



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

CÍCERO FRANCISCO BEZERRA FELIPE

ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS
E NEUROBIOQUÍMICOS DA PIPLARTINA, ALCAMIDA
ISOLADA DE *PIPER TUBERCULATUM* JACQ., EM CAMUNDONGOS

FORTALEZA – CE

2009

CÍCERO FRANCISCO BEZERRA FELIPE

ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS
E NEUROBIOQUÍMICOS DA PIPLARTINA, ALCAMIDA
ISOLADA DE *PIPER TUBERCULATUM* JACQ., EM CAMUNDONGOS

Tese de doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará - UFC, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glauce Socorro de Barros Viana

FORTALEZA – CE
2009

F353e Felipe, Cícero Francisco Bezerra

Estudo dos efeitos comportamentais e neurobioquímicos da piplartina, alcalamida isolada de *Piper tuberculatum* Jacq., em camundongos / Cícero Francisco Bezerra Felipe. – Fortaleza, 2009.

188 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2009.

1. Piperaceae 2. Ansiedade 3. Depressão 4. Antioxidantes
I. Viana, Glauce Socorro de Barros (orient.) II. Título

CDD: 583.25

CÍCERO FRANCISCO BEZERRA FELIPE

ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS
E NEUROBIOQUÍMICOS DA PIPLARTINA, ALCAMIDA
ISOLADA DE *PIPER TUBERCULATUM* JACQ., EM CAMUNDONGOS

Tese de doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará - UFC, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana (orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Antônio José Lapa
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Prof. Dr. Francisco Marcos Bezerra da Cunha
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa
Universidade Federal do Ceará – UFC

“Finalmente, irmãos, tudo que é verdadeiro, tudo o que é respeitável, tudo o que é justo, tudo o que é puro, tudo o que é amável, tudo o que é de boa fama, se alguma virtude há, e se algum louvor existe, seja isso que ocupe o vosso pensamento.”

Filipenses 4:8

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida;

Aos meus amados pais, Felipe e Necí, pelo exemplo de amor, honestidade e respeito;

As minhas irmãs, Aparecida Fátima e Virgínia e ao meu sobrinho Arthur, pelo carinho e apoio;

À Professora Dra. Glauce Viana, a quem devo muito de meu aprendizado e pela oportunidade de trabalhar ao seu lado;

Às Professoras Dra. Danielle Silveira e Dra. Nylane Alencar, por terem prontamente aceito fazerem parte da minha banca de qualificação;

Aos Professores Dr. José Lapa, Dr. Reinaldo Nóbrega, Dr. Marcos Cunha e Dra. Cléa Florenço pela gentileza em participar da banca de avaliação do presente trabalho;

Às Profas. Dra. Geanne Matos, Dra. Juvênia Bezerra, Dra. Kalyne Leal e Dra. Silvânia Vasconcelos pela amizade;

Ao Prof. Dr. Edilberto Silveira, por ter gentilmente fornecido o material vegetal estudado neste trabalho;

À direção da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte – FMJ, pelo apoio e parceria fundamentais para a realização desta pesquisa;

Aos amigos da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte – FMJ, Anderson, Beth, Giovanny, Iri e Samya pela valiosa amizade e companheirismo;

Aos amigos da Pós-Graduação e, em especial, ao Flávio Maia e à Lissiana Magna, estimados amigos, a quem tenho grande carinho e admiração;

Aos queridos amigos Carlos Jorge, pela receptividade e hospitalidade; Francisco Campos, pelo exemplo de cavalheirismo e de humanidade; Nildete, por sua doçura e Paula, por seu carisma;

Aos bolsistas Juscélio Filho, Louise Emanuelle, Jeferson Alexandre, Marcelo Paraíba e Abdiel, pela preciosa ajuda e empenho prestados para a realização deste trabalho;

Às técnicas Ivna, Xênia e Vilaní, pela seriedade, zelo e profissionalismo em tudo que fazem;

Ao Laboratório de Neurofarmacologia, pela receptividade junto à excelente equipe de profissionais que fazem desse laboratório um referencial de seriedade, qualidade e compromisso com a pesquisa;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro, sem o qual seria impossível a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e símbolos

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. GENERALIDADES	20
1.2. A FAMÍLIA PIPERACEAE	23
• Histórico.	23
• Aspectos botânicos.	25
• Aspectos químicos.	28
• Aspectos farmacológicos.	34
1.3. PIPER TUBERCULATUM JACQ.	47
2. OBJETIVOS	51
2.1. OBJETIVO GERAL	51
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3. MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1. ANIMAIS	53
3.2. MATERIAL	53
• Atropina.	53
• Diazepam.	53
• Escopolamina.	54
• Flumazenil.	54
• Haloperidol.	54
• Imipramina.	54
• Oxotremorina.	55

• Paroxetina.	55
• Pentilenotetrazol.	55
• Pilocarpina.	55
• Piplartina.	56
• Reserpina.	56
• Tiopental sódico.	57
3.3. MÉTODOS – ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS	59
DA PIPLARTINA:	
• Acinesia induzida pela reserpina.	60
• Campo aberto.	61
• Catalepsia induzida por haloperidol.	62
• Convulsões induzidas por pilocarpina.	63
• Convulsões induzidas por PTZ.	64
• Esquiva-passiva.	65
• Labirinto em cruz elevado.	67
• Nado forçado.	69
• Potencialização do tempo de sono barbitúrico.	71
• Potencialização do tempo de sono etéreo.	72
• <i>Rota Rod.</i>	73
• Tremores induzidos por oxotremorina.	75
3.4. MÉTODOS – ESTUDO DOS EFEITOS NEUROBIOQUÍMICOS	76
DA PIPLARTINA	
• Teste de viabilidade celular.	77
• Atividade anti-oxidante <i>in vitro</i> da piplartina frente o radical DPPH.	80
• Atividade anti-oxidante <i>ex vivo</i> da piplartina frente à peroxidação lipídica induzida por choque térmico.	81
• Dosagem das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico em homogenatos de tecido cerebral.	82
• Dosagem de nitrito em homogenatos de tecido cerebral.	83

• Dosagem de proteínas em homogenatos de tecido cerebral.	84
• Determinação da concentração de monoaminas e de seus metabólitos em homogenatos de corpo estriado de camundongos tratados com piplartina.	86
• Determinação da densidade de receptores muscarínicos (M1 + M2) em homogenatos de corpo estriado de camundongos tratados com piplartina.	90
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	92
4. RESULTADOS	93
4.1. ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA PIPLARTINA	93
• Acinesia induzida pela reserpina.	93
• Campo aberto.	95
• Catalepsia induzida por haloperidol.	97
• Convulsões induzidas por pilocarpina.	99
• Convulsões induzidas por PTZ.	101
• Esquiva-passiva.	104
• Labirinto em cruz elevado.	106
• Nado forçado.	110
• Potencialização do tempo de sono barbitúrico.	112
• Potencialização do tempo de sono etéreo.	114
• <i>Rota Rod</i> .	116
• Tremores induzidos por oxotremorina.	118
4.2. ESTUDO DOS EFEITOS NEUROBIOQUÍMICOS DA PIPLARTINA	120
• Teste de viabilidade celular.	120
• Atividade anti-oxidante <i>in vitro</i> da piplartina frente o radical DPPH.	122

• Atividade anti-oxidante <i>ex vivo</i> da piplartina frente à peroxidação lipídica induzida por choque térmico (dosagem das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico – TBARS em homogenatos de tecido cerebral).	124
• Atividade anti-oxidante <i>ex vivo</i> da piplartina frente à peroxidação lipídica induzida por choque térmico (dosagem de nitrito em homogenatos de tecido cerebral).	126
• Determinação da concentração de monoaminas e de seus metabólitos em homogenatos de corpo estriado de camundongos tratados com piplartina.	128
• Determinação da densidade de receptores muscarínicos (M1 + M2) em homogenatos de corpo estriado de camundongos tratados com piplartina.	130
5. DISCUSSÃO	132
6. CONCLUSÕES	159
7. REFERÊNCIAS	162

Lista de Figuras

1. INTRODUÇÃO

- Figura 1.2.1.** Aspectos botânicos da família Piperaceae. **27**
- Figura 1.2.2.** Estruturas químicas de alguns compostos isolados de espécies de Piper. **29**
- Figura 1.3.1.** Estrutura química da piplartina {5,6-diidro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)]-2(1H)piridinona}. **49**

3. MATERIAL E MÉTODOS

- Figura 3.3.1.** Aparelho da esquiva-passiva. **66**
- Figura 3.3.2.** Labirinto em cruz elevado. **68**
- Figura 3.3.3.** Cilindro do nado forçado. **70**
- Figura 3.3.4.** Aparelho do *rota rod*. **74**
- Figura 3.4.1.** Estruturas químicas do MTT e MTT formazan. **78**
- Figura 3.4.2.** Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE. **89**

4. RESULTADOS

- Figura 4.1.1.** Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o número de cruzamentos (NC) de camundongos pré-tratados com reserpina e submetidos ao campo aberto. **94**
- Figura 4.1.2.** Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o número de cruzamentos (NC), número de *grooming* (NG) e número de *rearing* (NR) de camundongos submetidos ao campo aberto. **96**
- Figura 4.1.3.** Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a catalepsia induzida por haloperidol (5 mg/Kg, i.p.) em camundongos. **98**

- Figura 4.1.4.** Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. **108**
- Figura 4.1.5.** Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o número de entradas dos camundongos nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. **109**
- Figura 4.1.6.** Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência e a duração da perda do reflexo postural (ambos em segundos) de camundongos tratados com tiopental (40 mg/Kg, i.p.). **113**
- Figura 4.1.7.** Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência e a duração da perda do reflexo postural (ambos em segundos) de camundongos introduzidos em uma câmara fechada, saturada com éter etílico. **115**
- Figura 4.1.8.** Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a intensidade dos tremores induzidos por oxotremorina (0,5 mg/Kg, i.p.) em camundongos. **119**
- Figura 4.2.1.** Efeito *in vitro* da piplartina (25, 50 e 100 µg/mL) sobre a concentração das substâncias reativas do ácido tiobarbitúico (TBARS), geradas pela peroxidação lipídica induzida por choque térmico, em homogenatos de tecido cerebral de camundongos. **125**
- Figura 4.2.2.** Efeito *in vitro* da piplartina (25, 50 e 100 µg/mL) sobre a concentração de nitrito, em homogenatos de tecido cerebral de camundongos. **127**

Lista de Tabelas

3. MATERIAL E MÉTODOS

- Tabela 3.2.1.** Relação dos equipamentos utilizados nos ensaios neurobioquímicos. **58**

4. RESULTADOS

- Tabela 4.1.1.** Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência da primeira convulsão e sobre o tempo de morte de camundongos tratados com pilocarpina (350 mg/Kg, i.p.). **100**
- Tabela 4.1.2.** Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência da primeira convulsão e sobre o tempo de morte de camundongos tratados com pentilenotetrazol (80 mg/Kg, i.p.). **103**
- Tabela 4.1.3.** Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência de entrada (em segundos) dos camundongos no compartimento escuro do aparelho da esquiva passiva, em 15 minutos e 24 horas após o tratamento com piplartina. **105**
- Tabela 4.1.4.** Efeito da piplartina (20, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) isolada ou associada à imipramina (6 mg/Kg, i.p.) ou à paroxetina (1,0 mg/Kg, i.p.) sobre o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao teste do nado forçado. **111**
- Tabela 4.1.5.** Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a coordenação motora de camundongos submetidos ao teste do *rota rod*. **117**

- Tabela 4.2.1.** Efeito da piplartina (1, 5, 50 e 100 µg/mL) **121**
isoladamente ou associada à 6-OHDA (10 µg/mL),
sobre concentração de MTT em cultura de células
mesencefálicas de embriões de rata.
- Tabela 4.2.2.** Efeito da piplartina (0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 5 e 50 **123**
µg/mL) frente ao radical DPPH.
- Tabela 4.2.3.** Efeito da piplartina (100 mg/Kg, i.p.) sobre a **129**
concentração de monoaminas e metabólitos em
corpo estriado de camundongos.
- Tabela 4.2.4.** Efeito da piplartina (100 mg/Kg, i.p.) sobre a **131**
densidade de receptores muscarínicos (M1 + M2)
em corpo estriado de camundongos.

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

μL	Microlitro
μM	Micromolar
5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
ACN	Acetonitrila
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATRO	Atropina
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
CONT	Controle
DZP	Diazepam
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucéico
DOPAC	Ácido diidroxifenilacético
EEG	Eletroencefalograma
EPM	Erro padrão da média
FLU	Flumazenil
g	Gramma
GABA	Ácido gama aminobutírico
HALO	Haloperidol
HVA	Ácido homovanílico
IMI	Imipramina
i.p.	Intraperitoneal
IP₃	Trifosfato de inositol
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mmol	Milimol

NA	Noradrenalina
NEBA	Número de entradas nos braços abertos
NC	Número de cruzamentos
NG	Número de <i>grooming</i>
ng	Nanograma
NQ	Número de quedas
NR	Número de <i>rearing</i>
TP	Tempo de permanência
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
PAR	Paroxetina
PILO	Pilocarpina
PIP	Piplartina
PTZ	Pentilenotetrazol
RSA	Radical scavenging activity
TIO	Tiopental

RESUMO

Piper tuberculatum Jacq. (pimenta de macaco) é uma Piperaceae muito usada no Nordeste do Brasil como condimento ou remédio. A pipartina (PIP), uma alcaloide isolada da planta, ainda é pouco estudada e isto incentivou a investigação do seu potencial efeito comportamental e neurobioquímico. Os resultados mostraram que a PIP (50 e 100 mg/Kg, i.p.) aumentou o número de *grooming* e *rearing* de camundongos no campo aberto e reverteu a catalepsia induzida por haloperidol. O composto também apresentou efeito ansiolítico, no labirinto em cruz elevado, que foi revertido pelo flumazenil. A atividade hipnótica da PIP foi observada apenas no teste de potencialização do tempo de sono com éter, mas não no tempo de sono barbitúrico. Apesar desses efeitos, a droga não induziu déficit motor nos animais no teste do *rota rod*. A PIP (50 e 100 mg/Kg, i.p.) apresentou efeito antidepressivo ao reverter a acinesia em animais pré-tratados com reserpina (10 mg/Kg, i.p.) e ao reduzir o tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao nado forçado. Neste teste, o efeito da PIP (20 mg/Kg, i.p.) foi potencializado com a imipramina (6 mg/Kg, i.p.), mas não com a paroxetina (1 mg/Kg, i.p.). Além desses efeitos a PIP (100 mg/Kg, i.p.) aumentou a concentração de NA e DA no corpo estriado dos animais, sugerindo que a droga tenha uma ação antidepressiva e pró-convulsivante semelhante aos ATC's. Este último efeito foi observado com a redução do tempo de morte de camundongos tratados com PTZ (80 mg/Kg, i.p.). A pipartina apresentou ação antimuscarínica apenas sobre os tremores induzidos por oxotremorina (0,5 mg/Kg, i.p.), não sendo observados outros efeitos da alcaloide sobre o sistema colinérgico de animais tratados com pilocarpina (350 mg/Kg, i.p.) ou submetidos ao teste da esquiva-passiva ou sobre a densidade de receptores muscarínicos (M1 + M2). A alcaloide não apresentou ação anti-oxidante frente ao DPPH, mas reduziu as concentrações de TBARS e de nitrito, gerados em homogenatos de cérebro submetidos ao choque térmico. Por fim, a droga (1, 5 e 50 µg/mL) não alterou a viabilidade de células mesencefálicas de ratos e protegeu-as da ação da 6-OHDA (10 µg/mL). Na concentração de 100 µg/mL, a PIP mostrou-se tóxica, isoladamente ou associada a 6-OHDA. Estes resultados mostram que a pipartina possui importantes efeitos sobre o comportamento, que têm como base a interação da droga com alguns sistemas de neurotransmissão e eventos bioquímicos celulares.

Palavras chave: Piperaceae, *Piper tuberculatum*, Pipartina, Ansiedade, Depressão, Antioxidante e Neuroproteção.

ABSTRACT

Piper tuberculatum Jacq. (pimenta de macaco) is a Piperaceae widely used in Northeast Brazil as a spicy or remedy. The few studies found in the literature on Piplartine (PIP), an alcamide isolated from the plant, lead us to evaluate its potential behavioral and neurobiochemical effects. The results showed that PIP (50 e 100 mg/Kg, i.p.) increased the number of grooming and rearing of mice in the open field and reversed the catalepsy induced by haloperidol. The compound also showed an anxyolytic effect, on the elevated plus maze, which was reversed by flumazenil. The hypnotic activity of PIP was registered only in the presence of ether, but not in the presence of tiopental. Despite of these effects, the drug did not induce motor coordination deficit on the animals subjected to the rota rod test. PIP (50 e 100 mg/Kg, i.p.) had an antidepressant effect, by reversing the akinesia of reserpine pre-treated animals and by decreasing the immobility time of mice subjected to the forced swimming test. In this task, the effect of PIP (20 mg/Kg, i.p.) was potentiated by imipramine (6 mg/Kg, i.p.), but not by paroxetine (1 mg/Kg, i.p.). Also, PIP (100 mg/Kg, i.p.) increased the level of NA and DA in striatum of pre-treated animals, suggesting that the drug has an antidepressant and pro-convulsant TCA-like effects. The pro-convulsant effect was noted by the decrease of the death time in PTZ-treated mice. Piplartine showed an antimuscarinic action only on the tremours induced by oxotremorine (0,5 mg/Kg, i.p.) and no other effects of the alcamide were registered on the cholinergic system of the animals treated with pilocarpine (350 mg/Kg, i.p.) or subjected to the passive-avoidance task or on the density of muscarinic (M1 + M2) receptors. PIP was devoided of antioxidant action against DPPH, but the drug decreased the concentration of TBARS and nitrite, generated on brain homogenates subjected to a thermic chock. At last, piplartine (1, 5 and 50 µg/mL) did not alter the viability of mesencephalic rat cells and protected them from the action of 6-OHDA (10 µg/mL). The concentration of 100 µg/mL of PIP was toxic, when isolated or associated to 6-OHDA. All these findings indicate that piplartine has important effects on behavior, as the result of the interaction of the drug with some neurotransmitters systems and cellular biochemical events.

Key Words: Piperaceae, *Piper tuberculatum*, Piplartine, Anxiety, Depression, Antioxidant and neuroprotection.

1.1. GENERALIDADES:

As plantas têm sido utilizadas pelo homem desde tempos imemoriais, para curar doenças ou promover seu alívio; houve tempos em que elas eram a mais importante fonte de medicamentos para o homem. Com o desenvolvimento das indústrias farmacêuticas na década de 40, essa antiga forma de terapêutica começou a perder sua importância, sendo cada vez mais substituída por medicamentos sintéticos, por ser considerada desprovida de fundamento científico (Carlini, 2003).

O uso de plantas com efeitos medicinais remete ao homem pré-histórico. Evidências arqueológicas sugerem que as plantas eram utilizadas por nossos ancestrais com fins terapêuticos (Halberstein, 2005). As grandes civilizações da antiga China, da Índia e do Norte da África deixaram evidências escritas do uso de plantas para o tratamento de uma grande variedade de doenças (Phillipson, 2001).

Na maioria das sociedades antigas, os produtos botânicos eram consumidos com propósitos terapêuticos e psicoterápicos. Os egípcios são considerados o primeiro povo a utilizar produtos naturais que os estudos modernos comprovaram ter propriedades terapêuticas. Eles foram os responsáveis também pela elaboração e relato de substâncias com ação medicinal derivadas de recursos naturais. Os médicos egípcios prescreviam sedativos, analgésicos e medicamentos para tratar doenças do trato gastrointestinal e geniturinário a partir de substâncias derivadas de plantas e animais, sendo administradas de várias formas (uso oral, tópico e inalatório). O uso de plantas medicinais também é relatado na Antiga Grécia, na China, na Índia e no Tibet, assim como nas culturas Asteca e Maia (Halberstein, 2005).

No século XIX o homem começou a isolar princípios ativos de plantas medicinais e um importante marco foi o isolamento da quinina, a partir da *Cinchona* que, anos depois, descobriu-se possuir propriedades antipirética, anti-malária e analgésica. Essas descobertas conduziram ao interesse pelas plantas do “Novo Mundo” e expedições foram feitas em busca de novos medicamentos. Um grande número de compostos isolados antes da Segunda Guerra Mundial tornou-se agentes de uso clínico e muitos ainda são utilizados, a saber: morfina e codeína do látex da papoula do ópio, digoxina da folha da *Digitalis*, atropina e hioscina de espécies de *Solanaceae*. A era dos antibióticos iniciou-se durante aquele período da história, a partir das descobertas de uma série de efeitos antibacterianos de produtos naturais derivados de espécies de *Penicillium*, *Cephalosporium* e *Streptomyces*. Nos anos pós-guerra houve uma relativa escassez de descobertas de novas drogas a partir de plantas, uma vez que o foco de atenção da indústria farmacêutica foi direcionado à pesquisa de compostos sintéticos, tendo em vista o sucesso de substâncias como os beta-bloqueadores (atenolol) e inibidores da enzima conversora da angiotensina (captopril) para o tratamento da hipertensão arterial, beta agonistas (salbutamol) para tratamento da asma e benzodiazepínicos para tratamento dos transtornos de ansiedade. Recentemente, tem ocorrido novo interesse da indústria farmacêutica no isolamento de compostos de fontes naturais, evidenciando-se o isolamento de substâncias como o taxol e o etoposídeo (quimioterápicos) e a artemisina (anti-malário) (Phillipson, 2001).

Estima-se que 25 – 30% de todas as drogas atualmente disponíveis são derivadas de produtos naturais (plantas, microorganismos e animais). Apesar disso, nas últimas décadas,

devido ao avanço da química industrial, a pesquisa em produtos naturais na indústria farmacêutica tem experimentado um leve declínio. Contudo, evidências recentes mostram que, para algumas doenças complexas, os produtos naturais ainda representam uma estimável fonte de produção de novos compostos químicos, uma vez que eles representam estruturas privilegiadas, selecionadas por mecanismos evolutivos em um período de tempo de milhões de anos. Apesar disso, poucas plantas têm sido cientificamente estudadas a fim de se avaliar sua qualidade, eficácia e segurança como agentes terapêuticos (Calixto, 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 65-80% da população de países subdesenvolvidos, em virtude da falta de acesso aos recursos da medicina convencional, utiliza plantas com efeitos medicinais como recurso básico em saúde. Juntos, o Brasil e os demais países da América Latina possuem grande parte da biodiversidade do planeta. O Brasil sozinho possui cerca de 20 – 22% de todas as plantas e micro-organismos existentes. Apesar de possuírem todos esses recursos naturais, esses países não têm utilizado adequadamente sua grande biodiversidade em benefício de seu próprio desenvolvimento (Calixto, 2005).

1.2. A FAMÍLIA PIPERACEAE:

- **Histórico:**

Do ponto de vista etnofarmacológico, as espécies de *Piper* são utilizadas há séculos com as mais diversas finalidades. Na Polinésia e Micronésia, *Piper methysticum* (kava) é usado no tratamento da gonorréia, reumatismo, bronquite, asma, nas dores de cabeça e de estômago e nos estados de ansiedade leve e moderada (principal uso) (Blumenthal et al., 1998). O uso medicinal da kava foi difundido na Europa logo após a descoberta das ilhas do Pacífico Sul. Na Alemanha, os primeiros relatos de preparações a base de kava datam do ano de 1850 (Folmer et al., 2006).

Na medicina indiana *Piper longum* é usado no tratamento da gonorréia, nas cólicas menstruais, nos distúrbios do sono, na tuberculose, nas infecções respiratórias, na gota e na artrite (Sunila & Kuttan, 2005). Além dessas propriedades, Christina et al. (2006) relata ainda o uso de *Piper longum* como agente antimicobacteriano, antialérgico, antiasmático, antitussígeno, antitérmico, hipotensor, hipoglicemiante e vasodilatador coronariano.

Em alguns países da Ásia, as folhas de *Piper betel* são mascaradas, e utilizadas em função dos efeitos carminativo, estimulante e afrodisíaco (Arambewela et al., 2005). Santhakumari et al. (2003) e Wirotasangthong et al. (2008) citam outras aplicações de *Piper betel*, como o uso nos distúrbios gastrointestinais e nas hepatopatias, na prevenção da halitose, na redução da placa bacteriana e na cicatrização de ferimentos. A Tailândia tem uma grande diversidade de espécies de plantas com uso medicinal, dentre as quais se destaca

Piper sarmentosum, uma erva terrestre muito utilizada naquela região por causa das propriedades carminativa, expectorante, analgésica e antitussígena (Riditid et al., 1998). Os componentes bioativos presentes no vegetal são os possíveis responsáveis pelos efeitos antiagregante plaquetário e antimicrobiano (Han et al., 1992).

Na República de São Tomé e Príncipe as folhas de *Piper capense* são usadas na cicatrização de ferimentos (devido a sua propriedade bactericida), na indigestão, flatulência e cólicas intestinais (devido as suas propriedades estomáquica e carminativa); os frutos de *Piper nigrum*, por sua vez, são utilizados como condimentos ou são aplicados externamente como rubefaciente e desinfectante (Martins et al., 1998).

No Brasil, várias espécies de *Piper* são utilizadas, com as mais diferentes indicações. A infusão das folhas ou dos rizomas *Piper regnelli*, por exemplo, é usada na cicatrização de feridas e irritações da pele (Felipe et al., 2005). Já na região amazônica, as folhas de *Piper marginatum* são usadas nas desordens do fígado e nas cólicas (Reigada, 2007) e as raízes de *Piper piscatorum* são usados pela população local como anestésico, empregado na dor de dente. Para tanto, uma pequena porção do rizoma é mascado, produzindo uma sensação de dormência, que dura por dez minutos, acompanhada de intensa salivação (McFerren & Rodriguez, 1997). No estado da Paraíba, *Piper marginatum* é usado como condimento e também como antídoto para picada de cobra (Santos et al., 1998) e *Piper tuberculatum* é usado nos problemas do estômago (da Cunha et al., 2001). No sudeste do Brasil, *Piper aduncum* é utilizado na medicina popular para tratar tracoma, vaginites e dores de estômago (Moreira et al., 1998).

- **Aspectos botânicos:**

A família Piperaceae pertence à superordem Nymphaeiflorae, ordem Piperales e compreende 14 gêneros e aproximadamente 1950 espécies (Santos et al., 2001). Dentre esses, o gênero Piper e Peperomia são mais abundantes, possuindo cerca de 700 e 600 espécies, respectivamente, distribuídas em ambos os hemisférios. Estas espécies encontram-se amplamente distribuídas nas regiões tropical e sub-tropical e, algumas delas, possuem elevado valor comercial e econômico devido as suas propriedades condimentar e medicinal (Reigada, 2007).

De acordo com Guimarães & Giordano (2004), estudos taxonômicos vêm sendo desenvolvidos em Piperaceae no Brasil com base nas pesquisas realizadas por T.G. Yuncker, especialista na família, que estabeleceu as diretrizes para o entendimento desse grupo. O nordeste brasileiro conta com quatro gêneros: *ottonia*, *peperomia*, *piper* e *pothomorphe*, não tendo sido assinalado o gênero *sarchorhachis*, exclusivo das Regiões Sudeste e Sul do Brasil. No Ceará as espécies encontram-se representadas, principalmente, nas superfícies dos relevos residuais cristalinos mais proeminentes, cujas altitudes e a pequena distância do litoral determinam maiores índices pluviométricos, desenvolvendo solos mais profundos e, conseqüentemente, abrigando uma flora diferenciada. Estas regiões, denominadas serras úmidas, como Aratanha, Baturité e Maranguape, são as preferidas por espécies de Peperomia e certas espécies de Piper, que apresentam indivíduos à sombra. Nas encostas da Chapada do Araripe, no sul do Ceará, e no topo do planalto da Ibiapaba e da Serra Grande, também foram registradas espécies de Piperaceae.

Os membros desta família são geralmente ervas eretas ou escandentes, subarbustos, arbustos ou pequenas árvores, terrestres ou epífitas (figura 1a). Folhas estipuladas, alternas, opostas ou verticiladas, sésseis ou pecioladas, inteiras, de consistência e formas as mais diversas, tricomas muito variados, geralmente dotadas de glândulas translúcidas. Flores aclamídeas, diminutas, monoclinas ou diclinas, protegidas por bracteólas pediceladas ou sésseis, sacadogaleadas ou peltadas, dispostas esparsas ou congestas em espigas, formando umbelas ou não, ou dispostas em racemos, axilares ou terminais, opostos ou não às folhas. Estames 2 – 6, livres ou adnatos às paredes do ovário; anteras rimosas, bitecas ou unitecas. Ovário súpero, séssil, geralmente imerso na raque, ou pedicelado, unilocular, uniovulado; óvulo basal, ortótrofo; estilete presente ou ausente, 1 – 4 estigmas variáveis na forma. Fruto do tipo drupa, séssil ou pedicelado. Endosperma escasso, apresentando perisperma; embrião mínimo.



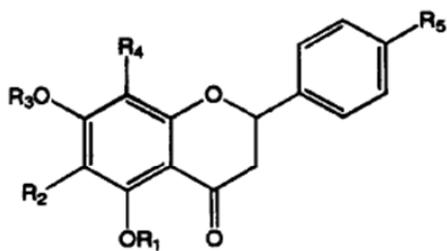
Figura 1.2.1. Aspectos botânicos da família Piperaceae. A figura “a” representa o aspecto morfológico de um membro da família Piperaceae e, em detalhe, na figura “b”, as folhas e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. são evidenciados.

- **Aspectos químicos:**

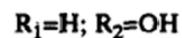
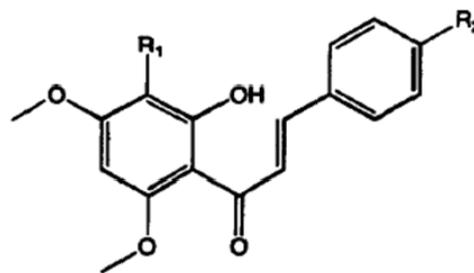
A análise fitoquímica de espécies de Piper demonstrou a ocorrência de vários metabolitos secundários, muitos deles exibindo atividades biológicas (Reigada, 2007). Em uma revisão feita por Pamar et al. (1997), os autores afirmam que já foram identificados mais de 600 constituintes químicos pertencentes a doze classes de compostos bioativos isolados da família Piperaceae, tais como alcanidas, propenilfenóis, lignanos, neolignanos, terpenos, esteróides, kavapironas, piperolidas, chaconas e diidrochalconas, flavonas e flavanonas (figura 2).

Alguns estudos têm identificado amidas com propriedade inseticida, diidrochalconas com atividade citotóxica e antimicrobiana e pironas psicoativas (McFerren & Rodriguez, 1998). Curiosamente, as kavapironas são frequentemente encontradas em *Piper methyisticum* e apresentam seus maiores efeitos sobre o sistema nervoso central (efeito depressor, anticonvulsivante, anestésico e relaxante muscular). Esses compostos são derivados lipofílicos da estrutura aril-etileno-alfapirona, com substituintes prenil ou estiril, na posição 6- e estão presentes em 3 – 20% nos rizomas secos daquela espécie. As principais kavapironas com atividade central são a (+)-kavaína (1,8%), (+)-metisticina (1,2%), desmetoxiangonina (1%), iangonina (1%), diidro-kavaína (0,6%) e todas apresentaram efeito anticonvulsivante (Bilia et al., 2002). No Brasil, estudos feitos com espécies nativas de Piperaceae têm revelado a ocorrência de pironas, lignóides e cromonas, além de várias alcanidas.

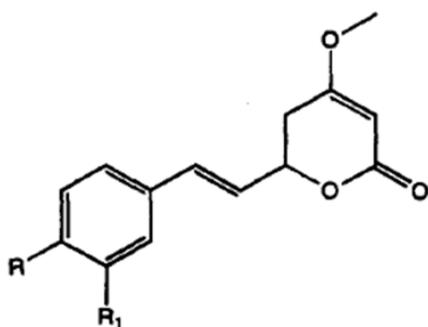
1. INTRODUÇÃO



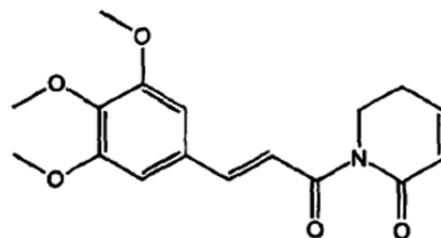
Sakuranetina
(Flavanona)



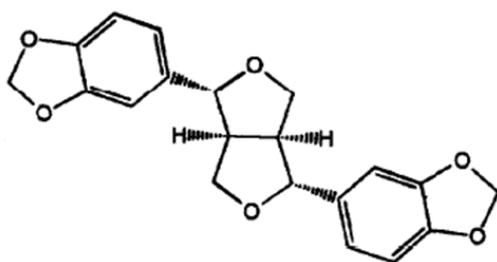
Flavocavaína C
(Diidrochalcona)



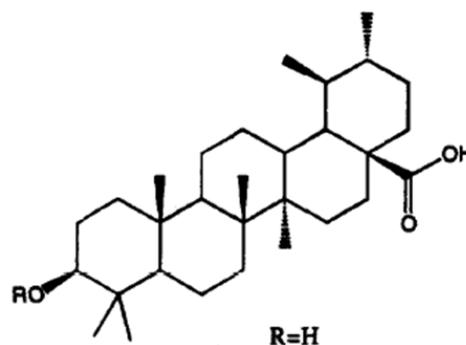
Kavaína
(Kavapirona)



Piplartina
(Alcamida)

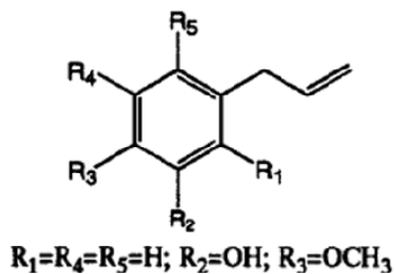


Sesamina
(Lignano)

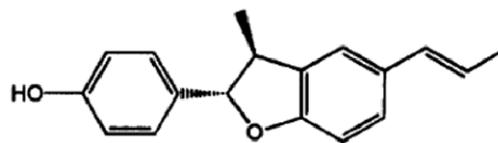


Ácido Ursólico
(Esterol)

Figura 1.2.2. Estruturas químicas de alguns compostos isolados de espécies de Piper. A figura apresenta alguns representantes das principais classes químicas de metabólitos bioativos isolados de espécies de Piper (Pamar et al, 1997).



Chavibetol
(Propenilfenol)



Cronocaroon
(Neolignano)

Figura 1.2.2. (Continuação). Estruturas químicas de alguns compostos isolados de espécies de Piper. A figura apresenta alguns representantes das principais classes químicas de metabólitos bioativos isolados de espécies de Piper (Pamar et al, 1997).

A piperina foi a primeira alcalamida isolada de espécies de *Piper* e alguns estudos mostraram que este composto apresenta efeitos depressor central, antitérmico, analgésico e anti-inflamatório. Além da piperina, a literatura cita outras alcalamidas que também apresentam atividade biológica, como a deidropiperonalina, isolada de *Piper longum* e dotada de efeito vasodilatador em anéis de artérias coronárias (Pamar et al., 1997). A piplartina, também conhecida como piperlongumina, é uma alcalamida presente em muitos membros da família Piperaceae. Um derivado químico deste composto, a 4'-desmetilpiplartina foi isolado em 2000 por Dodoson et al. (2000), a partir das folhas de *Piper cenocladum*. A aduncamida, isolada de *Piper aduncum*, possui atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* e efeito antiproliferativo em alguns tipos de células malignas (Navickiene et al., 2000). A isopiperoleina B e a pipericida são encontradas em *Piper nigrum* (Srinivas & Rao, 1999); no Japão outras alcalamidas também foram isoladas de *Piper nigrum*, a saber: piperbiclobutanamidas A e B (Fujiwara et al., 2001).

A literatura também tem descrito a presença de lignóides e fenóis (que apresentam importante efeito antimicrobiano contra *Aspergillus flavus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* e atividade larvicida contra *Biomphalaria glabrata*) (Navickiene et al., 2000), flavonóides e terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos – componentes químicos comumente encontrados em várias espécies de *Piper*, compreendendo os principais constituintes voláteis presentes nesses vegetais) (Martins et al., 1998; Júnior et al., 1999; Mundina et al., 2001; Santos et al., 2001).

Além dos grupos de compostos mencionados anteriormente, vários alcanos de cadeia lateral longa, alcoóis, ácidos, ésteres e

ciclohexanos oxigenados foram isolados. Os ciclohexanos oxigenados são raramente encontrados na natureza e são providos de atividade antitumoral e antimicrobiana. O primeiro relato da ocorrência desses compostos foi na espécie *Piper hookeri*, que contém pipexida e crotepóxido. Este último composto tem sido relacionado a uma possível atividade antitumoral *in vitro*. Derivados de ácidos benzóicos que foram isolados a partir das folhas de *Piper aduncum* mostraram significativa atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luetus* e *E. coli* (Baldoqui et al., 1999).

Nas florestas úmidas com baixa incidência luminosa no Sudeste do Brasil encontra-se *Piper ilhotzkyanum*, espécie vegetal de onde alguns constituintes químicos (cromonas, sesquiterpenos, ácidos benzóicos prenilados) foram isolados e referidos quanto à atividade inseticida (Moreira et al., 1998a). Sesquiterpenos (E-cariofileno e germacreno D) foram encontrados em abundância em dez espécies de Piperaceae da Floresta Atlântica Brasileira. Entretanto, monoterpenos não-oxigenados (Z)-p-ocimeno, α -pineno e β -pineno também foram encontrados (Morais et al., 2007). Investigações fitoquímicas realizadas em *Piper aduncum* do Sudeste do Brasil mostraram a presença de derivados do ácido benzóico, cromonas, flavonas e flavonóides com atividade antibacteriana e citotóxica (Baldoqui et al., 1999). Apenas um pequeno número de flavonas foi isolado de espécies de *Piper*; muitas delas são compostos tri- ou tetraoxigenados; como exemplos desses compostos tem-se a sakuratenina, isolada de *Piper aduncum*, (Moreira et al., 1998b), a kaplanina (C-glicosilflavona), isolada por Moreira et al. (2000) das folhas de *Piper ilhotzkyanum*, e a sakuranetina, flavona até então isolada de *Piper aduncum*.

Um trabalho realizado com as partes aéreas de *Piper chaba* levou ao isolamento do β -sitosterol (um esteroide também encontrado em *Piper betle*, juntamente com ácido ursólico, ácido-3- β -acetato ursólico, que apresentam efeito antiagregante plaquetário frente aos agonistas ácido araquidônico e ADP). Monoterpenos (cariofileno e β -cariofileno), sesquiterpenos, hidrocarbonetos alifáticos, lignanos e neolignanos (Bhandari et al., 1997) também foram isolados de *Piper chaba*. Os lignanos formam uma família de compostos naturais opticamente ativos. Suas estruturas são formadas por duas unidades C_6, C_3 ligadas ao carbono β da cadeia lateral e os compostos formados são providos de atividades farmacológicas. A sesamina foi o primeiro lignano a ser isolado a partir de *Piper peepuloides* (Pamar et al., 1997). A (-)-grandisina, lignano de núcleo tetrahydrofurano, foi isolada de *Piper solmisianum*. De *Piper cubeba* já foram isolados vinte e quatro lignanos (Usia et al., 2005), alguns dos quais mostraram atividade inibitória sobre as enzimas do citocromo P450, que estão envolvidas no metabolismo da maioria das drogas. Os neolignanos representam uma classe de compostos com importante atividade inseticida, antifúngica e anti-PAF. Vários compostos dessa classe têm sido isolados de espécies de Piper (Benevides et al., 1999), a exemplo do conocarpan, constituinte majoritário de *Piper regnelli* (Felipe et al., 2006).

- **Aspectos farmacológicos:**

A família Piperaceae tem revelado inúmeros representantes com efeitos farmacológicos diversos, comprovados através de vários estudos científicos. Os compostos isolados de *Piper philippinum*, a saber, (-)-3'-4'-O-O-demetileinocinina e 3,4-metilenodioxicinamaldeído foram testados quanto à atividade anti-agregante no trabalho de Chen et al. (2007). Neste trabalho, os compostos citados inibiram, quase que completamente, o efeito do ácido araquidônico, revelando assim, um potente efeito anti-agregante plaquetário, semelhante aquele observado com a aspirina. O grupo de Chen et al. (2007), em outro trabalho, testou o efeito anti-agregante das taiwanamidas A, B e C, da 1-cinamoilpirrolidina e 1-(m-metoxicinamoil)-pirrolidina em uma suspensão de plaquetas. Os resultados deste trabalho mostraram que as taiwanamidas A e B, 1-cinamoilpirrolidina e 1-(m-metoxicinamoil)-pirrolidina inibiram completamente o efeito do ácido araquidônico e destes quatro compostos, a taiwanamida B e 1-(m-metoxicinamoil)-pirrolidina foram os mais potentes.

A piperlongumina, uma alcalamida isolada de *Piper longum*, teve efeito anti-agregante plaquetário, como relataram Iwashita et al. (2007). Neste trabalho, os autores afirmaram que a alcalamida exerce seu efeito ao antagonizar a ligação do agonista do receptor de Tromboxano A₂, o composto U46619, de maneira dose-dependente. Park et al. (2007) observaram os mesmos efeitos com a piperlongumina em seu trabalho. Os autores avaliaram, também, o efeito de outras alcalamidas isoladas de *Piper longum* sobre a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico, colágeno, PAF e trombina. A piperina, pipernonalina e piperoctadecalidina apresentaram efeito anti-agregante nas concentrações de 30, 150, 300

μM , em plaquetas em suspensão, na presença de cada um dos agonistas citados, exceto a trombina.

Piper longum também apresenta efeito inibitório sobre a formação de novos vasos. Para testar a ação anti-angiogênica, um extrato etanólico de *Piper longum* (10 mg/Kg, i.p., por 5 dias) foi estudado em células de melanoma B16F-10 injetadas em camundongos C57BL/6. Neste trabalho, Sunila et al. (2005) observaram que o tratamento com o extrato etanólico de *Piper longum* reduziu o número de capilares formados nas células de melanoma e a proliferação de células endoteliais, possivelmente pela redução da expressão do RNAm para o fator de crescimento do endotélio vascular – VEGF. O efeito anti-angiogênico foi avaliado também *ex vivo* em anéis de aorta de ratos, tratados com VEGF (20 ng/mL), na presença ou não do extrato etanólico de *Piper longum* (10 $\mu\text{g/mL}$). Neste ensaio, o tratamento com o extrato reduziu o brotamento de novos vasos nos anéis de aorta, induzido por VEGF.

A inibição da indução das moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1 e selectina E) via $\text{TNF}\alpha$, também foi estudado por Singh et al. (2008). Os autores testaram o extrato clorofórmico (2,5 – 17,5 $\mu\text{g/mL}$) de *Piper longum* em cultura primária de células endoteliais de cordão umbilical, na presença de $\text{TNF}\alpha$ e neutrófilos. Os autores observaram que o extrato clorofórmico inibiu a adesão dos neutrófilos às células endoteliais, em concentrações que variaram de 5 a 17,5 $\mu\text{g/mL}$. Este efeito foi seguido da redução da concentração das moléculas de adesão celular, cujo efeito máximo foi observado na concentração de 17,5 $\mu\text{g/mL}$ do extrato clorofórmico de *Piper longum*, sugerindo que estes fenômenos são, em parte, mediados pelo efeito anti- $\text{TNF}\alpha$ do material vegetal. Kumar et al. (2007) desenvolveram um estudo

semelhante para avaliar o efeito da piperina sobre a indução das moléculas de adesão celular (VCAM-1 e selectina E) via TNF α . A piperina, de maneira dose-dependente (10 – 60 $\mu\text{g/mL}$), inibiu a adesão de neutrófilos a células endoteliais em cultura, e, em paralelo, a alcamida reduziu a expressão das moléculas de adesão celular VCAM-1 e selectina E, nas concentrações máximas de 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (kumar et al., 2007).

O extrato etanólico de *Piper longum* (10 mg/Kg, i.p., por 5 dias) foi avaliado sobre algumas citocinas produzidas durante a angiogênese. A formação de novos vasos foi induzida em células de melanoma B16F-10 injetadas em camundongos C57BL/6. Os resultados deste trabalho mostraram que o tratamento com o extrato etanólico reduziu os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF α) produzidas durante a angiogênese; fenômeno que não foi observado no grupo de animais controle (Sunila et al., 2005).

A asma é uma doença relacionada às vias aéreas que possui um importante componente inflamatório. Partindo dessa premissa, Wirotasangthong et al. (2008) investigaram o efeito do extrato etanólico das folhas de *Piper betle* sobre mediadores alérgicos produzidos por mastócitos (histamina e fator estimulador de colônia de macrófagos – GM-CSF) e pelas células epiteliais pulmonares (eotaxina e interleucina-8 – IL-8) cultivadas *in vitro*, na presença ou não do extrato. Em cada tipo celular foram adicionados, respectivamente, IgE (30 ng/mL) e TNF α (100 $\mu\text{g/mL}$), como indutores da resposta alérgica/inflamatória e os autores observaram que o extrato etanólico das folhas de *Piper betle* diminuiu a hipersecreção de histamina, GM-CSF, eotaxina e IL-8, sugerindo que *Piper betle* pode servir como uma nova alternativa para o controle de doenças mediadas por citocinas.

O extrato metanólico dos frutos de *Piper cubeba* foi avaliado quanto à atividade anti-inflamatória (Choi & Hwang, 2003). Para tal finalidade, o extrato (200 mg/Kg, v.o.) foi administrado em camundongos que foram, posteriormente, submetidos a testes específicos para inflamação aguda e sub-crônica. Nos testes que avaliam o processo agudo da inflamação, a administração do extrato metanólico dos frutos de *Piper cubeba* reduziu, significativamente, o edema em 70 e 45 %, nos testes do edema induzido por carragenina e edema de orelha induzido por ácido araquidônico, respectivamente. Os autores avaliaram, também, o efeito do material vegetal sobre a atividade sérica das enzimas TGO e TGP, na artrite induzida por formaldeído. Neste teste, entretanto, o extrato de *Piper cubeba* não reduziu os parâmetros citados, indicando que o efeito farmacológico do extrato só é observado em condições inflamatórias agudas.

Stohr et al. (2001) comprovaram o efeito inibitório de 20 componentes isolados de 19 espécies de Piper, sobre a atividade das enzimas ciclooxigenase I e 5-lipoxigenase. A análise cromatográfica revelou que a maioria dos componentes isolados eram amidas alifáticas insaturadas. Muitos destes compostos apresentaram considerável efeito inibitório em, pelo menos, uma das enzimas estudadas. Os melhores resultados sobre a inibição da formação de leucotrienos foram obtidos com o extrato de *Piper kadsura*, enquanto que o extrato de *Piper boehmeriifolium* foi eficaz em reduzir a síntese de prostaglandinas, ao inibir a atividade da enzima ciclooxigenase I. Wu et al. (2002) mostraram que os princípios ativos isolados de *Piper methysticum* (diidro kavaina, desmetoxiangonina, flavocavaina, cavaina, diidrometisticina, iangonina e metisticina) também têm efeito inibitório sobre as enzimas ciclooxigenase I e II. Para tanto, foram

usadas enzimas extraídas de vesícula seminal, na presença de oxigênio e ácido araquidônico como substrato enzimático; naproxeno, ibuprofeno e aspirina foram os controles positivos do ensaio. Dos sete componentes extraídos do rizoma de *Piper methysticum*, a diidrocaína e a iangonina mostraram o maior efeito inibitório sobre as ciclooxigenases I e II, respectivamente, na concentração de 100 µg/mL.

Outro estudo *in vitro* (Folmer et al., 2006) avaliou o efeito anti-inflamatório de componentes ativos da raiz de *Piper methysticum* (kava – kavaina 400 µg/mL, metisticina 400 µg/mL, diidrocaína 400 µg/mL, diidrometisticina 400 µg/mL, flavocaína A 100 µg/mL, flavocaína B 400 µg/mL e iangonina 400 µg/mL). O estudo usou culturas de células leucêmicas (K562, Jurkat e DSMZ), tratadas ou não com os compostos derivados de kava ora citados. Ensaio de viabilidade celular e biologia molecular foram realizados e mostraram que os compostos não interferiram com a viabilidade celular sendo, portanto, desprovidos de efeitos tóxicos; a técnica de *western blot* mostrou também que aqueles compostos inibiram a atividade transcricional para TNF α , que, por sua vez, inibe a ativação de uma via sinalizadora comum do processo inflamatório, mediada por NF- κ B. Outros trabalhos (Matsuda et al., 2008; Valdivia et al., 2008) também foram desenvolvidos, comprovando o efeito anti- TNF α /NF- κ B de vários compostos isolados de Piper.

Em 2002 Rex et al. comprovaram o efeito ansiolítico do extrato etanólico dos rizomas de *Piper methysticum*, planta tradicionalmente usada no Pacífico Sul por suas propriedades tranqüilizante e calmante. Neste trabalho, os animais receberam uma única dose do extrato (120 – 240 mg/Kg, via oral) ou de diazepam (15 mg/Kg, via oral) e foram

submetidos ao labirinto em cruz elevado, aparelho validado para avaliar efeito ansiolítico do tipo benzodiazepínico. O extrato produziu um efeito ansiolítico semelhante aquele observado com o diazepam, manifesto pela mudança do comportamento natural do animal (medo e ansiedade) ao ser submetido ao labirinto em forma de cruz, elevado a 64 cm do solo.

A despeito do efeito ansiolítico, *Piper methysticum* não causa déficit de importantes habilidades mentais (cognição); a amnésia anterógrada é um efeito comumente observado com o uso de compostos ansiolíticos da classe dos benzodiazepínicos. Além disso, *Piper methysticum* é bem tolerado, não desenvolvendo dependência nas dosagens usuais e os efeitos tóxicos podem ocorrer apenas em doses altas, quando tomadas por longos períodos (a hepatotoxicidade foi um efeito tóxico observado com o uso das kavalactonas) (Bilia et al., 2002).

Os efeitos da (\pm)-kavaina sobre a neurotransmissão (canais iônicos dependentes de voltagem em fatias de hipocampo de cobaia) foram o foco do trabalho de Grunze et al. (2001). Os autores mostraram que a kavaina apresenta um fraco efeito antagonista sobre os canais de Na^+ , o que parece contribuir, em parte, para o efeito anticonvulsivante comumente relacionado ao composto. Contrariamente, a (\pm)-kavaina tem um importante efeito antagonista sobre os canais de cálcio tipo L e, ao mesmo tempo, o composto age como um modulador positivo para o aumento da condutância do K^+ através do seu canal iônico. Este mesmo efeito já havia sido observado dois anos antes por Schirmacher et al., (1999), que avaliaram o efeito da (\pm)-kavaina sobre a ativação de canais de Na^+ e

Ca²⁺, voltagem-dependentes, em cultura de células de gânglios da raiz dorsal de ratos recém-nascidos.

Piper methysticum também apresentou efeito anti-oxidante, no ensaio com DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) realizado por Wu et al. (2002). Os autores isolaram sete compostos da raiz de *Piper methysticum* (diidro kavaina, desmetoxiangonina, flavocavaina, cavaina, diidrometisticina, iangonina e metisticina) e avaliaram a atividade anti-oxidante de cada uma delas. Das sete substâncias citadas, apenas iangonina e metisticina, ambos na concentração de 2,5 mg/mL, apresentaram efeito anti-oxidante; as vitaminas E e C foram usadas como controle positivo da reação e apresentaram efeito anti-oxidante, nas concentrações de 25 e 50 µM, respectivamente. Usando a mesma metodologia, outro trabalho avaliou o potencial anti-oxidante de compostos fenólicos extraídos dos frutos de *Piper nigrum* (3,4-dihidroxifenil-etanol e 3,4-diidroxi-6-(N-etilamino)-benzamida (Chatterjee et al., 2007). O glicosídeo 3,4-dihidroxifenil-etanol (0,1 ng/mL) apresentou importante efeito anti-oxidante frente ao radical DPPH; o mesmo não foi observado com o composto 3,4-diidroxi-6-(N-etilamino)-benzamida. Em contraste, os compostos citados não foram eficazes em impedir a oxidação do β-caroteno, quando na presença de espécies reativas de oxigênio.

Yamaguchi et al, (2006) testaram *in vitro* o efeito anti-oxidante de compostos isolados dos frutos de *Piper crassinervium* (hidroquinonas preniladas e ácidos hidroxibenzóicos prenilados) frente aos radicais DPPH e ABAP (2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano). No ensaio com DPPH, as hidroquinonas preniladas (40 µM) apresentaram efeito anti-oxidante superior aquele dos ácidos benzóicos; o mesmo efeito foi observado no ensaio com ABAP, utilizando-se uma

concentração de hidroquinonas de 20 μM . A inibição da peroxidação lipídica foi avaliada também em lipossomos de fosfatidilcolina como modelo de membrana celular, frente à ação oxidativa do complexo Fe^{2+} /ácido ascórbico. Neste modelo, a ação anti-oxidante dos derivados hidroquinônicos foi, mais uma vez, superior à ação dos ácidos hidroxibenzóicos ao diminuir a formação das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, produtos comuns da peroxidação de lipídeos de membrana.

Piper betel tem sido muito estudado por sua propriedade anti-oxidante (Dasgupta, 2004). Battacharya et al. (2007) investigaram o efeito anti-oxidante do extrato etanólico de *Piper betel* (50 – 100 $\mu\text{g/mL}$) sobre uma suspensão de mitocôndrias de fígado de ratos, submetidas à fotossensibilização com lâmpada de tungstênio (100 W). A peroxidação lipídica induzida neste processo e o efeito anti-oxidante do material vegetal foram determinados pela produção das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, dienos conjugados e hidroperóxidos lipídicos. Todos esses parâmetros apresentaram-se significativamente diminuídos na presença de concentrações diferentes (50, 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$) do extrato. Observou-se também que a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ do extrato foi eficaz em aumentar os níveis da enzima anti-oxidante superóxido dismutase (SOD) e reduzir a peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} /ácido ascórbico na suspensão de mitocôndrias irradiadas. Tais efeitos não foram observados nos grupos controle. Através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi possível identificar os constituintes majoritários do extrato etanólico das folhas de *Piper betel*. Tal análise revelou a presença dos compostos fenólicos cavibetol e 4-alilpirocatecol, os possíveis responsáveis pelo efeito anti-oxidante do extrato. Mula et al. (2008) chegaram a mesma conclusão ao avaliarem também o efeito anti-

oxidante dos compostos ora citados, sugerindo que os mesmos são importantes agentes protetores contra danos a sistemas biológicos, indizados pela geração de espécies reativas de oxigênio.

O extrato alcoólico dos frutos de *Piper longum* e seu componente majoritário, a piperina, foram testados e avaliados quanto aos seus efeitos hematológicos (Sunila & Kuttan, 2005). Camundongos Balb/c foram tratados, via intraperitoneal, durante cinco dias com o extrato alcoólico dos frutos de *Piper longum* (10 mg/dose/animal) e piperina (1,14 mg/dose/animal) e, durante um mês, a cada três dias, amostras foram coletadas para a análise de alguns parâmetros hematológicos, a saber: hematócrito, contagem diferencial de leucócitos, concentração de hemoglobina, anticorpos totais e celularidade de medula óssea. Como efeitos hematológicos, os autores observaram que o tratamento com o extrato hidroalcoólico e a piperina aumentaram o número total de células na medula óssea e de leucócitos no sangue, sem promover mudanças apreciáveis na contagem diferencial, concentração de hemoglobina e hematócrito. O tratamento promoveu, também, um aumento no título de anticorpos totais, sugerindo que o material vegetal, além de estimular o sistema imune, também apresentou importante efeito sobre a proliferação de células indiferenciadas da medula óssea.

O efeito hepatoprotetor do extrato etanólico (50 e 100 mg/Kg, v.o.) dos frutos de *Piper longum* foi estudado em ratos Wistar submetidos ao tratamento com CCl₄ (1 mL/Kg, v.o., duas vezes por semana, durante 28 dias). Neste estudo, a extensão da fibrose induzida por CCl₄ e o efeito do extrato sobre essa lesão foram avaliados de acordo com a atividade sérica das enzimas alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), fosfatase alcalina

(FAL) e a concentração de bilirrubina total no soro. O tratamento com o extrato etanólico (50 e 100 mg/Kg) dos frutos de *Piper longum* reduziu significativamente (e dose-dependente) a atividade sérica das enzimas hepáticas citadas e a concentração plasmática de bilirrubina total. O trabalho investigou também o efeito do tratamento com o extrato etanólico sobre a concentração hepática de hidroxiprolina (HP – marcador da fibrose hepática). Neste grupo de animais, o conteúdo hepático de HP encontrava-se reduzido em relação ao grupo que recebeu apenas CCl₄. Esses achados demonstraram que o extrato etanólico dos frutos *Piper longum* possui importante atividade hepatoprotetora e anti-fibrótica no modelo de hepatotoxicidade induzida por CCl₄ (Christina et al., 2006).

Sunila & Kuttan (2005) observaram que o extrato etanólico dos frutos de *Piper longum* apresentou efeito radioprotetor em camundongos submetidos à radiação (Co60 – 6 Gy/animal). A contagem das células brancas nos camundongos controle irradiados com Co60 foi drasticamente reduzida a 1.900 células/mm³ no terceiro dia de radiação; em contrapartida, a contagem dos leucócitos dos animais irradiados tratados com o extrato etanólico (400 mg/Kg, i.p.) foi de 2.783 células/mm³. O número total de células da medula óssea aumentou nos animais irradiados tratados 16,7 x 10⁶ células/fêmur quando comparado ao grupo controle, exposto à radiação (12,2 x 10⁶ células/fêmur). O extrato etanólico dos frutos de *Piper longum* reduziu os níveis de glutatona piruvato transaminase (GPT), fosfatase alcalina (FAL) e a peroxidação lipídica no fígado e soro dos animais irradiados tratados. A administração do extrato também aumentou os níveis de glutatona reduzida. Neste trabalho os autores afirmaram que o mecanismo através do qual o extrato etanólico dos frutos de *Piper longum* promove os efeitos citoprotetores ainda é desconhecido, mas

os resultados sugerem uma possível utilidade desse material como agente protetor na radioterapia.

O trabalho de Chatterjee et al. (2007) utilizou a técnica de eletroforese para mostrar que compostos fenólicos (glicosídeo 3,4-dihidroxifenil etanol e 3,4-diidroxi-6-(N-etilamino)-benzamida) extraídos dos frutos de *Piper nigrum* apresentaram efeito radioprotetor quando adicionados em uma solução contendo plasmídeos de DNA submetidos à radiação γ (50 kGy).

O efeito hipolipemiante de seis alcaloides isoladas dos frutos de *Piper nigrum* foi avaliado no trabalho de Rho et al. (2007). Os compostos isolados desta espécie, tais como a piperacina, retrofractamida, piperacina, pelitorina, deidroretrofractamida e deidropiperonalina foram incubadas em um meio contendo microsomas de fígado de rato, na presença de colesterol. Este ensaio avaliou o efeito das alcaloides de *Piper nigrum* sobre a atividade da enzima ACAT (colesterol aciltransferase – enzima responsável pela esterificação do colesterol hepático). Como resultado, foi observado que deidroretrofractamida, deidropiperonalina, piperacina, retrofractamida, piperacina e pelitorina reduziram a atividade da ACAT, nas concentrações de 60 μM , 90 μM , 3,7 μM , 24,5 μM , 13,5 μM e 40,5 μM , respectivamente. O trabalho avaliou também o efeito das alcaloides sobre a formação de ésteres de colesterol em cultura de células HepG2, na presença de ácido oléico; os seis compostos reduziram a esterificação do colesterol em uma concentração máxima de 10 $\mu\text{g/mL}$. Com esses resultados, os autores concluíram que os compostos isolados dos frutos de *Piper nigrum* têm uso potencial na prevenção e tratamento de dislipidemias e aterosclerose, através da inibição da enzima ACAT.

Um estudo (Arambewela et al., 2005) mostrou que os extratos aquoso e etanólico (200 mg/Kg, v.o.) das folhas de *Piper betle* apresentaram efeito hipoglicemiante quando testados em ratos normoglicêmicos e diabéticos (induzido por streptozotocina – STZ). Neste trabalho foi observado que o extrato aquoso das folhas de *Piper betle* induziu o acúmulo de glicogênio no fígado e músculo esquelético dos animais tratados, indicando que o material em questão aumentou a captação de glicose para aqueles tecidos ao sensibilizar os receptores de insulina e/ou induzindo as enzimas relacionadas à síntese do glicogênio. Nos animais diabéticos que receberam os extratos aquoso e etanólico notou-se uma redução da peroxidação lipídica, indicando um efeito anti-oxidante dos extratos, confirmado *in vitro* através do ensaio com o radical DPPH.

Ridtitid et al. (1998) afirmam que o extrato aquoso de *Piper rostratum* reduziu os níveis séricos de glicose em coelhos diabéticos (modelo do alloxano) e em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. No mesmo ano, o efeito hipoglicêmico do extrato aquoso de *Piper sarmentosum* foi examinado em ratos normais e diabéticos (no modelo de diabetes induzido por estreptozotocina); no teste de tolerância oral à glicose, a administração oral repetida (sete dias) do mesmo extrato (0,125 e 0,250 g/Kg) reduziu significativamente a glicose plasmática de maneira semelhante à glibenclamida (5 mg/Kg, via oral); a administração aguda do extrato, entretanto, não reduziu os mesmos parâmetros nos ratos diabéticos, como o fez a glibenclamida (Peungvicha et al., 1998).

Piper sarmentosum também foi estudado devido à propriedade relaxante muscular, referida pela população da Tailândia, que utiliza aquela planta no alívio das mialgias. Ridtitid et al. (1998) avaliaram o

efeito relaxante neuromuscular do extrato metanólico das folhas de *Piper sarmentosum* em uma preparação de hemidiafragma-nervo frênico. Neste estudo, os pesquisadores observaram que o extrato, nas concentrações de 3,2, 4,0, 4,8 e 6,4 mg/mL exibiu um aumento transitório na tensão muscular, seguido por uma intensa diminuição da tensão, de maneira dose-dependente. O bloqueio neuromuscular produzido pelo extrato (4,07 mg/mL) foi comparado aquele obtido com a d-tubocurarina e succinilcolina nas concentrações de 1,1 μ M e 15 μ M, respectivamente. O efeito relaxante neuromuscular foi parcialmente revertido por tetraetilamonio (bloqueador ganglionar); o mesmo não foi observado com a neostigmina (anticolinesterásico), sugerindo que o possível mecanismo de ação consiste na inibição da liberação de acetilcolina a partir do terminal pré-sináptico.

Piper betle também é referenciado por seu efeito contraceptivo. No trabalho feito por Sarkar et al. (2000), o extrato etanólico das folhas de *Piper betle*, quando administrado cronicamente (30 – 60 dias), nas doses orais de 500 e 1000 mg/Kg, reduziu a fertilidade de camundongos Swiss machos. Este efeito foi evidenciado através da diminuição do número e da motilidade dos espermatozóides, redução da concentração de frutose no líquido seminal, diminuição do peso dos órgãos reprodutivos e aumento da concentração de colesterol no testículo dos animais tratados. Não foi observada, entretanto, qualquer alteração na concentração plasmática de testosterona e todas as alterações cessaram após a administração do extrato vegetal, sugerindo que o efeito contraceptivo de *Piper betle* ocorre apenas na fase de maturação dos espermatozóides no epidídimo, sem influenciar o perfil hormonal sistêmico.

1.3. PIPER TUBERCULATUM JACQ.:

Piper tuberculatum Jacq. (figura 1b), um membro da família Piperaceae é um arbusto com ca. 2 – 2,5 m de altura; ramos pubérulos. Folhas com bainha alada; pecíolo 0,5 – 1 cm de comprimento, pubérulo; lâmina oblongo-elíptica ou ovado-elíptica, 8 – 12,5 x 4 – 6 cm, base assimétrica, ápice agudo, papiráceomembranácea, brilhante, glabra na face adaxial, pubérula nas nervuras na face abaxial; nervuras ascendentes em número de 8 – 10 pares, peninérveas, dispostas até o ápice da lâmina. Espigas eretas, com 4 – 7 de cm comprimento; pedúnculo 1 – 1,5 cm de comprimento; bractéolas triangular-subpeltadas, marginalmente franjadas (figura 1b). Estames 4. Drupa tetragonal, ovada ou subobovada, lateralmente comprimida, glabra, 3 estigmas sésseis. Esta espécie pode ser encontrada no continente Americano e Antilhas e no Brasil, nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e Mato Grosso. No Ceará é conhecida como pimenta-de-macaco ou pimenta-longa, cresce em altitudes aproximadas aos 550 m, em encosta úmida, em capoeira e em locais brejosos.

Piper tuberculatum Jacq. é considerada planta medicinal e usada como carminativa pela população nordestina (Braga, 1953). Relata-se que esta espécie é também utilizada como sedativo, analgésico para dores de dente (frutos) e até como antídoto para picada de cobra. Alguns constituintes químicos já foram isolados de *Piper tuberculatum* Jacq., a saber: cefaranona B, piperdardina, piperina e piplartina (Da Cunha & Chaves, 2001).

A piplartina (também chamada piperlongumina ou 5,6-diidro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)]-2(1H) piridinona), é uma alcaloide que possui diferentes atividades biológicas. Capron & Wiemer (1996) e Navickiene et al. (2000) demonstraram em seus trabalhos que a piplartina apresenta, respectivamente, atividade inseticida (contra a formiga *Atta cephalotes*) e antifúngica (contra *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides*). A piplartina também apresentou efeito leishmanicida potente quando testada *in vitro* em promastigotas de *Leishmania donovani*, na concentração de 100 µM. Este efeito foi observado *in vivo*, na dose de 30 mg/Kg, em hamsters que apresentavam leishmaniose visceral (Bodiwala et al., 2002).

Em ensaios de agregação plaquetária, a piplartina mostrou ser um potente inibidor da agregação plaquetária induzida por colágeno, ácido araquidônico, fator ativador de plaquetas, mas não por trombina (Fontenele et al., 2009).

Em aorta de rato, a piplartina apresentou efeito espasmolítico, relaxando o vaso pré-contraído por fenilefrina de maneira dose-dependente. Esta ação ocorreu independentemente do endotélio funcional e da participação das prostaciclina. Quando administrada repetidas vezes durante a fase tônica da contração, a piplartina inibiu o espasmo induzido por KCl, sugerindo um possível efeito da molécula sobre os canais de potássio dependentes de voltagem. Em meio livre de cálcio, a piplartina inibiu também a contração do vaso frente à fenilefrina (Oliveira, 2000).

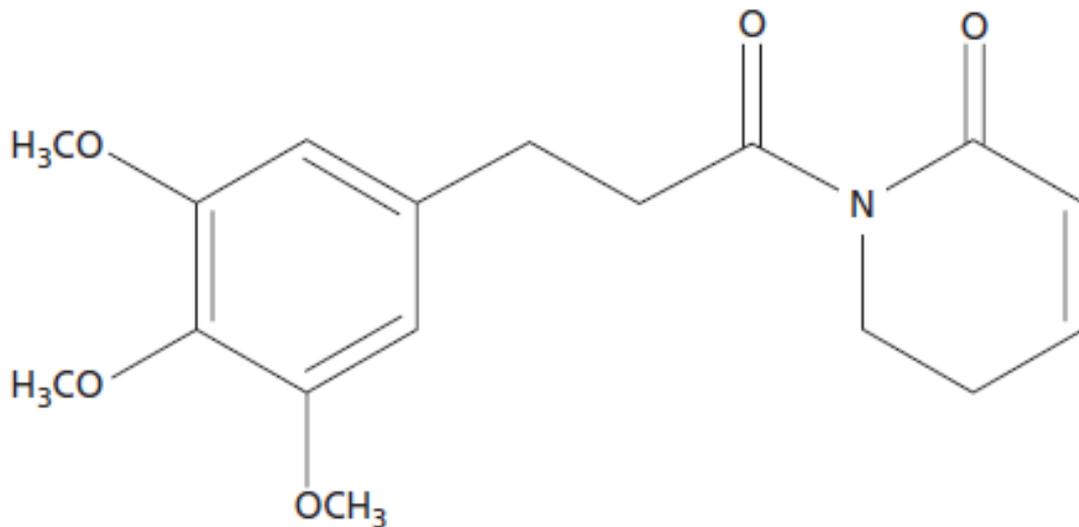


Figura 1.3.1. Estrutura química da piplartina {5,6-diidro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)]-2(1H)piridinona}. A piplartina é uma alcaloide presente em algumas espécies de Piper, dentre elas, *Piper tuberculatum* Jacq.; este composto possui diferentes efeitos farmacológicos, tais como efeito inseticida, anti-fúngico, anti-agregante, vasorelaxante, anti-tumoral e ansiolítico. Fonte: Fontenele et al. (2009).

A piplartina apresentou importante atividade anti-tumoral em alguns trabalhos (Bezerra et al., 2006; Bezerra et al., 2007; Bezerra et al., 2008), inibindo a proliferação de algumas linhagens de células tumorais (HL-60 – leucemia promielocítica humana, B16 – melanoma murino, HCT-8 – carcinoma de cólon humano, CEM – leucemia linfocítica humana, K-562 – leucemia mielocítica crônica humana e JUKART - leucemia de células T humanas). Com esses trabalhos os autores sugeriram que o efeito anti-proliferativo da piplartina parece estar relacionado à inibição da síntese do DNA e indução de morte celular pelas vias da apoptose e necrose, dependendo da concentração utilizada no ensaio.

Investigações prévias realizadas em nosso laboratório mostraram que a piplartina apresentou importantes efeitos sobre o sistema nervoso central (efeito ansiolítico e antidepressivo – Felipe et al., 2007). A investigação desses efeitos foi incentivada pelo parentesco existente entre *Piper tuberculatum* Jacq. e *Piper methysticum*, planta bastante estudada, cujos efeitos farmacológicos centrais já são bem conhecidos e empregada como fitoterápico na terapia complementar do tratamento da ansiedade e distúrbios do sono. Além disso, a escassez de informações na literatura sobre os efeitos centrais dos constituintes químicos isolados de *Piper tuberculatum* Jacq. foi outro fator que reforçou o delineamento da pesquisa, associado ao fato de que a planta em questão é facilmente encontrada na região do Cariri, onde é muito usada pela população local, seja por seu valor culinário ou medicinal.

2.1. OBJETIVO GERAL:

Investigar os efeitos comportamentais e neurobioquímicos da piplartina, alcaloide isolada de *Piper tuberculatum* Jacq., em camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar o perfil farmacológico da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) em camundongos submetidos a testes que avaliam o efeito de drogas sobre atividade locomotora e coordenação motora;
- Identificar o perfil farmacológico da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) em camundongos submetidos a testes que avaliam o efeito ansiolítico, hipnótico, anticonvulsivante, antidepressivo, cataléptico e cognitivo de drogas;
- Investigar o efeito da piplartina isoladamente (1, 5, 50 e 100 µg/mL) ou associada à 6-OHDA (10 µg/mL) sobre a viabilidade de células mesencefálicas cultivadas *in vitro*;
- Investigar o efeito anti-oxidante da piplartina (25, 50 e 100 µg/mL) sobre a peroxidação lipídica induzida em homogenatos de tecido cerebral;
- Investigar o efeito anti-oxidante da piplartina (0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 5 e 50 µg/mL) frente ao radical DPPH;

2. OBJETIVOS

- Investigar o efeito do pré-tratamento com pirlartina (100 mg/Kg, i.p.) sobre a densidade de receptores muscarínicos (M1 + M2) em corpo estriado de camundongos;
- Investigar o efeito do pré-tratamento com pirlartina (100 mg/Kg, i.p.) sobre a concentração das monoaminas e seus metabólitos em corpo estriado de camundongos.

3.1. ANIMAIS:

Para a realização do presente estudo, utilizou-se camundongos Swiss machos, com peso médio de 25 g e ratos Wistar fêmeas, com peso médio de 250 g. Os animais utilizados foram provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte – FMJ e mantidos em ambiente com temperatura constante de 24°C e ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o *Guide for Care and Use of Laboratory Animals – National Institutes of Health Guide*.

3.2. MATERIAL:

- **Atropina:**

Sulfato de atropina (INC Biomedicals, USA) foi dissolvido em água destilada e utilizado como antagonista colinérgico muscarínico (10 mg/Kg, i.p.) no teste dos tremores induzidos por oxotremorina.

- **Diazepam:**

Ampolas de diazepam (20 mg/2mL - União Química, Brasil) foram utilizadas. A droga foi diluída em água destilada e administrada nas doses de 1 e 2 mg/Kg, via intraperitoneal, como padrão para efeito ansiolítico e hipnótico/anticonvulsivante nos modelos do labirinto em cruz elevado, no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital e das convulsões induzidas por pentilenotetrazol, respectivamente.

- **Escopolamina:**

Metilnitrato de escopolamina (Sigma Chemical, Co, USA) foi dissolvido em água destilada e administrado na dose de 10 mg/Kg, via intraperitoneal, como droga padrão para efeito amnésico no modelo da esquiva-passiva.

- **Flumazenil:**

Ampolas de flumazenil (20 mg/2mL - União Química, Brasil) foram utilizadas. A droga foi diluída em água destilada e administrada na dose de 2,5 mg/Kg, via intraperitoneal, como antagonista benzodiazepínico.

- **Haloperidol:**

Ampolas de haloperidol (5 mg/mL - Cristália, Brasil) foram utilizadas. A droga foi diluída em água destilada e administrada na dose de 5 mg/Kg, via intraperitoneal, como antagonista dopaminérgico.

- **Imipramina:**

Comprimidos de cloridrato de imipramina (Imipra, 25 mg – Cristália Farma, Brasil) foram pulverizados e dissolvidos em água destilada. A droga foi administrada na dose de 30 mg/Kg, i.p., como padrão de efeito antidepressivo nos testes da acinesia induzida por reserpina e do nado forçado. Nos testes de potencialização do efeito antidepressivo, a imipramina foi administrada na dose de 6 mg/Kg, i.p.

- **Oxotremorina:**

Oxotremorina (Sigma Chemical, Co, USA) foi dissolvida em água destilada e administrada na dose de 0,5 mg/Kg, via intraperitoneal, como agonista colinérgico muscarínico, no teste dos tremores induzidos por oxotremorina.

- **Paroxetina:**

Comprimidos de cloridrato de paroxetina (Pondera, 40 mg – Eurofarma, Brasil) foram pulverizados dissolvidos em água destilada. A droga foi administrada na dose de 10 mg/Kg, i.p., como padrão de efeito antidepressivo nos testes da acinesia induzida por reserpina e do nado forçado. Nos testes de potencialização do efeito antidepressivo, a paroxetina foi administrada na dose de 1 mg/Kg, i.p.

- **Pentilenotetrazol:**

Pentilenotetrazol (Sigma Chemical, Co, USA) foi dissolvido em água destilada e administrado na dose de 80 mg/Kg, via intraperitoneal, como droga convulsivante, no teste das convulsões induzidas por pentilenotetrazol.

- **Pilocarpina:**

Pilocarpina (Sigma Chemical, Co, USA) foi dissolvida em água destilada e administrada na dose de 350 mg/Kg, via intraperitoneal, como droga convulsivante, no teste das convulsões induzidas por pilocarpina.

- **Piplartina:**

A piplartina, princípio ativo de *Piper tuberculatum* Jacq., foi extraída das cascas do rizoma desta planta. As partes subterrâneas de *Piper tuberculatum* Jacq. foram coletados no campus da Universidade Federal do Ceará – UFC e um exemplar do material vegetal (excicata nº 34736) foi depositado no herbário Prisco Bezerra no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará – UFC. Para o isolamento da piplartina, 450 g das cascas do rizoma foram macerados com uma mistura de éter de petróleo/acetato de etila 1:1 (1,5 L) durante 24 horas (3x). A mistura de solventes foi rotaevaporada sob pressão reduzida para a obtenção de um sólido amarelado (13,24 g) que forneceu 4,35 g de piplartina após recristalização em metanol. A piplartina [syn. Piperlongumine, N-(3,4,5-Trimethoxycinnamoyl)- Δ^3 – piperidin-2-one], m.p. 122.2-122.6 oC (Lit. 128-130 oC and 124 oC) foi caracterizada através da análise de RMN mono e bidimensional (Braz-Filho et al., 1981). No presente estudo, a piplartina foi solubilizada em água destilada com Cremophor 3,0% com auxílio de um aparelho sonicador. Duas soluções de concentrações diferentes do alcalóide foram preparadas, nas doses de 50 mg/Kg e 100 mg/Kg e administradas via intraperitoneal.

- **Reserpina:**

A reserpina (Sigma Chemical, Co, USA) foi dissolvida em água destilada e utilizada como droga padrão para indução de depressão química (10 mg/Kg, i.p.) no teste da acinesia induzida por reserpina.

- **Tiopental sódico:**

Frascos-ampola de tiopental sódico (Thiopentax 1 g – Cristália) foram utilizados. A droga foi diluída em água destilada e administrada na dose de 40 mg/Kg, via intraperitoneal e usada na potencialização do tempo de sono barbitúrico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 3.2.1. Relação dos equipamentos utilizados na realização dos ensaios neurobioquímicos.

Equipamentos	Modelo / Marca
Agitador de tubos	251, FANEN, SP, Brasil
Balança analítica	H5, Mettler, Suíça
Banho Maria	102/1, FANEN, SP, Brasil
Bomba para HPLC	LC-10AD Shimadzu Corp., Japão
Centrífuga refrigerada	Marathon 26 KMR, Fisher Scientific
Cintilador	Beckman LS 6500
Coluna para catecolaminas	C 18, 5 μ m, 250x4,6 mm, Shimadzu
Contador de cintilação líquida	LS 6500, Beckman, Fullerton
Cubetas de plástico	Sarstedt, Alemanha Oriental
Degaseificador	DGU-2A Shimadzu Corp., Japão
Detector de Fluorescência	RF 535, Shimadzu Corp., Japão
Detector eletroquímico	L-ECD-6 ^a , Shimadzu Corp., Japão
Eletrodo de carbono	Shimadzu, Japão
Equipamento de Millipore	Millipore Apparatus, Bedford
Espectrofotômetro	Beckman DU 640B, Fullerton
Estufa para secagem	Modelo 315 SE FANEM, SP, Brasil
Frascos para cintilação	Vials Beckman, Fullerton
Freezer a – 70 °C	ULT 2586-3D14, Revco Scientific
Homogeneizadores manuais	Bellico, USA
Integrador C-R6A	Shimadzu Corp., Japão
Medidor de pH, modelo B374	Micronal, SP, Brasil
Micropipetas	H.E., Pedersen, Dinamarca
Pré-coluna	CLC G-ODS, 4mmx1cm, Shimadzu
Sonicador	PT 10-35. Brinkmann Instruments

3.3. MÉTODOS – ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA PIP:

Todos os testes comportamentais foram realizados sempre no mesmo horário (de 12:00 às 16:00 horas), em uma sala fechada com temperatura constante ($23 \pm 1^\circ \text{C}$) e iluminação de pouca intensidade (lâmpada vermelha de 15V). Para a realização dos experimentos, os animais foram divididos em grupos e tratados com veículo (cremophor a 3%, i.p. – 10 mL/Kg), piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) ou a droga padrão específica do modelo comportamental realizado. Decorridos trinta minutos após a administração das drogas, os animais foram submetidos aos testes comportamentais descritos a seguir.

- **Acinesia induzida pela reserpina:**

Neste procedimento (Askew, 1963) os camundongos foram tratados previamente com reserpina (10 mg/Kg, i.p.) e, decorridas 18 horas da administração da droga, os mesmos animais, mas distribuídos em grupos distintos, receberam veículo (cremophor a 3%, i.p. – 10 mL/Kg), piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.), imipramina (30 mg/Kg, i.p. – antidepressivo tricíclico usado como droga padrão) e paroxetina (10 mg/Kg, i.p. – antidepressivo inibidor da recaptação de serotonina usado também como droga padrão). Meia hora depois, cada animal foi colocado no aparelho do campo aberto para a avaliação da atividade locomotora (durante 5 minutos). O número de cruzamentos (NC) foi o parâmetro comportamental observado. Para o registro do NC, foram contados todos os quadrantes cruzados pelo animal, quando este se encontrava com as quatro patas dentro do mesmo quadrante.

- **Campo aberto:**

O campo aberto (CA) é bastante utilizado para a avaliação do efeito de drogas sobre a atividade locomotora. O aparelho consistiu em uma arena de formato quadrado, com as paredes confeccionadas em acrílico transparente (30 x 30 x 15 cm) e piso em acrílico preto, dividido em nove quadrantes iguais (Archer, 1973).

Grupos diferentes de animais receberam veículo (cremophor a 3%, i.p. – 10 mL/Kg) e piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) e, meia hora após o tratamento, cada camundongo foi colocado com as quatro patas no centro da arena do campo aberto e o seu comportamento foi observado por cinco minutos. Os parâmetros comportamentais observados neste teste foram: o número de cruzamentos (NC); o número de *rearing* (NR), postura na qual o animal fica na posição vertical, apoiado somente pelas patas traseiras, e o número de *grooming* (NG), ato de auto-limpeza do animal. Para o registro do NC, foram contados todos os quadrantes cruzados pelo animal, quando este se encontrava com as quatro patas dentro do mesmo quadrante.

- **Catalepsia induzida por haloperidol:**

Para a realização deste teste, grupos diferentes de camundongos foram pré-tratados com veículo (cremophor a 3%, i.p. – 10 mL/Kg) e piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) e, decorridos 30 minutos da aplicação, todos os animais receberam uma injeção intraperitoneal de haloperidol (5 mg/Kg – droga neuroléptica utilizada como padrão para induzir catalepsia). A avaliação deste efeito (rigidez muscular) foi observada quando os camundongos tratados foram colocados com suas patas dianteiras apoiadas em uma barra horizontal a 5 cm de altura da bancada, de tal forma que o mesmo permanecesse em posição vertical. O tempo de imobilidade do animal na barra foi o parâmetro observado, durante cinco minutos. Caso o animal deixasse a posição imposta antes do tempo determinado, o processo era mais uma vez repetido, respeitando o número máximo de três tentativas (Carlini, 1973).

- **Convulsões induzidas por pilocarpina:**

Neste modelo comportamental grupos diferentes de camundongos foram tratados previamente com veículo (cremophor a 3%, i.p. – 10 mL/Kg) e piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.). Meia hora após a administração das drogas, cada animal recebeu uma injeção i.p. de pilocarpina (350 mg/Kg). Como parâmetros de avaliação do efeito da piplartina sobre as convulsões, foram avaliados a latência para o aparecimento da primeira convulsão (em segundos) e a latência da morte (em segundos). O tempo total de observação (*cut off time*) foi de 60 minutos (Turski et al., 1984).

- **Convulsões induzidas por PTZ:**

Os camundongos utilizados neste teste foram divididos em diferentes grupos que foram tratados previamente com veículo (cremophor a 3%, i.p. – 10 mL/Kg), piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) e diazepam (2 mg/Kg, i.p. – droga padrão para efeito anticonvulsivante neste modelo experimental). Meia hora após a administração das drogas, cada animal recebeu uma injeção i.p. de pentilenotetrazol (80 mg/Kg). Como parâmetros de avaliação do efeito da droga sobre as convulsões, foram avaliados a latência (em segundos) para o aparecimento da primeira convulsão (tônico-clônica generalizada) e a latência da morte (também em segundos). O tempo total de observação (*cut off time*) foi de 30 minutos (Lowson et al., 1990).

- **Esquiva-passiva:**

O aparelho da esquiva-passiva é uma caixa de acrílico (48 x 22 x 22 cm), dividida em dois compartimentos (um claro, iluminado por uma lâmpada e um compartimento escuro, com piso eletrificado), separados por uma porta (Figura 3.3.1.).

O protocolo foi realizado de acordo com Imanishi et al (1996). Meia hora após o tratamento com veículo (cremophor a 3%, i.p. – 10 mL/Kg) e piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.), cada animal foi colocado no equipamento (desligado) durante 1 minuto para habituação. Decorrido este tempo, o animal era retirado e após 30 segundos, recolocado no compartimento claro do aparelho (desta vez, ligado) para iniciar a fase de treino. Ao passar do compartimento claro para o escuro, o animal recebia um choque de 1 mA de intensidade, durante 1 segundo, e era retirado do aparelho logo em seguida. Após 15 minutos, o procedimento era repetido para registrar o tempo que o animal levava para entrar no compartimento escuro do aparelho (latência) e receber o choque novamente. Esta fase avaliava o aprendizado do camundongo (esquiva em 15 minutos). Decorridas 24 horas, o procedimento era realizado mais uma vez para avaliar a memória do animal (esquiva em 24 horas). O tempo limite de permanência do camundongo no compartimento claro foi de 300 segundos. O modelo utilizou escopolamina (10 mg/Kg, i.p.) como padrão para indução de amnésia.

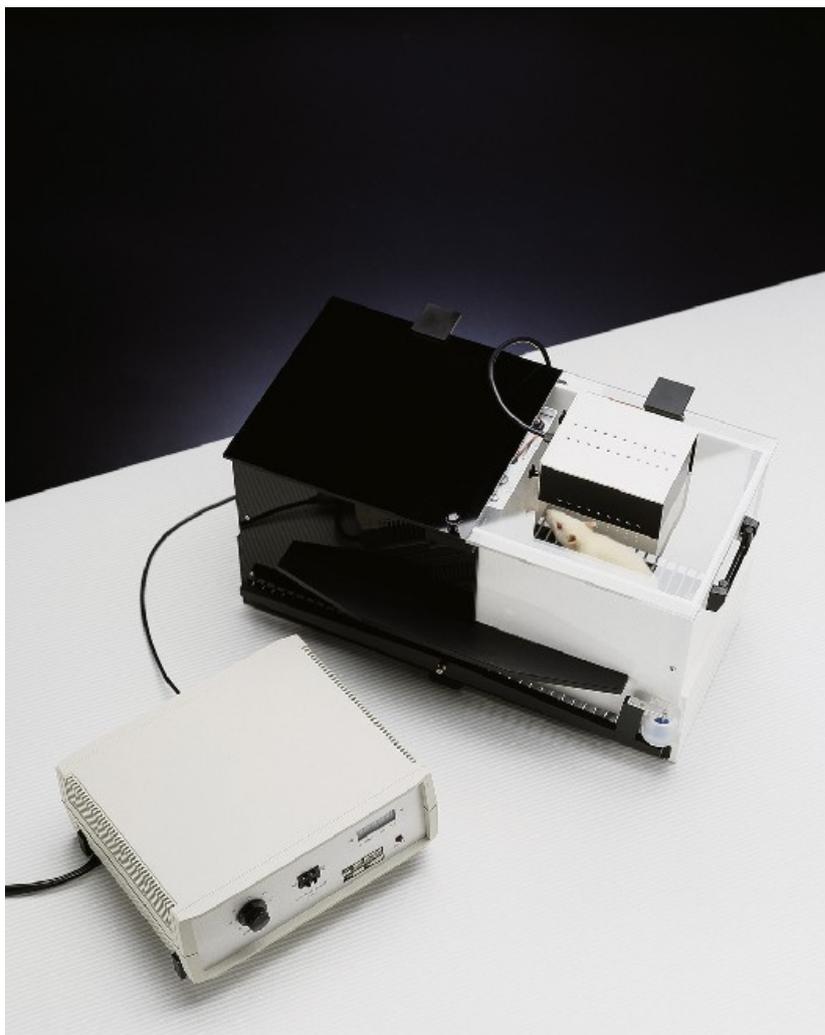


Figura 3.3.1. Aparelho da esquiva-passiva. Aparelho utilizado para o estudo de drogas com possíveis ações sobre o aprendizado e a memória. O equipamento possui um compartimento claro, iluminado por uma lâmpada, e outro compartimento escuro, com piso eletrificado, separado por uma porta. O modelo fundamenta-se no uso de um estímulo aversivo (choque elétrico) para que o processo de formação e retenção da memória ocorram.

Fonte: <http://www.ugobasile.com>

- **Labirinto em cruz elevado:**

O labirinto em cruz elevado (figura 3.3.2.) para camundongos (Lister, 1987) consistiu em um aparelho formado por dois braços abertos (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 25 cm), unidos entre si por uma plataforma central (5 x 5 cm), formando uma cruz, a qual encontrava-se elevada a 45 cm do solo. As paredes do labirinto foram confeccionadas em acrílico transparente e o piso, em acrílico preto.

Decorrido o tempo de 30 minutos após a administração do veículo (cremophor a 3%, i.p. – 10 mL/Kg) e piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.), cada animal foi colocado na plataforma central do labirinto com o focinho voltado para um dos braços fechados, e seu comportamento foi observado por 5 minutos. Neste teste, os seguintes parâmetros de comportamento foram analisados: o número de entradas nos braços abertos (NEBA) e o tempo de permanência do animal nos braços abertos (TPBA – em segundos). O modelo utilizou o diazepam (1 mg/Kg, i.p.) como droga padrão para a ação tipo ansiolítica e flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.), antagonista benzodiazepínico dos receptores GABAérgicos.



Figura 3.3.2. Labirinto em cruz elevado. Aparelho utilizado para avaliar a atividade ansiolítica de drogas do tipo benzodiazepínica. A análise do efeito ansiolítico dá-se pelo registro no número de entradas do animal tratado nos braços abertos do aparelho, bem como o tempo por ele despendido nos braços abertos.
Fonte: <http://www.colinst.com>

- **Nado forçado:**

O teste do nado forçado foi realizado utilizando cilindros de acrílico transparente, medindo 18 cm de altura e 14 cm de diâmetro, com volume total de 2 L, contendo 1,5 L de água a 27° C. Neste teste todos os animais foram submetidos previamente a uma sessão de treino, onde os mesmos foram colocados para nadar no cilindro durante 15 minutos. Quando retirados do aparelho, os camundongos foram colocados em caixas forradas com papel-toalha até secarem, sendo depois devolvidos as suas gaiolas. Vinte e quatro horas após o treino, os animais foram divididos em grupos que receberam veículo (cremophor a 3%, i.p. – 10 mL/Kg), piplartina (20, 50 e 100 mg/Kg, i.p.), imipramina (6 e 30 mg/Kg, i.p. – antidepressivo tricíclico usado como droga padrão de efeito antidepressivo) e paroxetina (1 e 10 mg/Kg, i.p. – antidepressivo inibidor da recaptação de serotonina usado também como droga padrão de efeito antidepressivo). Após o intervalo de 30 minutos da administração, cada animal foi colocado para nadar individualmente no cilindro durante 5 minutos, tempo durante o qual foi observado o tempo de imobilidade (seg), parâmetro utilizado para avaliar o efeito da droga neste modelo experimental (Porsolt et al., 1978).



Figura 3.3.3. Cilindro do nado forçado. O aparelho acima é usado no teste do nado forçado, modelo empregado na avaliação de drogas com efeito anti-depressivo. O tempo de imobilidade é o parâmetro avaliado durante a execução do teste.
Fonte: <http://www.biogen.es>

- **Potencialização do tempo de sono barbitúrico:**

Neste teste, os camundongos foram pré-tratados com veículo (cremophor a 3%, i.p. – 10 mL/Kg), piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) e diazepam (2 mg/Kg, i.p.) e, 30 minutos após, cada animal recebeu uma injeção intraperitoneal de tiopental sódico (40 mg/kg). A latência (indução do sono – em segundos) e a duração (tempo do sono – em segundos) da perda do reflexo postural (reflexo de endireitamento) dos animais foram os parâmetros observados no teste, que teve duração de 3 horas (Carlini et al., 1986).

- **Potencialização do tempo de sono etéreo:**

Para a realização deste teste, foram utilizados cilindros de plástico transparentes (30 cm de altura X 20 cm de diâmetro). Em cada um destes, a 20 cm do piso, foi suspensa uma bola de algodão pesando 6 g e umedecida com 5,0 mL de éter etílico. Feito isso, o sistema foi devidamente fechado por 10 minutos, para que ocorresse a saturação do meio interno. Decorrido o tempo, os animais pré-tratados com veículo (cremophor a 3%, i.p. – 10 mL/Kg), diazepam (2 mg/Kg, i.p.) e piplartina (50 e 100 mg/Kg, ip.) foram inseridos, individualmente, no interior dos cilindros plásticos. A latência (indução do sono – em segundos) e a duração (tempo do sono – em segundos) da perda do reflexo postural (reflexo de endireitamento) dos animais foram os parâmetros avaliados neste teste (Lapa et al., 2008).

- ***Rota rod:***

No teste do *rota rod*, os animais tratados com com veículo (cremophor a 3%, i.p. – 10 mL/Kg) e piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) foram colocados individualmente com as quatro patas sobre uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso (figura 3.3.4.), a uma rotação de 12 rpm, durante 1 minuto. Foram registrados o número de quedas (NQ) sofridas (sendo o limite máximo de 3 quedas para cada animal) e o tempo de permanência (TP) na barra giratória como parâmetros avaliados (Dunham & Myia, 1957).

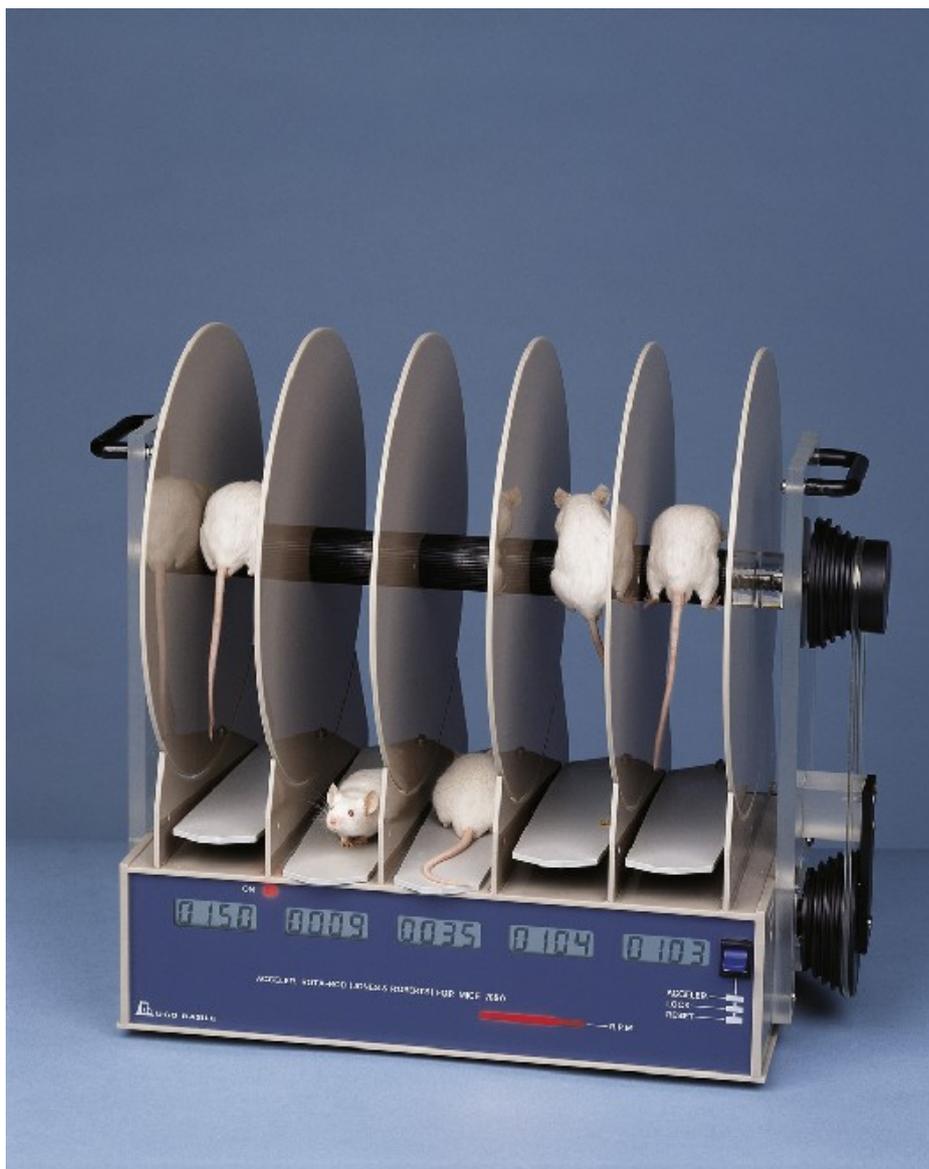


Figura 3.3.4. Aparelho do *rota Rod*. Aparelho utilizado para o estudo da ação de drogas sobre a coordenação motora. A avaliação é feita mediante a observação de dois parâmetros: o tempo de permanência (TP) do animal sobre a barra giratória e o número de quedas (NQ) sofridas, durante 1 minuto.

Fonte: <http://www.ugobasile.com>

- **Tremores induzidos por oxotremorina:**

O experimento foi realizado segundo a técnica descrita por Fukuzaki et al. (2000). Decorridos 30 minutos da administração do veículo (cremophor a 3%, i.p. – 10 mL/Kg), piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) e atropina (10 mg/Kg, i.p.), cada animal recebeu uma injeção de oxotremorina (0,5 mg/Kg, i.p.) e teve seu comportamento avaliado 10, 20 e 30 min após a administração deste último composto. A intensidade dos tremores apresentados pelos animais foi avaliada de acordo com uma escala descrita por Coward et al. (1977):

0- Ausência de tremores;

1- Tremores fracos e isolados;

2- Tremores moderados e pouco persistentes;

3- Tremores intensos e persistentes.

3.4. MÉTODOS – ESTUDO DOS EFEITOS NEUROBIOQUÍMICOS DA PIP:

A análise dos efeitos neurobioquímicos da piplartina foi realizada em cultura de células e homogenatos de tecido cerebral.

Para a cultura de células foram utilizados ratos Wistar fêmeas prenhas. Estes animais foram levemente anestesiados com éter e mortos por deslocamento cervical e sua área abdominal foi aberta para a retirada dos embriões. As culturas de células foram obtidas de mesencéfalo de embriões de rato Wistar de 17-20 dias de gravidez como descrito por Choi & Hwang (2003). As células mesencefálicas foram então dissecadas mecanicamente e suspensas em Meio Essencial de Eagle (MEM) completado com soro de cavalo 10%, estreptomicina (100 mg/ml), penicilina (1000 UI/ml), actinomicina C (2.5 mg/ml), bicarbonato de sódio (24 mM) e glicose (11 mM). A viabilidade das células foi avaliada com o corante Azul de Tripam e, posteriormente, as células plaqueadas em placas multi-well de 96 x 6 poços previamente tratadas com poli-lisina com uma concentração de 5×10^4 células/poço. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa a 5% CO₂. Quatro dias depois do plaqueamento, as culturas foram utilizadas para experimentação, adicionando-se a piplartina isoladamente (1, 5, 50 e 100 µg/mL) ou associada à 6-OHDA (10 µg/mL). O efeito da piplartina sobre a viabilidade celular foi analisado através do ensaio com MTT, descrito a seguir.

- **Teste de viabilidade celular:**

Um dos métodos mais utilizados na avaliação da citotoxicidade de diferentes compostos é o teste da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), devido à sua rapidez, versatilidade e alta reprodutibilidade. Este teste colorimétrico baseia-se na capacidade das células viáveis converterem um sal de tetrazólio solúvel (MTT) num precipitado de formazan insolúvel (figura 3.4.1.). Os sais de tetrazólio atravessam a membrana celular e no citoplasma aceitam elétrons a partir de substratos oxidados, ou de determinadas enzimas, sendo particularmente reduzidos como resultado da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Esta reação converte os sais de MTT de cor amarela em cristais de formazan de cor violeta que se acumulam em endossomas e são posteriormente transportados para a superfície celular através de um processo de exocitose (Supino, 1995; Liu, 1999). Os referidos cristais de formazan podem ser posteriormente dissolvidos num solvente orgânico, que permita a sua quantificação por espectrofotometria (Freshney, 1994).

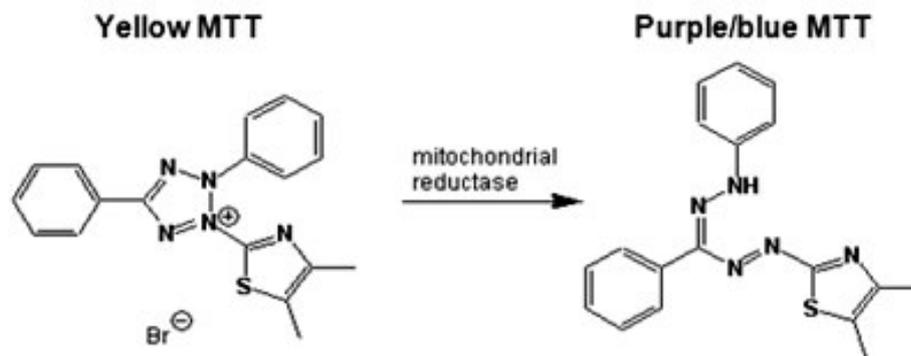


Figura 3.4.1. Estruturas químicas do MTT e MTT formazan. Modificação química na molécula de MTT. Este fenômeno ocorre no interior de células, por meio de reações de oxido-redução entre a molécula e substratos doadores de elétrons.
Fonte: Liu (1999).

Para a obtenção de homogenatos de tecido cerebral, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e decapitados com uma tesoura cirúrgica; os encéfalos retirados foram rapidamente colocados em uma placa de Petri, sobre gelo. Para a retirada do hipocampo e corpo estriado, acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi retirada das leptomeninges com o auxílio de uma pinça reta de microdissecação, a qual, progredindo delicada e tangencialmente aos ventrículos laterais, divulsionou o córtex em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo parte do corpo estriado. Este último (caudado, putamen e núcleo accumbens) foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex (Burke & Greenbaum 1987). As amostras obtidas foram envolvidas em papel alumínio previamente identificado e pesado, sendo então armazenadas a -70° C para posterior análise através dos testes bioquímicos e neuroquímicos descritos a seguir (exceto no ensaio para atividade anti-oxidante frente ao radical DPPH).

- **Atividade anti-oxidante da piplartina frente ao radical DPPH:**

A atividade antioxidante da piplartina foi determinada através do método do DPPH (Sanches-Moreno et al., 1999). Inicialmente a piplartina e o α -tocoferol (droga padrão anti-oxidante) foram adicionados a uma solução de DPPH 0,3 mM em mistura de metanol/etanol (1:1), obtendo-se uma concentração final de piplartina de 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 5 e 50 $\mu\text{g/mL}$ e 75 $\mu\text{g/mL}$ de α -tocoferol. As misturas foram mantidas em repouso e protegidas da luz por um período de tempo de 60 minutos. Decorrido este período de tempo, a redução do radical DPPH foi verificada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm, tendo como branco a mistura de metanol/etanol (1:1). O RSA (*radical scavenging activity*) foi calculado como a percentagem de descoloração do DPPH, utilizando a seguinte equação: $\% \text{RSA} = [(\text{ABS}_{\text{DPPH}} - \text{ABS}_{\text{Solução Teste}}) / \text{ABS}_{\text{DPPH}}] \times 100$.

- **Atividade anti-oxidante da piplartina frente à peroxidação lipídica induzida por choque térmico:**

Para a realização deste ensaio (Auddy et al., 2003), foram preparados homogenatos de cérebros de camundongos a 20%, em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,4). Alíquotas de 1,0 mL do homogenato foram distribuídas em tubos de ensaio e três soluções de piplartina foram acrescentadas aqueles tubos, obtendo-se concentrações finais da alcalimida de 25, 50 e 100 µg/mL. Como controle do ensaio, 100 µL do veículo foram adicionados a 900 µL do homogenato. Em seguida, as amostras foram estocadas a -20° C durante 24 horas; decorrido este período de tempo, os homogenatos foram imediatamente incubados em banho-maria a 37°C (com exceção do grupo controle que permaneceu à temperatura ambiente) durante 1 hora para indução de peroxidação lipídica. Ao final deste tempo, foram realizadas as dosagens de nitrito e das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (marcadores de peroxidação lipídica) no material para verificar o efeito antioxidante da piplartina.

- **Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em homogenatos de tecido cerebral:**

A uma alíquota de 250 μL da amostra (homogenato de tecido cerebral) foram misturados 400 μL de ácido perclórico a 35%. A mistura resultante foi devidamente homogeneizada e em seguida submetida à centrifugação a 14.000 rpm durante 10 minutos. Do sobrenadante, 600 μL foram retirados e adicionados a 200 μL de ácido tiobarbitúrico a 1,2 %; a mistura foi levada ao banho-maria por 30 minutos a uma temperatura variável de 95 - 100° C. Decorrido este período de tempo, a solução foi retirada e colocada em banho de gelo para finalizar a ocorrência da reação e o produto colorido formado teve sua absorvância determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 532 nm (Agar et al., 1999).

- **Dosagem de nitrito em homogenatos de tecido cerebral:**

Para a dosagem de nitrito (Green et al., 1981) foi usado o reagente de Griess (N-1-naftiletilenodiamina a 0,1%, água bidestilada, sulfanilamida a 1% e ácido fosfórico a 5%, na proporção de 1:1:1:1). Este reagente revela a presença de nitrito em amostras biológicas por meio de uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea, com um pico de absorvância em 560 nm). A 100 µL do reagente de Griess foram adicionados 100 µL do sobrenadante da amostra (homogenato de tecido cerebral). Para o branco foram usados 100 µL do reagente de Griess acrescidos de 100 µL de salina. A leitura da absorvância foi feita em 560 nm.

- **Dosagem de proteínas em homogenatos de tecido cerebral:**

A quantidade de proteína em homogenatos cerebrais foi determinada a 25 °C, utilizando albumina sérica bovina como padrão, de acordo com o método previamente descrito (Lowry et al., 1951), que emprega duas reações de formação de cor para analisar a concentração protéica por espectrofotometria. Inicialmente, é feita uma reação biureto de baixa eficiência, na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Essa cor biureto é característica de todas as proteínas, e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa de ensaio. Depois, o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocalteu, que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptofano livres ou ligados a proteínas. Como as quantidades desses dois aminoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações (verde-azulada) é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração foi medida em comprimento de onda de 750 nm, através de um espectrofotômetro Beckam DU 640B.

A seguir é apresenta de forma simplificada a seqüência de etapas realizada para a determinação da concentração de proteínas nas amostras de tecido cerebral:

3. MATERIAL E MÉTODOS

	Branco	Padrão	Teste
Água destilada	750 µL	700 µL	750 µL
Amostra	-	-	-
Padrão	-	50 µL (BSA)	-
Reagente C	500 µL	500 µL	500 µL

Após a adição do reagente C (solução de cobre alcalino - 24 mL de Na₂CO₃ 0,1 N e 1,0 mL de CuSO₄.5H₂O a 0,5 % em NaKC₄H₄O₆.4H₂O a 1 %), as misturas foram deixadas em repouso durante 10 minutos. Em seguida, procedeu-se a adição de 50 µL do reagente D (reativo de Folin e água destilada 1:1) em todos os tubos, que foram mantidos em subsequente repouso por 30 minutos, antes de se efetuar a determinação da absorbância em cada uma das amostras. Como padrão de proteína, foi utilizada uma solução de albumina sérica bovina (1 mg/mL).

- **Determinação da concentração de monoaminas e de seus metabólitos em homogenatos de corpo estriado de camundongos pré-tratados com piplartina:**

Para a determinação dos níveis de monoaminas e seus metabólitos, foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (Miyoshi et al., 2002). Na cromatografia líquida clássica, um adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna, e eluído por um líquido ideal (fase móvel). Uma determinada mistura a ser separada é então introduzida na coluna, a qual é carregada através da mesma por um líquido eluente. Caso um composto presente na mistura (soluto) seja adsorvido fracamente pela superfície da fase sólida estacionária, este atravessará a coluna mais rapidamente que outro soluto que seja mais fortemente adsorvido. A separação dos solutos, então, torna-se possível caso existam diferenças na adsorção pelo sólido.

Os detectores eletroquímicos medem a condutância do eluente, ou a corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para que a detecção ocorra, faz-se necessário que, no primeiro caso, os solutos sejam iônicos, e, no segundo caso, os solutos devem ter a característica de serem relativamente fáceis de sofrerem oxidação ou redução. Os detectores eletroquímicos são também chamados de detectores amperimétricos ou coulométricos, uma vez que medem a corrente associada com a oxidação ou redução de solutos. No presente estudo, foi utilizado o tipo amperométrico, o qual reage com uma quantidade muito menor de soluto (em torno de 1%). Todas as técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial para um eletrodo (geralmente de carbono vítreo), oxidação da substância que está sendo estudada, próxima à superfície do eletrodo, seguindo a

amplificação e medida da corrente produzida. As catecolaminas (monoaminas e metabólitos) sofrem oxidação nos grupos de anel hidroxil, com consequente produção de um derivado ortoquinônico, com liberação de dois elétrons.

Após a administração intraperitoneal da piplartina (100 mg/Kg, i.p.), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e decapitados com uma tesoura cirúrgica. Seus cérebros foram removidos e dissecados rapidamente sob gelo para retirada do corpo estriado (CE), o qual foi armazenado em papel-alumínio e mantido a uma temperatura de 70° C abaixo de zero para posterior análise do conteúdo de monoaminas (noradrenalina, dopamina e serotonina) e metabólitos (HVA, DOPAC e 5-HIAA). O CE foi utilizado para preparar homogenatos a 10%. Para tanto, os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico (HClO₄) por 30 segundos e centrifugados em seguida por 15 minutos em uma centrífuga refrigerada (4° C) a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de CLAE para análise química.

Para a análise das monoaminas, uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro de partícula de 3µm (Shimadzu, Japão) foi utilizada. A fase móvel foi composta por tampão de ácido cítrico 0,163M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69M (SOS), como reagente formador do par iônico; acetonitrila 4% v/v e tetrahidrofurano 1,7% v/v. a solução utilizada foi preparada pesando-se 17,75 g de ácido cítrico (Grupo Química, Rio de Janeiro, Brasil), o qual foi dissolvido com água milli-Q para um volume de 400 mL e o pH foi ajustado para um valor igual a 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil). A esta solução foram adicionados 75mg de SOS (ácido octanosulfônico sódico - Sigma

3. MATERIAL E MÉTODOS

Chemical, Co, USA) e o volume acrescido para 471,5 mL com água milli-Q. A solução preparada foi então filtrada e degaseificada e acrescidos 20mL de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 10 mL de tetrahidrofurano (Sigma Chemical, Co, USA), completando um volume final de 500 mL.

Os padrões utilizados foram preparados em uma concentração final de 4ng de DA, NA, 5-HT, DOPAC, HVA e 5-HIAA (Sigma Chemical, Co, USA). A partir da altura ou área dos picos destes padrões, as amostras foram calculadas no programa Microsoft Excel em um computador PC, e os resultados expressos em ng/g de tecido.



Figura 3.4.2. Aparelho para cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE. Aparelho usado na análise do conteúdo de monoaminas e metabólitos em corpo estriado de camundongos tratados diariamente com PIP (100 mg/Kg, i.p).
Fonte: <http://www.shimadzu.com>

- **Determinação da densidade de receptores muscarínicos (M1 + M2) em homogenatos de corpo estriado de camundongos pré-tratados com piplartina:**

A densidade de receptores muscarínicos (M1 + M2) foi determinada pelo ensaio de *binding*, executado em homogenatos cerebrais, utilizando-se o ligante específico cloridrato de [3H]-N-metilescopolamina ([3H]-NMS, 85 Ci/mmol - New England), de acordo com método previamente descrito (Dombrowski et al., 1983).

A [3H]-NMS liga-se a sítios específicos dentre os quatro primeiros segmentos transmembrana dos receptores muscarínicos que existem nos fragmentos de membranas dos tecidos homogeneizados. Desse modo, o ligante tritiado marca especificamente os receptores colinérgicos presentes no tecido estudado.

A atropina é outro antagonista clássico utilizado nos “brancos” dos ensaios para determinar a radioatividade de *background* ou ligações não específicas. A atropina acrescentada em concentração muito maior do que a da [3H]-NMS interage, seletivamente, com os mesmos sítios de ligação do receptor, deslocando e deixando livre toda a droga radioativamente marcada, que é logo depois, filtrada. A radioatividade contida no filtro é, então, contada por cintilação líquida.

Após a administração intraperitoneal da piplartina (100 mg/Kg, i.p.), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e decapitados com uma tesoura cirúrgica. Seus cérebros foram removidos e dissecados rapidamente sob gelo para retirada dos corpos estriados (CE), os quais foram armazenados em papel-alumínio e mantidos a uma temperatura de 70° C abaixo de zero. Para

3. MATERIAL E MÉTODOS

o ensaio de *binding* foram feitos homogenatos a 10 % em tampão fosfato de sódio 150 mM, pH 7,4. Rapidamente, os homogenatos foram incubados em tampão fosfato de sódio contendo 2,38 nM de [3H]-NMS, na presença ou na ausência de sulfato de atropina 12,5 µM em um volume final de 0,2 mL, para experimentos de pontos únicos. Como [3H]-NMS é um ligante não-específico dos receptores muscarínicos, pode ligar-se a todos os subtipos destes receptores (M1- + M2-símile). Após incubação a 37°C por 30 minutos, a reação foi terminada por filtração a vácuo através de filtros Whatman GF / B. Os filtros foram lavados três vezes com 4 mL de solução salina 0,9 % gelada, secos a 60°C por no mínimo 2 horas e colocados em frascos de vidro (vials) com 3 mL de um coquetel de cintilação líquida (0,5 g de p-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno - POPOP e 4,0 g de 2,5-difeniloxazol - PPO, dissolvidos em 1000 mL de tolueno).

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500. A ligação específica foi calculada como a ligação total menos a ligação não-específica feita na presença de atropina 12,5 mM. Os resultados foram expressos em fentomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Lowry et al (1951), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*). Foram considerados estatisticamente significativos todos os valores que obtiveram $p < 0,05$.

4.1. ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA PIP:

- **Acinesia induzida pela reserpina:**

O efeito antidepressivo da piplartina foi estudado sobre a acinesia induzida pelo pré-tratamento com reserpina. O número de cruzamentos (NC) foi o parâmetro avaliado neste teste, que utiliza o campo aberto para estudar o efeito em questão. Na figura 4.1.1. pode-se observar que o tratamento com reserpina (10 mg/Kg, i.p.) isoladamente reduziu, de forma significativa, o número de cruzamentos dos animais em relação ao grupo controle em 76% [CONT: $40,2 \pm 2,7$ (08), RES 10: $9,5 \pm 1,1$ (07)]. Este efeito, entretanto, foi revertido na presença de imipramina (30 mg/Kg, i.p.), paroxetina (10 mg/Kg, i.p.) e piplartina (100 mg/Kg, i.p.), que aumentaram, de forma significativa, o NC em 80%, 76% e 52%, respectivamente, em relação ao grupo tratado apenas com reserpina (10 mg/Kg, i.p.) [IMI 30: $48,2 \pm 4,4$ (09), PAR 10: $40,1 \pm 2,3$ (10) e PIP 100: $20,2 \pm 3,2$ (08)]. A dose menor de piplartina, no entanto, não apresentou o mesmo resultado sobre o NC [PIP 50: $8,6 \pm 1,5$ (08)].

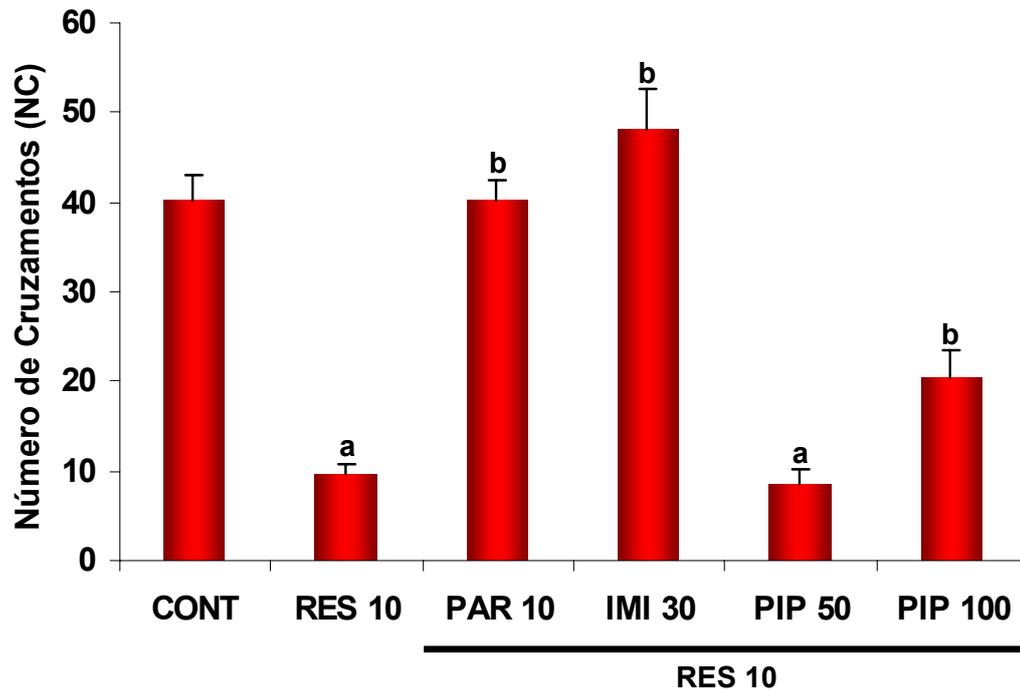


Figura 4.1.1. Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o número de cruzamentos (NC), número de *grooming* (NG) e número de *rearing* (NR) de camundongos pré-tratados com reserpina e submetidos ao campo aberto. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a” e “b” vs CONT e RES 10, respectivamente, quando $p < 0,05$. CONT = controle, RES 10 = reserpina 10 mg/Kg, i.p., PAR 10 = paroxetina 10 mg/Kg, i.p., IMI 30 = imipramina 30 mg/Kg, i.p., PIP 50 = piplartina 50 mg/Kg, i.p. e PIP 100 = piplartina 100 mg/Kg, i.p.

- **Campo aberto:**

O efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) isoladamente sobre a atividade locomotora de camundongos é mostrado na figura 4.1.2., Nesta figura tem-se a avaliação do efeito da piplartina sobre o número de cruzamentos (NC) de camundongos submetidos ao teste do campo aberto. Neste parâmetro, o tratamento com PIP 50 e 100 não provocou alteração alguma no NC dos animais em relação ao grupo controle: CONT: $47,8 \pm 4,0$ (16), PIP 50: $53,0 \pm 2,9$ (13) e PIP 100: $53,3 \pm 4,2$ (13).

Ainda na figura 4.1.2. observa-se que o tratamento com PIP 50 e 100 aumentou, de forma significativa, o NG dos animais em 50% e 54%, respectivamente, em relação ao grupo controle: CONT: $3,1 \pm 0,5$ (17), PIP 50: $6,4 \pm 0,6$ (13) e PIP 100: $7,0 \pm 0,5$ (12).

Da mesma maneira, na figura 4.1.2., observa-se que o tratamento com PIP 50 e 100 aumentou, de forma significativa, o NR dos animais em 60% e 18%, respectivamente, em relação ao grupo controle: CONT: $16,9 \pm 3,8$ (16), PIP 50: $27,0 \pm 1,8$ (13) e PIP 100: $20,8 \pm 1,7$ (12).

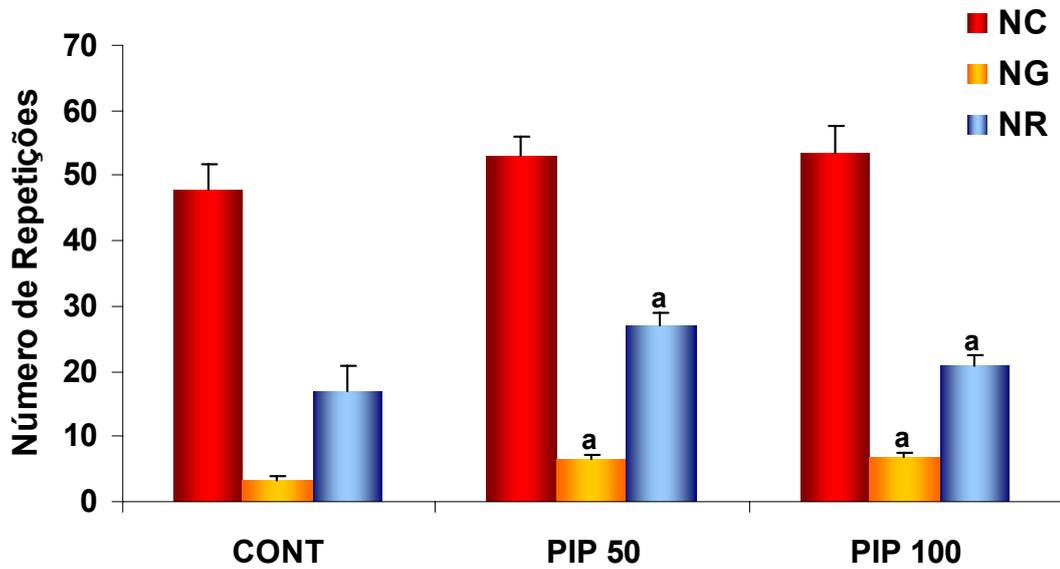


Figura 4.1.2. Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o número de cruzamentos (NC), número de *grooming* (NG) e número de *rearing* (NR) de camundongos submetidos ao campo aberto. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a” vs CONT, quando $p < 0,05$. CONT = controle, PIP 50 = piplartina 50 mg/Kg, i.p. e PIP 100 = piplartina 100 mg/Kg, i.p.

- **Catalepsia induzida por haloperidol:**

O efeito da piplartina sobre o sistema dopaminérgico foi estudado neste teste, através da indução da catalepsia por haloperidol, efeito avaliado pelo tempo de imobilidade (em segundos) do animal em uma barra suspensa. A figura 4.1.3. mostra que a piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) diminuiu, de forma significativa, o tempo de imobilidade, em 24% e 21%, respectivamente, o tempo de imobilidade dos camundongos, em relação ao grupo de animais pré-tratados com haloperidol (5 mg/Kg, i.p.): CONT: $274,8 \pm 5,0$ (12), PIP 50: $206,2 \pm 18,4$ (12) e PIP 100: $214,5 \pm 22,9$ (12). Não foi observado, do ponto de vista estatístico, diferença de efeito entre os grupos tratados com as duas doses de piplartina.

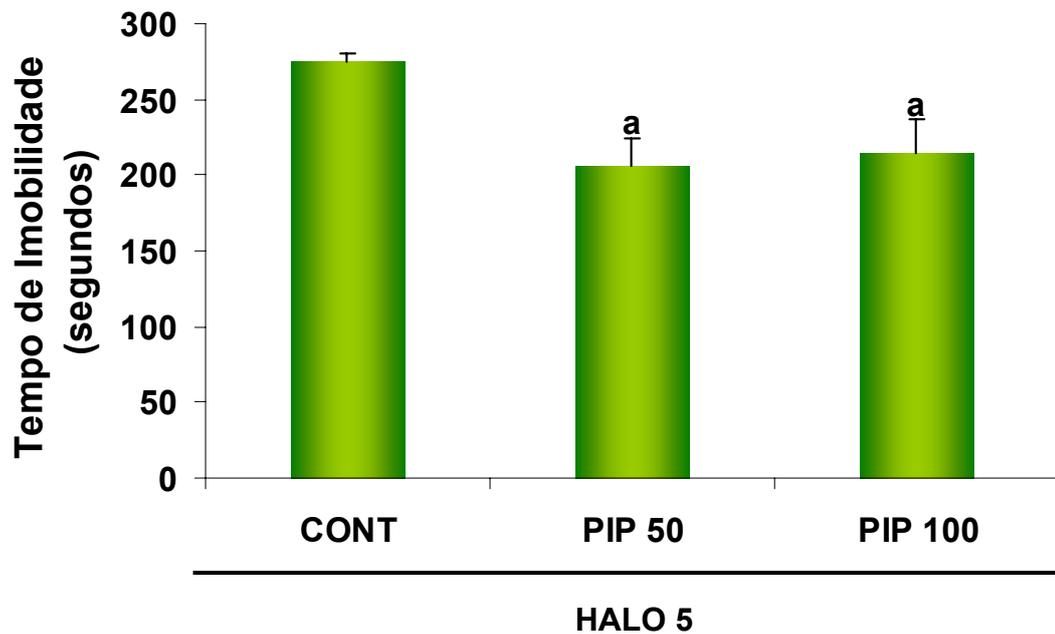


Figura 4.1.3. Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a catalepsia induzida por haloperidol (5 mg/Kg, i.p.) em camundongos. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a” vs CONT, quando $p < 0,05$. CONT = controle, HALO 5 = haloperidol 5 mg/Kg, i.p., PIP 50 = piplartina 50 mg/Kg, i.p. e PIP 100 = piplartina 100 mg/Kg, i.p.

- **Convulsões induzidas por pilocarpina:**

O efeito anti-convulsivante da piplartina foi avaliado através do presente teste, que utilizou a pilocarpina (350 mg/Kg, i.p.) como agente pró-convulsivante. Neste teste, a piplartina, em ambas as doses, não apresentou efeito algum sobre a latência da primeira convulsão e sobre o tempo de morte dos camundongos tratados com a pilocarpina, como pode ser observado na tabela 4.1.1.

4. RESULTADOS

Tabela 4.1.1. Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência da primeira convulsão e sobre o tempo de morte de camundongos tratados com pilocarpina (350 mg/Kg, i.p.).

Grupos	Latência 1^a Convulsão (segundos)	Latência de Morte (segundos)
Controle (PILO 350)	514,9 ± 26,6 (18)	819,5 ± 74,1 (18)
PIP 50 + PILO 350	519,8 ± 21,8 (16)	854,4 ± 55,2 (16)
PIP 100 + PILO 350	460,7 ± 21,7 (14)	707,1 ± 57,9 (14)

Os valores representam média ± erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*). Em parêntesis encontra-se o número de animais utilizados em cada grupo experimental. PILO 350 = pilocarpina 350 mg/Kg, i.p., PIP 50 + PILO 350 = piplartina 50 mg/Kg, i.p. + pilocarpina 350 mg/Kg, i.p. e PIP 100 + PILO 350 = piplartina 100 mg/Kg, i.p. + pilocarpina 350 mg/Kg, i.p.

- **Convulsões induzidas por PTZ:**

O efeito da piplartina sobre as convulsões foi estudado neste teste, que utilizou como agente pró-convulsivante o pentilenotetrazol (PTZ 80 mg/Kg, i.p.) e como parâmetros de avaliação, a latência para o aparecimento da primeira convulsão e o tempo de morte (ambos em segundos). Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.1.2, onde se observa que o diazepam (2 mg/Kg, i.p.) aumentou, de forma significativa, a latência para a primeira convulsão e o tempo de morte em 94% e 58%, respectivamente, em relação aos animais tratados com pentilenotetrazol (80 mg/Kg, i.p.). Sobre a latência da primeira convulsão, a piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) não apresentou diferença em relação ao grupo de animais tratados com pentilenotetrazol (80 mg/Kg, i.p.); sobre o tempo de morte, a piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) reduziu, de forma significativa, o parâmetro em questão em 43% e 45%, respectivamente, em relação ao grupo tratado com pentilenotetrazol (80 mg/Kg, i.p.) e 76% e 77%, respectivamente, em relação ao grupo tratado com diazepam (2 mg/Kg, i.p.).

Para o estudo da potencialização, uma dose baixa de pentilenotetrazol (40 mg/Kg, i.p.) foi administrada de forma isolada ou associada à imipramina (30 mg/Kg, i.p.) e à piplartina (100 mg/Kg, i.p.). O pentilenotetrazol (40 mg/Kg, i.p.), isoladamente, aumentou, de forma significativa, a latência para a primeira convulsão e o tempo de morte em 94% e 58%, respectivamente, em relação ao grupo de animais tratados com pentilenotetrazol (80 mg/Kg, i.p.). Este efeito, entretanto, não diferiu do ponto de vista estatístico, daquele observado no grupo de animais tratados com diazepam (2 mg/Kg, i.p.). Por sua vez, as associações piplartina (100 mg/Kg, i.p.) + pentilenotetrazol (40 mg/Kg, i.p.) e imipramina (30 mg/Kg, i.p.) + pentilenotetrazol (40 mg/Kg, i.p.)

reduziram, de forma significativa, a latência da primeira convulsão em relação ao grupo de animais tratados apenas com pentilenotetrazol (40 mg/Kg, i.p.) em 40% e 44%, respectivamente. As associações, no entanto, não promoveram qualquer alteração sobre o tempo de morte.

4. RESULTADOS

Tabela 4.1.2. Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência da primeira convulsão e sobre o tempo de morte de camundongos tratados com pentilenotetrazol (80 mg/Kg, i.p.).

Grupos	Latência 1ª Convulsão (segundos)	Latência de Morte (segundos)
PTZ 80	98,8 ± 10,6 (18)	740,1 ± 138,1 (18)
PTZ 40	1.727,8 ± 72,1 ^a (18)	1800 ± 0,0 ^a (18)
DZP 2 + PTZ 80	1.688,5 ± 11,4 ^a (14)	1800 ± 0,0 ^a (14)
PIP 50 + PTZ 80	85,3 ± 7,8 (16)	420,6 ± 51,2 ^a (16)
PIP 100 + PTZ 80	77,0 ± 6,4 (17)	402,7 ± 81,8 ^a (14)
IMI 30 + PTZ 40	934,2 ± 189,5 ^b (18)	1800 ± 0,0 ^a (18)
PIP 100 + PTZ 40	956,0 ± 193,4 ^b (16)	1800 ± 0,0 ^a (18)

Os valores representam média ± erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a” e “b”, vs PTZ 80 e PTZ 40, respectivamente, quando $p < 0,05$. Em parêntesis encontra-se o número de animais utilizados em cada grupo experimental. PTZ 80 = pentilenotetrazol 80 mg/Kg, i.p., PTZ 40 = pentilenotetrazol 40 mg/Kg, i.p., DZP 2 + PTZ 80 = diazepam 2 mg/Kg, i.p. + pentilenotetrazol 80 mg/Kg, i.p., PIP 50 + PTZ 80 = piplartina 50 mg/Kg, i.p. + pentilenotetrazol 80 mg/Kg, i.p., PIP 100 + PTZ 80 = piplartina 100 mg/Kg, i.p. + pentilenotetrazol 80 mg/Kg, i.p., IMI 30 + PTZ 40 = imipramina 30 mg/Kg, i.p. + pentilenotetrazol 40 mg/Kg, i.p. e PIP 100 + PTZ 40 = piplartina 100 mg/Kg, i.p. + pentilenotetrazol 40 mg/Kg, i.p.

- **Esquiva-passiva:**

O efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a memória recente e tardia de camundongos foi testado no aparelho da esquiva passiva, sobre a latência de entrada no compartimento escuro do aparelho, em 15 minutos e 24 horas, respectivamente, após o tratamento com a droga.

De acordo com a tabela 4.1.3. pode-se observar que a piplartina, em ambas as doses, não alterou o tempo de entrada em 15 minutos e em 24 horas, em relação ao grupo controle. De forma contrária, a escopolamina (10 mg/Kg, i.p.), reduziu, de forma significativa, o tempo de entrada em 15 minutos e em 24 horas em 64% e 38%, respectivamente, relação ao grupo controle.

4. RESULTADOS

Tabela 4.1.3. Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência de entrada (em segundos) dos camundongos no compartimento escuro do aparelho da esQUIVA passiva, em 15 minutos e 24 horas após o tratamento com piplartina.

Grupos	Latência em 15 minutos (segundos)	Latência em 24 Horas (segundos)
CONT	266,56 ± 20,18 (14)	299,99 ± 0,007 (14)
ESC 10	94,91 ± 10,61 ^a (14)	183,47 ± 8,81 ^a (14)
PIP 50	276,47 ± 15,00 ^b (14)	250,86 ± 21,68 ^b (14)
PIP 100	283,54 ± 16,45 ^b (13)	259,79 ± 26,79 ^b (13)

Os valores representam média ± erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a” e “b” vs CONT e ESC 10, respectivamente, quando $p < 0,05$. Em parêntesis encontra-se o número de animais utilizados em cada grupo experimental. CONT = controle, ESC 10 = escopolamina 10 mg/Kg, i.p., PIP 50 = piplartina 50 mg/Kg, i.p. e PIP 100 = piplartina 100 mg/Kg, i.p.

- **Labirinto em cruz elevado:**

O efeito ansiolítico da pipartina foi estudado neste modelo, através da análise de dois parâmetros comportamentais: o número de entradas (NEBA) e o tempo de permanência (TPBA – em segundos) dos animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.

Na figura 4.1.4. tem-se o efeito da pipartina sobre o TPBA de camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado [CONT: $51,6 \pm 4,8$ (20), DZP 1: $219,1 \pm 9,8$ (17), PIP 50: $105,0 \pm 12,6$ (13), PIP 100: $154,2 \pm 9,9$ (15), DZP 1 + FLU 2,5: $101,0 \pm 6,9$ (11) e PIP 100 + FLU 2,5: $65,1 \pm 8,8$ (09)]. Observa-se que o diazepam (1 mg/Kg, i.p.) aumentou, de forma significativa, o parâmetro em questão em relação ao grupo controle em 76%. Este efeito, entretanto, foi revertido na presença do flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.), que reduziu, de forma significativa, o TPBA dos camundongos tratados com a associação diazepam (1 mg/Kg, i.p.) + flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.), em relação ao grupo que recebeu apenas o diazepam (1 mg/Kg, i.p.) em 53%. A pipartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.), por sua vez, aumentou, de forma significativa e dose-dependente, o TPBA de camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado, em 50% e 66%, respectivamente, em relação ao grupo controle. Na presença do flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.), entretanto, o TPBA dos camundongos tratados com pipartina (100 mg/Kg, i.p.) reduziu, de forma significativa em 57%, em relação ao grupo que recebeu apenas pipartina (100 mg/Kg, i.p.).

Na figura 4.1.5 tem-se o efeito da pipartina sobre o NEBA de camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado [CONT: $3,8 \pm 0,3$ (20), DZP 1: $9,6 \pm 1,2$ (17), PIP 50: $7,6 \pm 0,5$ (13), PIP 100: $6,2 \pm$

0,5 (15), DZP 1 + FLU 2,5: $9,2 \pm 0,4$ (10) e PIP 100 + FLU 2,5: $4,4 \pm 0,6$ (09)]. Nela pode-se observar que o diazepam (1,0 mg/Kg, i.p.) e a pipartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) aumentaram, de forma significativa, o número de entradas dos camundongos nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em 60%, 49% e 39%, respectivamente, em relação ao grupo controle. As associações diazepam (1 mg/Kg, i.p.) + flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.) e pipartina (100 mg/Kg, i.p.) + flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.), entretanto, não mostraram diferença significativa em relação aos grupos tratados apenas com diazepam (1 mg/Kg, i.p.) e pipartina (100 mg/Kg, i.p.), respectivamente.

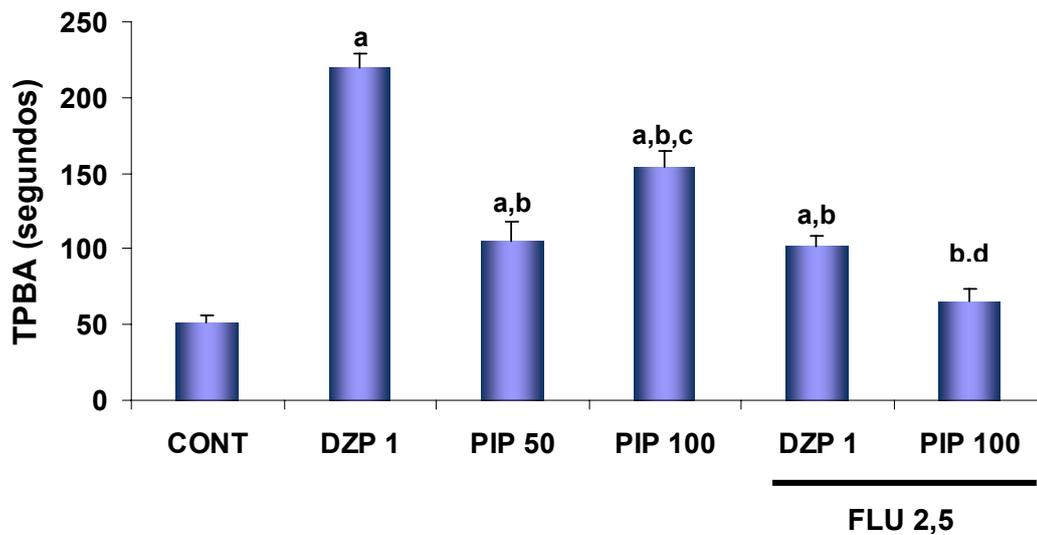


Figura 4.1.4. Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos (TPBA) do labirinto em cruz elevado. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a”, “b”, “c” e “d” vs CONT, DZP 1, PIP 50, PIP 100, respectivamente, quando $p < 0,05$. CONT = controle, DZP 1 = diazepam 1 mg/Kg, i.p., PIP 50 = piplartina 50 mg/Kg, i.p., PIP 100 = piplartina 100 mg/Kg, i.p. e FLU 2,5 = flumazenil 2,5 mg/Kg, i.p.

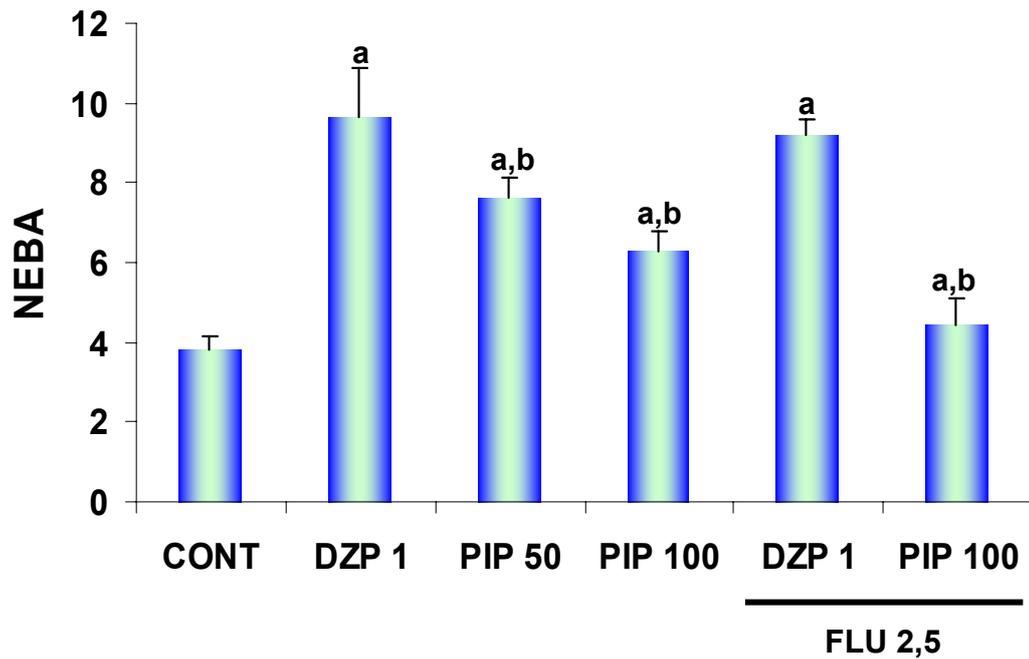


Figura 4.1.5. Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o número de entradas dos camundongos nos braços abertos (NEBA) do labirinto em cruz elevado. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a”, “b” e “c” vs CONT, DZP 1 e PIP 100, respectivamente, quando $p < 0,05$. CONT = controle, DZP 1 = diazepam 1 mg/Kg, i.p., PIP 50 = piplartina 50 mg/Kg, i.p., PIP 100 = piplartina 100 mg/Kg, i.p. e FLU 2,5 = flumazenil 2,5 mg/Kg, i.p.

- **Nado forçado:**

O efeito antidepressivo da piplartina foi estudado no teste do nado forçado, através da análise do tempo de imobilidade (em segundos) do animal no cilindro com água (tabela 4.1.4.). As drogas antidepressivas imipramina (IMI 30 mg/Kg, i.p.) e paroxetina (PAR 10 mg/Kg, i.p.) e a piplartina (PIP 50 e 100 mg/Kg, i.p.) reduziram, de forma significativa, o tempo de imobilidade dos animais tratados em 57%, 55%, 61% e 83%, respectivamente, em relação ao grupo controle. No caso da piplartina, o efeito manifestou-se de forma dose-dependente.

Para o estudo de potencialização, doses baixas de cada um dos compostos acima citados foram administradas de forma isolada e associada. As drogas antidepressivas imipramina (6 mg/Kg, i.p.) e paroxetina (1 mg/Kg, i.p.) e a piplartina (20 mg/Kg, i.p.), isoladamente, não apresentaram diferença de efeito, quando comparados entre si ou ao grupo controle. A associação IMI 6 + PIP 20, por sua vez, reduziu, de forma significativa, o tempo de imobilidade dos animais no cilindro em 53%, 53% e 57%, respectivamente, em relação aos grupos controle, imipramina (6 mg/Kg, i.p.) e piplartina (20 mg/Kg, i.p.). A associação paroxetina (1 mg/Kg, i.p.) + piplartina (20 mg/Kg, i.p.), entretanto, não mostrou diferenças significativas em relação aos grupos controle, paroxetina (1 mg/Kg, i.p.) e piplartina (20 mg/Kg, i.p.).

4. RESULTADOS

Tabela 4.1.4. Efeito da piplartina (20, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) isolada ou associada à imipramina (6 mg/Kg, i.p.) ou à paroxetina (1,0 mg/Kg, i.p.) sobre o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao teste do nado forçado.

Grupos	Tempo de Imobilidade (segundos)
CONT	147,0 ± 14,5 (12)
IMI 6	146,0 ± 14,0 (12)
IMI 30	62,9 ± 9,9 ^{a,b} (12)
PAR 1	113,9 ± 10,6 (10)
PAR 10	64,8 ± 8,1 ^{a,d} (10)
PIP 20	158,3 ± 14,4 (12)
PIP 50	57,3 ± 7,5 ^{a,f} (19)
PIP 100	24,1 ± 3,1 ^{a,f,g} (17)
PIP 20 + IMI 6	67,8 ± 10,1 ^{a,b,f} (12)
PIP 20 + PAR 1	119,8 ± 12,7 ^e (10)

Os valores representam média ± erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a”, “b”, “c”, “d”, “e”, “f” e “g” vs CONT, IMI 6, IMI 30, PAR 1, PAR 10, PIP 20 e PIP 50, respectivamente, quando $p < 0,05$. Em parêntesis encontra-se o número de animais utilizados em cada grupo experimental. CONT = controle, IMI 6 = imipramina 6 mg/Kg, i.p., IMI 30 = imipramina 30 mg/Kg, i.p., PAR 1 = paroxetina 1 mg/Kg, i.p., PAR 10 = paroxetina 10 mg/Kg, i.p., PIP 20 = piplartina 20 mg/Kg, i.p., PIP 50 = piplartina 50 mg/Kg, i.p., PIP 100 = piplartina 100 mg/Kg, i.p., PIP 20 + IMI 6 = piplartina 20 mg/Kg, i.p. + imipramina 6 mg/Kg, i.p. e PIP 20 + PAR 1 = piplartina 20 mg/Kg, i.p. + paroxetina 1 mg/Kg, i.p.

- **Potencialização do tempo de sono barbitúrico:**

O efeito sedativo-hipnótico da piplartina foi estudado neste teste, através da avaliação da latência (tempo de indução do sono, em segundos) e da duração da perda do reflexo postural (reflexo de endireitamento – duração do sono, em segundos) dos animais, como pode ser observado na figura 4.1.6. Para a latência da perda do reflexo postural dos grupos experimentais [CONT: $203,0 \pm 16,2$ (13), DZP 2: $68,4 \pm 4,5$ (11), PIP 50: $258,2 \pm 50,2$ (13) e PIP 100: $397,6 \pm 57,2$ (13)] é evidenciado o efeito do diazepam (2 mg/Kg, i.p.) ao reduzir, de maneira significativa, o parâmetro em questão, em 66% em relação ao grupo controle. A dose de 50 mg/Kg de piplartina, entretanto, não apresentou efeito; de forma contrária, a dose de 100 mg/Kg de piplartina, aumentou, de forma significativa, a latência da perda do reflexo postural em 48%, quando comparada ao grupo controle.

A duração da perda do reflexo postural dos grupos experimentais [CONT: $1194,3 \pm 250,8$ (13), DZP: $3410,0 \pm 731,5$ (11), PIP 50: $408,9 \pm 64,1$ (13) e PIP 100: $1052,5 \pm 209,3$ (13)] é apresentada na mesma figura. Nesta pode-se observar que o diazepam (2 mg/Kg, i.p.) manteve o padrão de efeito descrito no parágrafo anterior, isto é, aumentou a duração da perda do reflexo postural, de forma significativa em 64%, em relação ao grupo controle. De forma contrária, a piplartina 50 mg/Kg reduziu significativamente o parâmetro em questão em 64% em relação ao controle; com o aumento da dose para 100 mg/Kg, observou-se um aumento gradual do efeito, que não diferiu, do ponto de vista estatístico, do grupo controle.

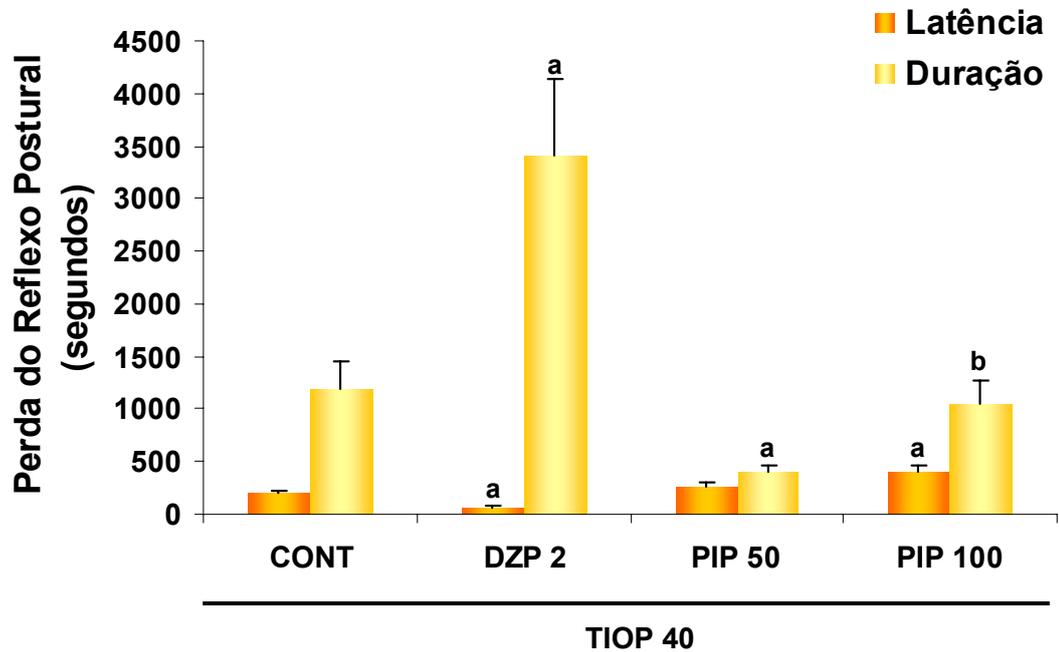


Figura 4.1.6. Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência e a duração da perda do reflexo postural (ambos em segundos) de camundongos tratados com tiopental (40 mg/Kg, i.p.). As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a”, e “b” vs CONT, PIP 50, respectivamente, quando $p < 0,05$. CONT = controle, DZP 2 = diazepam 2 mg/Kg, i.p., PIP 50 = piplartina 50 mg/Kg, i.p., PIP 100 = piplartina 100 mg/Kg, i.p. e TIOP 40 = tiopental 40 mg/Kg, i.p.

- **Potencialização do tempo de sono etéreo:**

O efeito sedativo-hipnótico da piplartina foi estudado também neste teste, através da análise dos mesmos parâmetros apresentados no tópico anterior, isto é, a latência e a duração da perda do reflexo postural (reflexo de endireitamento) dos animais, ambos apresentados na figura 4.1.7. Através da análise do primeiro parâmetro [CONT: $25,7 \pm 0,8$ (10), DZP 2: $18,7 \pm 0,7$ (10), PIP 50: $45,2 \pm 4,1$ (14) e PIP 100: $25,0 \pm 1,0$ (14)], pode-se observar que apenas a piplartina 50 mg/Kg aumentou a latência da perda do reflexo postural dos animais, de forma significativa, em 43% em relação ao grupo controle.

O efeito da piplartina sobre a duração da perda do reflexo postural [CONT: $156,6 \pm 6,3$ (10), DZP 2: $314,6 \pm 28,3$ (10), PIP 50: $187,7 \pm 7,7$ (14) e PIP 100: $237,0 \pm 14,7$ (14)] é mostrado na mesma figura. Nela, observa-se que os grupos tratados com diazepam e piplartina 100 mg/Kg aumentaram, de forma significativa, a duração da perda do reflexo postural em 50% e 33%, respectivamente, em relação ao grupo controle. Este mesmo efeito, entretanto, não foi observado no grupo tratado com piplartina 50 mg/Kg.

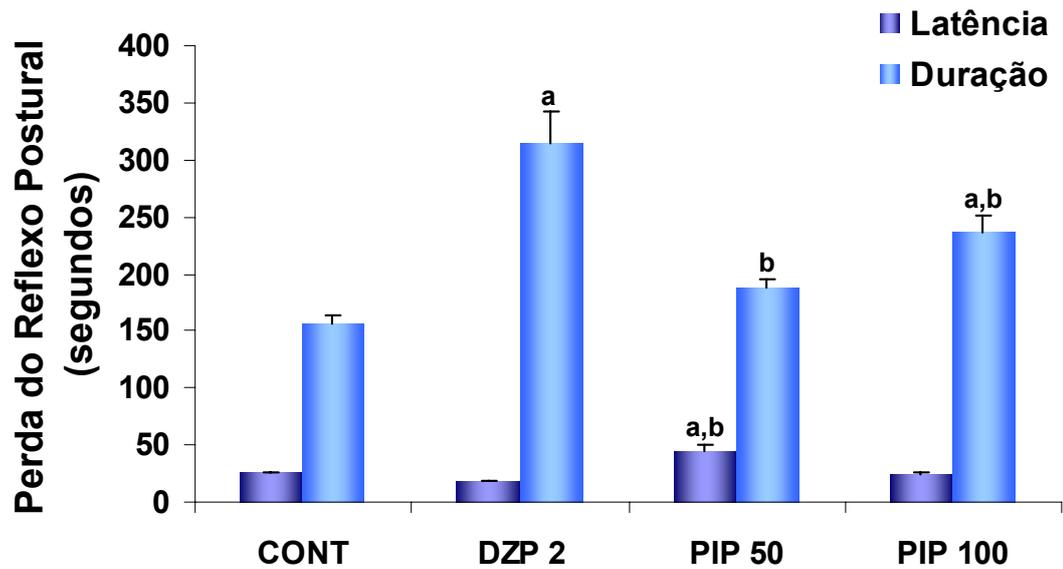


Figura 4.1.7. Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência e a duração da perda do reflexo postural (ambos em segundos) de camundongos introduzidos em uma câmara fechada, saturada com éter etílico. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a” e “b” vs CONT e DZP 2, respectivamente, quando $p < 0,05$. CONT = controle, DZP 2 = diazepam 2 mg/Kg, i.p., PIP 50 = piplartina 50 mg/Kg, i.p. e PIP 100 = piplartina 100 mg/Kg, i.p.

- ***Rota rod:***

Neste teste, a piplartina, em ambas as doses (50 e 100 mg/Kg, i.p.), não apresentou efeito algum sobre a coordenação motora (tempo de permanência sobre a barra giratória – TP e o número de quedas – NQ) dos camundongos submetidos ao *rota rod*, como pode ser observado na tabela 4.1.5.

4. RESULTADOS

Tabela 4.1.5. Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a coordenação motora de camundongos submetidos ao teste do *rota rod*.

Grupos	Número de Quedas	Tempo de Permanência (segundos)
CONT	0,0 (20)	60 (20)
PIP 50	0,0 (12)	60 (12)
PIP 100	0,0 (15)	60 (15)

Os dados representam a média dos valores. Em parêntesis encontra-se o número de animais utilizados em cada grupo experimental. CONT = controle, PIP 50 = piplartina 50 mg/Kg, i.p. e PIP 100 = piplartina 100 mg/Kg, i.p.

- **Tremores induzidos por oxotremorina:**

Neste teste, a intensidade do tremor induzido por oxotremorina (OXO 0,5 mg/Kg, i.p.) foi o parâmetro avaliado. A figura 4.1.8. mostra que a piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) e a atropina (ATRO) reduziram a intensidade dos tremores, de forma significativa, em 100%, 16% e 31%, respectivamente, em relação ao grupo controle: CONT: $2,7 \pm 0,06$ (18), ATRO: 0,0 (09), PIP 50: $2,2 \pm 0,1$ (18) e PIP 100: $1,8 \pm 0,1$ (18).

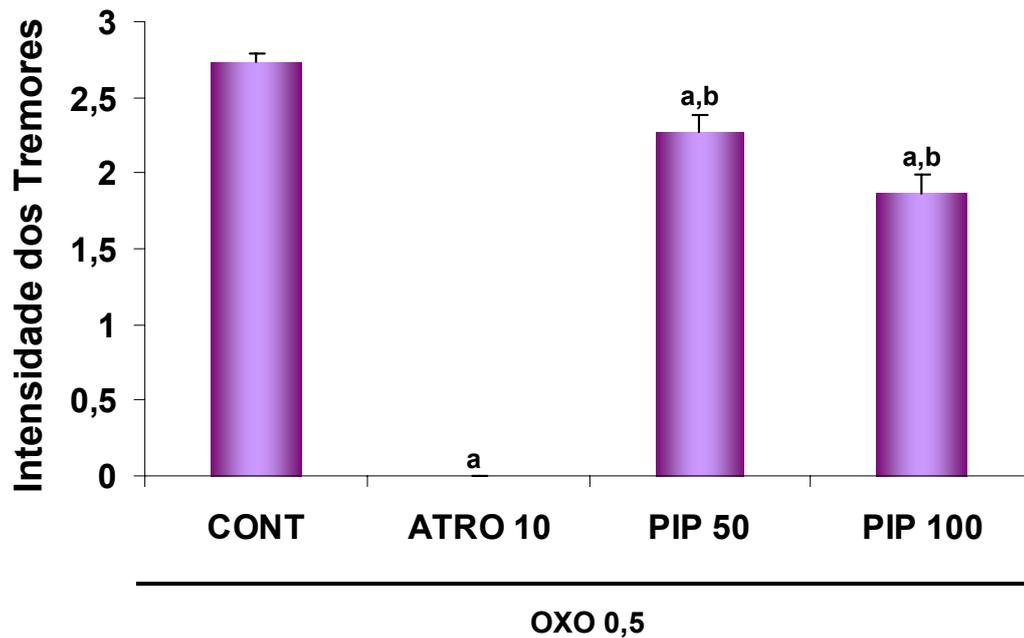


Figura 4.1.8. Efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a intensidade dos tremores induzidos por oxotremorina (0,5 mg/Kg, i.p.) em camundongos. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a” e “b” vs CONT e ATRO 10, respectivamente, quando $p < 0,05$. CONT = controle, ATRO 10 = atropina 10 mg/Kg, i.p., PIP 50 = piplartina 50 mg/Kg, i.p., PIP 100 = piplartina 100 mg/Kg, i.p. e OXO 0,5 = oxotremorina 0,5 mg/Kg, i.p.

4.2. ESTUDO DOS EFEITOS NEUROBIOQUÍMICOS DA PIP:

- **Teste de viabilidade celular:**

Neste teste, foi estudado o efeito da piplartina (1, 5, 50 e 100 µg/mL), isoladamente ou associada à 6-OHDA (10 µg/mL), sobre a viabilidade de células mesencefálicas de embriões de rata, cultivadas *in vitro*; o parâmetro usado para tal finalidade foi a concentração de MTT. Como pode ser observado na tabela 4.2.1., a adição de 6-OHDA (10 µg/mL) ao meio de cultura reduziu, de forma significativa, a absorvância de MTT formazan em 58% em relação ao grupo controle. De forma contrária, não foi observada diferença significativa na absorvância de MTT formazan entre o grupo controle e os grupos tratados com piplartina (1, 5 e 50 µg/mL). No grupo tratado com piplartina (100 µg/mL), entretanto, observa-se uma redução significativa da absorvância de MTT formazan, em 38% em relação ao grupo controle. Tal efeito não diferiu do ponto de vista estatístico, daquele observado no grupo tratado com 6-OHDA (10 µg/mL).

Quando associada à 6-OHDA (10 µg/mL), a piplartina (1, 5 e 50 µg/mL) reduziu, de forma significativa, a absorvância de MTT formazan em 23%, 20% e 28%, respectivamente, em relação ao grupo controle. Tal redução, entretanto, ainda diferiu estatisticamente do valor observado no grupo tratado com 6-OHDA (10 µg/mL). No grupo tratado com a associação piplartina (100 µg/mL) + 6-OHDA (10 µg/mL), também pode ser observada uma redução significativa da absorvância de MTT formazan em relação ao grupo controle de 48%. Tal efeito, entretanto, não diferiu do ponto de vista estatístico, daquele observado no grupo tratado com 6-OHDA (10 µg/mL).

4. RESULTADOS

Tabela 4.2.1. Efeito da piplartina (1, 5, 50 e 100 µg/mL) isoladamente ou associada à 6-OHDA (10 µg/mL), sobre concentração de MTT formazan em cultura de células mesencefálicas de embriões de rata.

Grupos	MTT formazan (absorbância em 595 nm)
CONT	0,4219 ± 0,0185 (05)
6-OHDA 10	0,1771 ± 0,0226 ^a (03)
PIP 1	0,3743 ± 0,0434 ^b (03)
PIP 5	0,3728 ± 0,0245 ^b (03)
PIP 50	0,3394 ± 0,0287 ^b (03)
PIP 100	0,2577 ± 0,0168 ^a (03)
PIP 1 + 6-OHDA 10	0,3219 ± 0,0254 ^{a,b} (03)
PIP 5 + 6-OHDA 10	0,3352 ± 0,0077 ^b (03)
PIP 50 + 6-OHDA 10	0,3001 ± 0,0115 ^{a,b} (03)
PIP 100 + 6-OHDA 10	0,2186 ± 0,0169 ^a (03)

Os valores representam média ± erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a” e “b” vs CONTR e 6-OHDA 10, respectivamente, quando $p < 0,05$. Em parêntesis encontra-se o número de replicatas de cada grupo experimental. CONT = controle, 6-OHDA 10 = 6-hidroxidopamina 10 µg/mL, PIP 1 = piplartina 1 µg/mL, PIP 5 = piplartina 5 µg/mL, PIP 50 = piplartina 50 µg/mL, PIP 100 = piplartina 100 µg/mL, PIP 1 + 6-OHDA 10 = piplartina 1 µg/mL + 6-hidroxidopamina 10 µg/mL, PIP 5 + 6-OHDA 10 = piplartina 5 µg/mL + 6-hidroxidopamina 10 µg/mL, PIP 50 + 6-OHDA 10 = piplartina 50 µg/mL + 6-hidroxidopamina 10 µg/mL e PIP 100 + 6-OHDA 10 = piplartina 100 µg/mL + 6-hidroxidopamina 10 µg/mL,

- **Atividade anti-oxidante da piplartina frente ao radical DPPH:**

Este ensaio avaliou o efeito anti-oxidante da piplartina frente ao radical DPPH. Como pode ser observado na tabela 4.2.2., a piplartina, nas concentrações estudadas, não apresentou diferença de efeito do ponto de vista estatístico em relação ao grupo controle, ao contrário da vitamina E, que reduziu a concentração de DPPH no meio reacional em 96% em relação ao controle.

4. RESULTADOS

Tabela 4.2.2. Efeito da piplartina (0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 5 e 50 µg/mL) frente ao radical DPPH.

%RSA (<i>radical scavenging activity</i>)	
CONT	3,072 ± 0,05126 (06)
VIT E 75	0,09563 ± 0,008544 ^a (06)
PIP 0,05	3,251 ± 0,08275 ^b (06)
PIP 0,1	3,233 ± 0,04324 ^b (06)
PIP 0,2	3,249 ± 0,05915 ^b (06)
PIP 0,5	3,312 ± 0,05564 ^b (06)
PIP 5	3,171 ± 0,05765 ^b (06)
PIP 50	3,214 ± 0,06903 ^b (06)

Os valores representam média ± erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a” e “b” vs CONT e Vitamina E 75 µg/mL, respectivamente, quando $p < 0,05$. Em parêntesis encontra-se o número de experimentos de cada grupo experimental. CONT = controle, VIT E 75 = vitamina E 75 µg/mL, PIP 0,05 = piplartina 0,05 µg/mL, PIP 0,1 = piplartina 0,1 µg/mL, PIP 0,2 = piplartina 0,2 µg/mL, PIP 0,5 = piplartina 0,5 µg/mL, PIP 5 = piplartina 5 µg/mL e PIP 50 = piplartina 50 µg/mL.

- **Atividade anti-oxidante da piplartina frente à peroxidação lipídica induzida por choque térmico (dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS, em homogenatos de tecido cerebral):**

A figura 4.2.1. apresenta o efeito da piplartina sobre a concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em homogenatos de tecido cerebral, geradas a partir da peroxidação lipídica induzida por choque térmico. Como pode ser observado, o grupo submetido ao choque térmico (*stress* – STR) apresentou um aumento significativo da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico de 23%, em relação ao grupo controle: CONT: $0,190 \pm 0,015$ (13) e STR: $0,249 \pm 0,014$ (15). A piplartina, nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ [PIP 25: $0,166 \pm 0,010$ (13), PIP 50: $0,199 \pm 0,013$ (14) e PIP 100: $0,202 \pm 0,019$ (13)] apresentou uma redução na concentração das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico de 33%, 20% e 18%, respectivamente, em relação ao grupo *stress*.

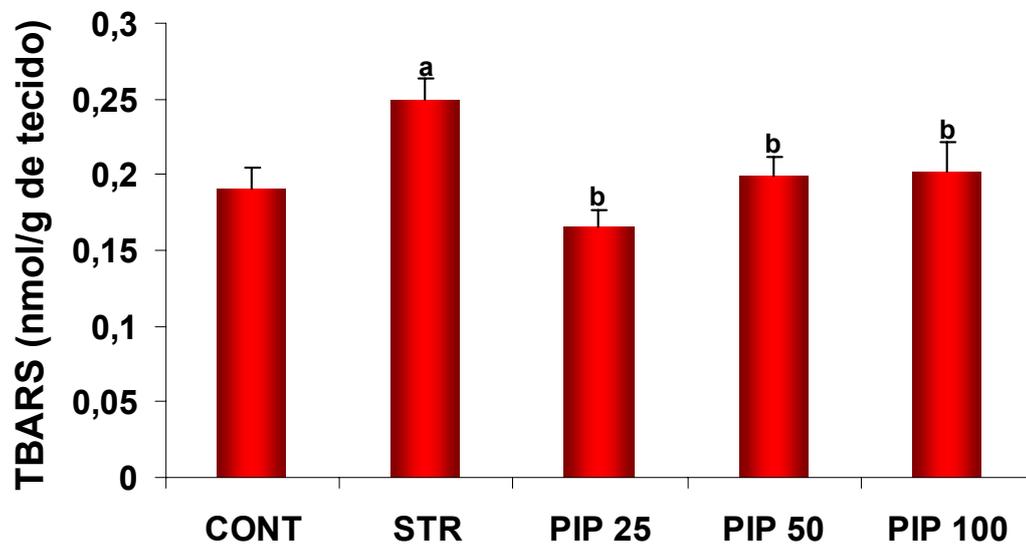


Figura 4.2.1. Efeito da piplartina (25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre a concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), geradas pela peroxidação lipídica induzida por choque térmico, em homogenatos de tecido cerebral de camundongos. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a” e “b” vs CONT e SRT, respectivamente, quando $p < 0,05$. CONT = controle, STR = *stress*, PIP 25 = piplartina 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PIP 50 = piplartina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e PIP 100 = piplartina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- **Atividade anti-oxidante da piplartina frente à peroxidação lipídica induzida por choque térmico (dosagem de nitrito em homogenatos de tecido cerebral):**

A figura 4.2.2. apresenta o efeito da piplartina sobre a concentração de nitrito em homogenatos de tecido cerebral, gerado a partir da peroxidação lipídica induzida por choque térmico. Como pode ser observado, o grupo submetido ao choque térmico (*stress* – STR) apresentou um aumento significativo da concentração de nitrito de 39% em relação ao grupo controle: CONT: $19,1 \pm 0,9$ (12) e STR: $31,6 \pm 2,0$ (13). A piplartina, nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ [PIP 25: $21,6 \pm 1,7$ (13), PIP 50: $23,8 \pm 2,8$ (12)], por sua vez reduziu, de forma significativa, a concentração de nitrito em 31% e 24%, respectivamente, em relação ao grupo *stress*. A concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de piplartina [PIP 100: $30,9 \pm 2,2$ (13)], de forma contrária, promoveu um aumento significativo na concentração de nitrito de 38% em relação ao grupo controle. Este valor, entretanto, não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo *stress*.

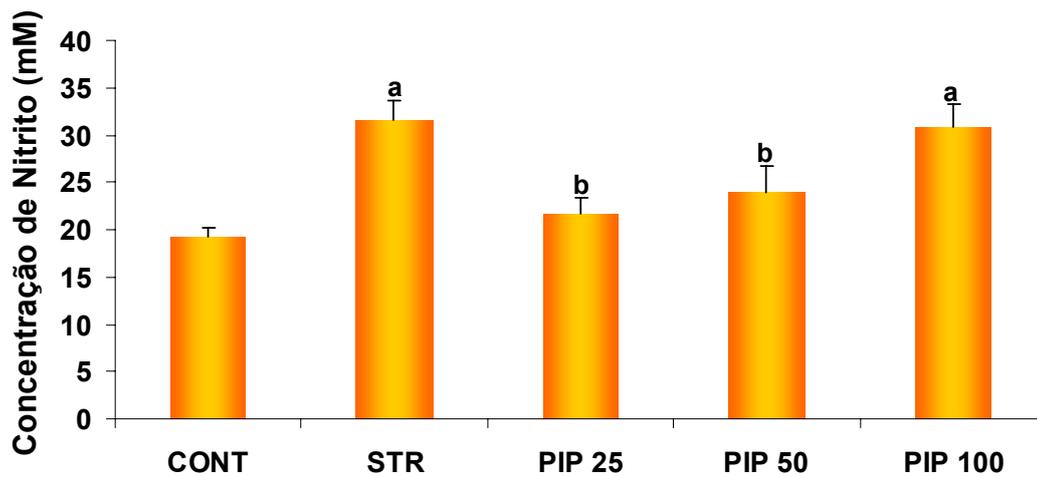


Figura 4.2.2. Efeito da piplartina (25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre a concentração de nitrito, gerado pela peroxidação lipídica induzida por choque térmico, em homogenatos de tecido cerebral de camundongos. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a” e “b” vs CONT e SRT, respectivamente, quando $p < 0,05$. CONT = controle, STR = *stress*, PIP 25 = piplartina 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PIP 50 = piplartina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e PIP 100 = piplartina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- **Determinação da concentração de monoaminas e metabólitos em homogenatos de tecido cerebral de camundongos pré-tratados com piplartina:**

A tabela 4.2.3. mostra que a administração aguda de piplartina (100 mg/Kg, i.p.) promoveu um aumento significativo nos níveis de NA (83%), HVA (61%), DA (45%), DOPAC (56%) e 5-HIAA (56%) em relação aos seus respectivos controles. A concentração de 5-HT, no entanto, mostrou-se significativamente reduzida (81%) no grupo tratado com piplartina (100 mg/Kg, i.p.), quando comparado ao seu grupo controle.

4. RESULTADOS

Tabela 4.2.3. Efeito do pré-tratamento com piplartina (100 mg/Kg, i.p.) sobre a concentração de monoaminas e metabólitos em corpo estriado de camundongos.

Concentração (ng/g de tecido)		
	CONT	PIP 100
NA	461,9 ± 79,6 (09)	747,5 ± 217,7 ^a (11)
HVA	360,2 ± 69,0 (09)	947,7 ± 103,3 ^a (10)
DA	1.054,9 ± 119,1 (12)	1.953,4 ± 321,8 ^a (12)
DOPAC	386,6 ± 36,7 (12)	892,7 ± 81,5 ^a (12)
5-HT	780,4 ± 127,6 (09)	141,5 ± 35,8 (07)
5-HIAA	376,4 ± 43,4 (10)	873,8 ± 80,2 ^a (10)

Os valores representam média ± erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*); “a” vs CONT, quando $p < 0,05$. Em parêntesis encontra-se o número de amostras utilizadas em cada grupo experimental. CONT = controle e PIP 100 = piplartina 100 mg/Kg, i.p.

- **Determinação da densidade de receptores muscarínicos (m1 + M2) em homogenatos de corpo estriado de camundongos pré-tratados com PIP:**

No ensaio de *binding*, a pirlartina (100 mg/Kg, i.p.) não promoveu qualquer alteração na densidade de receptores muscarínicos (M1 + M2) do corpo estriado de camundongos, em comparação ao grupo controle (tabela 4.2.4).

Tabela 4.2.4. Efeito do pré-tratamento com piplartina (100 mg/Kg, i.p.) sobre a densidade de receptores muscarínicos (M1 + M2) em corpo estriado de camundongos.

Densidade de receptores muscarínicos (M1 + M2)	
Bmax (fmoles/mg de proteína)	
CONT	497,8 ± 46,4 (06)
PIP 100	572,1 ± 77,4 (06)

Os valores representam média ± erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls (teste *post hoc*). Em parêntesis encontra-se o número de amostras (duplicatas) utilizadas em cada grupo experimental. CONT = controle e PIP 100 = piplartina 100 mg/Kg, i.p.

Drogas que alteram as funções mentais e em especial as plantas, exercem grande fascínio sobre os seres humanos, muitas vezes cercadas por superstições místicas, pensamentos mágicos e rituais religiosos; dessa forma, dentre todas as plantas usadas pelo homem, aquelas capazes de alterar a consciência e as modalidades sensoriais têm recebido uma consideração especial. Entretanto, o desafio de tentar esclarecer os mecanismos de ação sobre o comportamento, humor e a cognição, tem sido ignorado ou encarado como baixa prioridade. Substâncias derivadas de plantas, tais como a cafeína, a efedrina, os canabinóides, os opióides e a reserpina são alguns exemplos de compostos que se comprovou ter efeitos sobre o SNC. Contudo, para a maioria das plantas que se sabe possuir alguma ação sobre o SNC, ainda não se conhece seus princípios ativos. As pesquisas realizadas nesse sentido, como para avaliar propriedades analgésicas, ansiolíticas e antidepressivas, estão em etapas farmacológicas iniciais, consistindo basicamente na administração de extratos purificados dessas plantas em animais. Esses testes pré-clínicos freqüentemente confirmam ou não a utilização popular dessas plantas. (Carlini, 2003).

A análise fitoquímica de espécies de *Piper* demonstrou a ocorrência de vários compostos químicos, muitos deles exibindo atividades biológicas (Reigada, 2007). Dentre esses componentes, podemos citar como exemplos as amidas insaturadas, os flavonóides, os lignanos, os ésteres de cadeia curta e longa, os esteróides e os alcalóides (Morais et al., 2007). Os alcalóides representam um extenso grupo de metabolitos secundários, com diversas estruturas, distribuições na natureza e importantes atividades biológicas; são compostos cíclicos que contém um átomo de nitrogênio em um estado negativo de oxidação, de limitada distribuição nos organismos vivos.

Geralmente, a função dos metabólitos secundários nos vegetais não é totalmente esclarecida. Em relação aos alcalóides, sua função nas plantas é a proteção contra animais herbívoros e parasitas (Grycova et al., 2007). Contudo, devido às propriedades farmacológicas dos alcalóides, esses compostos têm sido usados na medicina como agentes anti-câncer, antimaláricos, analgésicos e também no tratamento do parkinsonismo, hipertensão e desordens do sistema nervoso central (Rathbone et al., 2002).

Testes de atividade locomotora e exploração em roedores são largamente utilizados na avaliação de agentes psicotrópicos. Para tanto, uma grande variedade de aparatos são utilizados como, por exemplo, o campo aberto (Archer, 1973). O campo aberto é um dos modelos animais mais populares no campo da psicologia. Neste modelo, um animal (usualmente um roedor) é inserido em um ambiente desconhecido, cuja escapatória seja impossibilitada pela presença de paredes laterais que cercam este ambiente (Walsh et al., 1976).

Os efeitos de diferentes tipos de drogas têm sido investigados no modelo do campo aberto, incluindo compostos com efeitos ansiolíticos (benzodiazepínicos, neuropeptídeos e drogas serotoninérgicas), estimulantes (anfetaminas, cocaína), sedativos (neurolépticos) ou indutores de convulsão (drogas epileptogênicas) (Prut et al., 2003). O modelo do campo aberto, portanto, possibilita discutir a especificidade do efeito de uma droga, caso ela seja estimulante, sedativa, ansiolítica ou ansiogênica (Lister, 1987).

O aumento da atividade locomotora pode ser considerado um efeito estimulante, enquanto que a diminuição da atividade vertical

(NR) e horizontal (NC) são relacionadas à sedação (Prut et al., 2003). Dessa forma, o aumento ou a diminuição da atividade motora espontânea fornece uma indicação do nível de excitabilidade do sistema nervoso central (Mansur et al., 1971). A piplartina, nas doses estudadas (50 e 100 mg/Kg, i.p.), não apresentou qualquer alteração sobre o NC dos animais tratados em relação ao grupo controle. No entanto, a alcanida aumentou tanto o NG quanto o NR, sugerindo que a droga possui um efeito estimulante central. Este efeito pode ser o resultado do aumento da concentração de dopamina (DA) e DOPAC no corpo estriado de camundongos, como foi observado no grupo de animais tratados com piplartina (100 mg/Kg, i.p.).

Obeso et al. (2002) afirmam que o sistema dopaminérgico inerva todos os núcleos da base, através da via nigroestriatal e provavelmente exerce um importante controle modulatório dos circuitos neuronais (vias direta e indireta). Os núcleos (caudado, putamen e globo pálido) da base fazem parte de um complexo circuito neuronal organizado em paralelo para integrar atividades de diferentes regiões corticais. As áreas corticais enviam projeções glutamatérgicas ao corpo estriado, que é a principal porta de entrada dos núcleos da base. O corpo estriado envia projeções gabaérgicas a outros núcleos, como o globo pálido e a substância negra reticulada. Esses núcleos modulam o tálamo, que por sua vez envia projeções glutamatérgicas estimulatórias de volta ao córtex, facilitando com maior ou menor intensidade o início do movimento. A modulação mediada pelos núcleos da base ocorre pelo balanço entre dois circuitos que ligam o estriado ao globo pálido, a via direta e a via indireta. A dopamina estimula a via direta e inibe a via indireta. Desta forma ela funciona como um modulador dos núcleos da base, pois quando liberada no corpo estriado facilita o movimento. Isso explica a lentidão de

movimentos e a rigidez muscular na doença de Parkinson, visto que a degeneração dos neurônios nigroestriatais causa a redução dos níveis de dopamina no estriado, e conseqüentemente distúrbios de movimento. Por outro lado, o excesso de dopamina ou a supersensibilização de receptores dopaminérgicos no corpo estriado causa aumento dos movimentos e incoordenação, como no caso da discinesia, causada pelo tratamento com agonistas dopaminérgicos, ou com L-DOPA ou como ocorre na Coreia de Huntington.

Embora vários neurotransmissores possam modular a expressão do comportamento de *grooming*, a dopamina está particularmente envolvida no processo (Drago et al., 1999). Quase todas as espécies de animais passam uma grande parte do tempo em comportamento de *grooming*. Este comportamento ocorre pela estimulação e bloqueio dos sub-tipos de receptores dopaminérgicos (Cromwell et al, 1996). A administração aguda de piplartina (100 mg/Kg, i.p.) aumentou a concentração de dopamina no corpo estriado dos camundongos tratados. O aumento desse neurotransmissor pode, em parte, justificar o aumento do comportamento de *grooming*, observado naquele grupo de animais, quando submetidos ao teste do campo aberto. Outra possibilidade para este efeito reside na interação da droga com receptores dopaminérgicos. Para testar essa hipótese, foi estudado o efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a catalepsia induzida por haloperidol (5 mg/Kg, i.p.).

O teste anteriormente citado fundamenta-se no fato de que algumas espécies de roedores, incluindo ratos e camundongos, quando sob efeito de uma droga neuroléptica típica, como o haloperidol, apresentam intensa rigidez muscular. Os neurolépticos típicos são aqueles compostos que agem bloqueando os receptores

dopaminérgicos D₂ da via mesolímbica, via esta postulada como causadora dos sinais e sintomas positivos das psicoses. Dessa forma, quando os animais são colocados com suas patas dianteiras apoiadas em uma barra horizontal, os mesmos permanecem nessa posição por significativo período de tempo. Esse fenômeno experimental é um método de grande utilidade para triagem de agentes antipsicóticos que, em geral, produzem efeitos extrapiramidais (reações secundárias indesejáveis), sendo que alguns desses sinais, que fazem parte da síndrome neuroléptica induzida por neurolépticos típicos, incluem certa rigidez muscular e postura atípica (Almeida, 2006).

De fato, a administração de haloperidol (5 mg/Kg, i.p.) aos camundongos promoveu a rigidez muscular descrita anteriormente, observada através do aumento tempo de imobilidade do animal na barra suspensa. Este resultado é consistente com outros trabalhos (Bardin et al., 2006; Simon et al., 2000; Wiley et al., 2003) que afirmam que os antipsicóticos suprimem a atividade motora e induzem catalepsia em roedores. A administração de piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.), entretanto, reduziu o tempo de imobilidade dos animais tratados com haloperidol. Isto sugere que a piplartina, além de aumentar a concentração de dopamina no corpo estriado, também possa atuar sobre os receptores dopaminérgicos, revertendo o efeito do haloperidol sobre os receptores D₂.

Os sintomas da ansiedade são comuns na sociedade e, particularmente, nos consultórios médicos (King, 2008). Estas desordens tipicamente persistem por muitos anos e estão associadas ao estresse, à redução da qualidade de vida e ao aumento da morbidade e da mortalidade (Wittchen et al., 2005). Os tratamentos atuais para os distúrbios da ansiedade têm uma eficácia modesta e

muitos pacientes não respondem ou não toleram as intervenções farmacológicas e/ou psicológicas (terapia cognitiva-comportamental) (Garner et al., 2009). Isto tem levado a uma série de investigações científicas com o intuito de descobrir novas estratégias farmacológicas para o tratamento da ansiedade. Para tanto, em se tratando de pesquisa pré-clínica, vários modelos animais são empregados para avaliar o potencial ansiolítico de drogas.

Os modelos animais para o estudo da ansiedade têm tornado possível investigar a relação cérebro-comportamento, possibilitando a compreensão dos fenômenos fisiológicos e patológicos relacionados ao comportamento e suas bases neuropsicobiológicas (van der Staay, 2006). Muitos modelos animais de ansiedade examinam o comportamento natural de camundongos e ratos submetidos a determinadas situações (Rodgers et al, 1997). Essas situações incluem testes de interação social (File et al, 2003), a exposição a um ambiente aversivo (labirinto em cruz elevado) ou aberto (campo aberto) (Garner et al., 2009).

O emprego do campo aberto na avaliação da ansiedade tem sido proposto considerando-se que um aumento na ambulação do animal e a sua maior permanência na região central do aparelho seriam indicativos de uma redução da ansiedade. Esta proposta, entretanto, tem sido criticada por alguns autores pelo fato das medidas avaliadas poderem ser influenciadas por vários fatores como a atividade locomotora e a exploração (File, 1993).

Atualmente, o labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos métodos mais populares, através do qual a ansiedade pode ser medida em roedores (Montgomery, 1958; Pellow et al., 1985). Neste

modelo um rato (ou camundongo) é colocado no centro do labirinto para livre exploração daquele ambiente (Rodgers et al., 1993; Rodgers et al., 1997; Andersen et al., 2000). Sabe-se que a relutância dos roedores em explorar os braços abertos do labirinto é causada mais pelo medo que esses animais têm de espaços abertos, do que pela própria altura do aparelho (Pellow et al., 1985; Falter et al., 1992; Fernandes et al., 1996). Treit et al. (1993) forneceram evidências de que a ausência da proteção lateral nos braços abertos seria mais importante do que a altura, no desencadeamento do medo no LCE, ou seja, o labirinto é um modelo de ansiedade animal baseado no medo inato de que os roedores possuem de ficar em espaços abertos e elevados.

O labirinto em cruz elevado é uma excelente ferramenta para detectar compostos que tenham ação com o complexo receptor GABA_A/Benzodiazepínico. Este teste mostra-se muito sensível para determinar a influência do receptor GABA_A/Benzodiazepínico no processo de ansiedade, visto que, outras drogas como a buspirona, que envolvem receptores serotoninérgicos, apresentam resultados muito variáveis em relação ao modelo citado (Rodgers et al., 1997).

As drogas ansiolíticas (benzodiazepínicos e alguns anticonvulsivantes) estão entre as classes de drogas que modulam alostericamente os receptores para o ácido gama-amino butírico (GABA). O GABA é o neurotransmissor inibitório predominante no sistema nervoso central e o seu receptor (GABA_A) é o principal alvo farmacológico de drogas usadas em psiquiatria para induzir ansiólise e sedação. (Olson, 2002). Este neurotransmissor está presente em altas concentrações (milimolar) em muitas regiões cerebrais, concentrações estas que são cerca de 1.000 vezes maiores que aquelas dos

neurotransmissores clássicos monoaminérgicos nas mesmas regiões. O GABA é formado a partir do glutamato pela ação da enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD), enzima encontrada apenas em neurônios que sintetizam este neurotransmissor no cérebro e é destruído por uma reação de transaminação, em que o grupo amino é transferido para o ácido α -oxoglutárico (produzindo glutamato), com formação de semi-aldeído succínico e, a seguir, ácido succínico. Esta reação é catalisada pela GABA transaminase (GABA-T). Os neurônios GABAérgicos e os astrócitos (células gliais) captam o GABA através de transportadores específicos, e é este mecanismo, melhor do que a GABA-T, que o remove após sua liberação (Rang et al., 2007).

O GABA atua em dois tipos distintos de receptores: GABA_A e GABA_B. O receptor GABA_A consiste em um canal regulado por ligante, sensível ao cloro, enquanto os receptores GABA_B são acoplados à proteína G e regulam canais de K⁺ que quando ativados reduzem a condutância ao Ca⁺⁺ e inibem a produção de AMPc. Os benzodiazepínicos são drogas que agem sobre o sistema GABA-BZD-canal de cloreto, aumentando a afinidade do neurotransmissor GABA pelo receptor GABA_A, que constitui o maior sistema de inibição neuronal do SNC. Este receptor, uma proteína de grande peso molecular, apresenta-se na forma de um canal pentamérico para íons cloreto, com sítios de afinidade de ligação para diversas drogas, como os barbitúricos, anestésicos gerais, neuroesteróides e beta-carbolinas. O canal é composto por sub-unidades α , β , γ , δ , ϵ , θ e π . A sub-unidade α tem-se mostrado diretamente relacionada à afinidade das drogas benzodiazepínicas ao receptor GABA_A, enquanto que a sub-unidade γ parece estar diretamente relacionada à eficácia das drogas. Os benzodiazepínicos, ao se ligar ao seu sítio específico, aumentam a afinidade ao GABA, o que aumenta a frequência de abertura do canal

e conseqüente entrada dos íons cloreto, levando à hiperpolarização da membrana e conseqüente diminuição da atividade neuronal (Korpi, et al., 2002; Kralic et al., 2002).

No teste do labirinto em cruz elevado, o diazepam (1 mg/Kg, i.p.) exerceu seu efeito ansiolítico ao fazer com que os camundongos tratados não só entrassem mais vezes nos braços abertos do labirinto, mas passassem mais tempo por lá. De forma semelhante, a piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) também promoveu os mesmos efeitos, sugerindo que a droga poderia estar atuando no receptor GABA_A. Estes resultados estão em concordância com Zangrossi (1997), ao afirmar que roedores submetidos ao tratamento com benzodiazepínicos, como o diazepam, cruzam mais vezes os braços abertos do labirinto e passam mais tempo nesses braços, quando comparados aos animais do grupo controle.

Para comprovar a hipótese de que a piplartina estaria atuando no receptor GABA_A, foram feitas associações diazepam (1 mg/Kg, i.p.) + flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.) e piplartina (100 mg/Kg, i.p.) + flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.). O flumazenil é um derivado imidabenzodiazepina, com alta afinidade pelo receptor benzodiazepínico, agindo como antagonista competitivo no sítio de ligação benzodiazepínico dos receptores GABA_A, que contém as sub-unidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, ou $\alpha 5$ (Hammers, 2004). Ele é o único antagonista utilizado em clínica, para reverter a intoxicação causada por benzodiazepínicos (Kleingeist et al., 1998).

A associação de flumazenil ao diazepam (1 mg/Kg, i.p.) e à piplartina (100 mg/Kg, i.p.) reduziu o tempo de permanência dos animais nos braços abertos do labirinto, sem reduzir, no entanto, o

número de entradas dos animais naqueles braços. Estes resultados mostram a ação do flumazenil ao bloquear o efeito do diazepam sobre o comportamento dos camundongos no labirinto em cruz elevado. Da mesma maneira, o flumazenil bloqueou o efeito da piplartina sobre o comportamento dos camundongos no labirinto em cruz elevado, sugerindo, portanto, que a piplartina parece atuar no receptor GABA_A, o mesmo alvo da ação de compostos benzodiazepínicos.

Drogas com ação depressora central alteram a coordenação motora e habilidades manuais, prejudicando a execução de atividades que exigem reflexo e um bom controle motor. Este efeito de relaxamento muscular é observado com drogas do grupo dos hipnóticos-sedativos, particularmente os benzodiazepínicos. Estas drogas inibem os reflexos polissinápticos e a transmissão internuncial e, em altas doses, podem deprimir a transmissão na junção neuromuscular esquelética (Katsung et al., 2008).

A coordenação motora é um comportamento complexo e pode refletir equilíbrio, força muscular e alterações na deambulação. Dificuldades na performance motora podem prejudicar a realização de testes comportamentais, tais como aprendizado e memória, exploração e motivação. Um dos testes mais utilizados para o estudo da coordenação motora é o teste do *rota rod* (Bogo et al., 1981). Este teste foi popularizado por Dunham e Miya com a finalidade de avaliar déficits neurológicos em ratos e camundongos (Rustay et al., 2003). De acordo com Massaquoi et al. (1998), a perda da coordenação motora é uma característica comum de muitas desordens neurológicas e um dos efeitos farmacológicos mais facilmente observáveis em casos de intoxicação. Sob esse ponto de vista, o tratamento com a piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) não produziu qualquer alteração na

coordenação motora dos animais, indicando que, nesta faixa de dose, a alcamida não induziu qualquer déficit motor. Estudos realizados em nosso laboratório com uma dose maior de piplartina (200 mg/Kg, i.p. – dados não apresentados) mostrou que, mesmo nesta faixa de dose, o efeito da droga sobre a coordenação motora de camundongos não foi observado.

Rustay et al. (2003) recomendam que sejam utilizadas múltiplas doses de drogas a serem testadas no modelo do *rota rod*, porque muitos agentes depressores, como o etanol, barbitúricos (Dudek et al., 1994), benzodiazepínicos (Crabbe et al., 1998) e alguns antagonistas glutamatérgicos (Diana et al., 1994) podem apresentar efeito locomotor bifásico, isto é, produzir estimulação em baixas doses e sedação em doses maiores. Este efeito, tampouco, foi observado com as doses estudadas no presente trabalho (50 e 100 mg/Kg, i.p.), indicando que, a despeito do possível efeito do tipo ansiolítico da piplartina, esse composto não promove alterações motoras, como aquelas observadas com os benzodiazepínicos.

Além da ansiólise, sedação, hipnose, relaxamento muscular e a perda da coordenação motora, outros efeitos são comumente observados com o uso de compostos benzodiazepínicos, a saber: amnésia anterógrada, e inibição da convulsão (Korpi, et al., 2002; Kralic et al., 2002). O efeito hipnótico da piplartina foi avaliado, inicialmente, através do teste que utiliza o tiopental (40 mg/Kg, i.p.) como agente indutor do sono. O teste permite verificar se determinada droga possui efeito hipnótico, considerando-se para tanto o efeito de que, quando duas drogas possuem o mesmo efeito farmacológico, eles se somam. O princípio deste teste, portanto, consiste em verificar se uma droga possui a capacidade de potencializar o efeito hipnótico

do tiopental, embora algumas drogas desprovidas de ação central como, por exemplo, a adrenalina e a histamina também apresentam resultados positivos (Riley et al., 1958).

Quando associada ao tiopental (40 mg/Kg, i.p.), a piplartina, paradoxalmente, aumentou a latência e diminuiu a duração da perda do reflexo postural dos camundongos tratados, contrariamente ao efeito hipnótico observado com o diazepam (2 mg/Kg, i.p.) neste mesmo teste. A literatura afirma que a diminuição da latência e o aumento da duração da perda do reflexo postural são classicamente observados em drogas depressoras do SNC (Willianson et al., 1996) e a ação hipnótica do tiopental é mediada pelo aumento da neurotransmissão inibitória GABAérgica e pela inibição da neurotransmissão excitatória glutamatérgica (Cordato et al, 1999; Lukatch et al, 1996). Dessa forma, o efeito observado com a piplartina neste teste, confronta-se com aquele observado no labirinto em cruz elevado, onde a piplartina mostrou uma atividade do tipo benzodiazepínica.

É válido salientar, entretanto, que o teste em questão não é específico, visto que compostos que interagem com a biotransformação dos barbitúricos, em nível do complexo citocromo P-450, podem mascarar o efeito destes fármacos (Golubkova et al., 1998). Zaugg et al. (1999) afirmam que o tiopental e o pentobarbital são anestésicos intravenosos que têm, como importante característica farmacocinética, o fato de o pentobarbital ser um metabólito derivado da biotransformação do tiopental, formado pela substituição de um átomo de enxofre por outro de oxigênio (as meias-vidas plasmáticas do tiopental e do pentobarbital são, respectivamente, de 9 e 72 horas). Assim sendo, o efeito da piplartina sobre o tempo de sono induzido por

tiopental pode ter duas explicações: inicialmente, a piplartina estaria inibindo a biotransformação hepática do tiopental e, assim, aumentou a latência e diminuiu a duração da perda do reflexo postural dos camundongos, ou a droga possui uma baixa especificidade, podendo estar atuando em outros sistemas de neurotransmissão, além do sistema GABAérgico, como será discutido a seguir.

Para testar a primeira hipótese, foi realizada a potencialização do tempo de sono com éter. A vantagem deste teste é que ele descarta a possibilidade da influência de uma sobre a biotransformação hepática de outra (Lapa, 2008). Com a realização deste outro teste, observou-se que a piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) aumentou, de forma semelhante ao diazepam (2 mg/Kg, i.p.), a duração da perda do reflexo postural dos animais, quando os mesmos foram introduzidos em uma câmara saturada com éter etílico. Este resultado sugere que a primeira hipótese parece ser coerente, isto é, a piplartina aumentou a biotransformação hepática do tiopental, levando, ao aumento da latência e à diminuição da duração da perda do reflexo postural dos camundongos tratados com a alcamida. E segunda hipótese proposta (atuação da pilartina em outros sistemas de neurotransmissão), no entanto, pode ser responsável, em parte, pelo efeito descrito anteriormente. Este efeito ficará claro a seguir, nos próximos parágrafos.

As monoaminas estão envolvidos na patogênese de uma série de doenças mentais. A dopamina (DA) parece estar envolvida nas psicoses e assim, muitos anti-psicóticos bloqueiam os receptores dopaminérgicos. A serotonina, por sua vez, está envolvida em várias neuroses, incluindo a ansiedade e as desordens do pânico. Por outro lado, a noradrenalina, a serotonina e/ou a dopamina estão bastante

envolvidas na depressão. As desordens depressivas, incluindo a depressão maior endógena e a distímia, são doenças sérias e, muitas vezes, incapacitantes. O tratamento da depressão depende do entendimento da fisiopatologia da doença e os mecanismos através dos quais as drogas podem aliviar os sintomas dessa condição (Elhwuegi, 2004).

Os modelos animais de depressão são usados, portanto, para reproduzir os aspectos dessas desordens do comportamento, permitindo a descoberta de novos compostos que possam tratar essas desordens. Esses modelos podem ser usados também como ferramentas através das quais novos alvos moleculares possam ser identificados para a subsequente descoberta e desenvolvimento de novas drogas (McArthur et al., 2006). A década de 60 foi o período durante o qual os modelos neuroquímicos para o estudo da depressão começaram a ser refinados e propostos. Neste período, a doença depressiva ficou caracterizada como um fenômeno bioquímico. Desde então, a teoria das monoaminas tornou-se amplamente aceita. Esta teoria sugere que a depressão seria ocasionada pela deficiência da atividade monoaminérgica, tratável com drogas que aumentassem esta atividade (Schildkaut, 1965).

O antagonismo dos efeitos farmacológicos da reserpina foi o primeiro modelo de função monoaminérgica anormal, através do qual os compostos antidepressivos foram diferenciados de outras drogas psicoativas (Askel, 1963; Metys et al., 1967). Os efeitos farmacológicos da reserpina como a ptose palpebral, acinesia, diarreia, bradicardia e hipotermia são prontamente observados e revertidos pelos antidepressivos tricíclicos e inibidores da enzima monoamina oxidase (Bourin et al., 1983). No presente estudo, o

modelo de depressão farmacológica que utiliza a reserpina (10 mg/Kg, i.p.) foi realizado. Nele, o pré-tratamento com reserpina provocou a redução dos parâmetros comportamentais estudados no campo aberto (número de cruzamentos, de *grooming* e de *rearing*), demonstrando o efeito acinético da droga, como descrito no parágrafo anterior. O efeito observado anteriormente resultou possivelmente da depleção dos estoques neuronais de noradrenalina, dopamina e serotonina (Goodwin et al, 1971). O tratamento com a piplartina (100 mg/Kg, i.p.), entretanto, aumentou o número de cruzamentos e o número de *rearing* dos animais pré-tratados com reserpina; o mesmo foi observado nos animais tratados com os antidepressivos imipramina e paroxetina. Este resultado sugere que o possível efeito antidepressivo da piplartina seja consequente do aumento de noradrenalina e dopamina, induzido pela droga, como foi observado nos homogenatos de corpo estriado dos animais tratados com piplartina (100 mg/Kg, i.p.), analisados através da técnica da cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.

Durante as décadas de 60 e 70 houve o desenvolvimento de outros modelos animais para o estudo da depressão. Esses modelos tinham como característica o fato de o comportamento ser induzido independentemente de manipulações farmacológicas. Esses modelos utilizavam o estresse como um importante fator de risco para o desenvolvimento da depressão (Hammen, 2005; Nemeroff et al., 2005). Dessa forma, o modelo do desespero aprendido foi proposto e desenvolvido. Nele, um animal é exposto a um estímulo aversivo, como um choque elétrico, do qual não possa escapar, nem controlar. Este procedimento resulta déficits motivacionais de longa duração, revertidos com o tratamento com fármacos antidepressivos, como a imipramina (McArthur et al., 2006). O teste do nado forçado, também

chamado de desespero comportamental ou teste de Porsolt, foi inicialmente proposto como uma variação mais simples do desespero aprendido, e é possivelmente o teste mais amplamente usado para o *screening* de novos compostos com potencial efeito antidepressivo (Cryan et al., 2005).

Este teste também foi realizado no presente estudo. Nele, um animal é previamente forçado a nadar em um espaço confinado. Como consequência, ele se torna imóvel após uma fase de extenso nado e tentativas de escape (Porsolt et al., 1977). As drogas antidepressivas tricíclicas e atípicas reduzem o tempo de imobilidade quando o roedor é recolocado no cilindro com água, 24 horas após o experimento inicial (Porsolt et al., 1978). Os animais do grupo controle apresentaram o referido comportamento; a administração dos antidepressivos imipramina (30 mg/Kg, i.p.) e paroxetina (10 mg/Kg, i.p.) reduziram o tempo de imobilidade do animal; da mesma maneira, a piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) também reduziu o tempo de imobilidade dos animais no cilindro com água. Este efeito reforça a hipótese de que a piplartina apresenta uma importante ação antidepressiva, observada inicialmente no modelo da acinesia induzida por reserpina. No intuito de confirmar essa hipótese e traçar o possível mecanismo de ação antidepressiva da piplartina, a mesma, em uma dose mais baixa (20 mg/Kg, i.p.), foi administrada em camundongos, associada à imipramina (6 mg/Kg, i.p.) ou paroxetina (1 mg/Kg, i.p.). a primeira associação mostrou um efeito antidepressivo equivalente à imipramina (30 mg/kg, i.p.) e à piplartina (100 mg/Kg, i.p.), isoladamente. O mesmo efeito, entretanto, não foi observada na associação entre a piplartina (20 mg/Kg, i.p.) e a paroxetina (10 mg/Kg, i.p.). Isto indica, portanto, que a piplartina tenha um mecanismo de ação semelhante aquele observado com a imipramina,

isto é, atua inibindo a recaptação de monoaminas nas fendas sinápticas.

O desenvolvimento dos antidepressivos inibidores da recaptação da serotonina (5-HT), para o tratamento da depressão, ocorreu em resposta à descoberta da importância da serotonina na fisiopatologia da depressão, bem como pela busca de uma nova classe de antidepressivos mais segura que os tricíclicos e os inibidores da monoamina oxidase. Todos os inibidores da recaptação da serotonina aumentam a concentração sináptica da serotonina, ao inibirem a sua recaptação para o interior do neurônio pré-sináptico (Liebelt, 2008). Este mecanismo de ação, entretanto, parece não estar relacionado à ação antidepressiva da piplartina, visto que a associação da piplartina (20 mg/Kg, i.p.) e paroxetina (1 mg/Kg, i.p.), em doses sub-terapêuticas, não apresentou qualquer efeito sobre o comportamento dos camundongos submetidos ao teste do nado forçado; em adição, o tratamento com a piplartina (100 mg/Kg, i.p.) reduziu a concentração de serotonina (5-HT) e aumentou a concentração do metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) no corpo estriado dos camundongos (como foi visto pela técnica da cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE). O conjunto desses achados sugere, portanto, que a ação da piplartina seja decorrente da sua interação com outro sistema de neurotransmissores, que não o sistema serotoninérgico.

Os antidepressivos tricíclicos, como a imipramina, juntamente com os inibidores da monoamina oxidase, constituem os primeiros fármacos usados no tratamento da depressão, representando a geração mais antiga dessas drogas (Sarko et al., 2000). Hafliger e Schindler no final da década de 1940 sintetizaram uma série de mais de 40 compostos derivados iminodibenzil; um destes compostos era a

imipramina, um composto dibenzazepínico. Durante alguns estudos clínicos, observou-se que a imipramina foi relativamente ineficaz em reduzir a agitação e inquietude nos pacientes psicóticos, porém teve uma ação marcante em pacientes depressivos. Desde então, evidências acumuladas demonstram sua eficácia no tratamento da depressão maior (Thase et al., 2000). É bem estabelecido que a imipramina e outros antidepressivos tricíclicos relacionados potencializam a ação de aminas biogênicas através do bloqueio de sua inativação fisiológica, transporte e recaptação, nas terminações nervosas (Barbaccia et al., 1983). É possível que a piplartina exerça seu efeito antidepressivo nesse nível, em função de a droga aumentar a concentração de noradrenalina e dopamina no corpo estriado dos animais (como foi visto pela técnica da cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE) e assim, reverter o efeito depletor da reserpina sobre essas catecolaminas; além disso, a associação da piplartina (20 mg/Kg, i.p.) e imipramina (6 mg/Kg, i.p.), em doses sub-terapêuticas, mostrou que o efeito antidepressivo de ambas as drogas foi potencializado, sugerindo que os dois compostos parecem ter o mesmo efeito sobre o sistema de recaptação de monoaminas no terminal neuronal. Em adição aos seus efeitos inibitórios sobre os transportadores monoaminérgicos, a imipramina interage também com receptores alfa-adrenérgicos. Os receptores α_2 incluem autoreceptores pré-sinápticos que limitam a atividade neurofisiológica de neurônios noradrenérgicos ascendentes do *locus coeruleus* (Foote et al., 1994). Este efeito, também, pode estar envolvido na ação antidepressiva da piplartina, já que sua ação farmacológica tem se mostrado ser semelhante aquela observada com a imipramina.

Uma vez que a piplartina tem apresentado algumas ações semelhantes à imipramina, foi questionado se a mesma apresentaria,

também, os efeitos colaterais freqüentemente associados aos antidepressivos tricíclicos. Um destes efeitos é a convulsão. Alguns estudos têm demonstrado que altas doses de imipramina tem atividade epileptogênica em animais e em seres humanos (Koella et al., 1979; Krijzer et al., 1984; Roseinstein et al., 1993), mas o exato mecanismo das convulsões observadas com a imipramina ainda não é compreendido (Ago et al., 2006). Uma vez que o rendimento obtido com o isolamento da piplartina é baixo e isso impossibilitou o uso de doses mais elevadas desse composto para avaliar seu potencial convulsivante, a piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) foi testada no modelo que utiliza o pentilenotetrazol (PTZ) como agente indutor de convulsões. Inicialmente, os animais pré-tratados com a piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) e subsequentemente tratados com PTZ (80 mg/Kg, i.p.) apresentaram uma redução significativa do tempo de morte em relação ao grupo tratado apenas com o pentilenotetrazol. Este efeito sugere que a piplartina apresenta um potencial pró-convulsimante como o da imipramina. Para testar esta hipótese, foi utilizada uma dose menor de PTZ (40 mg/Kg, i.p.) isoladamente e associada à piplartina (100 mg/Kg, i.p.) ou imipramina (30 mg/Kg, i.p.). Como resultado dessas associações, foi observado que as mesmas reduziram a latência da primeira convulsão em relação ao grupo tratado apenas com PTZ (40 mg/Kg, i.p.), mostrando que a piplartina, nas doses estudadas, e a imipramina parecem compartilhar não apenas de suas propriedades antidepressivas, mas também de um efeito tóxico, a convulsão. Contrariamente, doses menores de piplartina (10 e 20 mg/Kg, i.p) mostraram efeito protetor sobre as convulsões induzidas por PTZ (dados não mostrados). Este efeito bifásico parece ocorrer como o resultado do aumento de monoaminas que se observa com a administração desses compostos em doses elevadas. Estes achados são corroborados pelo trabalho de Shouse et

al. (2001), ao mostrarem que o aumento de noradrenalina e serotonina, mas não de dopamina, estaria associado a alterações no eletroencefalograma, à descargas neuronais intermitentes na amígdala e/ou *locus coeruleus* e, até mesmo, a sua generalização por todo o córtex cerebral. Ago et al. (2006) reforçam que a imipramina está envolvida na geração de convulsões devido as suas propriedades sobre a neurotransmissão monoaminérgica e, além disso, devido ao bloqueio que essa droga causa sobre os receptores H1. Os autores descartam, ainda, o envolvimento do sistema colinérgico neste caso.

Esta última observação também foi comprovada no presente trabalho, ao se estudar o efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre as convulsões induzidas por pilocarpina (350 mg/Kg, i.p. – um agonista colinérgico muscarínico). Este é um dos modelos mais importantes de epilepsia do lobo temporal (Turski et al., 1989; Cavalheiro et al., 2006) e nele, a piplartina não apresentou qualquer efeito, uma vez que a droga não alterou os parâmetros comportamentais (latência da primeira convulsão e tempo de morte) observados no teste. Este efeito, entretanto, contradiz Liebelt (2008) e Sarko (2000), ao afirmarem que os compostos tricíclicos apresentam propriedades antimuscarínicas (boca seca, visão turva, constipação, retenção urinária, taquicardia sinusal e déficit cognitivo) como efeito colateral comum, nas dosagens terapêuticas.

Para confirmar esse primeiro achado, foram feitas outras investigações sobre os efeitos da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) no sistema colinérgico, baseado em evidências clínicas e experimentais que têm dado suporte para a hipótese de que o sistema colinérgico no cérebro está envolvido em processos mnemônicos (Gallagher et al, 1995). Para tanto, foi testado o efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg,

i.p.) sobre e memória de camundongos submetidos ao teste da esquiva-passiva. Hasselmo (1995) estudou a influência neuromodulatória colinérgica sobre o aprendizado e memória no hipocampo e córtex. A acetilcolina é o neurotransmissor responsável pela transferência de impulsos dos neurônios colinérgicos de células nervosas colinoceptivas para células de tecidos inervados (Tucek et al., 1993). Estudos fisiológicos sobre a acetilcolina indicam que o seu efeito neuromodulador em nível celular é diverso, causando facilitação sináptica e supressão, bem como hiperpolarização direta e despolarização, tudo isto na mesma área cortical (Kimura et al., 1999).

Experimentos comportamentais indicam que a acetilcolina está envolvida em uma grande variedade de funções cognitivas, tais como percepção, atenção seletiva, aprendizado associativo e memória (Hasselmo, 1995). No modelo da esquiva-passiva estudado neste trabalho, a escopolamina (10 mg/Kg, i.p.), um antagonista dos receptores muscarínicos, promoveu um déficit cognitivo nos camundongos (esquiva de 15 minutos), que persistiu por até um dia após a aplicação da droga (esquiva em 24 horas). Prado-Alcalá et al. (1993) afirmam que em muitos casos, a administração central ou sistêmica de drogas anticolinérgicas ou lesões do sistema colinérgico causam déficit na memória, enquanto que drogas que aumentam a atividade colinérgica exercem o efeito contrário.

Os antidepressivos, apesar de aliviarem os sintomas da depressão, podem também apresentar impactos negativos sobre as funções cognitivas. Déficits na memória têm sido observados com varias classes de antidepressivos. Em estudos clínicos, observou-se que a administração de antidepressivos sedativos, com um componente anticolinérgico marcante, como os antidepressivos

tricíclicos, é prejudicial para a memória (van Laar et al. 2002) e Zarindast et al. (2003) demonstraram que a administração de imipramina diminui a consolidação da memória no teste de esQUIVA passiva. Contrariamente, a piplartina não apresentou qualquer efeito amnésico nos animais tratados e submetidos ao mesmo teste.

Alterações adaptativas tem sido observadas em resposta ao tratamento com antidepressivos tricíclicos. Estas incluem alteração na sensibilidade de receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA_B) e possivelmente receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA), além dos receptores muscarínicos da acetilcolina (Kitamura et al., 1991). Para avaliar a influência da piplartina (100 mg/Kg, i.p.) sobre a densidade dos receptores muscarínicos, foi realizado o ensaio de *binding* muscarínico (M1 + M2) no corpo estriado dos animais tratados. O ensaio confirmou, mais uma vez, que a piplartina não apresenta efeito sobre o sistema colinérgico, visto que a densidade dos receptores muscarínicos (M1 + M2) não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle.

Os subtipos de receptores muscarínicos foram identificados por biologia molecular e estudos farmacológicos e, nos últimos anos, foram identificados pelo menos cinco diferentes subtipos de receptores muscarínicos – M₁ ao M₅ (Caulfield et al., 1998). Os receptores muscarínicos pertencem à superfamília dos receptores ligados à proteína G. Os subtipos M₁, M₃ e M₅ são acoplados aos subtipos de proteína G G_{aq/11} e G_{a13}, levando, por exemplo, à ativação da fosfolipase C (PLC) e fosfolipase D (PLD), enquanto os receptores M₂ e M₄ preferencialmente são acoplados às proteínas G_o e G_i, levando à inibição da adenilil ciclase (Rumenapp et al., 2001). Os receptores muscarínicos do tipo M₁ são os mais importantes no SNC; eles

medeiam a ativação da MAP quinase, um processo essencial para a plasticidade sináptica (Hamilton et al., 2001). O receptor M₂ cerebral, por sua vez, contribui para a antinocicepção centralmente mediada e animais *knockout* para receptor M₂ mostram inibição nos tremores e atenuam a hipotermia induzidos por agonistas colinérgicos (Gomez et al., 1999).

A oxotremorina é uma droga agonista dos receptores muscarínicos e sua atividade tremorigênica parece ser mediada principalmente através da estimulação central do sistema colinérgico (Bebbington et al., 1966). Esta droga foi utilizada como outra ferramenta para avaliar o efeito da piplartina (50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o sistema colinérgico. Neste teste, entretanto, a piplartina apresentou uma fraca atividade anticolinérgica muscarínica, ao diminuir a intensidade dos tremores induzidos pela oxotremorina (0,5 mg/Kg, i.p.). Este conjunto de resultados vêm a confirmar a hipótese de que a piplartina parece não apresentar efeito importante sobre o sistema colinérgico, de maneira contrária à imipramina. Apesar dessa diferença, a ação mínima da piplartina sobre esse sistema de neurotransmissão, nas doses estudadas, acaba sendo uma vantagem em relação ao antidepressivo tricíclico, visto que os efeitos antimuscarínicos desses compostos são os responsáveis, em parte, pelos efeitos colaterais comumente observados nesta classe de drogas.

Já foi observado que a exposição crônica ao estresse pode induzir severas desordens psiquiátricas, incluindo a depressão (De Kloet et al., 2005). Alterações biológicas oxidativas estão sendo grandemente reconhecidas como uma rota crítica para danos que geram a fisiopatologia das desordens psiquiátricas induzidas pelo

estresse (Berk, 2007). O aumento do estresse oxidativo ocorre na depressão maior, evidenciado pela diminuição das defesas antioxidantes plasmáticas em conjunto com o aumento da peroxidação lipídica nesses pacientes (Ozcan et al, 2004). Nas desordens psiquiátricas relacionadas ao estresse, o estresse oxidativo desencadeia ou exacerba várias rotas de dano, como a disfunção mitocondrial, desregulação da homeostase do cálcio, alteração de rotas energéticas, dano a precursores neuronais, inibição da neurogênese e indução de eventos sinalizadores da apoptose (Cregan et al., 2002).

Devido a associação existente entre o estresse oxidativo e a fisiopatologia da depressão, o papel anti-oxidantes nas ações terapêuticas dos antidepressivos tem sido relativamente compreendido (Diamond et al, 1997). Algumas drogas antidepressivas têm mostrado um aumento na expressão de genes da atividade de importantes enzimas anti-oxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) (Kolla et al, 2005). Já foi observado também que a fluoxetina pode reverter e prevenir o dano oxidativo observado no estresse psicológico induzido, como foi evidenciado pela elevação não só da atividade da SOD, mas também pela ativação de uma série de componentes chave do sistema anti-oxidante endógeno (Zafir et al., 2007). Zafir et al. (2009) observaram que a administração de drogas antidepressivas e, dentre elas, a imipramina, reduziu a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione S-transferase, glutathione reductase, glutathione e a concentração de malonaldeído e proteínas carboniladas no tecido cerebral de animais submetidos ao estresse crônico. Esses achados incentivaram o estudo do potencial efeito anti-oxidante da piplartina, avaliado em três metodologias distintas.

A primeira metodologia avaliou o efeito anti-oxidante *in vitro* da piplartina (0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 5 e 50 µg/mL) e vitamina E (75 µg/mL) frente ao DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), um radical livre usado para avaliar a capacidade seqüestradora de radicais de compostos com potencial efeito anti-oxidante (Blois, 1958). Os radicais livres são moléculas altamente reativas formadas a partir de transferências de elétrons, podem reagir e formar uma outra série de espécies reativas, como as espécies reativas do oxigênio (ROS) e se não neutralizadas podem levar ao estresse oxidativo, exacerbar a inflamação e promover dano tecidual. Os radicais livres incluem as espécies reativas do oxigênio (EROs) como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}), radical peróxido (ROO^{\cdot}), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como as espécies reativas do nitrogênio (RNS), como o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) e espécies reativas do cloro (RCS) como o ácido hipocloroso (HOCl) (Mosley et al., 2006). Neste ensaio a piplartina não apresentou efeito anti-oxidante, visto que a concentração de DPPH no meio reacional não se modificou na presença da alcalina. Huang et al. (2005) afirmam que o DPPH é um radical nitrogenado estável de vida longa e que muitos compostos com atividade anti-oxidante que reagem rapidamente com radicais de vida transitória, como o radical peroxil, podem reagir lentamente ou serem inertes frente ao DPPH. Isto pode explicar o fato de a piplartina não ter apresentado efeito anti-oxidante no teste.

Em função desses achados, o potencial efeito anti-oxidante da piplartina (25, 50 e 100 µg/mL) foi avaliado sobre a peroxidação lipídica gerada em homogenatos de tecido cerebral submetidos ao choque térmico. A peroxidação lipídica é um processo extremamente complexo e lesivo, caracterizado pela quebra dos lipídios das membranas celulares e a formação do radical peroxil (LOO^{\cdot}). Uma vez

iniciado, este processo pode ser propagado, já que o radical peróxil formado pode reiniciar o processo, que pode ocorrer indefinidamente (Ferreira et al., 1997). A concentração das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico e de nitrito foram os parâmetros de avaliação de atividade anti-oxidante usados nesse teste. Foi observado que a piplartina diminuiu a concentração dos dois parâmetros bioquímicos, revelando, portanto, sua atividade anti-oxidante apenas em concentrações baixas. Esta observação é corroborada por Liu et al. (2000) ao afirmarem que uma série de compostos fitoquímicos, tais como vitaminas, carotenóides, terpenóides, flavonóides, lignanos, fenóis e alcalóides exibem propriedades anti-oxidantes.

Por último foi avaliado o efeito anti-oxidante da piplartina (1, 5, 50 e 100 µg/mL) isoladamente ou associada à neurotoxina 6-OHDA (10 µg/mL), sobre a viabilidade de células mesencefálicas de embriões de ratas, cultivadas *in vitro*. A 6-OHDA destrói os neurônios dopaminérgicos e esta ação parece ocorrer a partir da geração de peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, presumivelmente iniciada por um metal de transição como o ferro. Assim, estudos recentes têm sugerido o envolvimento de mecanismos de estresse oxidativo que facilitam a conversão da 6-OHDA em uma quinona, com a formação de peróxido de hidrogênio, que inicia uma via de sinalização para a morte celular (Del Rio et al., 2000).

A determinação da atividade das enzimas mitocondriais pode ser utilizada como ferramenta para se determinar a viabilidade celular. Dentre elas, a medição da clivagem do sal de tetrazólium (MTT) pelas desidrogenases mitocondriais, formando um precipitando insolúvel de formazan, é um ótimo protocolo para avaliar o efeito de compostos neuroprotetores (Guangjung et al., 2002). Os sais de tetrazólio

atravessam a membrana celular e no citoplasma aceitam elétrons a partir de substratos oxidados, ou de determinadas enzimas, sendo particularmente reduzidos como resultado da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Esta reação converte os sais de MTT de cor amarela em cristais de formazan de cor violeta que se acumulam em endossomas e são posteriormente transportados para a superfície celular através de um processo de exocitose (Supino, 1995; Liu, 1999).

Os resultados da cultura de células mesencefálicas mostraram que a piplartina, isoladamente, nas concentrações de 25 e 50 µg/mL não diminuiu a viabilidade celular, diferentemente da 6-OHDA e de sua concentração de 100 µg/mL, que diminuiu a concentração de MTT nas células, indicando que, nesta concentração, a piplartina apresenta toxicidade para as células cultivadas *in vitro*. Quando associada à neurotoxina 6-OHDA (10 µg/mL), a piplartina, nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, apresentou um efeito neuroprotetor celular devido, possivelmente, ao seu efeito anti-oxidante já descrito nos parágrafos anteriores. A concentração de 100 µg/mL, no entanto, não foi capaz de reverter a neurotoxicidade celular induzida pela 6-OHDA (10 µg/mL), confirmando a hipótese de que, nesta concentração, a alcamida é tóxica, além de apresentar efeitos bifásicos, que ocorrem de acordo com a faixa de concentração utilizada.

Através da análise e da discussão dos resultados apresentados nos capítulos anteriores, pode-se concluir que a piplartina:

- Aumentou o número de *grooming* e o número de *rearing*, mas não o número de cruzamentos de camundongos no campo aberto, sugerindo que o efeito está relacionado ao aumento de dopamina no corpo estriado;
- Reverteu a catalepsia induzida por haloperidol através da sua possível interação com os receptores dopaminérgicos e/ou através do aumento de dopamina no corpo estriado;
- Apresentou efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado, revertido pelo flumazenil, o que sugere a participação do receptor GABA_A, além da ausência de efeito miorrelaxante;
- Diminuiu a duração do sono barbitúrico e aumentou a duração do sono etéreo, sugerindo que a droga interfere no metabolismo hepático do tiopental;
- Reverteu a acinesia induzida por reserpina, o que indica um efeito antidepressivo possivelmente relacionado ao aumento da noradrenalina no corpo estriado;
- Reduziu o tempo de imobilidade no nado forçado, efeito potencializado pela imipramina, sugerindo uma ação semelhante aquela dos antidepressivos tricíclicos;
- Semelhantemente à imipramina, apresentou uma ação pró-convulsivante, ao potencializar o efeito do pentilenotetrazol;

- Diminuiu a concentração de serotonina no corpo estriado e a associação com paroxetina não reduziu tempo de imobilidade no nado forçado, sugerindo que o efeito antidepressivo não envolve o sistema serotoninérgico;
- Apresentou discreta ação antimuscarínica, pois reverteu os tremores induzidos por oxotremorina;
- Não apresentou efeito sobre as convulsões induzidas por pilocarpina, não produziu déficit cognitivo em camundongos submetidos à esquiva-passiva, nem alterou a densidade dos receptores muscarínicos no corpo estriado;
- Aumentou NA, HVA, DA, DOPAC e 5-HIAA e reduziu 5-HT no CE, justificando os efeitos comportamentais já observados;
- É destituída de ação antioxidante frente ao radical DPPH, mas reduziu TBARS e nitrito, gerados em um processo oxidativo;
- Em baixas concentrações, apresentou efeito neuroprotetor, em células expostas à ação da 6-OHDA;
- Na concentração de 100 µg/mL, mostrou-se citotóxica, diminuindo a viabilidade celular.

Em suma, a piplartina apresentou efeitos comportamentais (bifásicos), resultantes da interação com sistemas de neurotransmissão e eventos bioquímicos celulares, interferindo assim com sistemas GABAérgico, noradrenérgico, dopaminérgico e agindo como droga ansiolítica e antidepressiva, sendo dotada também de efeito anti-oxidante e neuroprotetor.

AGAR, E.; BOŞNAK, M.; AMANVERMEZ, R.; DEMİR, S.; AYYILDIZ, M.; CELİK, C. The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat. **Neuroreport**, v.10, p.1799 – 1801, 1999.

AGO, J.; ISHIKAWA, T.; MATSUMOTO, N.; RAHMAN, A.; KAMEI, C. Mechanism of imipramine-induced seizures in amygdala-kindled rats. **Epilepsy Research**, v.72, p.1 – 9, 2006.

ALMEIDA, R.N. Psicofarmacologia – fundamentos práticos. Ed. Guanabara Koogan, pp. 162 – 164. Rio de Janeiro – RJ. 2006.

ANDERSEN, I.L.; BOE, K.E.; FOERVIK, G.; JANCZAK, A.M.; BAKKEN, M. Behavioural evaluation of methods for assessing fear responses in weaned pigs. **Appl. Anim. Behav. Sci**, v.69, p.227 – 240, 2000.

ARAMBEWELLA, L.S.R.; ARAWAWALA, L.D.A.M.; RATNASOORIYA, W.D. Antidiabetic activities of aqueous and ethanolic extracts of *Piper betle* leaves in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p.239 – 245, 2005.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav**, v.21, p.205 – 235, 1973.

ASKEL, B.M. A simple screening procedure for imipramine-like antidepressant agents. **Life Sci**, v.10 p.725 – 730, 1963.

AUDDY, B.; FERREIRA, M.; BLASINA, F.; LAFON, L.; ARREDONDO, F.; DAJAS, F.; TRIPATHI, P.C.; SEAL, T.; MUKHERJEE, B. Screening

of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. **J Ethnopharmacol**, v.84, p.131 – 138, 2003.

BALDOQUI, D.C.; KATO, M.J.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.D.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M. A. Chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v.51, p.899 – 902, 1999.

BARDIN, L.; KLEVEN, M.S.; BARRET-GREVOZ, C.; DEPOORTERE, R.; NEWMAN-TANCREDI, A. Antipsychotic-like vs. cataleptogenic actions in mice of novel antipsychotics having D2 antagonist and 5-HT1A agonist properties. **Neuropsychopharmacology**, v.31, p.1869 – 1879, 2006.

BATTACHARYA, S.; MULA, S.; GAMRE, S.; KAMAT, J.P.; BANDYOPADHYAY, S.K.; CHATTOPADHYAY. Inhibitory property of *Piper betel* extract against photosensitization-induced damages to lipids and proteins. **Food Chemistry**, v.100, p.1474 – 1480, 2007.

BEBBINGTON, A.; BRIMBELCOMBE, R.W.; SHAKESHAFT, D. The central and peripheral activity of acetylenic amines related to oxotremorine. **Br. J. Pharmacol**, v.26, p.56 – 67, 1966.

BENEVIDES, P.J.C.; SARTORELLI, P.; KATO, M.J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, v.52, p.339 – 343, 1999.

BERK, M. Oxidative biology: new intervention opportunities in psychiatry. **Acta Neuropsychiatr**, v.19, p.259 – 260, 1999.

BEZERRA, D.P.; CASTRO, F.O.; ALVES, A.P.N.N.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; COSTA-LOTUFO, L.V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.801 – 807, 2006.

BEZERRA, D.P.; MILITÃO, G.C.G.; CASTRO, F.O.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; COSTA-LOTUFO, L.V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in Vitro**, v.21, p.1 – 8, 2007.

BEZERRA, D.P.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; VASCONCELLOS, M.C.; SILVA, A.C.R.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; HENRIQUES, J.A.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; SAFFI, J. Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. **Mutation Research**, v.652, p.164 – 174, 2008.

BHANDARI, S.P.S.; BABU, U.V.; GARG, H.S. A lignan from *Piper chaba* stems. **Phytochemistry**, v.47 p.1435 – 1436, 1997.

BILIA, A.R.; GALLORI, F.; VINCIERI, F.F. Kava-kava and anxiety: growing knowledge about the efficacy and safety. **Life Sciences**, v.70, p.2581 – 2597, 2002.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p.1199 – 1200, 1958.

BLUMENTHAL, M.; BUSSE, W.R.; GOLDBERG, A.; GRUENWALD, J.; HALL, T.; RIGGINS, C.W.; RISTER, R.S. The Complete German Commission E Monographs. **American Botanical Council**, Austin, p.685, 1998.

BODIWALA, H.S.; SINGH, G.; SINGH, R.; DEY, C.S.; SHARMA, S.S.; BHUTANI, K.K.; SINGH, I.P. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **Journal of Natural Medicines**, v.500, p.39 – 48, 2002.

BOGO, V.; HILL, T.A.; YOUNG, R.W. Comparison of accelerod and rotarod sensitivity in detecting ethanol- and acrylamide-induced performance decrement in rats: review of experimental considerations of rotating rod systems. **Neurotoxicology**, v.2, p.765 – 87, 1981.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. **Centro de Divulgação Universitária - Estudos e Ensaios Biblioteca de Divulgação e Cultura**. Publicação nº 2, p.523, 1953.

BURKE, R. E.; GREENBAUM, D. Effect of post-mortem factors on muscarinic receptor subtypes in rat brain. **J. Neurochem**, v.49, p.529 – 596, 1987.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131 – 134, 2005.

CAPRON, M.A.; WIEMER, D.F. Piplaroxide, an ant-repellent piperidine epoxide from *Piper tuberculatum*. **Journal of Natural Products**, v.59, p.794 – 795, 1996.

CARLINI, E.A. Farmacologia prática sem aparelhagem. São Paulo. Ed **Sarvier**, p.44, 1973.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.502, p.501 – 512, 2003.

CARLINI, E.A.; CONTAR, J.D.P.; SILVA-FILHO, A.R.; DA SILVEIRA-FILHO, N.G.; FROCHTENGARTEN, M.L.; BUENO, O.F. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **J Ethnopharmacol**, v.17, p.37 – 64, 1986.

CAULFIELD, M.P. Muscarinic receptors – characterization, coupling and function. **Pharmacol Ther**, v.58, p.319 – 379, 1993.

CAVALHEIRO, E.A.; NAFFAH-MAZACORATTI, M.G.; MELLO, L.E.; LEITE, J.P. The pilocarpin model of seizures. In: Pitkänen, A., Schwarcz, P.A., Moshé, S.L. (Eds.), **Models of Seizures and Epilepsy**. Elsevier, Amsterdam, p.433 – 448, 2006.

CHATTERJEE, S.; NIAZ, Z.; AGUTAM, S.; ADHIKARI, S.; VARIYAR, P.S.; SHARMA, A. Antioxidant activity of some phenolic constituents from green pepper (*Piper nigrum* L.) and fresh nutmeg mace (*Myristicia fragrans*). **Food Chemistry**, v.101, p.515 – 523, 2007.

CHEN, Y.U.; LIAO, C.H.; CHEN, I.H. Lignans, an amide and anti-platelet activities from *Piper philippinum*. **Phytochemistry**, v.68, p.2101 – 2111, 2007.

CHEN, Y.U.; CHEN, I.H.; LIAO, C.H. Amides with anti-platelet aggregation activity from *Piper taiwanense*. **Fitoterapia**, v.78, p.414 – 419, 2007.

CHOI, E.M.; HWANG, J.K. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, p.171 – 175, 2003.

CHRISTINA, A.J.M.; SARASWATHY, G.R.; HEISON ROBERT, S.J.; KOTHAI, R.; CHIDAMBARANTHAM, N.; NALINI, G.; THERESAL, R.L. Inhibition of CCl₄-induced liver fibrosis by *Piper longum* Linn.? **Phytomedicine**, v.13, p.196 – 198, 2006.

CORDATO, D.J.; MATHER, L.E.; GROSS, A.S.; HERKES, G.K. Pharmacokinetics of thiopental enantiomers during and following prolonged highdose therapy. **Anesthesiology**, v.91, p.1693 – 1702, 1999.

COWARD, D.M.; DOGGETT, N.S.; SAYERS, A.C. The pharmacology of N-carbamoyl-2-(2,6-dichlorophenyl)acetamide hydrochloride (LON-954) a new tremorogenic agent. **Drug Res**, v.27, p.2326 – 2332, 1977.

CRABBE, J.C.; GALLAHER, E.J.; CROSS, S.J.; BELKNAP, J.K. Genetic determinants of sensitivity to diazepam in inbred mice. **Behav Neurosci**, v.112, p.668 – 677, 1998.

CREGAN, S.P.; FORTIN, A.; MACLAURIN, J.G.; CALLAGHAN, S.M.; CECCONI, F.; YU, S.W.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L.; PARK, D.S.; KROEMER, G.; SLACK, R.S. Apoptosis-inducing factor is

involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. **J Cell Biol**, v.158, p.507 – 517, 2002.

CROMWELL HC, BERRIDGE KC. Implementation of action sequences by a neostriatal site: a lesion mapping study of grooming syntax. **Journal of Neuroscience**, v.16, p.3444 – 3458, 1996.

CRYAN, J.F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nat Rev Drug Discov**, v.4, p.775 – 790, 2005.

DA CUNHA, E.V.L.; CHAVES, M.C.O. Two amides from *Piper tuberculatum* fruits. **Fitoterapia**, v.72, p.197 – 199, 2001.

DASGUPTA, N.; DE, B. Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract in vitro. **Food Chemistry**, v.88, p.219 – 224, 2004.

DE KLOET, E.R.; JOELS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nat Rev Neurosci**, v.6, p.463 – 475, 2005.

DEL RIO, M.J.; VELEZ-PRADO, C. Monoamine neurotoxins-induced apoptosis in lymphocytes by a common oxidative stress mechanism: involvement of hydrogen peroxide, caspase-3 and nuclear factor kappa-B (NF-kappa-B). Jun transcription factors. **Biochem. Pharmacol**, v.63, p.677 – 688, 2002.

DIAMOND, D.M.; ROSE, G.M. Stress impairs LTP and hippocampal dependent memory. **Ann NY Acad Sci**, v.746, p.411 – 414, 1997.

DIANA, G.; SAGRATELLA, S. Different capability of N-methyl-D-aspartate antagonists to affect locomotor/exploratory activity of mice in a computerized on-line open field test. **Pharmacol Biochem Behav**, v.48, p.291 – 295, 1994.

DODSON, C.D.; DYER, L.A.; SEARCY, J.; WRIGHT, Z.; LETOURNEAU, D.K. Cenocladamide, a dihydropyridone alkaloid from *Piper Cenocladum*. **Phytochemistry**, v.53, p.51 – 54, 2000.

DOMBROWSKI, A.M.; JERKINS, A.A.; KAUFFMAN, F.C. Muscarinic receptor binding and oxidative activities in the adult rat superior cervical ganglion: effects of 6-hydroxydopamine and nerve growth factor. **J. Neurosci**, v.3, p.1963 – 1970, 1983.

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

DUDEK, B.C.; TRITTO, T.; UNDERWOOD, K.A. Genetic influences on locomotor activating effects of ethanol and sodium pentobarbital. **Pharmacol Biochem Behav**, v.48, p.593 – 600, 1994.

DUNHAM, M.W.; MIYA, T.S. A note of a simple apparatus detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of American Pharmaceutical Science**, v.46, p.208 – 209, 1957.

ELHWUEGI, A.S. Central monoamines and their role in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.28, p.435 – 451, 2004.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.J.; FEATHER-STONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, v.7, p. 88 – 95, 1961.

FALTER, U.; GOWER, A.J.; GOBERT, J. Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences. **Behav. Pharmacol**, v.3, p.123 – 128, 1992.

FELIPE, C.F.B.; FILHO, J.T.S.; SOUZA, L.E.O.; SILVEIRA, J.A.; UCHOA, D.E.A.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L.; VIANA, G.S.B. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**, v.14, p.605 – 612, 2007.

FELIPE, D.F.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V.; FRANCO, S.L.; CORTEZ, D.A.G. Analysis of neolignans compounds of *Piper regnelli* (Miq.) C. CD. Var. *pallescens* (C. DC.) Yunk by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, p.1371 – 1375, 2006.

FERNANDES, C.; FILE, S.E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v.54, p.31 – 40, 1996.

FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. **Rev Assoc Med Bras**, v.43, 61 – 68, 1997.

FILE, S.E. The interplay of learning anxiety in the elevated plus-maze. **Behavioral Brain Research**, v.58, p.199 – 202, 1993.

FILE, S.E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **Eur. J. Pharmacol**, v.463, p.35 – 53, 2003.

FOLMER, F.; BLASIUS, R.; MORCEAU, F.; TABUDRAVU, J.; DICATO, M.; JASPARS, M.; DIEDERICH, M. Inhibition of TNF α -induced activation of nuclear factor κ B by kava (*Piper methysticum*) derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v.71, p.1206 – 1218, 2006.

FONTENELE, J.B.; LEAL, L.K.A.M.; SILVEIRA, E.R.; FELIX, F.H.; FELIPE, C.F.B.; VIANA, G.S.B. Antiplatelet effects of pipartine, an alkalamide isolated from *Piper tuberculatum*: possible involvement of cyclooxygenase blockade and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.61, p.511 – 515, 2009.

FOOTE, J.; SELIGMAN, M.; MAGURA, S.; HANDELSMAN, L.; ROSENBLUM, A.; LOVEJOY, M.; ARRINGTON, K.; STIMMEL, B. An enhanced positive reinforcement model for the severely impaired cocaine abuser. **J Subst Abuse Treat**, v.11, p.525 – 539, 1994.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, 3^a edição, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994.

FUJIWARA, Y.; NAITHOU, K.; MIYAZAKI, T.; HASHIMOTO, K.; MORI, K.; YAMAMOTO, Y. Two new alkaloids, pipericyclobutanamides A and B, from *Piper nigrum*. **Tetrahedron Letters**, v.42, p.2497 – 2499, 2001.

FUKUZAKI, K.; KAMENOSONO, T.; NAGATA, R.. Effects of ropinirole on various parkinsonian models in mice, rats, and cynomolgus monkeys. **Pharmacol Biochem Behav**, v.65, p.503 – 508, 2000.

GALLAGHER, M.; COLOMBO, P.J. Aging and the cholinergic hypothesis of cognitive decline. **Curr. Opin. Neurobiol**, v.5, p.161 – 168, 1995.

GARNER, M.; MÖHLER, H.; STEIN, D.J.; MUEGGLER, T.; BALDWIN, D.S. Research in anxiety disorders: from the bench to the bedside. **Eur Neuropsychopharmacol**, v.19, p.381 – 390, 2009.

GOLUBKOVA, T.D.; HECKLER, E.; RATES, S.M.K.; HENRIQUES, J.A.P.; HENRIQUES, A.T. Inhibition of cytochrome P-450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction from *Helietta apiculata* markedly potentiate the hypnotic action of pentobarbital. **J. Ethnopharmacol**, v.60, p.141 – 148, 1998.

GOODWIN, F.K.; BUNNEY, W.E. Depressions following reserpine: a re evaluation. **Sem Psychiatry**, v.3, p.435 – 48, 1971.

GREEN, L.C.; TANNEBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v.212, p.56 – 58, 1981.

GRUNZE, H.; LANGOSCH, J.; SCHIRRMACHER, k.; JIIRG, D.; WEGERER, V.; WALDEN, J. Kava pyrones exert effects on neuronal transmission and transmembraneous cation currents similar to stablished mood stabilizers – a review. **Prog. Neuro-psychopharmacol. & Biol. Psychiat**, v.25, p.1555 – 1570, 2001.

GRYCOVA, L.; DOSTAL, J.; MAREK, R. Quaternary protoberberine alkaloids. **Phytochemistry**, v.68, p.150 – 175, 2007.

GUANGJUNG, N.; CHAOFANG, J.; YUANLIN, C.; SHENGRONG, S.; BAOLU, Z. Distinct effects of tea catechins on 6-hydroxidopamine-induced apoptosis in PC12 cells. **Arch. Biochem. Biophys**, v.397, p.84 – 90, 2002.

GUIMARÃES, E.F.; GIORDANO, L.C.S. Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v.55, p.21 – 46, 2004.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. **AEP**, v.15, p.686 – 699, 2005.

HAMILTON, S.E.; NATHANSON, N.M. The M1 receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons. **J Biol Chem**, v.276, p.15850 – 15855, 2001.

HAMMEN, C. Stress and depression. **Annu Rev Clin Psychol**, v.1, p.293 – 319, 2005).

HAMMERS, A. Flumazenil positron emission tomography and other ligands for functional imaging. **Neuroimaging Clin. N. Am**, v.14, p.537 – 551, 2004.

HAN, G.; MA, Y.; LI, C. The studies of natural PAF antagonistic neolignans from Piper genus and their structure–activity relationships. **Beijing Yike Daxue Xuebo**, v.24, p.347 – 350, 1992.

HASSELMO, M.E. Neuromodulation and cortical function: Modeling the physiological basis of behavior. **Behavioural Brain Research**, v.67, p.1 – 26, 1995.

HUANG, D.; OU, B.; & PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841 – 1856, 2005.

IWASHITA, M.; OKA, N.; OHKUBO, S.; SAITO, M.; NAKAHATA, N. Piperlongumine, a constituent of *Piper longum* L., inhibits rabbit platelet aggregation as a thromboxane A2 receptor antagonist. **European Journal of Pharmacology**, v.570, p.38 – 42, 2007.

JÚNIOR, J.X.A.; CHAVES, M.C.O.; CUNHA, E.V.L.; GRAY, A.I. Cepharanone B from *Piper tuberculatum* Jacq. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.27, p.325 – 327, 1999.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 10^a edição. Ed. McGraw Hill. 2008.

KIMURA, F.; FUKUDA, M.; TSUMOTO, T. Acetylcholine suppresses the spread of excitation in the visual cortex revealed by optical recording: Possible differential effect depending on the source of input. **European Journal of Neuroscience**, v.11, p.3597 – 3609, 1999.

KING, M. Prevalence of common mental disorders in general practice attendees across Europe. **Br. J. Psychiatry**, v.192, p.362–367, 2008.

KOELLA, W.P.; GLATT, A.; KLEBS, K.; DURST, T. Epileptic phenomena induced in the cat by the antidepressants maprotiline,

imipramine, clomipramine, and amitriptyline. **Biol. Psychiatry**, v.14, p.485 – 497, 1979.

KOLLA, N.; WEI, Z.; RICHARDSON, J.S.; LI, X.M. Amitriptyline and fluoxetine protect PC12 cells from cell death induced by hydrogen peroxide. **J Psychiatry Neurosci**, v.30, p.196 – 201, 2005.

KORPI, E.R.; GRUNDER, G.; HARTMUL, L. Drug interaction at GABA_A receptors. **Progress in Neurobiology**, v.67, p.113 – 159, 2002.

KRALIC, J.E.; O'BUCKLEY, T.K.; KHISTI, R.T.; HODGE, C.W.; HOMANICS, G.E.; MORROW, A.L. GABA_A receptor α -1 subunit deletion alters subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. **Neuropharmacology**, v.43, p.685 – 694, 2002.

KRIJZER, F.; SNELDER, M.; BRADFORD, D. Comparison of the (pro)convulsive properties of fluvoxamine and clovoxamine with eight other antidepressants in an animal model. **Neuropsychobiology**, v.12, p.249 – 254, 1984.

KUMAR, S.; SINGHAL, V.; ROSHAN, R.; SHARMA, A.; REMBHOTKAR, G.W.; GHOSH, B. Piperine inhibits TNF- α induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF- κ B and I κ B kinase activation. **European Journal of Pharmacology**, v.575, p.177 – 186, 2007.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; LIMA, T.C.M. Plantas medicinais – métodos de avaliação da atividade farmacológica. **SBPC**. Campinas – SP. 2008.

LIEBELT, E.L. An update on antidepressant toxicity: an evolution of unique toxicities to master. **Clinical Pediatric Emergency Medicine**, v.9, p.24 – 34, 2008.

LISTER R,G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v.29, p.180 – 185, 1987.

LIU, Y. Understanding the Biological Activity of Amyloid Proteins in Vitro: From Inhibited Cellular MTT Reduction to Altered Cellular Cholesterol Homeostasis, Prog. Neuropsychopharmacol. **Biol. Psychiatry**, v.23, p.377 – 395, 1999.

LIU, F.; NG, T.B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. **Life Sciences**, v.66, p.725 – 735, 2000.

LOWRY, H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurements with the folin phenol reagent. **J. Biol Chem**, v.193, p.265 – 275, 1951.

LOWSON, S.; GENT, J.P.; GOODCHILD, C.S. Anticonvulsant properties of propofol and thiopentone: comparison using two tests in laboratory mice. **Br J Anaesth**, v.64, p.59 – 63, 1990.

LUKATCH, H.S.; MACIVER, M.B. Synaptic mechanisms of thiopental-induced alterations in synchronized cortical activity, **Anesthesiology**, v.84, p.1425 – 1434, 1996.

MANSUR J, MARTZ RMW, CARLINI EA. Effects of acute and chronic administration of *Cannabis sativa* and (-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol on the behaviour of rats in an open-field arena.

Psychopharmacology, v.19, p.338-397, 1971.

MARTINS, A.P.; SALGUEIRO, L.; VILA, R.; TOMI, F.; CANIGUERAL, S.; CASANOVA, J.; PROENÇA DA CUNHA, A.; ADZETI, T. Essential oil from four *Piper* species. **Phytochemistry**, v.49, p.2019 – 2023, 1998.

MASSAQUOI, S.G.; HALLETT, M. Ataxia and other cerebellar syndromes. In: Jankovic J, Tolosa E, editors. **Parkinson's disease and movement disorders**. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998.

MASSIEU, L.; TAPIA, R. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. **J Neurochem**, v.69, p.1151 – 1160, 1997.

MATSUDA, H.; NINOMIYA, K.; MORIKAWA, T.; YASUDA, D.; YAMAGUCHI, I.; YOSHIKAWA, M. Protective effects of amide constituents from the fruit of *Piper chaba* on D-galactosamine/TNF- α -induced cell death in mouse hepatocytes. **Bioorg Med Chem Lett**, v.18, p.2038 – 2042, 2008.

McARTHUR, R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.84, p.436 – 452, 2006.

McFERRIN, M.A.; RODRIGUEZ, E. Piscicidal properties of piperovatina from *Piper piscatorum* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.60, p.183 – 187, 1998.

METYS, J.; METYSOVA, J. Relationship between antireserpine and central cholinolytic effects of imipramine-like antidepressants. In: Garattini S, Dukes MNH, editors. Antidepressant drugs. **Amsterdam: Excerpta Medica Foundation**, p.255–65, 1967.

MIYOSHI, E.; WIETZIKOSKI, S.; CAMPLESSEI, M.; SILVEIRA, R.; TAKAHASHI, R. N.; DA CUNHA, C. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Res Bull**, v.58, p.41 – 47, 2002.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. **J Comp Physiol Psychol**, v.48, p.254 – 260, 1958.

MORAIS, S.M.; FACUNDO, V.A.; BERTINI, L.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; JÚNIOR, J.F.A.; FERREIRA, S.A.; BRITO, E.S.; NETO, M.A.S. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, p.670 – 675, 2007.

MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A. Non-polar constituents from leaves of *Piper lhotzkyanum*. **Phytochemistry**, v.48, p.1339 – 1342, 1998a.

MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A. A cromone from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v.48, p.1075 – 1077, 1998b.

MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A. A C-glucosylflavone from leaves of *Piper lhotzkyanum*. **Phytochemistry**, v.55, p.783 – 786, 2000.

MULA, S.; BANERJEE, D.; PATRO, B.S.; BHATTACHARYA, S.; BARIK, A.; BANDYOPADHYAY, S.K.; CHATTOPADHYAY, S. Inhibitory property of the *Piper betel* phenolics against photosensitization-induced biological damages. **Bioorg Med Chem**, v.16, p.2932 – 2938, 2008.

MUNDINA, M.; VILA, R.; TOMI, F.; TOMÁS, X.; CICCIO, J.F.; ADZET, T.; CASANOVA, J.; CAÑIGUERAL, S. Composition and chemical polymorphism of the essential oils from *Piper lanceaefolium*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, p.739 – 748, 2001.

NAVICKIENE, H.M.D.; ALÉCIO, A.C.; KATO, M.J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M.C.M.; CAVALHEIRO, A.J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v.55, p.621 – 626, 2000.

NEMEROFF, C.B.; VALE, W.W. The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. **J Clin Psychiatry**, v.66, p.5 – 13, 2005.

OBESO, J.A.; RODRÍGUEZ-OROZ, M.C.; RODRÍGUEZ, M.; ARBIZU, J.; GIMÉNEZ-AMAYA, J.M. The basal ganglia and disorders of

movement: pathophysiological mechanisms. **News Physiol Sci**, v.17, p.51 – 55, 2002.

OLIVEIRA, E.D. Mecanismo de ação vasorelaxante da pipartina, uma alcalamida isolada das raízes e do caule de *Piper tuberculatum* Jacq. (piperaceae), em aorta de rato. **Dissertação de mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Universidade Federal da Paraíba – UFPB, 2000.

OLSON, R. GABA. In: Davis K, Charney D, Coyle J, Nemeroff C, editors. Neuropsychopharmacology: **The fifth generation of progress**. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins 2002.

OZCAN, M.E.; GULEC, M.; OZEROL, E.; POLAT, R.; AKYOL, O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol*, v.19, p.89 – 95, 2004.

PARK, B.S.; SON, D.J.; PARK, Y.H.; KIM, T.W.; LEE, S.E. Antiplatelet effects of acidamides isolated from the fruits of *Piper longum* L. **Phytomedicine**, v.14, p.853 – 855, 2007.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry**, v.46, p.597 – 673, 1997.

PELLOW S.; CHOPIN P.; FILE S.E.; BRILEY, M. Validation of open, closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v.14, p.149 – 167, 1985.

PEUNGVICHA, P.; THIRAWARAPAN, S.S.; TEMSIRIRIRKKUL, R.; WATANABE, H.; PRASAIN, J.K.; KADOTA, S. Hypoglycemic effect of the water extract of *Piper sarmentosum* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.60, p.27 – 32, 1998.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v.56, p.237 – 243, 2001.

PORSOLT, R.D.; LEPICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. **Nature**, v.266, p.730 – 732, 1977.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural depression in rats a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur J Pharmacol**, v.47, p.379 – 391, 1978.

PORSOLT, R.D.; CHERMAT, R.; LENÈGRE, A.; AVRIL, I.; JANVIER, S.; STÉRU, L. Use of the automated tail suspension test for the primary screening of psychotropic agents. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v.288, p.11 – 30, 1987.

PRUT L, BELZUNG C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviours: a review. **European Journal of Pharmacology**, v.463, p.3 – 33, 2003.

RATHBONE, D.A.; BRUCE, N.C. Microbial transformation of alkaloids. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.274 – 281, 2002.

REIGADA, J.B. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) – antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-

marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). **Tetrahedron: Asymmetry**, v.18, p.1054 – 1058, 2007.

REX, A.; MORGENSTERM, E.; FINK, H. Anxiolytic-like effects of Kava-Kava in the elevated plus maze test – a comparison with diazepam. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.26, p.855 – 860, 2002.

RHO, M.C.; LEE, S.W.; PARK, H.R.; CHOI, J.H.; KANG, J.Y.; KIM, K.; LEE, H.S.; KIM, Y.K. ACAT inhibition of alkamides identified in fruits of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v.68, p.899 – 903, 2007.

RIDTITID, W.; RATTANAPROM, W.; THAINA, P.; CHITTRAKARN, S.; SUNBHANICH, M. Neuromuscular blocking activity of methanolic extract of *Piper sarmentosum* leaves in the rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.61, p.135 – 142, 1998.

RILEY, H.; SPINKS, A. A biological assessment of tranquilizers. **J. Pharm. Pharmacol**, v.10, p.657 – 671, 1958.

RODGERS R.J.; COLE, J.C. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. **Physiol. Behav**, v.53, p.383 – 388, 1993.

RODGERS R.J.; DALVI A. Anxiety, defence and the elevated plus maze. **Neurosci. Biobehav. Rev**, v.21, p.801 – 810, 1997.

ROSENSTEIN, D.L.; NELSON, J.C.; JACOBS, S.C. Seizures associated with antidepressants. **J. Clin. Psychiatry**, v.54, p.289 – 299, 1993.

RUMENAPP, U.; ASMUS, M.; SCHABLOWSKI, H.; WOZNICKI, M.; HAN, L.; JAKOBS, K.H.; FAHIMI-VAHID, M.; MICHALEK, C.; WIELAND, T.; SCHMIDT, M. The M3 muscarinic acetylcholine receptor expressed in HEK-293 cells signals to phospholipase D via G12 but not Gq-type G proteins. Regulators of G proteins as tools to dissect pertussis toxin resistant G proteins in receptor-effector coupling. **J Biol Chem**, v.276, p.2474 – 2479, 2001.

RUSTAY, N.R.; WAHLSTEN, D.; CRABBE, J.C. Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. **Behav Brain Res**, v.141, p.237 – 249, 2003.

SANTHAKUMARI, P.; PRAKASAM, A.; PUGALENDI, K.V. Modulation of oxidative stress parameters by treatment with *Piper betle* leaf in streptozotocin induced diabetic rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v.35, p.373 – 378, 2003.

SANTOS, B.V.O.; DA CUNHA, E.V.L.; CHAVES, M.C.O.; GARY, A.I. Fenilalcanóides de *Piper marginatum*. **Phytochemistry**, v.49, p.1381 – 1384, 1988.

SANTOS, P.R.D.; MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A.C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**, v.58, p.547 – 551, 2001.

SARKAR, M.; GANGOPADHYAY, P.; BASAK, B.; CHAKRABARTY, K.; BANERJI, J.; ADHIKARY, P.; CHATTERJEE, A. The reversible antifertility effect of *Piper betle* Linn. on Swiss albino male mice. **Contraception**, v.62, p.271 – 274, 2000.

SARKO, J. Antidepressants: old and new – a review of their adverse effects and toxicity in overdose. **Pharmacologic Advances in Emergency Medicine**, v.18, p.637 – 754, 2000.

SATYAVATI, G.V. **Medicinal Plants of India**. New Delhi, v.1, p.242, 1976.

SCHIRRMACHER, K.; BUSSELBERG, D.; LANGOSCH, J.M.; WALDEN, J.; WINTER, U.; BINGMANN, D. Effects of (±)-kavain on voltage-activated inward currents of dorsal root ganglion cells from neonatal rats. **European Neuropsychopharmacology**, v.9, p.171 – 176, 1999.

SHOUSE, M.N.; STABA, R.J.; KO, P.; SAQUIB, S.F.; FARBER, P.R. Monoamines and seizures: microdialysis findings in *locus ceruleus* and amygdala before and during amygdala kindling. **Brain Research**, v.892, p.176 – 192, 2001.

SIMON, V.M.; PARRA, A.; MINARRO, J.; ARENAS, M.C.; VINADER-CAEROLS, C.; AGUILAR, M.A. Predicting how equipotent doses of chlorpromazine, haloperidol, sulpiride, raclopride and clozapine reduce locomotor activity in mice. **Eur Neuropsychopharmacol**, v.10, p.159 – 164, 2000.

SINGH, N.; KUMAR, S.; SINGH, P.; RAJ, H.G.; PRASAD, A.K.; PARMAR, V.S.; GHOSH, B. *Piper longum* Linn. Extract inhibits TNF-alpha-induced expression of cell adhesion molecules by inhibiting NF-kappaB activation and microsomal lipid peroxidation. **Phytomedicine**, v.15, p.284 – 91, 2008.

SRINIVAS, P.V.; RAO, J.M. Isopiperolein B: an alkamide from *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v.52, p.957 – 958, 1999.

STOHR, J.R.; XIAO, P.G.; BAUER, R. Constituents of Chinese *Piper* species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, p.133 – 139, 2001.

SUNILA, E.S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p.339 – 346, 2004.

SUNILA, E.S.; KUTTAN, G. Protective effect of *Piper longum* fruit ethanolic extract on radiation induced damage in mice: a preliminary study. **Fitoterapia**, v.76, p.649 – 655, 2005.

SUNILA, E.S.; KUTTAN, G. *Piper longum* inhibits VEGF and proinflammatory cytokines and tumor-induced angiogenesis in C57BL/6 mice. **International Immunopharmacology**, v.6, p.733 – 741, 2006.

SUPINO, R. **MTT Assays in Methods in Molecular Biology: In Vitro Toxicity Testing Protocols**, O'Hara, S. e Atterwill, C. K., Human Press Inc., Totowa, NJ, 1995.

THASE, M.E.; NINAN, P.T. New goals in the treatment of depression: moving toward recovery. **Psychopharmacol Bull**, v.2, p.24 – 35, 2002.

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

TUCEK, S.; DOLEZAL, V. The non-quantal release of acetylcholine from motor nerve terminals: comment on its likely size. **Prog Brain Res**, v.98, p.209 – 212, 1993.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; BORTOLOTTI, Z.A.; MELLO, L.M.; SCHWARZ, M.; TURSKI, L. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Res**, v.321, p.237 – 253, 1984.

TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, W.A.; BORTOLOTTI, Z.A.; CAVALHEIRO, E.A. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel model of intractable epilepsy. **Synapse**, v.3, p.154 – 171, 1989.

USIA, T.; WATABE, T.; KADOTA, S.; TEZUKA, Y. Potent cyp3A4 inhibitory constituents of *Piper cubeba*. **J. Nat. Prod**, v.68, p.64 – 68, 2005.

VALDIVIA, C.; MARQUEZ, N.; ERIKSSON, J.; VILASECA, A.; MUÑOZ, E.; STERNER, O. Bioactive alkenylphenols from *Piper obliquum*. **Bioorg Med Chem**, v.16, p.4120 – 4126, 2008.

VAN DER STAAY, F.J. Animal models of behavioral dysfunctions: basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. **Brain Res. Rev**, v.52, p.131 – 159, 2006.

VAN LAAR, M.W.; VOLKERTS, E.R.; VERBATEN, M.N.; TROOSTER, S.; VAN MEGEN, H.J.; KENEMANS, J.L. Differential effects of amitriptyline, nefazodone and paroxetine on performance and brain indices of visual selective attention and working memory. **Psychopharmacology (Berl)**, v.162, p.351 – 363, 2002.

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

WILEY, J.L.; MARTIN, B.R. Cannabinoid pharmacological properties common to other centrally acting drugs. **Eur J Pharmacol**, v.471, p.185 – 193, 2003.

WILLIANSOON, E.; OKPAKO, D.; EVANS, F.J. **Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material**. Chichester: J. Willey, 1996.

WIROTESANGTHONG, M.; INAGAKI, N.; TANAKA, H.; THANAKIJCHAROENPATH, W.; NAGAI, H. Inhibitory effects of Piper betle on production of allergic mediators by bone marrow-derived mast cells and lung epithelial cells. **Int Immunopharmacol**, v.8, p.453 – 457, 2008.

WITTCHEN, H.U.; JACOBI, F. Size and burden of mental disorders in Europe: a critical review and appraisal of 27 studies. **Eur. Neuropsychopharmacol**, v.15, p.357 – 376, 2005.

WU, D.; YU, L.; NAIR, M.G.; DEWITT, D.L. Cyclooxygenase enzyme inhibitory compounds with antioxidant activities from *Piper methysticum* (kava kava) roots. **Phytomedicine**, v.9, p.41 – 47, 2002.

YAMAGUCHI, L.F.; LAGO, J.H.G.; TANIZAKI, T.M.; MASCIO, P.D.; KATO, M.J. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acids derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v.67, p.1848 – 1843, 2006.

ZAFIR, A.; BANU, N. Antioxidant potential of fluoxetine in comparison to *Curcuma longa* in restraint-stressed rats. **Eur J Pharmacol**, v.572, p.23 – 31, 2007.

ZAFIR, A.; ARA, A.; BANU, N. *In vivo* antioxidant status: A putative target of antidepressant action. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.33, p.220 – 228, 2009.

ZANGROSSI JR. Modelos animais de ansiedade. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Eds). **Ansiedade e transtornos de ansiedade**. Rio de Janeiro: Científica Nacional, p.85 – 120, 1997.

ZARINDAST, M.R. Adrenoceptor mechanisms underlying imipramine-induced memory deficits in rats. **J Psychopharmacol**, v.17, p.83 – 88, 2003.

ZAUGG, S.; CASLAVSKA, J.; THEURILLAT, R.; THORMANN, W. Characterization of the stereoselective metabolism of thiopental and its metabolite pentobarbital via analysis of their enantiomers in human

7. REFERÊNCIAS

plasma by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v.838, p.237 – 249, 1999.