, T. Apomorphine effects on single and paired rat open-field behavior. **Physiology Behavioural**, v. 50, p. 189-194, 1991.

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro – conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, Londrina, v. 6, n.2, p. 1-6, 2005.

AUER, D.P. Reduced glutamate in the anterior cingulate cortex in depression: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study *Biological Psychiatry*, v. 47, p. 305-315, 2000.

BACCHI, E. M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: DI STASI, L. C. (org.). *Plantas medicinais: Arte e Ciência*. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, p. 169-197, 1996.

BARROS, M.; TOMAZ, C. Non-human primate models for investigating fear and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 2002; 26: 187-201.

BARROSO, G. M. et al. Sistemática de angiospermas do Brasil. Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, v. 3, p. 237-314, 1991.

BERG, MARIA E. VAN DEN; SILVA, MILTON HÉLIO L. DA. Contribuição ao conhecimento da flora medicinal de Roraima. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém. **Supl. Acta amazônica**, v. 18, n.1-2, p. 23-35, 1988.

BERMAN, R.M.; CAPPIELLO, A.; ANAND, A.; OREN, D.A.; HENINGER, G.R.; CHARNEY, D.S.; KRYSTAL, J.H. Antidepressant Effects of Ketamine in Depressed Patients. **Biological Psychiatry**, v. 47, p. 351-354, 2000.

BIALECKI, A. G.; MARODON, C. Essential oil of *Ayapana triplinervis* from Reunion Island: A good natural source of thymohydroquinone dimethyl ether. **Rev. Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 853-858, 2009.

BREMER, K. Asteraceae: cladistics and classification. Timber Press, Portland, p. 429, 1994.

BUENO, O. F. A., E. A. CARLINI, J. R. LEITE, N. G. SILVEIRA-FILHO, M. L. O.; SOUZA, S. T. **Journal Brasil Psiquiatria**. **33**: 266-78, 1984.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 33, p. 179 – 189, 2000.

CALIXTO, J. B., 2005. Resenha: *Cordia verbenacea*. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**. v. 2, p. 5–8.

CARR, A. et al. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.20, n.7, p.1716-1723, 2000.

CORDELL, G.A; COLVARD, M. D. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 5-14, 2005.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 501-512, 2003.

CHIANG, Y. M.;CHUANG, D. Y.; WANG, S. Y.;KUO, Y. H.; TSAI, P. W.; SHYUR, L. F. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 409-419, 2004.

COOLS, A. R.; SPRUTIJT, B. M.; ELLENBROEK, B. A. Role of central dopamine in ACTh-induced *grooming* behavior in rat. In: COLBERN D. L. & GISPEN W. H. (Eds), Neural Mechanisms and Biological Significance of *Grooming* Behaviour. **Annals of New York Academy of Sciences**, v 525, p. 338-350, 1988.

CUNHA, J. M.; MANSUR, J. Evaluation of psychotropic drugs with a modified open field test. **Pharmacology**, v. 16, p. 259-267, 1978.

CUNHA-OLIVEIRA, M.T.M. **Neuronal disfunction induced by drugs of abuse**. 2007. 178p. Tese (Doutorado em Biologia, na especialidade de Biologia Celular). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Universidade de Coimbra, Coimbra.

CUNHA-OLIVEIRA, T.; REGO, A. C.; OLIVEIRA, C.R. Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psycho stimulant drugs. **Brain Research Review**, Amsterdam, v. 40, p. 192-208, 2008.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Pharmacological Sciences**, n.23, p. 238-245, 2002.

DANDIYA, P. C.; GUPTA, B. D.; GUPTA M. L.; PATNI, S. K. Effects of LSD on open field test performance in rats. **Psychopharmacology**, v. 15, p. 333-340, 1969.

DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. (1996). Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death Differ*, 3:71-78.

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (ed.). **Methods in Plant Biochemistry**. San Diego: Academy Press, v. 6, 1991.

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais da Amazônia**. São Paulo: SP, 1989.

DI STASI, LUIZ CLÁUDIO; LIMA, CLÉLIA A. H. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Ed. UNESP, 2ª edição, São Paulo, 2002.

DING, Z. H.; DING, J. K. **Chin.Chem. Left.**, v. 10, p. 491, 1999.

DONALD, J. M.; CUTLER, M. G.; MOORE, M. R.; BRADLEY, M. Development and social behavior in mice after prenatal and postnatal administration of low levels of lead acetate. **Neuropharmacology**, v. 20(11), p. 1097-1104, 1981.

DRAGO, F.; CONTARINO, A.; BUSA, L. The expression of neuropeptide-induced excessive grooming behavior in dopamine D1 and D2 receptor-deficient mice. **European Journal Pharmacology**, v. 365, p. 125-131, 1999.

DSM-IV - MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DOS TRANSTORNOS MENTAIS- 4ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995.

DUMAN, R.S.; HENINGER, G.R.; NESTLER, E.J. A molecular and cellular theory of depression. **Archives in General Psychiatry**, v. 54, n. 7, p. 597-606, 1997.

DUNN, A. J.; GUILD, A. L.; KRAMARCY, N. R.; WARE, M. D. Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty but not ACTh or beta-endorphin. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.15, p. 605-608, 1981.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões, C.M.O.(org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC. p.87-99, 1999.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

GIANNI, P.; JAN, K.J.; DOUGLAS, M.J.; STUART, P.M.; TARNOPOLSKY, M.A. MIEYAL, J.J.; SRINIVASAN, V.; STARKE, D.W. (1995). Glutathionyl specificity of thioltransferases: mechanistic and physiological implications. In: **Biothiols in Health and Disease**. Parker L, Cadenas E, Marcel D (eds), New York, 305–372. (2004). Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp Gerontol*, 39: 1391-1400.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F. SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n.1, p. 1106-14, Dec.2000.

GOUDAS L.C, CARR, DB.; MASZCZYNSKA, I.; MARCHAND, J.E.; WURM, W.H. Differential effect of central versus parenteral administration of morphine sulfate on regional concentrations of reduced glutathione in rat brain. **Pharmacology**, Switzerland v.54, p.92–97, 1997.

GUZMAN, D.C.; VAZQUEZ, I.E.; BRIZUELA, N.O.; ALVAREZ, R.G.; MEJIA, G.B.; GARCIA, E.H.; SANTAMARIA, D.; DE APREZA, MR.; OLGUIN, H.J. Assessment of oxidative damage induced by acute doses of morphine sulfate in postnatal and adult rat brain. **Neurochemical Research**, New York, v.31, p.549–554, 2006.

GRAEFF, F.G. Drogas usadas no tratamento das desordens afetivas. *In*: GRAEFF, F. G. Drogas psicotrópicas e seu modo de ação. São Paulo: EPU; p. 41-60, 1989.

GRAEFF, FG; Guimarães, FS. Fundamentos da Psicofarmacologia. Atheneu, São Paulo, 1999.

GUIMARÃES, F. S. Transtornos afetivos. *In*: GRAEFF; F. G.; BRANDÃO, M. L., **Org. Neurobiologia das doenças mentais**. São Paulo: Lemos; p. 97-194, 1999.

GUPTAA, M.; MAZUMDERA, U. K.; CHAUDHURIB, I. L. A.; CHAUDHURIB, R. K.; BOSEB, P.; BHATTACHARYA A.; MANIKANDANA L.; PATRAA, S. Antimicrobial activity of *Eupatorium ayapana*. **Revista de Fitoterapia**, n. 73, p. 168-170, 2002.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal Clinical**, v. 57, suppl., 5, p. 715S-724S, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, New York 1989.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol** 1990; 186: 1-85.

HALLIWELL B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J Neurochemical** 1992; 59: 1.609-23.).

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as a animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54(1), p. 21-30, 1996.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-104, 1987.

IMHOF J. T.; COELHO, Z. M. I.; SCHIMITT, M. L.; MORATO, G. S.; CAROBREZ, A. P. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus-maze apparatus. **Behavioural Brain Reserch**, 56: 177-180, 1993.

JI, L.L.; FU, R. (1992). Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. **Jounal Appl Physiol**, 72: 549-554.

JOHANSSON, C.; AHLENIUS, S. Evidence for the involvement of 5-HT_{1A} receptors in the mediation of exploratory locomotor activity in the rat. **Journal Psychopharmacology**, v. 3, p. 32-35, 1989.

JORDÃO Jr, A.A.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.S.M.; VANUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina Ribeirão Preto*, v. 31, p. 434-449, 1998.

KALUEFF, A. V. Grooming and stress (in Russian). **Avix**, p. 148, 2002.

KAPLAN,H.; SADOCK, B. *Compêndio de psiquiatria dinâmica*. PortoAlegre: **Artes Médicas**, 1984.

Kim H. K.; Kim, J. H.; Gao X. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. **Pain**, 2006; 122:53-62.

KOEHN, F.E., Carter, G.T.,.The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Review Drug Discovery**.v. 4, p. 206–220, 2005.

KOKATE, C. K.; RAO, R. E. V. Pharmacological studies on the essential oil of *Eupatorium triplinerve*. Effects on the central nervous system and antimicrobial activity. **Flavours**, v. 2, n. 3, p. 177-180, 1971.

KORCHAZHKINA, O.; EXLEY, C.; SPENCER, S.A. Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2,4- dinitrophenylhydrazine. *J. Chromatogr. B*: **Annal Technology Biomedical Life Science**, v.794, n.2, p. 353-362, 2003.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceeding**, v. 18, p. 412-417, 1959.

KRUK, M. R.; WESTPHAL, G. G.; VAN ERP, A. M.; VAN ASPEREN, J.; CAVE, B. J.; SLATER, E.; DE KONING, J.; HALLER, J. The hypothalamus: cross-roads of endocrine and behavioural regulation in grooming and aggression. **Neuroscience Biobehavioural Rev.**, v. 23, p. 163-177, 1998.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEÃO, R. B. A.; FERREIRA, M. R. C.; JARDIM, M. A. G. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira Farmacologia.**, v. 88, n.1, p. 21-25, 2007.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.

LAPA, A. J. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões C.M.O. (Ed). Farmacognosia da planta ao medicamento. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, p.181-196, 1999.

LAPA, A. J.; Caden S.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LIMA, T. C. M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Salvador: **Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE)**, p. 74, 2001

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M. T. R.; LIMA, T. C. M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de Plantas Medicinais. **Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais**, 2003, p. 69-79.

LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. 2008. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa: Plantarum.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain** 2008; 137: 473-7.

MACDONALD, A.D. et al. Analgesic action of pethidine derivatives and related compounds. **British Journal of Pharmacology**, v. 1, p. 4-14, 1946.

MacFARLAND, C. G.; REEDER, W. G. Cleaning symbiosis involving Galapagos tortoises and two species of Darwin's finches. **Zeitschrift für tierpsychologie**, v. 34, p. 464-483, 1974.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; JÚNIOR, V. F. V. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Revista Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAES, M. et al. Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness. **Journal Affect. Disord.** 58, 241-246, 2000.

MAJ, I.; ROGOZ, Z.; SKUZA, G.; SOWINSKA, H. Effects of MK-801 and antidepressant drugs the forced swimming test in rats. **European Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 2, p. 37-41, 1992.

MALONE, M.H. Robichaud RC. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia** 25: 320-332, 1962.

MARINA, V. A.; CAMILLA, L.; G.; D. G.; RAFAEL, L. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, abr./jun., 2008.

MAURI, M.C. Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. **Neuropsychobiology**, v.37, p. 124-129, 1998.

MAYER, S.; IZYDORCZYK, I.; REEH, P. W. & GRUBB, B. D. Bradykinin-induced nociceptor sensitisation to heat depends on cox-1 and cox-2 in isolated rat skin. **Pain**, v. 130, p. 14–24, 2007.

MELO, FILHO J. **Psicossomática hoje**. Porto Alegre: Artes Médicas. p. 234-250, 1992.

MILLER, G. The magical number seven, plus or minus two: some limits on our capacity for processing information. **Psychol. Rev., Washington**, v. 63, p. 81-97, 1956.

MILLER, J. K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F. C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal Dairy Sci.** 1993; 76:2812–2823.

MONGELLI, E. et al. Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medical plants used in Argentina. **Journal Ethnopharmacology**, v. 71, p. 145-151, 2000.

MONTGOMERY KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 48: 254-260, 1955.

MOODY, T. W.; MERALI, Z.; CRAWLEY, J. N. The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 90, p. 281-290, 1993.

MORS, W. B. Plants medicinais. Rio de Janeiro. **Ciência Hoje**, v. 1(3), p. 51-54, 1992.

NAZIROG, L.U. Effects of physical exercise with a dietary vitamins C and E combination on oxidative stress in muscle, liver and brain of streptozotocin-induced diabetic pregnant rat. *Vitamin E: New Research*. Ed. MH Braunstein, **Nova Science Publishers**. New York. v.86, p. 69–83, 2006.

NESTLER, EJ; BARROT, M; DILEONE, RJ; EISCH, AJ; GOLD, SJ; MONTEGGIA, LM. **Neurobiology of Depression. *Neuron***. 34: 13-25, 2002.

NUTT, D. J. The pharmacology of human anxiety. **Pharmacology Therapeutics**, nº 47, p. 233-266, 1990.

NUTT, D. J. Overview of diagnosis and drug treatments of anxiety disorder. **CNS Spectrums**, 10: 49-56, 2005.

OECD – Organization of Economic Co-operation and development. In: The Revised Up-and-Down Procedure: A Test Method for Determining the Acute Oral Toxicity of Chemicals. **NIH Publication**. Nº 02-4501, p. I-4CD-ROM 1-2, 2001.

OPARA. E. C. Oxidative Stress. *Dis. Mon.*, v. 52, p. 183-198, 2006.

ÖZMEN, I.; NAZIROGLU, M.; ALICI, H.A.; SAHIN, F; CENGIZ, M.; EREN, I. Spinal morphine administration reduces the fatty acid contents in spinal cord and brain by increasing oxidative stress. **Neurochemical Research**, New York, v. 32, p. 19–25, 2007.

PANDOLFO, P.; PAMPLONA, F. A.; PREDIGER, R. D.; TAKAHASHI, R. N. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist. **European Journal Pharmacology**, v. 563, p. 141-148, 2007.

PARANHOS, M. E.; WERLANG, B. G.. **Diagnóstico e intensidade da depressão**. Barbarói, Santa Cruz do Sul, n.31, Ago./Dez. 2009.

PARE, D.; QUIRK, G. J.; LEDOUX, J. E. New vistas on amygdale networks in conditioned fear. **Journal of neurophysiology**, 92(1): 1-9, 1994.

PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE, BRILEY M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PETIT-DEMOULIERE B, CHENU F, BOURIN M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v. 177, p. 245-255, 2005.

PETROV, W.; STANEVA, D. The effect of a ginseng extract on adrenal cortex function. **Arzneimittelforschung**, v. 13, p. 1078-1081, 1963.

PIETROVSKI, E. F. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos das flores de *Combretum Leprosum* Mart. Curitiba. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Ciências Biológicas**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressants treatment. **European Journal Pharmacology**, v. 47, p. 379-391, 1978.

SANSON, L. T.; CAROBREZ, A. P. Long-lasting inhibitory avoidance acquisition in rats submitted to the elevated T-maze model of anxiety. **Behav Brain Res**, 101: 59-64, 1999.

SHARMA, O. P.; DAWRA, R. K.; KURADE, N. P.; SHARMA, P. D. A review of the toxicosis and biological properties of the genus *Eupatorium*. **Natural Toxins**, v. 6, n.1, p. 1-14, 1998.

SOUZA, T. J. T.; APEL, M. A.; BORDIGNON, S.; MATZENBACHER, N. I.; ZUANAZZI, J. A.; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 368-372, 2007.

RAHMAN, I.; SWARSKA, E.; HENRY, M.; STOLK, J.; MACNEE, W. Is there any relationship between plasma antioxidant capacity and lung function in smokers and in patients with chronic obstructive pulmonary disease? *Thorax*, v. 55, n.3, p.189-93, Mar. 2000.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Anti-oxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic Biol Medical**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REX, A.; STEPHENS, D. N.; FINK, H. "Anxiolytic" action of diazepam and abecamil in a modified open field test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 53, p. 1005-1012, 1996.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol.30, pag.289-304, 1997.

RODRIGUES, ELIANA; ALMEIDA, JOAQUIM M. DUARTE; PIRES, JÚLIA MOVILLA. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. **Rev. Bras. Farmacognosia**, 2010.

SCHILDKRAUT, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **American Journal of Psychiatry**, v. 122, p. 509-522, 1965.

SCUDELLER, V. V. et al. Etnoconhecimento de plantas de uso medicinal nas comunidades São João do Tupé e Central (Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé). Cap. 15, Diversidade Biológica e sociocultura do Baixo Rio Negro, Amazônia Central, vol. 2. Ed. UEA, Manaus, 2009.

SERAFIM, A. P.; FELICIO, L. F. Dopaminergic modulation of *grooming* behavior in virgin and pregnant rats. **Brazil Journal Medical Biology Research**, v. 34, p. 1465-1470, 2001.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, supl, p.315S-321S, 1995.

SÖDIN, B.; WESTING, Y. H.; APPLE, F. S. Biochemical mechanisms for oxygen free radicals formation during exercise. *Sports Medical*, v. 10, n. 4, p. 236-254, 1990.

SILVEIRA, P. F. da; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira Farmacognosia**, 18(4): 618-626, Out./Dez., 2008.

SIM, A.S.; SALONIKAS, C.; NAIDOO, D.; WILCKEN, D.E.L. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. *J. Chromatogr. B: **Annal. Technol. Biomed. Life Sci.***, v.785, p.337-344, 2003.

SOUSA, J. R.; DEMUNER, A. J.; PERDERSOLI, J. L.; AFONSO, A. M. Guiné: erva medicinal ou tóxica? *In: **Ciência e Cultura***, v. 39 (7), julho, SBPC, 1987.

STEGHENS, J.P.; KAPPEL, A.L.V.; DENIS, I.; COLLOMBEL, C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radical. Biol. Med.**, v. 31, n. 2, p. 242-249, 2001.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; FILHO, J. M. B.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira Farmacognosia.**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

STERU, L; Chermat, R; Thierry, B; Simon, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacol**, v. 85, p. 367-370, 1985.

TAYLOR, LESLIE. **Technical Data Report for Ayapana (*Ayapana triplinervis*)**. Disponível em: rain tree, 2006.

TEPE, B.; SOKMEN, M.; SOKMEN, A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidative activity of the essential oil and various extracts of *cycltrichium organifolium* (Labill.) Manden. & Scheng. **Journal of Food Engeneering**, v. 69, p. 335-342, 2005.

THRANE PS, MAEHLEN J, STOLTENBERG L, BRANDTZAEG P. Retrograde axonal cytokine transport; a pathway for immunostimulation in the braisn inducing hypoxia and sudden infant death. **Med. Hypotheses.**, v. 44(2), p. 81-84, 1996.

TORI, M. et al. **Journal Nat. Prod.**, v. 64, n. 8, p.1048, 2001.

TOSCANO, P. R.; ROTTA, C. T. Estresse e Doenças Cardiovasculares. In: Porto CC, Porto AL. *Doenças do coração prevenção e tratamento*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara, p.119-125, 2005.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *European Journal of Pharmacology*, v. 185, p. 1 10, 1990.

TSUBOI, H. Possible connections among job stress, depressive symptoms, lipid modulation and antioxidants. **J. Affect. Disord.** 91, 63-70, 2006.

TSUTSUI, H. Oxidative stress in heart failure: The role of mitochondria. **Internal Medicine Journal**. Carlton, v.40, p.1177-1182, 2001.

URZUA, A.; CAROLI, M.; VASQUEZ, L.;MENDOZA, L.; WILKENS, M.; TOJO, E. Antimicrobial study of the resinous exudate and diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 251-254, 1998.

VAN ERP, A. M. M.; KRUK, M. P.; MEELIS, W.; WILLEKEN-BRAMER, D. Effects of environmental stressors on time course, variability and from of self-grooming in the rat. **Behav. Brain Res.**, v. 65 p. 47-55, 1994.

YAGI, K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. **Biochem. Med.**, n.15, p.212-216, 1976.

YEO, H.C.; HELBOCK, H.J.; CHYU, D.W.; AMES, B.N. Assay of Malondialdehyde in Biological Fluids by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Anal. Biochem.**, v.220, n.2, p.391-396, 1994.

YU, L. L.; ZHOU, K. K.; PARRY, J. Antioxidant properties of cold- pressed Black caraway, carrot cranberry, and hemp seed oils. **Food Chemistry**, v. 91, p. 723-729, 2005.

YUNJONG LEE, CHANG-HUN LEE & UHTAEK HO. Painful channels in sensory neurons. **Molecular and Cells**, vol. 20, N° 3, p. 315-324, 2005.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: A critical review. **Psychol Bull.** 1976; 83:482-504, 1976.

ZHANG, M.; WUA, M.; ZHANG, J.; IRWINC, D.; GU, Y.; SHI, Q. Chemical constituents of Plants from the Genus Eupatorium. **Rev. Chemistry e Biodiversity**, v. 5, 2008.

ZANGROSSI H, FILE SE. (1992) Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. **Brain Res**, Bull. 29 (3-4): 1289-1292.

ANEXO

- Parecer da comissão de bioética.



Parecer de Aprovação Nº 056/2009/CEPAN/IEC/SVS/MS
Registro CEPAN - Nº 0050/2009

Ananindeua/PA, 11 de dezembro de 2009.

1. Projeto: “Efeitos de espécies amazônicas sobre o sistema nervoso central: análises comportamentais, fitoquímicas e antioxidantes”.

Pesquisador Responsável: MARCIENE ATAIDE DE ANDRADE

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado**.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este Comitê, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,


NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO
Coordenador do CEPAN/IEC