



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

**Thaís Montenegro de Andrade**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL E ESTRESSE OXIDATIVO DO EXTRATO  
HIDROALCOÓLICO DE *Petiveria alliacea* L.  
(Phytolacaceae).**

BELÉM – PA

2011

<b>ANDRADE, T. M.</b>	<b>AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NO SNC E ESTRESSE OXIDATIVO DE <i>Petiveria alliacea</i> L. (PHYTOLLACACEA)</b>		<b>PPGCF ICS/UFPA 2011</b>
-----------------------	--	--	------------------------------------



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

**Thaís Montenegro de Andrade**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL E ESTRESSE OXIDATIVO DO EXTRATO  
HIDROALCOÓLICO DE *Petiveria alliacea* L.  
(Phytolacaceae).**

**Orientadora: Profa. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro**

Dissertação 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

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

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

---

Andrade, Thaís Montenegro de.

Avaliação dos efeitos no SNC e estresse oxidativo de *Petiveria alliacea* L. (Phytollacacea) / Thaís Montenegro de Andrade ; Orientadora, Cristiane do Socorro Ferraz Maia, Co- Orientadora, Marta Chagas Monteiro — 2011.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2011.

1. Ansiedade. 2. Depressão. 3. Estresse Oxidativo. 4. Memória. 5. *Petiveria alliacea* L.  
I. Andrade, Thaís. II. Título.

CDD 22.ed. : 615.321

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Thaís Montenegro de Andrade

Avaliação dos efeitos no sistema nervoso central e estresse oxidativo do extrato hidroalcoólico de *Petiveria alliacea* L. (Phytolacaceae).

Dissertação apresentada à faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.  
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

À Deus.

Aos meus pais, Ercio Oliveira de Andrade e Thânia Maria Montenegro de Andrade, com muito amor, agradecendo ao apoio e todos os anos que investiram em mim e acreditam no meu potencial.

Ao meu irmão, Ercio Jr. Montenegro de Andrade, pela amizade, apoio e cumplicidade.

Ao meu marido, Juliano Gotardo Pancieri, por todo amor, carinho, compreensão e incentivo.

E aos meus amigos, presentes nos momentos difíceis fornecendo suporte.

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Cristiane Maia, que, nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

À Universidade Federal do Pará, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Laboratório de Imunologia e Microbiologia e ao Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará, por colocarem a disposição os laboratórios.

*"Não importa aonde você parou,  
Em que momento da vida você cansou,  
O que importa é que sempre é possível e necessário 'Recomeçar'.  
Recomeçar é dar uma chance a si mesmo.  
É renovar as esperanças na vida e o mais importante:  
Acreditar em você de novo.  
Sou do tamanho daquilo que vejo e não do tamanho da minha altura".*

*Carlos Drummond de Andrade*



## RESUMO

### AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E ESTRESSE OXIDATIVO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Petiveria alliacea* L. (Phytolacaceae).

**Introdução:** *Petiveria alliacea* L., conhecida popularmente como Mucuracaá, pertencente à família Phytolacaceae. Preparações desta planta têm sido amplamente utilizadas na medicina popular como sedativo, no tratamento da “memória fraca”, entre outros. Devido as suas características sedativas, procurou-se avaliar a atividade ansiolítica a partir dos efeitos comportamentais e de estresse oxidativo após a administração do extrato hidroalcoólico (EHA) em ratos adultos. **Métodos:** A planta foi coletada no município de Acará/Pa e suas folhas, talos e raízes foram tratados, depois macerados com etanol 70% e obtido o extrato. Ratos *Wistar* machos e fêmeas (n=5-10 por grupo) foram tratados com água e comida *ad libitum* e divididos em grupos: Controle, que recebeu solução salina; *P. alliacea* L., que receberam 900mg/Kg; diazepam (DZP) 1mg/Kg, como controle positivo para a atividade ansiolítica; fluoxetina (FXT) 10mg/Kg, como controle positivo para avaliar a atividade antidepressiva e cafeína(CAF) 10mg/Kg, como controle positivo para efeito mnemônico. Os testes comportamentais foram: campo aberto para a atividade ansiolítica e estimulatória, nado forçado para atividade antidepressiva, LTE para efeito mnemônico. Os testes de estresse oxidativo foram: TEAC para a dosagem de antioxidante total, dosagem do malondialdeído, dosagem de nitritos e nitratos e dosagem de metemoglobina. **Resultados/Discussão:** O tratamento com *P. alliacea* L. aumentou a atividade locomotora central e total dos ratos sugerindo atividade ansiolítica e estimulante; reduziu o tempo de imobilidade conferindo atividade antidepressiva e aumento na latência nos braços fechados na fase de teste do LTE demonstrando atividade mnemônica positiva. Nos parâmetros de estresse oxidativo, a espécie apresentou redução na capacidade antioxidante total e aumento das taxas de metemoglobina, sugerindo atividade pró-oxidante. **Conclusão:** Podemos concluir que o extrato possui atividade ansiolítica, atividade antidepressiva e atividade pró-oxidante. Entretanto, outros estudos são necessários para confirmar essas atividades.

**Palavras-chave:** Ansiedade; depressão; estresse oxidativo; memória; *Petiveria alliacea* L.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: <i>Petiveria alliacea</i> L. ....	3
Figura 2: Peroxidação de lipídeos.....	13
Figura 3: Fluxograma da coleta até a preparação do extrato de <i>P. alliacea</i> ..	19
Figura 4: Teste da atividade locomotora.....	22
Figura 5: Teste do nado forçado.....	24
Figura 6: Teste do labirinto em T elevado.....	27
Figura 7: Fluxograma para realização do teste de dosagem de metemoglobina.....	31
Figura 8: Gráfico dos efeitos do EHA de <i>P. alliacea</i> L. 900mg/kg em ratos avaliados no campo aberto.....	35
Figura 9: Gráfico do efeito do EHA de <i>P. alliacea</i> L., com relação ao percentual de quadrantes centrais por totais percorridos no Teste do Campo Aberto. ....	36
Figura 10: Gráfico do efeito do EHA de <i>P. alliacea</i> L., com relação ao tempo que os ratos levaram para sair do quadrante central do Campo Aberto.....	37
Figura 11: Gráfico do efeito do EHA de <i>P. alliacea</i> L., com relação ao número de vezes que os animais realizaram o comportamento de autolimpeza.....	38
Figura 12: Gráfico do efeito do EHA da <i>P. alliacea</i> L., no número de levantamentos no Teste do Campo Aberto.....	39
Figura 13: Gráfico do efeito do EHA de <i>P. alliacea</i> L. 900mg/kg sobre o tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado em ratos.....	40
Figura 14: Gráfico do número de reexposições necessárias para adquirir o	

estado de esquiva.....	41
Figura 15: Gráfico do efeito do EHA de <i>P. alliacea</i> L., na aquisição de esquiva no LTE.....	42
Figura 16: Gráfico do efeito do EHA de <i>P. alliacea</i> L., em relação ao tempo de escape do braço aberto. ....	43
Figura 17: Gráfico dos efeitos do EHA de <i>P. alliacea</i> L. em ratos, no teste e reteste realizados no LTE, um dia após o treino.....	44
Figura 18: Gráfico dos efeitos do EHA de <i>P. alliacea</i> L. em ratos, na avaliação de risco (AR).....	45
Figura 19: Gráfico referente a dosagem da capacidade antioxidante total, expressa em $\mu\text{mol/L}$ .....	46
Figura 20: Gráfico referente à dosagem de MDA nas amostras.....	47
Figura 21: Gráfico referente à dosagem de nitritos e nitratos presentes nos grupos.....	48
Figura 22: Gráfico referente à dosagem de metemoglobina nos grupos.....	49

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Abs	Absorbância
ABTS	2,2-Azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato]
ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
ANOVA	Análise de Variância de uma Via
AR	Avaliação de Risco
DZP	Diazepan
EHA	Extrato HidroAlcólico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
EPM	Erro Padrão da Média
ERN	Espécies Reativas do Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas do Oxigênio
FXT	Fluoxetina
LTE	Labirinto em 'T' Elevado
MDA	Malondialdeído
NN	Nitritos e Nitratos
R	Reteste
T	Teste
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TEAC	Capacidade Antioxidante Total

**LISTA DE SIMBOLOS E UNIDADES**

$^{\circ}\text{GL}$	Gay-Lussac
$\cdot\text{OH}$	Radical Hidroxila
$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singlete
ATM	Atmosfera
$\text{HNO}_2$	Ácido Nitroso
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de Hidrogênio
$\text{HOCl}$	Ácido Hipocloroso
$\text{N}_2\text{O}_3$	Óxido Nitroso
$\text{NaCl}$	Cloreto de Sódio
$\text{NO}\cdot$	Óxido Nítrico
$\text{NO}_2^-$	Íon Nitrito
$\text{NO}_3^-$	Íon Nitrato
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Radical Superóxido
$\text{O}_3$	Ozônio
$\text{ONOO}^-$	Peroxinitrito
rpm	Rotações por minuto

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Plantas medicinais.....	2
1.2. <i>Petiveria alliacea</i> L.....	4
1.2.1. Classificação botânica .....	4
1.2.2 Etnofarmacologia.....	5
1.2.3. Fitoquímica e farmacologia .....	6
1.3. Considerações gerais sobre transtornos no Sistema Nervoso Central	6
1.3.1. Ansiedade .....	6
1.3.2. Depressão .....	8
1.4 Memória.....	9
1.4.1 Memória de curta duração .....	9
1.4.2 Memória de longa duração .....	10
1.4.3 Memória de trabalho .....	10
1.5 Estresse oxidativo .....	11
1.5.1. Espécies reativas do nitrogênio e do oxigênio .....	11
1.5.2. Peroxidação de lipídeos .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	15
2.1. Objetivo geral .....	16
2.2. Objetivos específicos .....	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17

3.1. Material botânico .....	18
3.1.1. Coleta, identificação e preparo .....	18
3.2. Estudo farmacológico .....	20
3.2.1. Animais .....	19
3.2.2. Fármacos e soluções utilizadas .....	20
3.2.3. Tratamentos .....	20
3.3. Ensaio comportamentais .....	21
3.3.1. Teste da atividade locomotora espontânea ( <i>Open Field</i> ) .....	21
3.3.2. Teste do nado forçado .....	23
3.3.3. Teste do labirinto em “T” elevado .....	25
3.4. Métodos em bioquímica oxidativa .....	27
3.4.1. Dosagem da capacidade antioxidante total (TEAC) .....	28
3.4.2. Dosagem do malondialdeído (MDA) .....	29
3.4.3. Dosagem de nitritos e nitratos .....	30
3.4.4. Dosagem de metemoglobina.....	30
3.5. Análise estatística .....	32
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
4.1. Testes comportamentais .....	35
4.1.1. Teste do campo aberto.....	35
4.1.2. Teste do nado forçado .....	39
4.1.3. Teste do labirinto em “T” elevado .....	40
4.2. Bioquímica oxidativa.....	45

4.2.1. Dosagem da capacidade antioxidante total.....	45
4.2.2. Dosagem de TBARS .....	46
4.2.3. Dosagem de nitritos .....	47
4.2.4. Dosagem de metemoglobina.....	48
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>



# *1 INTRODUÇÃO*

## 1.1 Plantas medicinais

O uso de plantas para fins terapêuticos, cura ou prevenção de doenças, é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que de 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependia das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JÚNIOR et al. 2005).

O exercício da fitoterapia representa uma prática sociocultural da comunidade, que vem sendo aceita e utilizada por diversos profissionais da saúde do mundo todo, ainda que estes tenham sido formados em instituições pertencentes a um modelo biomédico-farmacológico de atenção à saúde. Estes produtos são utilizados com diversas finalidades, sob diversas combinações (com medicamentos alopáticos, homeopáticos, entre outros) baseadas em evidências históricas ou pessoais, onde geralmente não é atribuído nenhum evento adverso (SILVEIRA et al. 2008; PEIXOTO NETO e CAETANO, 2005).

Apesar da evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares realização de diagnóstico e acesso de medicamentos. Estes motivos, associados a fácil obtenção e a tradição do uso das plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA JÚNIOR et al. 2005).

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes estas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. Comparada à toxicidade dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade, a toxicidade das plantas medicinais é um

problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxicidade, bem como ação sinérgica com outras drogas ocorrem comumente. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais nas feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA JÚNIOR et al. 2005).

Hoje, são encontrados alguns estudos sobre plantas da biodiversidade amazônica o que acrescentar ao conhecimento científico a utilização de espécies nativas da região amazônica. Neste contexto, alguns autores como Audi et al. (2008) e Blainski et al. (2010) sugerem possível ação depressora do SNC com a administração de solução de *Petiveria alliacea* L. (Figura 1). Okada et al. (2008) identificou um composto que provavelmente é responsável pela atividade antioxidante, o S-benzil-fenilmetanotiosulfinato.



**Figura 1 - *Petiveria alliacea* L.**

Fonte: <http://www.rain-tree.com>

## 1.2 *Petiveria alliacea* L.

### 1.2.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

*P. alliacea* L. pertence à família Phytolaccaceae que é pantropical e ocorre, principalmente, na América do Sul. No Brasil, está representada por nove gêneros, dos quais cinco ocorrem no Rio Grande do Sul (*Phytolacca*, *Microtea*, *Petiveria*, *Rivina* e *Seguiera*). São plantas herbáceas a subarbustivas, raramente arbóreas, preferencialmente associadas a ambientes florestais (NEVES, 2006). As espécies da família Phytolaccaceae desenvolvem-se, preferencialmente, em locais subúmidos e sombreados (ROCHA et al. 2006).

A *P. alliacea* L. é uma herbácea perene, com leve aroma de aliáceo. Apresenta ramos eretos e folhas alternas elípticas, atenuadas na extremidade, livres e lisas e flores de coloração branca ocorrendo em espigas ou cachos terminais. É sublenhosa, ramificada com ramos compridos, delicados e ascendentes, folhas curto-pecioladas, alternas, estipuladas, membranosas, agudas no ápice e estreitas na base, flores sésseis e pequenas reunidas em inflorescência axilares e terminais espiciformes; androceu com quatro estames, gineceu unicarpelar com ovário súpero; fruto aquênio cilíndrico, achatado e crenado, dotado de espinhos que servem de meio de disseminação por se prenderem em animais e roupas de transeuntes (ROCHA et al. 2006; LORENZI e MATOS, 2002; DI STASI, 1989).

### 1.2.2 ETNOFARMACOLOGIA

A *P. alliacea* é conhecida popularmente como guiné, erva-guiné, pipi, erva-pipi, pênis-de-coelho, tipi, tipi-verdadeiro, amansa-senhor, mucuracaá, erva-de-olho, embayayendo e ouoembo (ROCHA et al. 2006). É comumente utilizada na América Latina com diversos propósitos medicinais: talos secos são usados contra dor de dentes no Brasil. A infusão das folhas e talos é empregada como diurético, abortivo, antitérmico, antireumático, antiespasmódico e antihelmíntico em vários países. A infusão da raiz é usada para cefaleia e como estimulante. Há ainda observação de efeitos tóxicos no SNC (BLAINSKI et al. 2010; AUDI et al. 2008; LIMA et al. 1991).

### 1.2.3 FITOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

De acordo com alguns estudos acerca da espécie, observa-se que a raiz contém esteróides, triterpenóides, saponina, nitrato de potássio, ácido benzóico, beta-sistosterol, polifenóis, taninos, acetato de isoarbinol, cinamato de isoarbinol, isoarborinol acetato, esteróides, alcalóides, flavonóides, taninos, cumarinas e derivados de cisteína sulfóxido; nas raízes e talos são encontrados compostos de enxofre, dentre os quais a tritolaniasina e trissulfeto de 2-hidroxi-5-etil benzila, sulfeto de alila, trissulfeto de benzila, benzaldeído e ácido benzóico. Enquanto que folha, caule e frutos contem fredelinol, álcool ligno-cérico, lignocerato de lignocerila e pinitol. No caule há alantoína, além de outros compostos biologicamente ativos tais como o óleo essencial (Petiverina), glicosídeos, isoarborinoltriterpeno, alcalóides, flavonóides. Nas sementes são encontrados isotiocianatos voláteis (MUSAH et al. 2009;

GOMES et al. 2008; KUBEC e MUSAH, 2001; ALONSO, 1998; LORES et al. 1990; RIVAS, 1988; SOUSA et al. 1987).

Diversos constituintes da espécie *P. alliacea* L. já tiveram sua atividade farmacológica descrita por vários autores. O efeito antifúngico dos polissulfídeos foi relatado por Benevides et al. (2001), bem como o potencial acaricida (ROSADO-AGUILAR et al. 2010). De acordo com Okada et al. (2008), um derivado tiosulfinato, o S-benzil-fenilmetanotiosulfinato, apresenta ação antioxidante. Foi também estudada a capacidade analgésica e anti-inflamatória das raízes de *P. alliacea* L. por Lopes-Martins et al. (2002) e de partes isoladas (Gomes et al. 2005). Além dessas atividades descritas, Blainiski et al. (2010) e Gomes et al. (2008) descreveram o efeito ansiolítico da planta total, comprovando seus efeitos comportamentais.

### **1.3 Considerações gerais sobre transtornos do SNC.**

#### **1.3.1 ANSIEDADE**

Ansiedade é um transtorno do SNC, caracterizado por um sentimento persistente de preocupação, que inibe a habilidade individual de relaxar. De acordo com os sintomas, a ansiedade pode variar os níveis de: transitória, como a que pessoa sente antes de uma cirurgia ou um ciclo menstrual; ao nervosismo generalizado, sentimento que caracteriza transtorno de ansiedade. Este transtorno é considerado um fenômeno heterogêneo que engloba diversas doenças como: transtorno de ansiedade generalizada, transtorno obsessivo compulsivo, transtorno do pânico e fobia social. A ansiedade acarreta manifestações físicas adaptativas (BRITO, 2011; KHANUM e RAZACK, 2010; LAKHAN e VIEIRA, 2010; YAMADA et al. 2009; SKINNER, 1953).

As respostas adaptativas consistem em reações orgânicas como: cefaleia, tremor, transpiração, dores e tensões musculares, febre, tosse dentre outras. Elas permanecem latentes até que sejam despertadas diante de uma ameaça. Fisiologicamente, estas respostas representam estímulo vital que motiva a realização de funções e a vivência de novas situações, porém muitas vezes são desencadeadas sem que haja necessidade. Estes falsos alarmes são produzidos quando a resposta de defesa é menos agressiva que o perigo em potencial. Nos animais, este mecanismo é conhecido como comportamento defensivo enquanto que nos humanos é a ansiedade (BRITO, 2011; LAKHAN e VIEIRA, 2010; NESSE, 2005; CHATTOPADHYAY et al. 1980).

Uma grande quantidade de fármacos, pertencentes a diferentes classes terapêuticas, apresenta eficácia comprovada no manejo do transtorno de ansiedade. Entretanto, todos apresentam inconvenientes, o que justifica a busca por novas substâncias ansiolíticas. Como por exemplo, os benzodiazepínicos provocam sedação, amnésia, podem causar abuso e/ou dependência, síndrome de abstinência e interações com outros depressores do SNC. Devido a estes efeitos adversos, cerca de 40% dos pacientes que apresentam transtornos da ansiedade usam alguma forma complementar de terapia e, por isso, muitas companhias farmacêuticas estão conduzindo estudos para encontrar alternativas medicinais que apresentem efeitos ansiolíticos mais específicos, como por exemplo, o uso de fitoterápicos (FAUSTINO et al. 2010; SOUSA et al. 2008).

Grande número de plantas medicinais cujo potencial terapêutico tem sido estudado em vários modelos animais, e cujos mecanismos de ação tem sido investigados através de ensaios neuroquímicos. Estes estudos têm provido informações úteis para o desenvolvimento de novos fármacos a partir dessas plantas para o tratamento dos distúrbios da ansiedade. Dentre as plantas citadas como atuantes no SNC, temos a *P. alliacea* L. (BLAINSKI et al. 2010; SOUSA et al. 2008; GIORGETTI et al. 2006).

Os transtornos de ansiedade estão entre os distúrbios psiquiátricos mais frequentes na população, onde crianças e idosos são os mais afetados. Soma-

se que, os sintomas ansiosos estão entre os mais comuns, podendo ser encontrados em qualquer pessoa em determinados períodos de sua existência. A distribuição entre os gêneros é de modo geral equivalente, exceto fobias específicas, como transtorno de estresse pós-traumático e transtorno de pânico que tem predominância no gênero feminino. Uma dificuldade comumente presente no diagnóstico da ansiedade é a superposição desta com sintomas depressivos, e diversos estudos sugerem que os dois construtos podem ser componentes de um processo de estresse psicológico geral (CASTILLO et al. 2000; ANDRADE e GORENSTEIN, 1998).

### 1.3.2 DEPRESSÃO

A depressão é caracterizada por alterações do humor, que pode variar de estágios muito discretos, ou levar a transtornos mais graves como alucinações e delírios, no caso da depressão psicótica, que é uma das principais causas de suicídio no mundo. Os sintomas mais comuns são desânimo persistente, sentimentos de culpa, alterações do sono, ideias suicidas, diminuição do apetite e da libido, diminuição do nível de funcionamento mental e presença de ideias obsessivas ou supervalorizadas. Os transtornos depressivos incluem a depressão maior, a distímia e transtorno bipolar (BEAR et al. 2008; MORAES, 2006).

O estresse parece ser um dos principais fatores ambientais que predisõem um indivíduo à depressão. Em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos por fatores estressantes, principalmente de origem psicossocial. Além disso, a conhecida influência de fatores genéticos na depressão pode ser decorrente do aumento da sensibilidade aos eventos estressantes (JOCA et al. 2003).



As principais teorias relativas à base biológica da depressão se referem aos estudos sobre neurotransmissores cerebrais e seus receptores, dos quais a teoria das monoaminas constitui a principal hipótese envolvendo os neurotransmissores cerebrais. Dentre as catecolaminas, a dopamina, a noradrenalina e a serotonina estão envolvidas nos processos depressivos, as quais resultariam no déficit funcional dessas monoaminas presentes em certas regiões do cérebro seriam a causa desta doença (BAHLS, 1999).

Dependendo da área afetada fisiologicamente no caso de transtornos do tipo depressivo, alterações cognitivas podem estar presentes, tais como déficits de memória (MAIA et al. 2009; SHUTOH et al. 2006; KNOWLTON et al. 1996).

#### **1.4 Memória**

Corresponde à retenção da informação aprendida, isto é, o processo pelo qual as experiências anteriores levam à alteração do comportamento. Entretanto, a retenção das informações não é realizada de modo igualitário, pois cada tipo de informação, conforme o avançar do tempo é armazenada de forma distinta sendo classificada de acordo com o tempo de duração em: memória de curta duração (ou de curto prazo), memória de longa duração (ou de longo prazo) e memória de trabalho, a qual não está completamente esclarecida (ALBUQUERQUE e SILVA, 2009; BEAR et al. 2008; HELENE e XAVIER, 2003; IZQUIERDO et al. 1999).

#### 1.4.1 MEMÓRIA DE CURTA DURAÇÃO

É aquela que dura de segundos a horas, ou seja, onde as informações são rapidamente esquecidas, como exemplo, pode citar a memória do alimento que é ingerido no jantar, que possivelmente será esquecido ao passar do tempo (BEAR et al. 2008; IZQUIERDO et al. 1999; IZQUIERDO et al. 1998). Estratégias de ensaio (repetir ou ensaiar a informação) podem ser ensinadas e usadas para organizar e reter a informação por período mais longo (BORUCHOVITCH, 1999).

#### 1.4.2 MEMÓRIA DE LONGA DURAÇÃO

Tem como função armazenar a informação que foi aprendida, porém não está em uso. Está intimamente relacionada à memória de curto prazo, isto implica que a aquisição deste tipo de conhecimento requer treinamento repetitivo e que a aquisição ocorre de forma gradual ao longo de diversas experiências, estando ligada à situação de aquisição original; seria, portanto, inflexível e pouco acessível a outros sistemas. As informações armazenadas na memória de longa duração são permanentes (HELENE e XAVIER, 2003; BORUCHOVITCH, 1999). Para Gagné et al. (1993), a sensação de não lembrar alguma coisa está mais associada à falta de uma boa pista de recuperação da informação do que a perda da informação propriamente dita.

### 1.4.3 MEMÓRIA DE TRABALHO

Refere-se ao arquivamento temporário da informação para o desempenho de diversas de tarefas cognitivas (HELENE e XAVIER, 2003). Segundo Miller (1956), a memória de trabalho é limitada quanto à capacidade de armazenamento imediato de informação. Fica, pois, em evidência, que este sistema apresenta limitação quanto ao tempo, mas pode ser mantido, se for ativado pela repetição ou pela transferência á memória de longo prazo. Tarefas que envolvem habilidades fonológicas, como nomear letras e objetos, relembrar sentenças faladas e ouvir histórias e rimas infantis, promovem as habilidades de memória (SANTOS e SIQUEIRA, 2002; MANN e LLBERMAN, 1984). Desta forma, elas podem facilitar a habilidade de representar *inputs* fonologicamente (consciência fonológica), na memória de trabalho. A memória de trabalho é designada como um sistema capaz de reter e manipular temporariamente a informação, enquanto participa de tarefas cognitivas como raciocínio, compreensão e aprendizagem (ADAMS e GATHERCOLE, 1995; ALLOWAY et al. 2004; GINDRI et al. 2007).

### 1.5 Estresse oxidativo

Estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema de regulação redox, onde há excesso na produção de agentes oxidantes (Espécies Reativas do Oxigênio – ERO – e Espécies Reativas do Nitrogênio - ERN) em relação ao sistema de defesa antioxidante fisiológico, acarretando danos aos lipídeos, proteínas, DNA (ácido desoxirribonucléico) e outras moléculas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

### 1.5.1 ESPÉCIES REATIVAS TÓXICAS DE NITROGÊNIO E OXIGÊNIO

As células vivas presentes em uma atmosfera rica em oxigênio estão constantemente expostas aos possíveis danos causados por ERO, que podem ser originadas tanto exógena quanto endogenamente. ERO é um termo bastante amplo que abrange não somente radicais de oxigênio, como radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), mas também derivados do oxigênio que não são radicais, como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ) e oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (DI MASCIO *et al.*, 2006). Além das ERO's, as espécies reativas do nitrogênio (ERN) podem ocasionar danos às células, estas incluem óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (BARREIROS *et al.* 2006).

### 1.5.2 PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS

Todos os componentes celulares estão susceptíveis à ação das ERO e ERN, entretanto a membrana celular é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações morfológicas e funcionais nesta estrutura (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

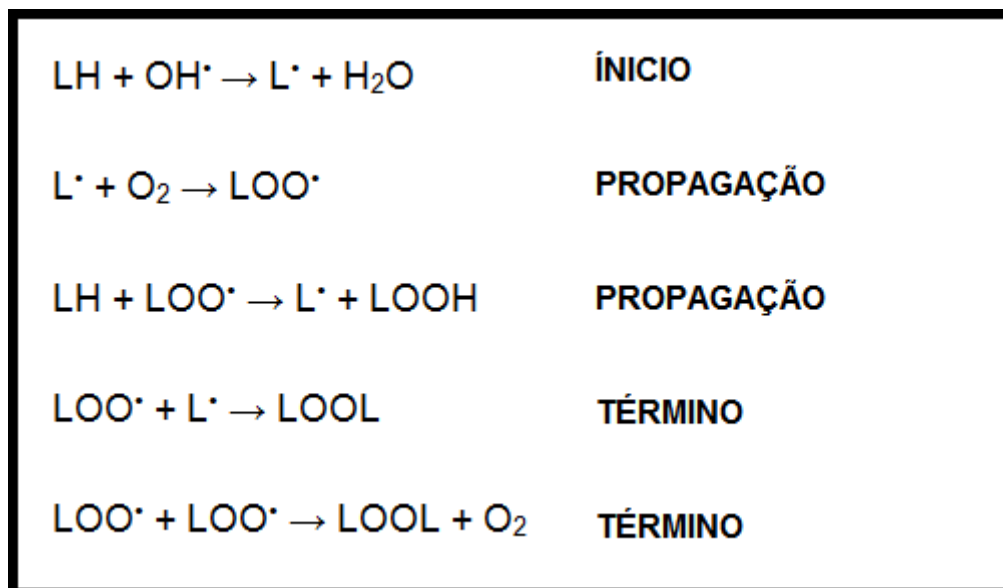
A peroxidação de lipídeos pode ser definida como uma cascata de reações bioquímicas que resultam da ação das ERO e ERN sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos ou até mesmo à morte celular, o que nos indica que a peroxidação pode estar relacionada ao envelhecimento, a exacerbação da toxicidade de xenobióticos, e diversas

doenças como câncer, diabetes, aterosclerose e inflamações (LIMA e ABDALLA, 2001; VANNUCCHI et al. 1998; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, que pode ser dividida em três etapas: início, propagação e término. A fase de início representa a interação do ácido graxo com uma espécie tóxica que é suficientemente reativa para retirar um átomo de hidrogênio, isto tem como consequência a perda de um átomo de hidrogênio do ácido graxo e liberação de um radical lipídico, ao qual é estabilizado por um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (LIMA e ABDALLA, 2001; VANNUCCHI et al. 1998; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Já na fase de propagação, em meio aeróbio, o radical lipídico incorpora uma ou mais moléculas de oxigênio e transforma-se em radical peróxido, o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono e promovendo esta etapa. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera um hidroperóxido lipídico. Peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando o radical peroxila reage com uma dupla ligação na mesma cadeia de ácido graxo, o que também pode propagar o processo (LIMA e ABDALLA, 2001; VANNUCCHI et al. 1998).

A última fase da peroxidação dos lipídeos é o término, que ocorre pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não-radicalares. A velocidade do processo de lipoperoxidação é limitada pelas fases anteriores (LIMA e ABDALLA, 2001). As três fases estão representadas na Figura 2.



**Figura 2** - Lipoperoxidação (L representa o ácido graxo).  
 Fonte: FERREIRA e MATSUBARA, 1997.

Na peroxidação lipídica são inúmeras as possibilidades de reações químicas com a produção de diversos marcadores de dano oxidativo, o que o torna de difícil compreensão e avaliação. A importância da mensuração dos produtos derivados da lipoperoxidação, em sangue humano ou outros fluidos biológicos, está relacionada à citotoxicidade destes produtos, que pode causar alterações celulares associadas ao envelhecimento e diversas doenças como o câncer, artrite e aterosclerose (VASCONCELOS et al. 2007; LIMA e ABDALLA, 2001).

A utilização de plantas pode interferir nas reações bioquímicas endógenas, podendo ocasionar proteção ou danos através da diminuição ou aumento do estresse oxidativo (SAIDI et al. 2012; OELZE et al. 2011; PIOTROWSKA et al. 2011), como por exemplo alterações nos níveis de produtos relacionados às reações oxidativas com reflexos no comportamento, a presença de NO no SNC pode ocasionar estes efeitos. Mudanças na sinalização do NO têm sido relatadas, tanto por aumentar quanto por diminuir comportamentos relacionados à ansiedade. Estudos com injeções sistêmicas de L-NAME, que reduz a produção de NO, aumentou o nível de ansiedade no LCE (CZECH et al. 2003). O tratamento sistêmico administrado de forma aguda

(FARIA et al. 1997; GUIMARÃES et al. 1994; VOLKE et al. 1998) e sub-crônica (DUNN e cols., 1998) com inibidores da enzima NOS, aumentou o tempo de exploração dos animais aos braços abertos do LCE.

A precisa contribuição da sinalização do NO para o comportamento deve ser obtida utilizando manipulações anatomicamente mais precisas. Quando o L-NOARG, outro inibidor da síntese de NO, foi infundido no hipocampo de ratos, foi observada uma diminuição no tempo de exploração dos braços abertos do LCE (MONZÓN et al. 2001). Isso significa que existem na literatura dados contraditórios em relação ao NO e as alterações comportamentais (DELBEL et al. 2005).

A utilização da *P. alliacea* L. por populações amazônicas sem comprovação científica de seus possíveis efeitos farmacológicos, bioquímicos e tóxicos, justifica a importância deste estudo, que visa contribuir com a avaliação das possíveis atividades comportamentais e do estresse oxidativo como alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos através do uso de plantas.

## *2 OBJETIVOS*



## 2.1 Objetivo geral

Avaliação dos efeitos comportamentais e estresse oxidativo em ratos adultos submetidos à administração via oral do extrato hidroalcólico de *P. alliacea* L.

## 2.2 Objetivos específicos

- a. Obter o extrato hidroalcólico (EHA) de *P. alliacea* L.;
- b. Avaliar os efeitos neurocomportamentais do EHA de *P. alliacea* L., através dos testes relacionados à atividade locomotora espontânea, ansiedade, depressão e memória;
- c. Determinar a atividade antioxidante total do plasma dos animais;
- d. Quantificar os compostos reativos ao Ácido Tiobarbitúrico após administração aguda;
- e. Dosar nitritos no plasma dos animais;
- f. Determinar a metemoglobinemia, através de método *in vitro*.

### *3 MATERIAL E MÉTODOS*

### 3.1 Material Botânico

#### 3.1.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E PREPARO

A planta foi coletada na vila de São Raimundo, município de Acará (PA) em março de 2010. Foi montada exsicata e a identificação botânica realizada por especialista do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) sob registro número MG 94354.

O material vegetal constituído de folhas, talos e raízes da *P. alliacea* L. foi selecionado e lavado em água corrente e a seguir em etanol 10%. As partes foram secas á temperatura ambiente por dois dias, desidratadas em estufa com circulação de ar forçado em temperatura média de 40°C durante seis dias e trituradas em moinho de facas para obtenção da droga pulverizada.

A droga pulverizada foi macerada por sete dias, onde foi utilizada como solvente etanol 70%. A solução extrativa foi submetida ao evaporador rotatório (Laborata 4000, Heidolph) em temperatura de 45°C, pressão de 160 atm e rotação de 120 rpm. Para garantir a remoção total do solvente, a solução extrativa foi levada para a estufa à temperatura de 60°C e posteriormente e para o banho-maria a 100°C. O fluxograma pode ser observado na Figura 3. A obtenção do extrato ocorreu na Central de Extração da Faculdade de Química e Farmacognosia.

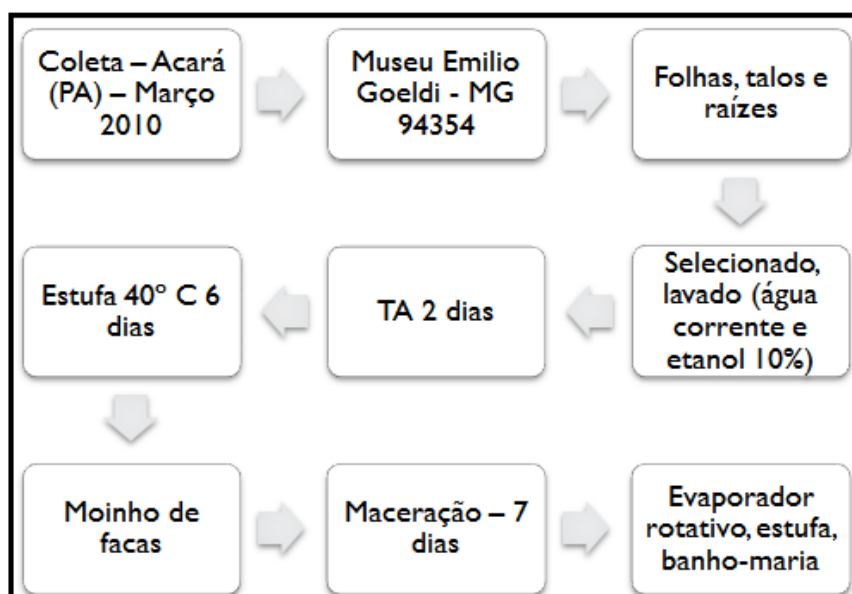


Figura 3 – Fluxograma da coleta até a preparação do extrato de *P. allieacea* L.

## 3.2 Estudos Farmacológicos

### 3.2.1 ANIMAIS

Foram utilizados *Rattus norvegicus*, variedade albino, linhagem Wistar (n = 7-10 animais por grupo, ambos os gêneros), pesando de 150-300 gramas; com idade de 2-3 meses, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Pará (UFPA) e mantidos em condições padronizadas de temperatura, exatidão e ciclo de luz claro/escuro de 12 h, com água e ração *ad libitum*. Nas salas onde ocorreram os experimentos comportamentais foram utilizadas lâmpadas fluorescentes para iluminação.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética (Nº 0050/2009 – Anexo A) em Pesquisa envolvendo animais do Instituto Evandro Chagas (CEPAN-IEC),

obedecendo aos critérios éticos de experimento animal, de acordo com as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais.

### 3.2.2 FÁRMACOS E SOLUÇÕES UTILIZADAS

Nos experimentos foram utilizados os seguintes fármacos e soluções padrões:

- a. Diazepam (DZP) (7-Cloro-1-metil-5-fenil-1,3-diidro-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona) - Diazepamil ® (Hipolabor). O DZP foi utilizado como controle positivo para atividade ansiolítica, na concentração de 1mg/Kg;
- b. Fluoxetina (FXT) (n-Metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil) fenóxi]-propan-1-amina hidrocloreto) - Fluxene ® (Eurofarma). A FXT foi utilizada como controle positivo para avaliar o efeito antidepressivo, na concentração de 10mg/Kg;
- c. Cafeína (1,3,7-Trimetilxantina) (Sigma), como controle positivo para avaliar o comportamento mnemônico, na concentração de 10mg/Kg.

### 3.2.3 TRATAMENTOS

Foi utilizada a concentração de 900mg/kg de animal do EHA de *P. alliacea* L., o qual foi dissolvido em solução salina (NaCl 0,9 %) e administrado via oral (gavagem) (BLAINSKI et al. 2010).

A concentração de DZP utilizada foi de 1mg/kg de animal, dissolvidos em 5 mL de solução salina. Já para FXT e CAF, a concentração utilizada foi de

10mg/kg de animal. Todas foram administradas via oral (gavagem) em volume de 5 mL.

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

### **3.3 Ensaios Comportamentais**

Os experimentos referentes aos ensaios comportamentais foram realizados no Laboratório de Farmacodinâmica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

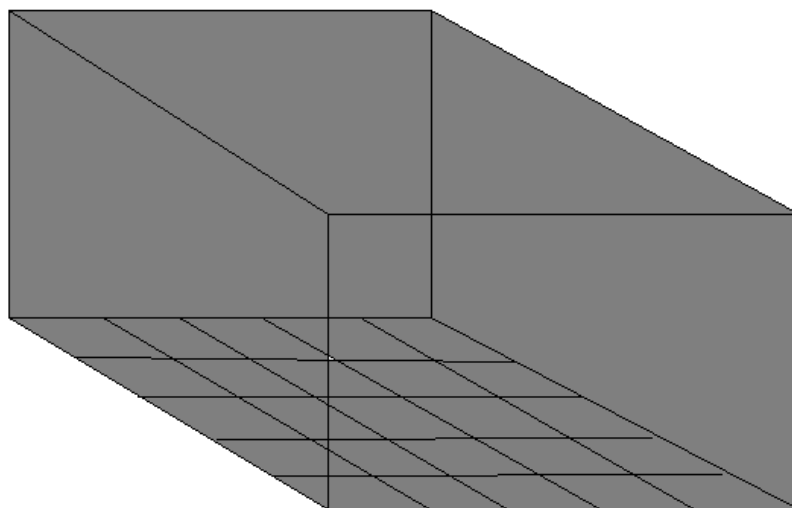
#### **3.3.1 TESTE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA (*OPEN FIELD*)**

Para avaliar as atividades de locomoção (ambulação, erguer-se e limpar-se) e exploratória dos animais, foi realizado o Teste do Campo Aberto, o mesmo pode também ser utilizado na avaliação da atividade ansiolítica, pois se baseia nos mecanismos de ansiedade e defesa que são essenciais para a sobrevivência de humanos e animais (PRUT e BELZUNG, 2003; SILVA, 2003). Ressalta-se que este teste também pode ser utilizado para avaliação de atividade ansiolítica.

Para a realização do Teste do Campo Aberto foi utilizada uma arena em madeira com dimensões de 100 cm de largura, 100 cm comprimento e 40 cm

de altura pintada com material impermeável de cor preta, com assoalho dividido em 25 quadrantes iguais com 20 cm de largura por 20 cm de comprimento, com as linhas na cor branca (Figura 3). Foram utilizados 3 grupos para o teste: o grupo 1 foi tratado com o extrato de *P. alliacea* L.; o grupo 2 foi tratado com Diazepam, na concentração de 1mg/Kg, como controle positivo do efeito ansiolítico; e o grupo 3 foi tratado com solução salina para servir de controle branco.

Antes do início dos experimentos, os animais foram conduzidos à sala de teste por um período de 1 hora para aclimatação e habituação ao ambiente do teste. A seguir, os animais foram colocados individualmente no quadrante central do campo aberto onde foi permitido o livre deslocamento dentro do aparato por 5 minutos. Este processo foi monitorado por experimentador que não tinha informações sobre o grupo de tratamento que estava sendo testado (PANDOLFO et al. 2007; WALSH e CUMMINS, 1976).



**Figura 4** - Teste da atividade locomotora: A arena (campo aberto) dividida em 25 quadrantes para a contagem da locomoção dos animais. Este comportamento era considerado quando o animal colocava as quatro patas em um dos quadrantes.

Foram contabilizados, de acordo com o protocolo de Pandolfo et al. (2007) e Walsh e Cummins (1976), os seguintes indicadores:

- a. Número de quadrantes periféricos cruzados (locomoção periférica);
- b. Número de quadrantes centrais cruzados (locomoção central);
- c. Tempo na área central;
- d. Percentual da locomoção central em relação a locomoção total;
- e. Frequência do comportamento de levantar-se (*rearing*);
- f. Tempo despendido para sair do ponto de partida;
- g. Frequência de autolimpeza corporal (*grooming*).

Não foi considerada locomoção quando o animal colocou uma, duas ou três patas em um dos quadrantes, com retorno ao quadrante original.

### 3.3.2 TESTE DO NADO FORÇADO

Após o teste do campo aberto, foi realizado o Teste do Nado Forçado, segundo protocolo de Porsolt et al. (1978), que avalia o comportamento do tipo depressivo através da submissão de roedores a uma situação de estresse. Quando expostos a esta situação, a reação natural do animal é a tentativa de fuga realizando intensa atividade física, contudo, após inúmeras tentativas de escape os movimentos de luta e fuga são interrompidos e o animal permanece imóvel, produzindo movimentos suficientes apenas para manter a cabeça acima da superfície da água (KIRBY e LUCKI, 1998; REDROBE e BOURIN, 1998).

Para a realização do teste os animais foram colocados em um cilindro Plexiglass (30 cm de diâmetro e 50 cm de altura), contendo aproximadamente 40 centímetros de volume de água a uma temperatura de  $23 \pm 1$  °C por 5min (Figura 4). São observados quatro tipos de comportamento: 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 foi mensurada a imobilidade contínua, o nado e o *climbing*. Após a observação de cada animal, o cilindro era limpo com álcool 10%.

Foram utilizados 3 grupos para o teste: grupo 1 que foi tratado com o extrato de *P. alliacea* L. 900mg/Kg; o grupo 2, tratado com FXT, na concentração de 10mg/Kg, como controle positivo do efeito antidepressivo; e o grupo 3 foi tratado com solução salina para servir como controle branco.



**Figura 5** - 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. O aumento do tempo do nado ou da subida, e a redução do tempo da imobilidade foram definidos como indicativo de comportamentos relacionados à depressão (CRYAN et al. 2002; KIRBY e LUCKI, 1998).

### 3.3.3 TESTE DO LABIRINTO EM “T” ELEVADO (LTE)

Objetivando avaliar o efeito do EHA de *P. alliacea* L. sobre a memória e aprendizado foi realizado o Teste do Labirinto em “T” Elevado. O experimento foi adaptado do protocolo de Sanson e Carobrez (1999) e adaptado por Takahashi et al. (2005). No protocolo experimental de aquisição de memória (treinamento), cada animal era posicionado no braço fechado do LTE e explorou este braço por tempo máximo de 300 segundos. Quando, deixando o braço fechado do labirinto, o animal posicionava as quatro patas em um dos braços abertos, o teste era finalizado e o animal retornava para o campo aberto de madeira por 30 segundos. Foram utilizados 3 grupos para o teste: grupo 1 que foi tratado com o extrato de *P. alliacea* L. 900mg/Kg; o grupo 2, tratado com CAF, na concentração de 10mg/Kg, como controle positivo do efeito mnemônico; e o grupo 3 foi tratado com solução salina para servir como controle branco.

Os animais foram submetidos novamente, no mesmo dia, a tantos testes quanto fossem necessários para alcançar o critério de permanecer 300 segundos no braço fechado (critério de esquiva). Imediatamente após a aquisição do critério de esquiva, o animal foi colocado em um dos braços abertos do LTE, sendo cronometrado o tempo de entrada no braço fechado. Ressalta-se que, alguns autores relacionam este comportamento de fuga dos braços abertos com o comportamento do tipo pânico (BRAVIN et al. 2005).

A ausência de paredes e a impossibilidade de girar com as patas traseiras parecem ser a base da aversão de roedores a espaços abertos,

sugerindo que esta característica deva ser a base do comportamento de esquiva em relação aos braços abertos do LTE (TREIT et al. 1993; GRAEFF, 1999).

A seguir, os animais eram colocados nas suas gaiolas para serem testados após 24 horas, quando foi realizado o primeiro teste (T1), onde os animais foram posicionados no final do braço fechado e cronometrado o tempo de saída com as quatro patas para um dos braços abertos. Após 30 segundos, foi realizado um reteste (R1), no qual cada animal foi recolocado no braço fechado do LTE, adotando-se o mesmo procedimento anterior.

Avaliação adicional realizada foi a tentativa de saída do braço fechado, considerada quando o rato se esticava do braço fechado, colocando 1, 2 ou 3 patas em um dos braços abertos e então retornava para sua posição original. Esta estratégia de defesa exibida pelo rato é denominada avaliação de risco (AR), sendo caracterizado pela exploração cautelosa, comportamento este que é afetado por medicamentos ansiolíticos (GRAEFF e BRANDÃO, 1999).

Após a observação de cada animal, o LTE era limpo com álcool 10% (v/v). O comportamento de AR foi interpretado como a frequência de tentativas no braço fechado (SANSON e CAROBREZ, 1999), de acordo com a fórmula a seguir:

$$AR = \text{frequência de tentativas} \times 100 / \text{tempo de esquiva}$$



**Figura 6** - Teste do labirinto em T elevado: O aparato é constituído por dois braços abertos e um braço fechado, para facilitar a observação do conflito de esquiva, aprendizado e esquiva de inibição (Fonte: MAIA, 2009).

Após os ensaios comportamentais, foi realizada a coleta de aproximadamente 1,5 mL de sangue, pela via do plexo orbital de cada animal para realização das dosagens da bioquímica oxidativa: capacidade antioxidante total; TBARS; nitritos e metemoglobinemia.

### **3.4 Métodos em bioquímica oxidativa**

Os parâmetros de estresse oxidativo foram analisados no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da UFPA.

### 3.4.1 DOSAGEM DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TEAC)

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 redução do ânion ABTS pelos antioxidantes endógenos e exógenos presentes na amostra, com consequente redução nas absorvâncias.

A incubação do ABTS<sup>®</sup> (2,2-Azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato]) produz o radical ABTS<sup>®+</sup>, o qual possui uma cor azul esverdeada estável, em leitura espectrofotométrica a 730nm. A adição da amostra (quando esta possui compostos antioxidantes) produz a neutralização do radical ABTS<sup>®+</sup>, levando à diminuição na absorvância.

Protocolo de dosagem:

	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>	<b>Amostra</b>
Água destilada	20µL	-	-
Padrão	-	20µL	-
Amostra	-	-	20µL
<b>Cromógeno</b>	1,0mL	1,0mL	1,0mL

Deve-se agitar bem e ler a absorbância (A1) em 730nm do radical ABTS. Adicionar 20 $\mu$ L 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 Fazer a leitura diferencial das absorbâncias e plotar em curva de calibração previamente constituída com diluições conhecidas de TROLOX. Os resultados são expressos em  $\mu$ mol/L.

### 3.4.2 DOSAGEM DE COMPOSTOS REATIVOS DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

A dosagem de TBARS 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 (que deve estar presente na amostra), formando um complexo TBA-MDA-TBA de cor rósea, lido em absorbância de 535nm.

Protocolo de dosagem:

	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>	<b>Amostra</b>
Água destilada	500 $\mu$ L	-	-
Padrão	-	500 $\mu$ L	-
Amostra	-	-	500 $\mu$ L
Reagente TBA	1,0mL	1,0mL	1,0mL

Deve-se misturar bem e incubar a 95°C por uma hora. Após este procedimento, resfriar em água corrente, adicionar 4 mL de álcool butílico, homogeneizar em vórtex e centrifugar a 2500rpm por 15 minutos. Colher 3 mL do sobrenadante para leitura espectrofotométrica em 535nm. A seguir, o resultado é plotado em curva de calibração previamente constituída com soluções de malondialdeído. Os resultados são expressos em nmol/mL.

### 3.4.3 DOSAGEM DE NITRITOS

De acordo com o método proposto por Granger et al. (1995), para a dosagem de nitritos deve-se adicionar reagente de Griess na amostra 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 540nm.

Protocolo de dosagem:

	<b><i>Branco</i></b>	<b><i>Padrão</i></b>	<b><i>Amostra</i></b>
Água destilada	100 µL	-	-
Padrão	-	100 µL	-
Amostra	-	-	100 µL
Reagente de Griess	100 µL	100 µL	100µL

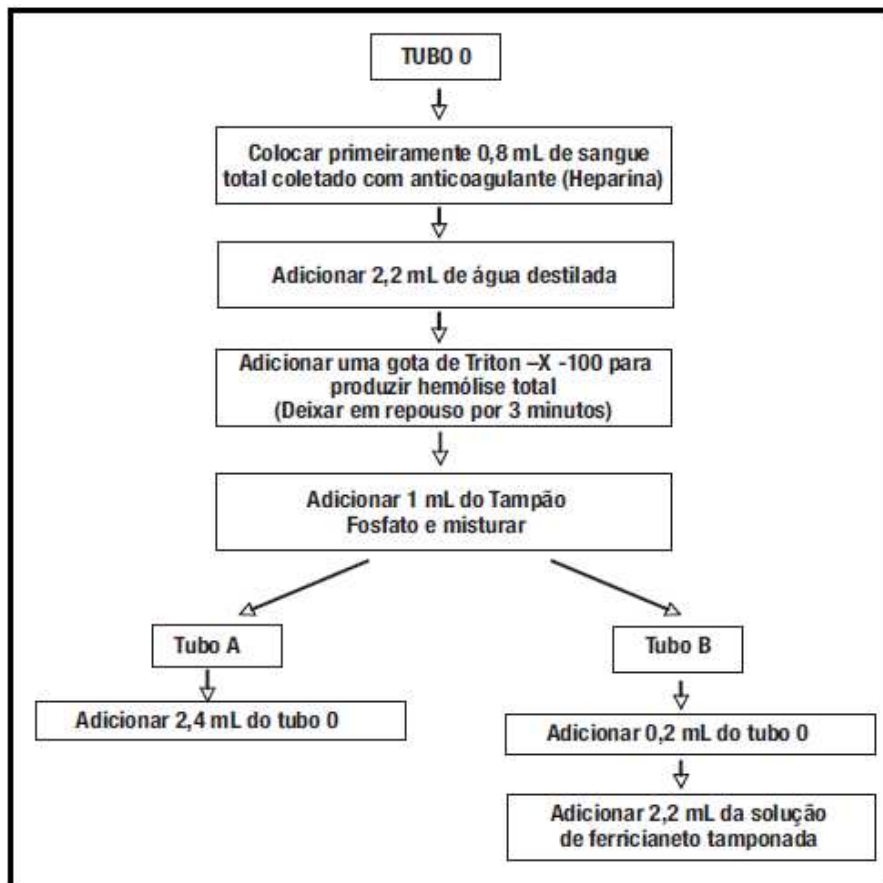
#### 3.4.4 DOSAGEM DA METEMOGLOBINA

A dosagem de metemoglobina foi realizada seguindo o protocolo de Hegesh et al. (1970), que consiste na leitura da absorbância diferencial entre a quantidade de metemoglobina presente em relação a 100% de oxidação da hemoglobina, no qual é convertida à cianometemoglobina. A leitura das absorbâncias foi realizada em 632nm, empregando-se espectrofotômetro (UV-visível, DR5000-HACH, *HEXIS®*) e os resultados expressos em porcentagem de metemoglobina.

Uma alíquota de 0,8 mL do sangue coletado com anticoagulante heparina (onde não há reação com o ferro) é colocado em um tubo 0, que em seguida é adicionado 2,2 mL de água destilada e deixa-se em repouso por 1h. Após este tempo, adiciona-se triton-x para produção de hemólise total e deixar em repouso por mais 3 min. Em seguida, adicionar 1 mL de tampão fosfato e misturar.

Separar essa solução do tubo 0 em tubo A e B. Onde no tubo A fica uma quantidade de 2,4 mL da solução do tubo 0, e no tubo B, uma quantidade de 0,2 mL do tubo 0 mais 2,2 mL de ferrocianeto tamponado.





**Figura 7** – Fluxograma para realização do teste de dosagem de metemoglobina (HEGESH et al. 1970). (Fonte: CAMARGO et al. 2007).

Ajustar o espectrofotômetro em 632 nm e acertar o “zero” com água destilada e fazer a leitura dos tubos A e B. Após a leitura, adicionar, em ambas as cubetas, 100 µL da solução neutralizada de cianeto e fazer novamente a leitura de C (tubo A na segunda leitura) e D (tubo B na segunda leitura).

Em seguida, realizar o cálculo da porcentagem de metemoglobina, pela seguinte fórmula:

$$\text{Cálculo de MHb (\% Hb)} = \frac{A - C}{(B - D) \times 12}$$

### 3.5 Análises Estatísticas

Os dados foram colocados quanto à distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Os dados dos testes comportamentais e de estresse oxidativo foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) de uma via, utilizando-se o programa *Graphpad Prism 5.0*.

Para as comparações *post hoc* dos dados de análise comportamento foi utilizado o teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls* para avaliar as significâncias estatísticas das diferenças médias. Para análise de dados de apenas 2 grupos, foi utilizado o Teste t de *student*.

Para os dados de estresse oxidativo, as comparações *post hoc* dos dados de estresse oxidativo foi realizada através do teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

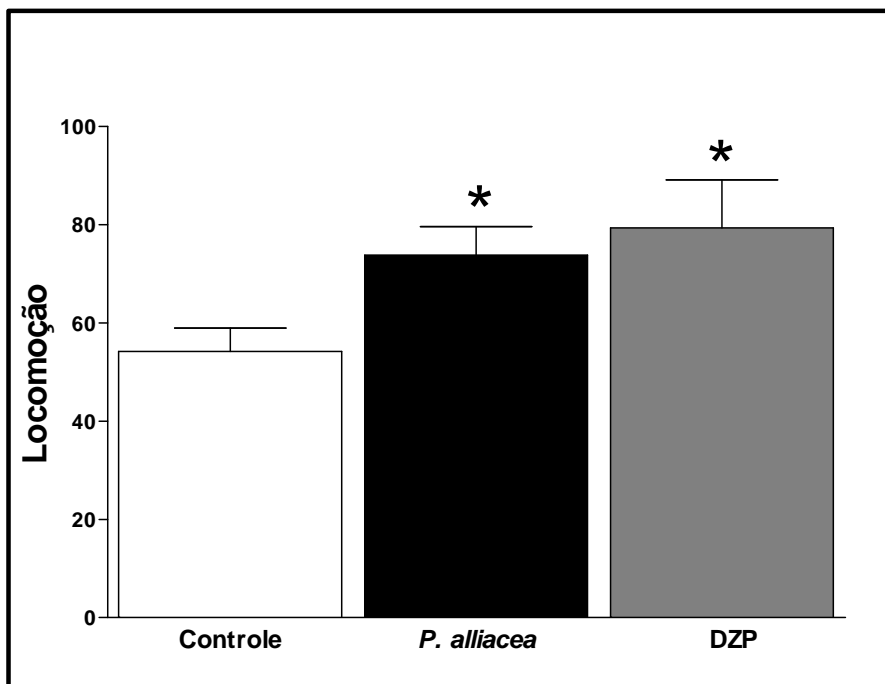
Os dados de cada grupo experimental foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) de 5-10 animais. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significantes foi de  $p < 0,05$ .

## *4 RESULTADOS*

## 4.1 Testes comportamentais

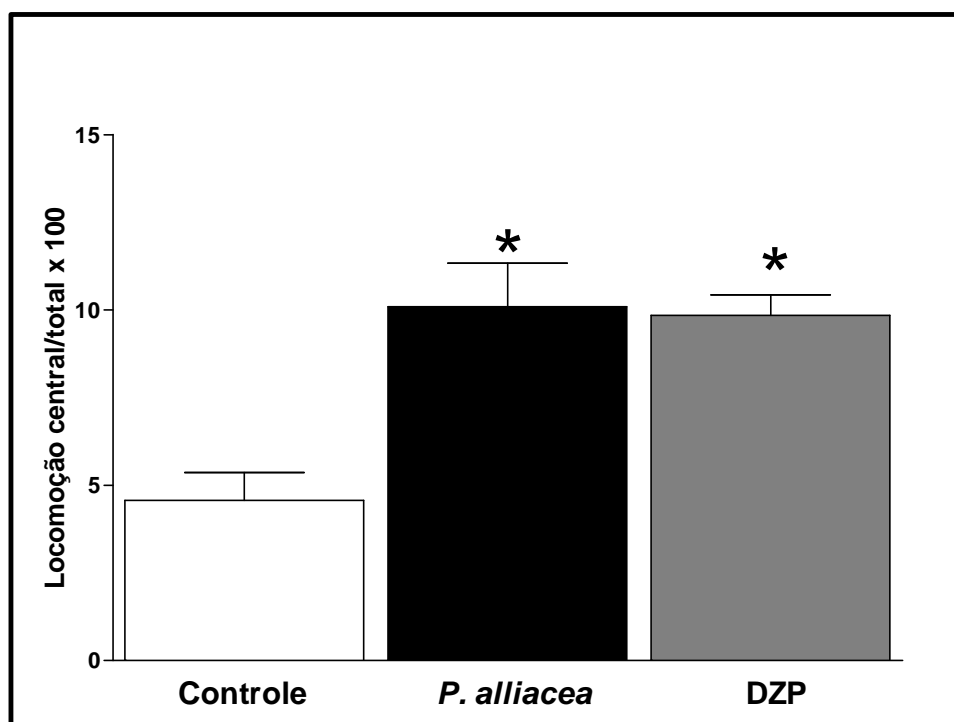
### 4.1.1 TESTE DO CAMPO ABERTO

O tratamento com o EHA de *P. alliacea* L. 900mg/Kg, aumentou a atividade locomotora total dos ratos, quando comparado ao grupo controle ( $F_{(2,27)} = 3,022$ ;  $p < 0,05$ ), e ao grupo DZP ( $F_{(2,27)} = 3,659$ ;  $p < 0,05$ ), como demonstrado na Figura 8.



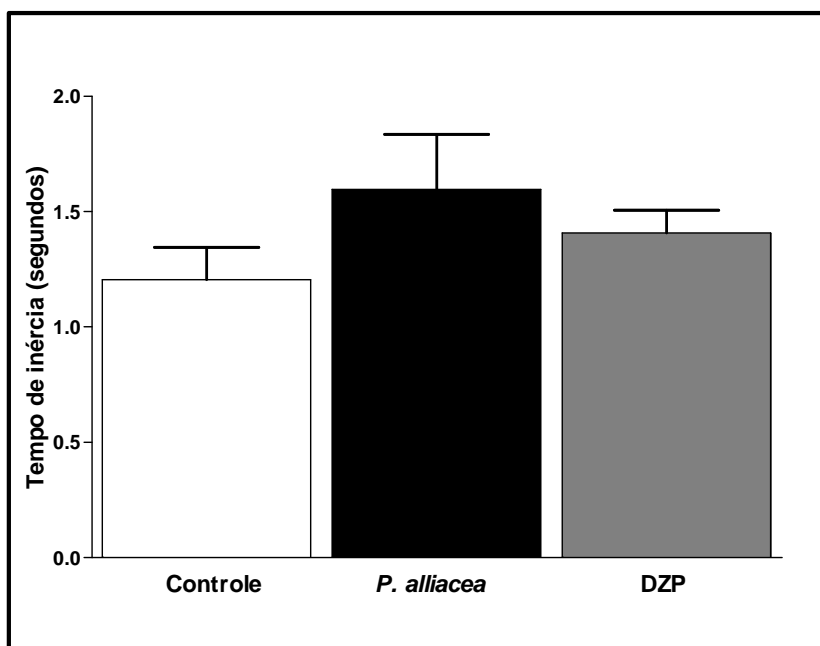
**Figura 8** – Efeito do EHA de *P. alliacea* L. 900mg/Kg em ratos, com relação a atividade locomotora no Teste do Campo Aberto. Cada barra apresenta a média ± e.p.m. 8-10 animais (machos e fêmeas). \* $p < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo controle. (ANOVA, Teste de *Newman-Keuls*).

O percentual da locomoção central em relação à total, observado na Figura 9, demonstrou o aumento da locomoção central pelo grupo tratado com o EHA de *P. alliacea* L. em relação ao controle ( $F_{(2,29)}= 6,045$ ;  $p<0,001$ ), com efeito similar ao grupo DZP ( $F_{(2,29)}= 5,778$ ;  $p<0,001$ ).



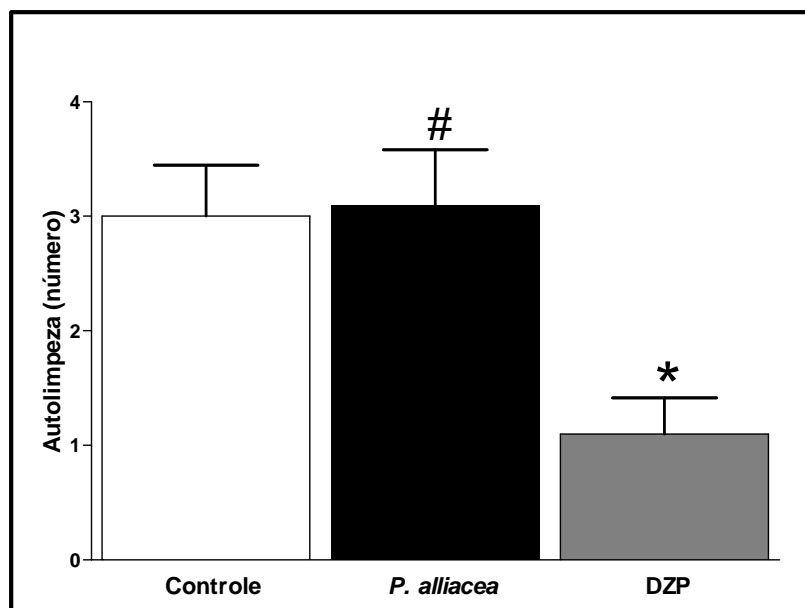
**Figura 9** - Efeito do EHA de *P. alliacea* L. 900mg/Kg em ratos, com relação ao percentual de quadrantes centrais por totais percorridos no Teste do Campo Aberto. Cada barra apresenta a média ± e.p.m. 10 animais (machos e fêmeas). \* $p<0,05$  diferença significativa em relação ao grupo controle.

Considerando o tempo de saída do quadrante central, o tratamento com o EHA *P. alliacea* L. não apresentou resultados significantes tanto em relação ao grupo controle quanto ao DZP, como evidenciado na Figura 10.



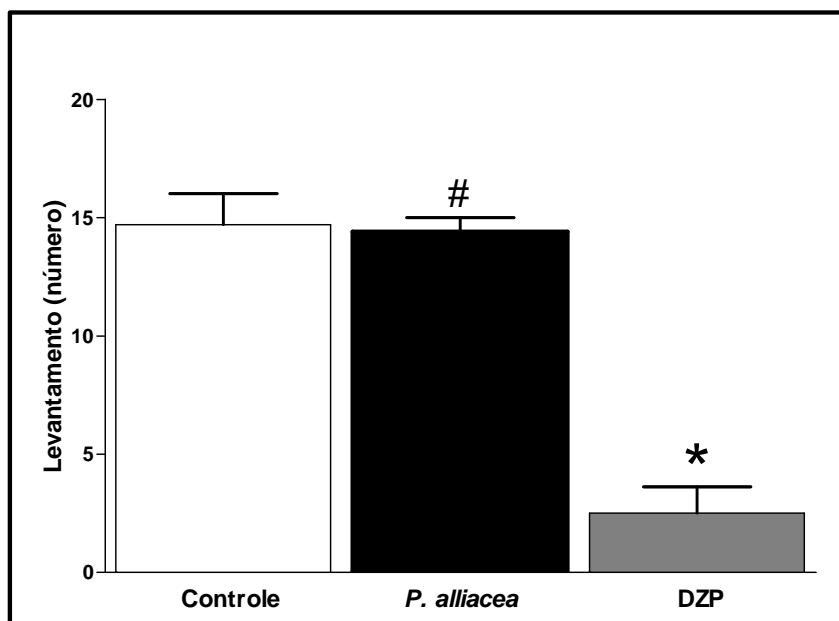
**Figura 10** - Efeito do EHA de *P. alliacea* L. 900mg/Kg em ratos, com relação ao tempo de saída do quadrante central no Teste do Campo Aberto. Cada barra apresenta a média  $\pm$  e.p.m. 8-10 animais (machos e fêmeas). (ANOVA, Teste de Newman-Keuls).

O tratamento com EHA de *P. alliacea* L. não apresentou resultados estatísticos no número de autolimpeza quando comparado com o controle. A *P. alliacea* aumentou este indicador quando comparado com o grupo DZP ( $F_{(2,29)} = 4,753$ ;  $p < 0,01$ ), que diminuiu significativamente o número de autolimpeza também em relação ao controle ( $F_{(2,29)} = 4,516$ ;  $p < 0,01$ ), como verificado na Figura 11.



**Figura 11** - Efeito do EHA de *P. alliacea* L. 900mg/Kg em ratos, com relação ao número de autolimpeza no Teste do Campo Aberto. Cada barra apresenta a média  $\pm$  e.p.m. 10 animais (machos e fêmeas). \* $p < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo DZP.

Como se observa na Figura 12, no número de levantamentos dos animais tratados com o EHA de *P. alliacea* apresentou um aumento estatístico em relação ao grupo tratado com DZP ( $F_{(2,25)} = 10,44$ ;  $p < 0,001$ ), que não foi observado em relação ao grupo controle salino. O DZP diminuiu o número de levantamentos quando comparado ao controle ( $F_{(2,25)} = 10,71$ ;  $p < 0,001$ ).

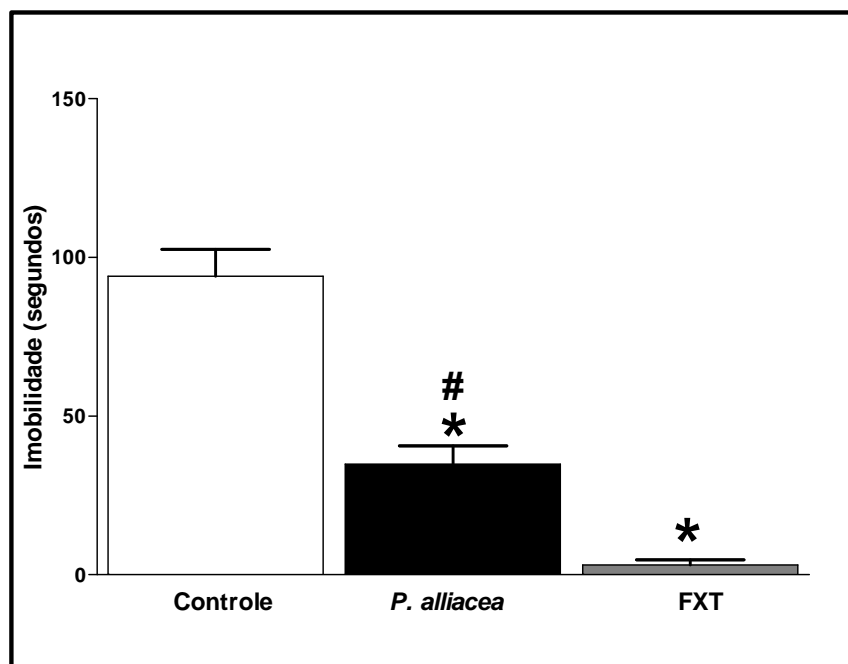


**Figura 12** - Efeito do EHA de *P. alliacea* L. 900mg/Kg em ratos, com relação ao número de levantamentos no Teste do Campo Aberto. Cada barra apresenta a média  $\pm$  e.p.m. 6-10 animais (machos e fêmeas). \* $p < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo DZP.

#### 4.1.2 TESTE DO NADO FORÇADO

A ANOVA de uma via revelou diferenças estatísticas entre os grupos experimentais para o teste do Nado Forçado. A *P. alliacea* L. reduziu o tempo de imobilidade quando comparado ao controle ( $F_{(2,29)} = 9,883$ ;  $p < 0,001$ ) e aumentou quando comparado ao grupo FXT ( $F_{(2,29)} = 5,292$ ;  $p < 0,001$ ), onde os animais mantiveram apenas alguns movimentos suficientes para manter cabeça fora d'água com o intuito de não afundar. Uma redução estatística foi observada comparando o tratamento com FXT 10 mg/Kg ao controle ( $F_{(2,29)} = 15,18$ ;  $p < 0,001$ ). Esta redução significativa no tempo em que os animais permaneceram imóveis é observada na Figura 13.





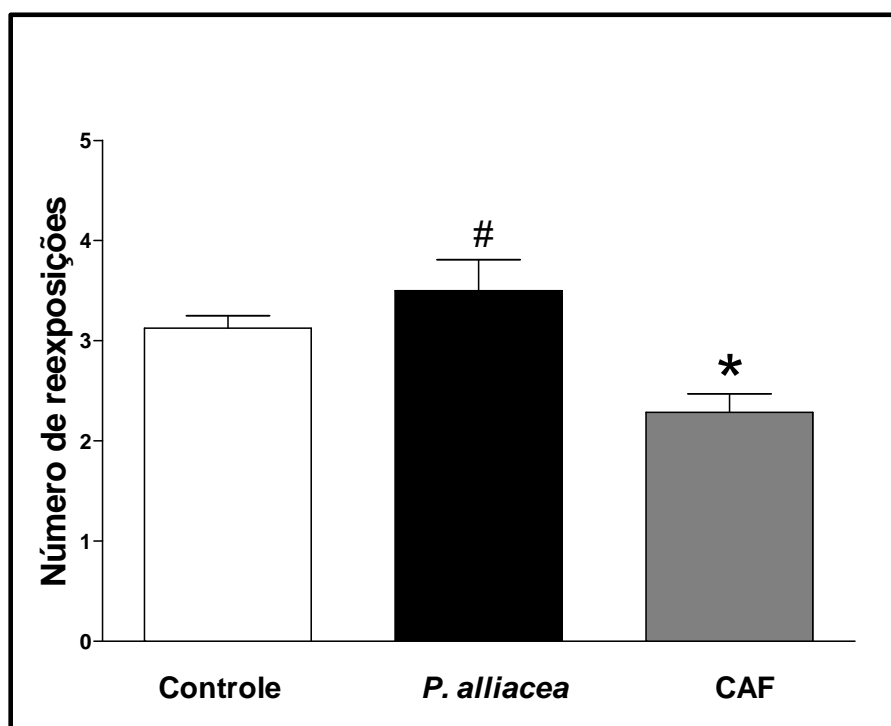
**Figura 13** - Efeito do EHA de *P. alliacea* L. 900mg/Kg em ratos, com relação ao tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado. Cada barra apresenta a média  $\pm$  e.p.m. 10 animais (machos e fêmeas). \* $p < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo DZP.

Quando observado o tempo de subida dos animais, na tentativa de fugir do ambiente aquático, os animais tratados com o EHA de *P. alliacea* L. não apresentaram diferenças significantes quando comparados aos controles do teste.

#### 4.1.3 TESTE DO LABIRINTO EM “T” ELEVADO (LTE)

Na Figura 14, observa-se que o grupo da *P. alliacea* L. apresentou diferença estatística quando comparada aos grupos CAF ( $F_{(2,24)} = 4,973$ ;  $p < 0,01$ ) no parâmetro relacionado à reexposição ao LTE, onde a média foi de 3

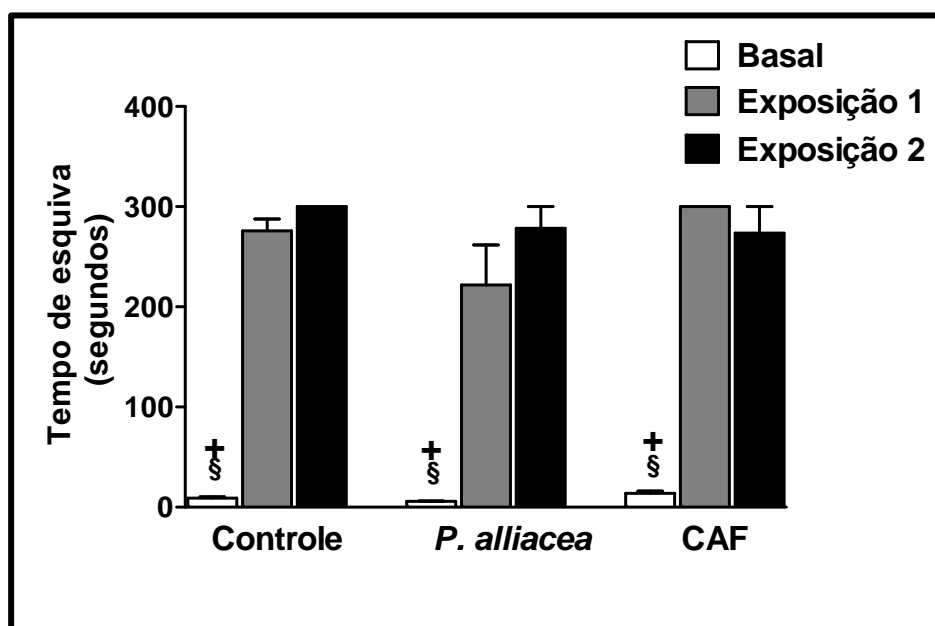
a 4 exposições para a aquisição do critério de esquiva. O grupo CAF necessitou de menos exposições para se manter 300 segundos no braço fechado do que o grupo controle ( $F_{(2,24)} = 3,273$ ;  $p < 0,01$ ).



**Figura 14** - Efeito do EHA de *P. alliacea* L. em ratos, com relação ao número de reexposições no Teste do LTE. Cada barra apresenta a média  $\pm$  e.p.m. 10 animais (machos e fêmeas). \* $p < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo CAF.

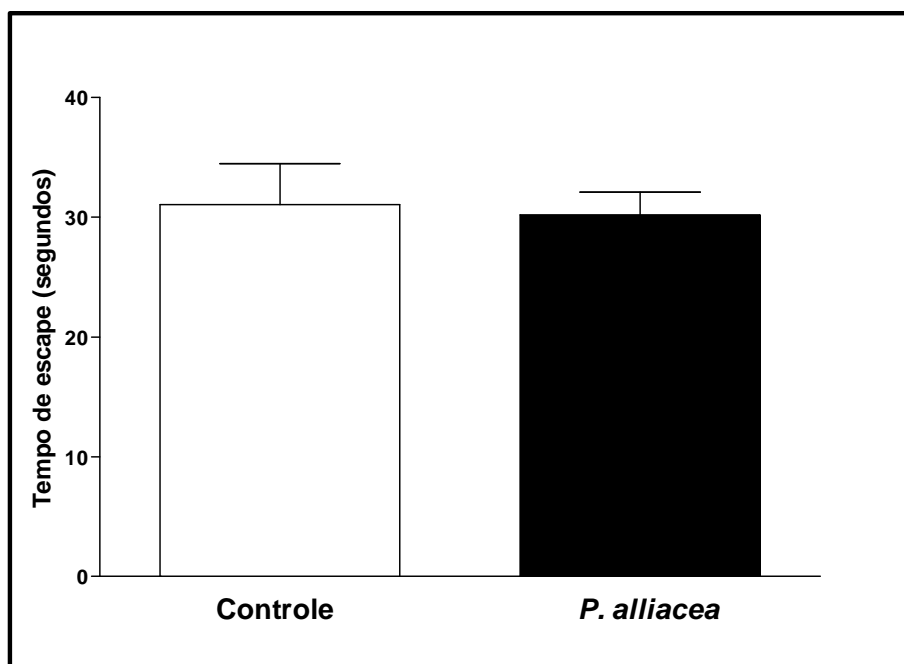
A Figura 15 apresenta uma análise comparativa entre as três primeiras exposições ao teste de acordo com cada grupo tratado. Na primeira exposição ao LTE para avaliação do nível basal do tempo de esquiva, o grupo tratado com EHA de *P. alliacea* L. não apresentou diferença significativa em relação aos controles salino e positivo. Após os 30 segundos de teste para avaliação

do nível basal, os animais foram novamente submetidos ao braço fechado do LTE para avaliação do tempo da segunda exposição (exposição 1). Observou-se que todos os grupos apresentaram aumento significativo do tempo de esquivas, em relação ao tempo de esquivas basal. Na terceira reexposição (exposição 2), após 30 segundos da obtenção do tempo de esquivas 1, todos os grupos mantiveram elevada a latência no braço fechado (Figura 15). Desta forma, observou-se que todos os grupos apresentaram aumento significativo dos tempos de latência nas etapas de exposição 1 e 2 em relação ao seus tempos de esquivas basal.



**Figura 15** - Efeito do EHA de *P. alliacea* L. em ratos, com relação à aquisição de esquivas no LTE. Cada barra representa a média  $\pm$  e.p.m. de 5-10 animais (machos e fêmeas). § $p < 0,05$  representa diferença significativa entre o controle basal com sua respectiva exposição 1. + $p < 0,05$  representa diferença significativa entre o controle basal com sua respectiva exposição 2.

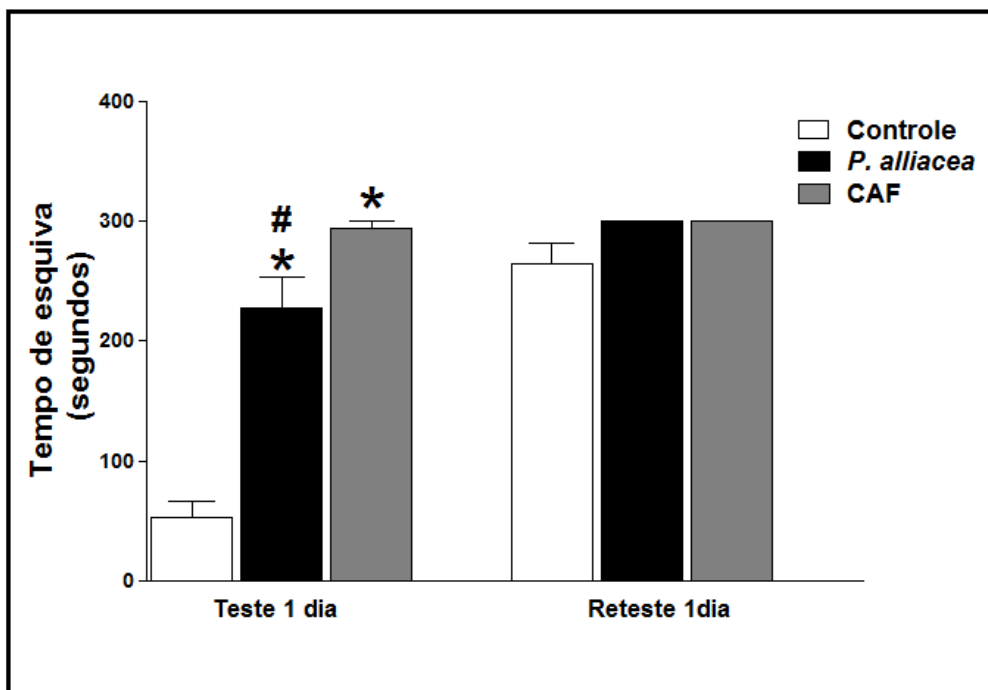
A Figura 16 demonstra o tempo de escape dos animais do braço aberto para o braço fechado do LTE. Observou-se que o grupo de tratamento com o EHA de *P. alliacea* L. não apresentou diferenças significantes no tempo de exploração dos braços abertos em relação ao grupo controle.



**Figura 16** - Efeito do EHA de *P. alliacea* L. em ratos, em relação ao tempo de escape do braço aberto no Teste do LTE. Cada barra apresenta a média  $\pm$  e.p.m. de 10 animais.

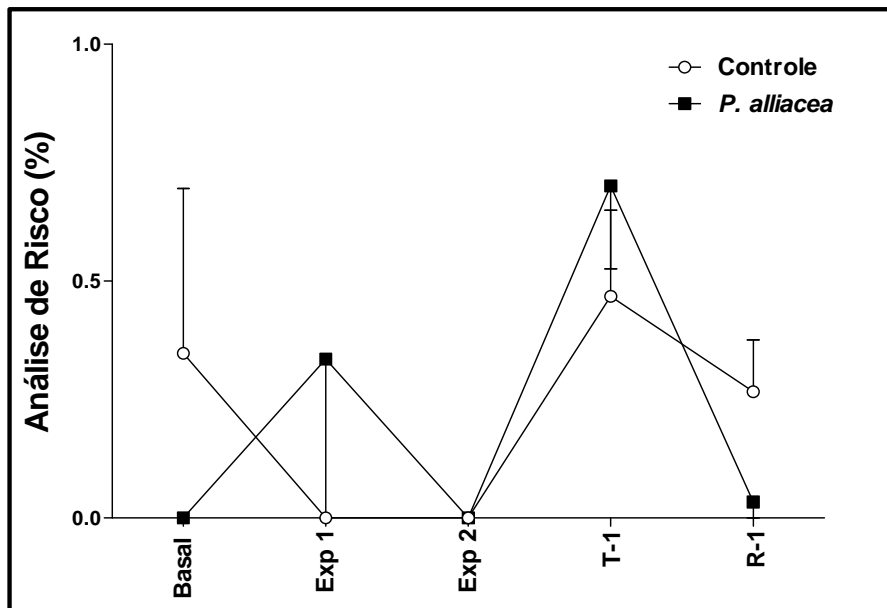
A Figura 17 demonstra o teste e o reteste realizados 24 horas após o treino. No teste realizado um dia após o treino (T1), os grupos *P. alliacea* ( $F_{(2,28)} = 10,12$ ;  $p < 0,001$ ) e CAF ( $F_{(2,28)} = 13,60$ ;  $p < 0,001$ ) apresentaram latência no braço fechado maior que o grupo controle. Porém, este aumento o tempo de esquiva no teste do grupo *P. alliacea* não atingiu os valores do grupo CAF ( $F_{(2,28)} = 3,741$ ;  $p < 0,05$ ). Após 30 segundos, os animais foram submetidos ao

reteste (R1) com os mesmos procedimentos realizados para o teste. Todos os grupos testados elevaram seus tempos de esquiva sem diferenças significantes entre eles.



**Figura 17** - Efeito do EHA de *P. alliacea* L. em ratos, com relação ao tempo de latência no braço fechado no teste e reteste realizados no LTE, 1 dia após o treino, com intervalos de 30 segundos. Cada barra apresenta a média  $\pm$  e.p.m. 10 animais (machos e fêmeas). \* $p < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo CAF.

A Figura 18 apresenta a AR nos estágios de exposição ao LTE: basal, exposição 1 (Exp 1), exposição 2 (Exp 2), Teste de 24 horas (T1) e reteste de 24 horas (R1). Os resultados demonstraram que o comportamento de AR entre os grupos não apresentou alteração significativa.

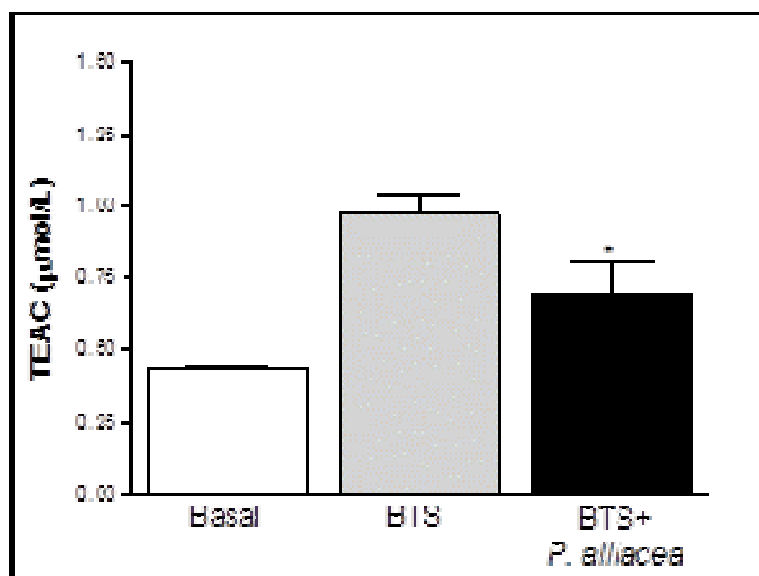


**Figura 18** - Efeitos do EHA de *P. allieacea* L. em ratos, com relação à avaliação de risco (AR). O teste consistiu na avaliação das tentativas dos animais para explorarem os braços abertos do LTE, nos estágios basal, exposição 1 (Exp 1), exposição 2 (Exp 2), teste de 24 horas (T1), reteste de 24 horas (R1). Cada barra apresenta a média  $\pm$  e.p.m. 10 animais (machos e fêmeas).

## 4.2 Bioquímica oxidativa

### 4.2.1 DOSAGEM DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TEAC)

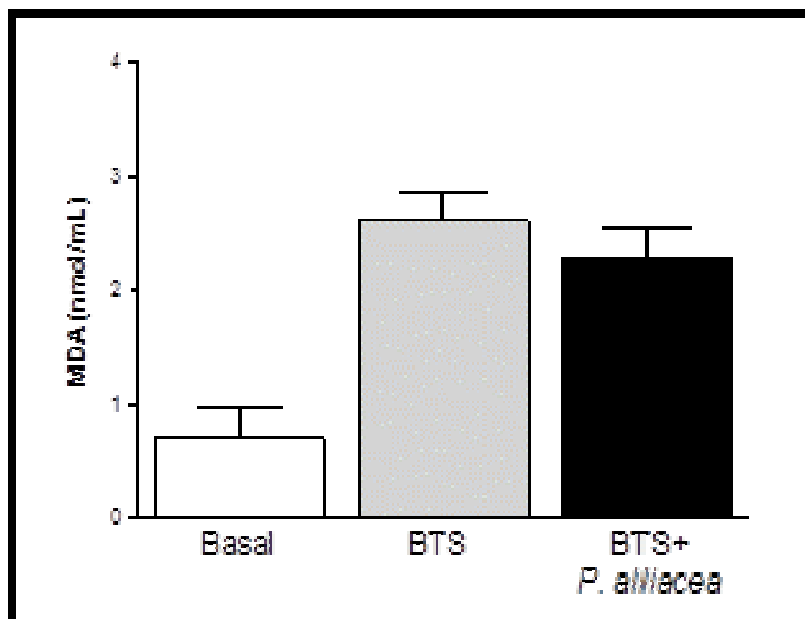
A Figura 19 apresenta os resultados referentes à capacidade antioxidante total (TEAC). Os resultados demonstraram que o extrato de *P. allieacea* L., na dose de 900mg/Kg, apresentou redução estatisticamente significativa, quando comparada aos grupos que passaram por estresse devido aos testes que avaliaram atividade comportamental (BTS) e de controle basal, que é o grupo em que os animais não sofreram nenhum tipo de estresse antes da coleta do material para análise.



**Figura 19** – Efeitos do EHA de *P. alliacea* L. em ratos, com relação à dosagem da capacidade antioxidante total, expressa em µmol/L. Cada barra apresenta a média ± e.p.m. de 5 animais. \* $p < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo BTS.

#### 4.2.2 DOSAGEM DE TBARS

Na Figura 20, são apresentados os resultados referentes à dosagem de TBARS não apontaram diferença estatística quando o extrato foi comparado aos grupos controle basal.

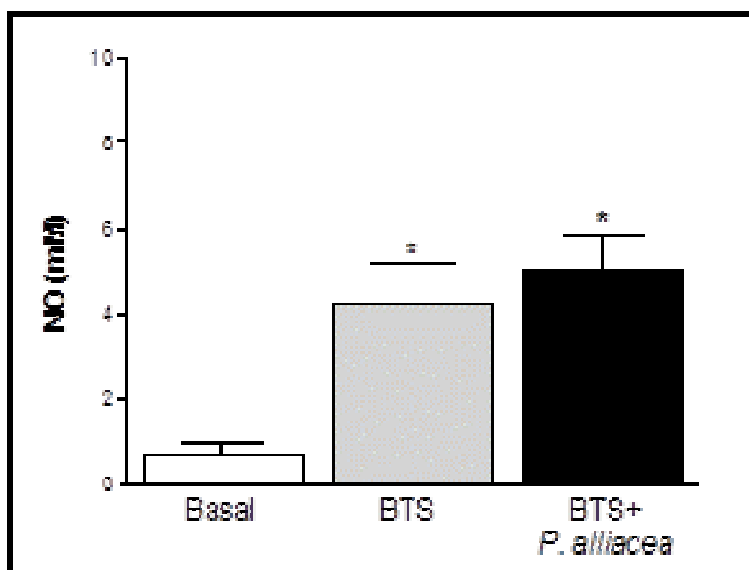


**Figura 20** – Efeitos do EHA de *P. alliacea* L. em ratos, com relação à dosagem de TBARS, expressa em nmol/L. Cada barra apresenta a média  $\pm$  e.p.m. de 5 animais.

#### 4.2.3 DOSAGEM DE NITRITOS

Na Figura 21, são apresentados os resultados de dosagem de nitritos presentes na amostra, onde se pode observar um aumento significativo, quando o grupo tratado com o EHA de *P. alliacea* L. quando comparados ao grupo BTS e controle basal.

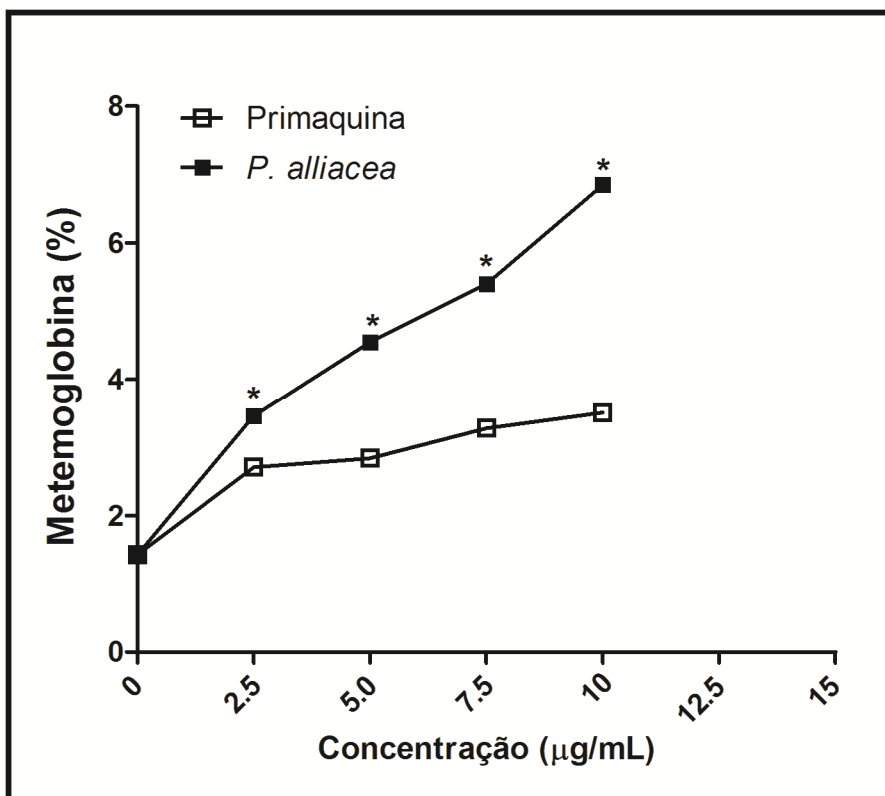




**Figura 21** – Efeitos do EHA de *P. alliacea* L. em ratos, com relação à dosagem de nitritos, expressa em mMol/L. Cada barra apresenta a média  $\pm$  e.p.m. de 5 animais. \* $p < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo basal.

#### 4.2.4 DOSAGEM DE METEMOGLOBINA

Na Figura 22, observam-se os resultados da dosagem de metemoglobina nas amostras, onde há um aumento significativo no percentual de metemoglobina de forma dose-dependente quando o EHA de *P. alliacea* L. foi administrado. Este aumento foi superior aos resultados relacionados à primaquina, que é uma droga conhecidamente efetiva no aumento deste composto no sangue após uso (FERREIRA et al. 2011; SANTANA et al. 2007).



**Figura 22** – Efeitos do EHA de *P. alliacea* L. *in vitro* em plasma de seres humanos, com relação à dosagem de metemoglobina, expressa em percentual. Cada ponto apresenta a média  $\pm$  e.p.m. de percentual de metemoglobina presente. \* $p < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo primaquina.

## *5 DISCUSSÃO*

A *P. alliacea* L. é um herbáceo da família Phytolacaceae, originária da África tropical e há muitos séculos foi integrada à flora natural dos climas úmidos das Américas do Sul e Central. A espécie é conhecida popularmente devido a seus diversos efeitos farmacológicos, tais como analgésica, diurética, abortiva, sedativa, anti-helmíntica, tratamento de doenças sexualmente transmissíveis, como antiespasmódica, entre outras (LOPES-MARTINS et al. 2002; SILVEIRA-FILHO et al. 1996; DE LIMA et al. 1991).

Foi relatado, também, o uso da espécie em cerimônias religiosas realizadas por escravos, que denominavam como “amansa senhor”, em referência a sua atividade sedativa e a sua toxicidade (GARCÍA-GONZÁLES et al. 2006; BENEVIDES et al. 2001; BRAGA, 1992; SOUSA et al. 1990; VON SZCZEPANSKI et al. 1972).

No presente trabalho, foi investigado o efeito da administração aguda do EHA de *P. alliacea* L. com o intuito de avaliar suas propriedades farmacológicas, de acordo com o uso popular, em modelos comportamentais, tais como, campo aberto, labirinto em T elevado e nado forçado, e de estresse oxidativo – capacidade antioxidante total, dosagem de TBARS, dosagem de nitritos e dosagem de metemoglobina, buscando comprovar essas atividades através do EHA da espécie estudada.

O teste do campo aberto é usado como medida de emocionalidade em roedores (ALBONETTI e FARABOLLINI, 1992; BROADHURST, 1978), além de ser utilizado para estudar os efeitos de ansiolíticos e outras classes de drogas sobre o comportamento em um novo ambiente (REX et al. 1996; MONTGOMERY, 1985).

Desta forma, entre os parâmetros avaliados no teste do campo aberto, observa-se a locomoção total e a atividade vertical (*rearing*) que, quando aumentadas, encontram-se relacionadas aos efeitos de drogas estimulantes, e quando diminuídas se relacionam a atividades do tipo sedativas ou prejudiciais a motricidade do animal (PRUT e BELZUNG, 2003). O *rearing* e o *grooming*

(autolimpeza) que, em roedores observados em campo aberto, são os parâmetros comportamentais mais usados para descrever influências da administração de drogas (REX et al. 1996; MONTGOMERY, 1985).

Também são utilizados outros parâmetros, tais como o aumento percentual da exploração na área central em relação à locomoção total, que é usado como qualificação de comportamento relacionado à ansiedade, visto que ratos possuem uma aversão natural a ambientes abertos. 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). Este efeito ocorre porque os ansiolíticos diminuem as respostas de medo geradas quando o animal se encontra em ambiente estranho ou aversivo, provocando o aumento da tendência natural do animal em explorar o novo *habitat* (CRAWLEY, 1985).

Neste teste, verificou-se que a dose de 900mg/Kg do EHA de *P. alliacea* L. obteve um aumento significativo do número de cruzamentos totais dos quadrantes quando comparado com o grupo tratado com solução salina (controle). Estes resultados diferem daqueles relatados por Blainski et al. (2010) que sugere apenas uma tendência no aumento da locomoção quando utilizada a planta total, sendo confirmado apenas o aumento da locomoção total demonstrados nos resultado obtidos com a *P. alliacea* L. utilizando raízes, na mesma concentração utilizada. Porém, Gomes et al. (2008), utilizando frações desta planta demonstrou diminuição da locomoção de animais no campo aberto, nas doses de 100mg/Kg e 200mg/Kg. Perez et al. (1998) relatou que a atividade locomotora espontânea está relacionada com a excitabilidade do SNC, sugerindo atividade estimulante deste sistema.

Na análise da locomoção central, este estudo demonstrou que o tratamento com *P. alliacea*, na dose de 900 mg/Kg aumentou o tempo de exploração central da arena. Blainski et al. (2010) demonstrou o mesmo efeito, utilizando o teste do labirinto em cruz elevado (LCE) administrando partes

totais desta planta em camundongos. Quando estes autores utilizaram as partes aéreas do vegetal, o efeito foi ansiogênico, demonstrando ações antagônicas em partes diferentes do mesmo vegetal.

Atividades farmacológicas da *P. alliacea* L. relacionadas à ansiedade são controversas. Gomes et al. (2008) relatou atividade depressora do SNC das frações de *P. alliacea* L. nas doses de 100mg/Kg e 200mg/Kg, com redução no número de *grooming*, *rearing* e na locomoção.

Além de alterações no comportamento exploratório, a exposição a ambientes desconhecidos resulta em várias mudanças comportamentais como, por exemplo, o aumento da frequência de autolimpeza realizada pelos ratos como forma de diminuir a excitação causada pela situação estressante (DELLIUS, 1967). Portanto, de acordo com os resultados deste trabalho, os parâmetros comportamentais exploratórios relacionados à autolimpeza ficaram preservados com a utilização do extrato.

No teste do nado forçado, o tratamento agudo com EHA de *P. alliacea* L. sugeriu atividade antidepressiva, pois neste modelo houve a diminuição da imobilidade dos animais tratados em relação ao controle. Este resultado foi contrário ao resultado demonstrado por Gomes et al. (2008), que observou aumento do tempo de imobilidade, quando os animais foram tratados com frações de *P. alliacea* L.

Foi validado um teste denominado LTE, que correlaciona medo e ansiedade em ratos, e é uma adaptação do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) pela exclusão de um dos braços fechados do aparato. Este teste é baseado na noção de que os ratos, em seu comportamento inato, apresentam comportamento de medo a ambientes abertos, onde a resposta inibitória é obtida após sucessivos testes contabilizando o tempo em que o mesmo permanece no braço fechado. As memórias de longa e curta-duração podem ser estimadas pelos estágios de teste e reteste de 24h respectivamente. Portanto, o teste do labirinto em T elevado é um método para avaliar memória

e ansiedade sem a variabilidade dos efeitos das drogas no LCE, tornando-o adequado como modelo animal de ansiedade (CALIXTO et al. 2008; SANSON e CAROBREZ, 1999).

De acordo com Conde et al. (2000), o número de reexposições para alcançar a resposta inibitória no LTE sugere uma estreita relação entre a diminuição do número de testes e o aumento da memória. Sendo assim, o aumento do número de reexposições para que o animal permaneça no braço fechado (critério de esquiva) correlaciona-se com a capacidade de aprendizado (SANSON e CAROBREZ, 1999; TAKAHASHI et al. 2005). Portanto, na avaliação do aprendizado, o tratamento com o EHA de *P. alliacea* L. não demonstrou diferenças estatísticas quando comparado ao grupo controle, sugerindo que a droga não interfere no mecanismo deste indicador comportamental e possivelmente, também, na memória de trabalho. Estes resultados podem ser confirmados quando analisados as 3 primeiras exposições ao aparato, demonstrando um aumento no tempo de latência no braço fechado após prévia exposição (basal). Estudos demonstram que a primeira latência do LTE é sempre menor que as subseqüentes tentativas, devido à falta de habituação da exploração nos braços abertos, quando comparado ao braço fechado (GRAEFF et al. 1998).

Na avaliação da memória de longa duração, que consiste na exposição ao braço fechado após 24 horas da aquisição do critério de esquiva, observou-se uma melhora no efeito mnemônico, caracterizado pelo aumento no tempo de esquiva ao braço aberto na fase de teste, quando comparado com o controle. De acordo com Graeff et al. (1998), a aversão aos braços abertos permanece como fator crítico que conduz ao aprendizado da esquiva inibitória no LTE. Izquierdo et al. (1999) afirma que, para que a memória de longa duração seja consolidada, são necessárias algumas horas para que ocorram as modificações bioquímicas necessárias ao processo de consolidação e posterior armazenamento, podendo ser recuperada após alguns dias ou até mesmo meses após o estímulo aversivo. Estes resultados relacionados à

memória confirmam a indicação popular descrita por Lorenzi e Matos (2002), que sugere seu uso para o tratamento de “memória fraca”.

No reteste de 24 horas, 30 segundos após o teste de 24 horas, observou-se que todos os grupos apresentaram aumento da latência no braço fechado. O aumento nas latências na fase de reteste são características deste modelo experimental, onde após a fase de teste há o aumento nos tempos de permanência no braço fechado (TAKAHASHI et al. 2005).

Quanto à avaliação do tempo de escape dos animais do braço aberto para o braço fechado no LTE, observou-se que o grupo de tratamento com o EHA de *P. alliacea* L. não apresentou diferenças significativas no tempo de exploração quando comparado ao grupo controle, sugerindo que a droga não interfere no comportamento tipo pânico.

Graeff et al. (1993) descreveram o LTE como um novo método para investigar comportamentos relacionados às emoções e processos que delimitam aprendizado. Assim, o LTE gera distintas características comportamentais, associadas ao medo e memória, que podem estar relacionadas aos diferentes tipos de desordens psiquiátricas e, então, serem diferentemente afetados por drogas distintas (CONDE et al. 2000). Este modelo experimental animal, portanto, é capaz de separar os comportamentos típicos de ansiedade e de pânico (GRAEFF et al. 1996; ROEMER e ORSILLO, 2007; VIANA et al. 1994).

O comportamento de AR, por sua vez, é interpretado como um comportamento de conflito, produzido por ativações de impulsos exploratórios e de medo, que faz parte do comportamento da defesa natural dos animais (BLANCHARD et al. 1990; BLANCHARD e BLANCHARD, 1989). Este representa um importante parâmetro para se qualificar o comportamento de esquivia, enquanto os ratos encontram-se no braço fechado do LTE (SANSON e CAROBREZ, 1999).



Neste estudo não são demonstradas alterações de AR, nos animais tratados com o EHA de *P. alliacea* L., no qual a função biológica do comportamento de AR, responsável por uma das estratégias de informações de situações de perigo (BLANCHARD et al. 1990), não se encontra alterada em todas as fases avaliadas.

Na espécie em estudo, também foi identificado um composto que possui atividade antioxidante, o S-benzyl-fenilmetanotioissulfinato, derivado dos tioissulfatos. Este composto é o mais derivado tioissulfato mais abundante na espécie e estão presentes em maior concentração na raiz de *P. alliacea* L. (OKADA et al. 2008). Este achado impulsionou a pesquisa no diz que diz respeito à atividade antioxidante, ou seja, no combate ao estresse oxidativo.

O estresse oxidativo, que é assim denominado por representar uma perturbação no balanço do equilíbrio entre molécula oxidante e antioxidante, está relacionado a diversas doenças neurodegenerativas e em diversos graus, tal qual acidente vascular cerebral, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, bem como o envelhecimento normal das células (CALABRESE et al. 2004; ISCHIROPOULOS e BECKMAN, 2003; FLOYD e HENSLEY, 2002; KOUTSILIERI et al. 2002; CALABRESE et al. 2000). Importantes evidências também mostram disfunções neuronais mediadas por radicais livres em transtornos neuropsiquiátricos como esquizofrenia e mania (ANDREAZZA et al. 2004). Salim (2011) e Bouayed et al. (2009), em estudos de revisão, correlacionam o estresse oxidativo com transtornos de ansiedade. Com bases nesses dados, foram realizados quatro testes em bioquímica oxidativa, com o intuito de avaliar a atividade antioxidante do EHA de *P. alliacea* L.

O método utilizado para a avaliação da capacidade antioxidante total foi proposto por Re et al. (1999). Este método se baseia na exposição da amostra, onde se encontram os antioxidantes, a um radical livre (ABTS<sup>®+</sup>) que é produzido em quantidades controladas. A incubação do ABTS<sup>®</sup> (2,2-Azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato]) com a enzima metemoglobina peroxidase

produz o radical  $ABTS^{\oplus}$ , onde, conforme se adiciona a amostra, há uma inibição na produção de radical  $ABTS^{\oplus}$ .

De acordo com os resultados encontrados, o EHA de *P. alliacea* L. reduziu a capacidade antioxidante total quando comparada ao BTS. Este resultado demonstra que o comportamento ansiolítico e estimulante da planta está associado ao efeito pró-oxidante da planta, sugerindo haver outra cascata de sinalização que esteja interferindo com os comportamentos analisados. É importante ressaltar que o decréscimo em TEAC não significa necessariamente que o dano oxidativo ocorreu, pode significar simplesmente que o mecanismo de defesa cumpriu sua função habitual (VASCONCELOS et al. 2007). São necessários estudos complementares que avaliem os níveis de TEAC após administração de *P. alliacea*.

Outro teste realizado foi a dosagem de MDA, que é o principal foco de atenção na peroxidação dos lipídeos, justamente por ser o produto desta peroxidação, pois através dele são mensuradas as espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). O aumento destas espécies está relacionado ao aumento da peroxidação de lipídeos e ao dano oxidativo (DRAPER e HADLEY, 1990). No entanto, a redução do TBARS, pode estar associada com a redução dos radicais livres ou do metabolismo celular na estrutura analisada (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). No estudo não foi encontrada diferença estatisticamente significativa do EHA de *P. alliacea* L. quando comparado aos outros grupos testados.

Realizou-se também a dosagem de nitritos presentes no plasma. Onde os resultados mostraram que o estresse gerado pelo manuseio não gerou aumento significativo nos níveis de NO, quando comparados com o grupo tratado com o extrato e o grupo basal, que não passou por nenhum teste comportamental antes da dosagem.

A presença de NO no SNC pode ocasionar efeitos comportamentais variáveis. Mudanças na sinalização do NO têm sido relatadas, tanto por aumentar quanto por diminuir comportamentos relacionados à ansiedade.

Estudos com injeções sistêmicas de L-NAME, que reduz a produção de NO, aumentou o nível de ansiedade no LCE (CZECH et al. 2003). O tratamento sistêmico administrado de forma aguda (FARIA et al. 1997; GUIMARÃES et al. 1994; VOLKE et al. 1998) e sub-crônica (DUNN et al. 1998) com inibidores da enzima NOS, aumentou o tempo de exploração dos animais aos braços abertos do LCE.

A precisa contribuição da sinalização do NO para o comportamento deve ser obtida utilizando manipulações anatomicamente mais precisas. Quando o LNOARG, outro inibidor da síntese de NO, foi infundido no hipocampo de ratos, foi observada uma diminuição no tempo de exploração dos braços abertos do LCE (MONZÓN et al. 2001). Isso significa que existem na literatura dados contraditórios em relação ao NO e as alterações comportamentais (DEL BEL et al. 2005).

Apesar de ter papel endógeno essencial, diversos estudos já demonstram que o excesso de NO pode estar envolvido na gênese e desenvolvimento de inúmeras patologias (IPPOUSHI, 2009; YUAN et al. 2009; VIRÁG et al. 2003; ROBINSON et al. 2001), como por exemplo, distúrbios neurodegenerativos (SAHA et al. 2006) como a esclerose múltipla (HORSSSEN et al. 2008).

Outro parâmetro relacionado ao estresse oxidativo analisado foi a dosagem de metemoglobina, pelo método proposto por Hegesh et al. (1970), que consiste na leitura da absorbância diferencial entre a quantidade de metemoglobina presente em relação a 100% de oxidação da hemoglobina, a qual é, posteriormente é convertida a cianometemoglobina.

Os resultados encontrados com a realização do método mostraram que a produção de metemoglobina é dose-dependente, pois quanto maior foi a concentração do extrato, maior foi a concentração de metemoglobina no sangue humano, conferindo à *P. alliacea* a capacidade pró-oxidante. Deve-se observar que não há relatos na literatura dos efeitos metemoglobinizante do extrato.

## *6 CONCLUSÃO*

Considerando os resultados obtidos no estudo, se conclui que o EHA de *P. alliacea* L., na dose de 900mg/kg em ratos, possui efeito ansiolítico e estimulante quando submetidos ao teste do campo aberto, atividade antidepressiva quando submetidos ao teste do nado forçado, e atividade mnemônica na memória de longa duração quando submetidos ao LTE. A alteração no comportamento relacionado ao aumento de emocionalidade, memória de curta duração e AR não foi observado no grupo tratado com *P. alliacea*, quando avaliados através do LTE.

Os resultados deste estudo também permitiram concluir que o uso do EHA de *P. alliacea* L. reduziu a capacidade antioxidante total e elevou as taxas de metemoglobina, sugerindo atividade pró-oxidante. Entretanto, estudos complementares são necessários para confirmar a atividade.

Em conjunto, estes resultados demonstraram que a administração em ratos de *P. alliacea* 900mg/Kg, de forma aguda, apresentou efeitos comportamentais, com atividades estimulantes, ansiolíticas, antidepressivas e mnemônicas referentes à memória de longa duração. Todos estes dados comportamentais estiveram associados à uma atividade pró-oxidante do extrato da planta. Estudos complementares são necessários para as possíveis vias de sinalização que possam estar alteradas e que possam explicar essas respostas comportamentais encontradas, assim como investigar os mecanismos envolvidos na atividade tóxica da *P. alliacea*.

## *7 REFERÊNCIAS*

ADAMS, A. M.; GATHERCOLE, S. E. Phonological working memory and speech production in preschool children. **J. Speech Hear. Res.**, Washington, 38: 2, p. 403-414, apr. 1995.

ALBONETTI, M. E.; FARABOLLINI, F. Social stress by repeated defeat: effects of social behavior and emotionality. **Behavior Brain Research**, v. 62, p. 187-193, 1992.

ALBUQUERQUE, F. S.; SILVA, R. H. A amígdala e a tênue fronteira entre memória e emoção. **Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul**; 31(3): 0-0, 2009.

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

ALLOWAY, T. P.; GATHERCOLE, S. E.; WILLIS, C. E.; ADAMS, A. A structural analysis of working memory and related cognitive skills in young children. **J. Experim. Child Psychol.**, Chicago, v. 7, n. 87, p. 85-106, jul. 2004.

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

ANDREAZZA, A. C.; SOARES, D. G.; KEHL, L. F.; LIMA-BORELLA, M. L.; SALVADOR, M. Transtornos neuropsiquiátricos e estresse oxidativo. In: IZQUIERDO, I.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F. **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos**. Porto Alegre: Artmed, p.489-496, 2004.

ANGRINI, M.; LESLIE, J. C.; SHEPARD, R. A. Effects of propranolol, buspirone, reserpine and clordiazepoxide on open-field behavior. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v 59 (2): 387-397, 1998.

AUDI, E. A.; CAMPOS, E. J. V. de; RUFINO, M.; CORTEZ, C. A. G.; BERSANI-AMADO, L.A.; LIRA SOARES, P.R.; PETROVICK & PALAZZO; M. J. C. de. *Petiveria alliacea* L.: Plant Drug Quality Control, Hydroalcoholic Extract Standardization and Pharmacological Assay of Lyophilized Extract. **Acta Farm Bonaerense**, 2008.

BAHLS, S. Depressão: uma breve revisão dos fundamentos biológicos e cognitivos. **InterAÇÃO**, Curitiba, v. 3, p. 49 a 60, jan./dez. 1999.

BARREIROS, A. L. B. S; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Quim. Nova**, Vol. 29 (1), 113-123, 2006.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed; págs. 726-729; 2008.

BENEVIDES, P. J. C.; YOUNG, M. C. M.; GIESBRECHT, A. M.; ROQUE, N. F.; BOLZANI, V. S. Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. **Phytochemistry**, 57: 743–747, 2001.

BLAINSKI, A.; PICCOLO, V.K.; MELLO, A. J. C. P.; OLIVEIRA, R. M. J. Dual effects of crude extracts obtained from *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae) on experimental anxiety in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. 120: 209–214, 2010.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; RODGERS, J.; WEISS, S. M.; The characterization and modeling of antipredator defense behavior. **Neurosci Biobehav Rev**. 14: 463-72 1989.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; RODGERS, J.; WEISS, S. M. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. **Neurosci. Biobehav. Rev**. 14: 463-472, 1990.

BORUCHOVITCH, E. Estratégias de aprendizagem e desempenho escolar: considerações para a prática educacional. **Psicol. Reflex. Crit.** vol.12, n.2, Porto Alegre, 1999.

BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; SOULIMANI, R. Oxidative stress and anxiety. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2: 63-67, 2009.

BRAGA, R. A. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Coleção Mossoroense. 3ª edição, 1992.

BRAVIN A. A.; VASCONCELOS, R. N. S.; DA SILVA, M. M.; PANDOSSIO, J. E. Efeito da administração aguda de imipramina, fluoxetina e bupiriona no comportamento de roedores submetidos ao teste de campo aberto, labirinto em “T” elevado e nado forçado. **Arquivos brasileiros de psiquiatria, neurologia e medicina legal**, vol. 99: (3), jul / ago / set, 2005.

BRITO, I. Ansiedade e depressão na adolescência. **Rev Port Clin Geral**, 27: 208-14. 2011.

BROADHURST, P. L. Drugs and inheritance of behavior: a survey of comparative psychopharmacogenetics. **New York: Plenum Press**, v.2, p. 206, 1978.

CALABRESE, V.; BATES, T. E.; STELLA, A. M. G.. NO Synthase and NO-Dependent Signal Pathways in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders: The Role of Oxidant/Antioxidant Balance. **Neurochemical Research**, Vol. 25, 9/10: 1315–134, 2000.

CALABRESE, V.; BOYD-KIMBALL, D.; SCAPAGNINI, G.; BUTTERFIELD, D. A. Nitric Oxide and Cellular Stress Response in Brain Aging and



Neurodegenerative Disorders: The Role of Vitagenes. **In Vivo**, 18: 245-268, 2004.

CALIXTO, A. V.; DUARTE, F. S.; MORAES C. K. L.; FARIA, M. S.; DE LIMA, T.C.M. Nitric oxide involvement and neural substrates of the conditioned and innate fear as evaluated in the T-maze test in rats. **Behavioural Brain Research**, 189: 341–349, 2008.

CAMARGO, T. M.; ALVES, M. I. F.; OLIVEIRA, S. J.; SHITARA, E. S.; OSHIMA-FRANCO, Y. Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MHb). **RBAC**, vol. 39(2): 95-98, 2007.

CASTILLO, A. R. G. L; RECONDO, R.; ASBAHR, F. R.; MANFRO, G. G. Transtornos de ansiedade. *Rev Bras Psiquiatr*; 22: 20-3, 2000.

CHATTOPADHYAY, P.; COOKE, E.; TOONE, B.; LADER, M. Habituation of Physiological response in anxiety. **Biological Psychiatry**. 15: 711-721, 1980.

CRAWLEY, J. N. Exploratory behavior models of anxiety in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 9: 37-44, 1985.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci**. 23: 238-245, 2002.

DE OLIVEIRA, M. R.; SILVESTRIN, R. B.; MELLO, E.; SOUZA, T.; MOREIRA, J. C. Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: effects of sub-acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. **Neurotoxicology**. 6: 1191–1199, 2007.

DELLIUS, J. D. Displacement activities and arousal. **Nature**, 214; 1250 – 1260, 1967.

DE SOUZA, J. R.; DEMUNER, A. J.; PINHEIRO, J. A.; BREITMAIER, E.; CASSELS, B. K. Dibenzyl trisulphide and trans-N-methyl-proline from *Petiveria alliacea*. **Phytochemistry**, 29: 3653-3655, 1990.

DI MASCIO, P.; BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 6, 1340-1344, 2006.

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

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, 186:421-431, 1990.

FAUSTINO, T. T., ALMEIDA, R. B. DE; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, Out/ 2010.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, 43(1): 61-8, 1997.

FERREIRA, M. E. S.; GOMES, M. S. M.; VIEIRA, J. L. F. Metemoglobinemia em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* em uso oral de primaquina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44 (1):113-115, jan-fev, 2011.

FLOYD, R. A., HENSLEY, K. Oxidative stress in brain aging implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. **Neurobiology of Aging**, 23:795-807, 2002.

GAGNÉ, E.D., YEKOVICH, C.W., & YEKOVICH, F.R. The cognitive psychology of school learning. **New York: Harper Collins**, 1993.

GARCÍA-GONZÁLES, M; MORALES, T. C.; OCAMPO, R.; PAZOS, L. Subchronic and acute preclinic toxicity and some pharmacological effects of the water extract from leaves of *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae). **Rev. Biol. Trop.** (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744) Vol. 54 (4): 1323-1326, Dez, 2006.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system: A study of historical sources from the 16th to 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, 109 (2007) 338–347.

GINDRI, G.; KESKE-SOARES, M.; MOTA, H. B. Memória de trabalho, consciência fonológica e hipótese de escrita. **Revista de Atualização Científica**, Barueri (SP), v. 19, n. 3, p. 313-322, jul.-set. 2007.

GOMES, P. B.; OLIVEIRA, M. M. da S.; NOGUEIRA, C. R. A.; NORONHA, E. C.; CARNEIRO, L. M. V.; BEZERRA, J. N. S.; NETO, M. A.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Study of Antinociceptive Effect of Isolated Fractions from *Petiveria alliacea* L. (tipi) in Mice. **Biol. Pharm. Bull.** 28(1) 42—46, 2005.

GOMES, P. B.; NORONHA, E. C.; MELO, C. T. V. DE; BEZERRA, J. N.S.; NETO, M. A.; LINO, C. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S.B.; SOUSA, F. C. F. Central effects of isolated fractions from the root of *Petiveria alliacea* L. (tipi) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 120: 209–214, 2008.

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, F.G.; BRANDÃO, M.L. **Neurobiologia das doenças mentais**. 5ª ed. São Paulo: Lemos, p.104-105; 159, 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.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**.

3rd ed., New York, Oxford University Press Inc, 1999.

HEGESH, E.; GRUENER, R. N.; COHEN, S.; BOCHKOVSKY, R.; SHUVAL, H. I. A sensitive micromethod for the determination of methemoglobin in blood. **Clin Chim Acta**, 30:679-682, 1970.

HELENE, A. F.; XAVIER, G. F. A construção da atenção a partir da memória. **Rev Bras. Psiquiatr.**; 25(II): 12-20, 2003.

HORSSSEN, J. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. **Free Radical Bio Med**, 45: 1729-1737, 2008.

HOVATTA, I.; TENNANT, R. S.; HELTON, R.; MARR, A. R.; SINGER, O.; REDWINE, J. M.; ELLISON, J. A.; SCHADT, E. E.; VERMA, I. M.; LOCKHART & CARROLEE BARLOW, D. J. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. **Nature**, 438: 662–666, 2005.

IPPOUSHI, K. Prevention of peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions by ellagic acid. **Food Chem**, 112: 185-188, 2009.

ISCHIROPOULOS, H.; BECKMAN, J. S. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association? **J. Clin. Invest.** 111: 163–169, 2003.

IZQUIERDO, I; BARROS, D. M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, L. A.; MEDINA, J. H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, 393: 635-636,1998.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; VIANNA, M. R. M.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, 103: 1–11, 1999.

JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Estresse, depressão e hipocampo. **Rev. Bras. Psiquiatr.**; 25: 46-51, 2003.

KHANUM, F.; RAZACK, S. Anxiety- Herbal Treatment: A Review. **Res Rev Biomed Biotech**, 1(2); 2010.

KIRBY, L.G.; LUCKI, I. The effect of repeated exposure to forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine in the rat. **Stress**, v 2: 251-263, 1998.

KNOWLTON, B. J.; MANGELS, J. A.; SQUIRE, L. R. A neostriatal habit learning system in humans. **Science**, 273: 1353-1354, 1996.

KOHN, H. I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **J Pharmacol Exp Ther**; v. 82: 292-300, 1944.

KOUTSILIERI, E., SCHELLER, C., TRIBL, F., RIEDERER, P. Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress – microglial contribution. **Parkinsonism and Related Disorders**, 8:401-406, 2002.

KUBEC, R.; MUSAH, R. A. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 981–985, 2001.

LAKHAN, S. E.; VIEIRA, K. F. Nutritional and herbal supplements for anxiety and anxiety-related disorders: systematic review. **Nutrition Journal**, v. 9: 42, 2010.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev Bras Ciênc Farm**. V. 37: (3), set./dez., 2001.

LIMA, T. C. M. de; MORATO, G. S.; TAKAHASHI, R. N. Evaluation of antinociceptive effect of *Petiveria alliacea* (Guiné) in animals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 86(2): 153-158, 1991.

LOPES-MARTINS, R. A. B.; PEGORARO, D. H.; WOISKY, R.; PENNA, S. C.; SERTIÉ, J. A. A. The anti-inflammatory and analgesic effects of a crude extract of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). **Phytomedicine**, v. 9: 245–248, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odesa-SP: Instituto Plantarum, 2002.

LORES, R. I.; CIRES, P. M. *Petiveria alliacea* L. (anamu). Study of the hypoglycemic effect. **Medicine interne**; v. 28 (4): 347-52; 1990.

MAIA, C. S. F, LUCENA, G. M. R. S.; CORRÊA, P. B. F.; SERRA, R. B.; MATOS, R. W. M.; MENEZES, F. C.; SANTOS, S. N.; SOUSA, J. B.; COSTA, E. T.; FERREIRA, V. M. M. Interference of ethanol and methylmercury in the developing central nervous system. **Neurotoxicology**, 30: 23-30, 2009.

MANN, V. A.; LLBERMAN, I. Y. Phonological awareness and verbal short-term memory. **J. Lear. Disab.**, Chicago, v. 17, n. 10, p. 592-599, dec. 1984.

MASOOD, A.; NADEEM, A.; MUSTAFA, S. J.; O'DONNELL, J. M. Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, 326: 369–379, 2008.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**. Vol 886 (1-2), Pag 172-189; 2000.

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. **J. Dairy Sci.** 1993; 76:2812–2823.

MONTGOMERY, K.C. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol.** (48): 254-260, 1955.

MORAES, I. G. da S.; PINHEIRO, R. T.; SILVA, R. A. da; HORTA, B. L.; SOUSA, P. L. R.; FARIA, A. D. Prevalência da depressão pós-parto e fatores associados. **Rev Saúde Pública**, 40(1): 65-70, 2006.

MUSAH, R. A.; HE, Q.; KUBEC, R.; JADHAV, A. Studies of a Novel Cysteine Sulfoxide Lyase from *Petiveria alliacea*: The First Heteromeric Alliinase. **Plant Physiology**, Vol. 151, pp. 1304–1316, 2009.

NESSE, R. M. Natural selection and the regulation of defenses a signal detection analysis of the smoke detector principle evolution and human behavior. **Evolution and Human Behavior**. V. 26: 88–105, 2005.

NEVES, P. C. P. das; BAUERMANN, S. G.; BITENCOURT, A. L. V.; SOUZA, P. A. de; MARCHIORETTO, M. S.; BORDIGNON, S. A. de L.; MAUHS, J. Palinoflora do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Phytolaccaceae R. Br. **Rev Bras Paleon**, 9(1):15-26, 2006.

OKADA, Y.; TANAKA, K.; SATO, E.; OKAJIMA, H. Antioxidant activity of the new thiosulfinate derivative, S-benzyl-phenylmethanethiosulfinate, from *Petiveria alliacea* L. **Org. Biomol. Chem.**, 2008, 6, 1097–1102.

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. **Eur J Pharmacol**; 563: 141-148, 2007.

PEIXOTO NETO, P. A. de S.; CAETANO, L. C. **Plantas medicinais: Do popular ao científico**. Ed UFAL, 2005.

PEREZ, R. M.; PEREZ, J. A.; GARCIA, L. M.; SOSSA, H. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, 62, 43–48, 1998.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressants treatment. **Eur. J. Pharmacol**, 47: 379-391, 1978.

PRUT, L., BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol** 463: 3-33, 2003.

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 Med**, v. 26:1231-7, 1999.

REDROBE, J.P., BOURIN, M. Dose-dependent influence of buspirone on the activities of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test. **Psychopharmacology**, 138: 198-206, 1998.

REX, A.; STEPHENS, D. N.; FINK, H. "Anxiolytic" action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. **Pharmacol. Biochem. Behav.** V. 53, p. 1005-1012, 1996.

RIVAS, M. C. Actividad antiinflamatoria y analgésica de *Petiveria alliacea*, TRAMIL III. **La Habana**, Cuba: MINSAP/enda-caribe, p. 318, 1988.

ROBINSON, V. K. Peroxynitrite inhibits inducible (Type 2) nitric oxide synthase in murine lung epithelial cells *in vitro*. **Free Radical Bio Med**, 30: 986-91, 2001.

ROCHA, L. D.; MARANHÃO, L. T.; PREUSSLER, K. H. Organização estrutural do caule e lâmina foliar de *Petiveria alliacea* L., Phytolaccaceae. **Rev. Bras. Farm.**, 87(3): 98-101, 2006.

ROSADO-AGUILAR, J. A.; AGUILAR-CABALLERO, A.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; BORGES-ARGAEZ, R.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; MENDEZ-GONZALEZ, M. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**, 168: 299–303, 2010.

SAHA, R. N. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. **Neurochem Int**, 49:154-163, 2006.

SALIM, S.; SARRAJ, N.; TANEJA, M.; SAHA, K.; TEJADA-SIMON, M. V.; CHUGH, C. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. **Behav. Brain Res.** 208: 545–552, 2010.

SALIM, S.; ASGHAR, M.; CHUGH, G.; TANEJA, M.; XIA, Z.; SAHA, K. Oxidative stress: a potential recipe for anxiety, hypertension and insulin resistance. **Brain Res.** 1359: 178–185, 2010.

SALIM, S. Oxidative Stress in Anxiety: Implications for Pharmacotherapy. **The American Journal of Integrative Medicine**, 1: 11-21, 2011.

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.

SANTANA, M. S.; ROCHA, M. A. F.; ARCANJO, A. R. L.; SARDINHA, J. F. J.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. G. C. Associação de metemoglobinemia e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com malária tratados com primaquina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 40 (5): 533-536, set-out, 2007.

SANTOS, M. R.; SIQUEIRA, M. Consciência fonológica e memória. **R. Fono Atual**, São Paulo, v. 5, n. 20, p. 48-53, jun. 2002.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, 138: 32, 1936.

SHUTOH, F.; OHKI, M.; KITAZAWA, H.; ITOHARA, S.; NAGAO, S. Memory trace of motor learning shifts transsynaptically from cerebellar cortex to nuclei for consolidation. **Neuroscience**, 139: 767-777, 2006.

SILVA, M. T. A. **Modelos comportamentais em neurociências**. 132 f. Tese (Livre-Docência). Instituto de psicologia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

SILVEIRA-FILHO, J.; FRANCO, A.; DA PONTE, J. J. Preliminary investigation on the nematocide potenciality of Guine's Plants (*Petiveria alliacea*). **Fitopatol. Venez.** 9: 14-15, 1996.

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

SIMEON, J. G.; KNOTT, V.J.; DUBOIS, C.; WIGGINS, D.; GERAETS, I.; THATTE, S.; MILLER, W. Buspirone therapy of mixed anxiety disorders in childhood and adolescence – a pilot study. **J. Child. Adolesc. Psychopharmacol.** V. 4: 159-170, 1994.

SKINNER, B. F. **Science and human behaviour**. New York: Macmillan, 1953.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITO, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; 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 de Farmacognosia**, 18(4): 642-654, Out./Dez. 2008.

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.

TAKAHASHI RN, PAMPLONA FA, FERNANDES MS. The cannabinoid antagonist SR 141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neurosci Lett* 2005; 380: 270-275.

TREIT, D., MENARD, J., ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, 44: 463-469, 1993.

URUEÑA, C.; CIFUENTES, C.; CASTAÑEDA, D.; ARANGO, A.; KAUR, P.; ASEA, A.; FIORENTINO, S. *Petiveria alliacea* extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 8: 60, 2008.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F. da; JUNQUEIRA-FRANCO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO JR, A. A. **Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante**. *In*: Simpósio de Nutrição Clínica. 31: 31-44, jan./mar. 1998.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. DE F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M DA S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 5, 1323-1338, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.

VIRÁG, L. E. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. **Toxicol Lett**, 140-141:113-124, 2003.

VON SZCZEPANSKI, C.; ZGORZELAK, P.; HOYER, G. A. Isolation, structural analysis and synthesis of an antimicrobial substance from *Petiveria alliacea* L. **Arzneim-Forsch**. 21 (11): 1975-1976, 1972.

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



YAMADA, T.; YAMADA, Y.; OKANO, Y.; TERASHIMA, T.; YOKOGOSHI, H. Anxiolytic effects of short- and long-term administration of cacao mass on rat elevated T-maze test. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 20: 948–955, 2009.

YUAN, Z. p38MAPK and ERK promote nitric oxide production in cultured human retinal pigmented epithelial cells induced by high concentration glucose. **Nitric Oxide**, 20: 9-15, 2009.

## ANEXO A – Parecer do Comitê 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”.

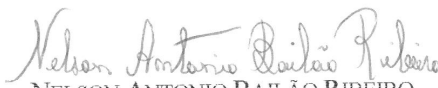
Pesquisador Responsável: MARCIENE ATAIDE DE ANDRADE

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