



HELENA BALK MELO

**ATIVIDADE NEUROPROTETORA DO EXTRATO ETANÓLICO DE
Aristolochia cymbifera SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E PERIFÉRICO DE
VERTEBRADOS**

São Gabriel

2016

HELENA BALK MELO

**ATIVIDADE NEUROPROTETORA DO EXTRATO ETANÓLICO DE
Aristolochia cymbifera SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E PERIFÉRICO DE
VERTEBRADOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal
do Pampa, como requisito parcial para obtenção do
Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

São Gabriel

2016

Melo, Helena

ATIVIDADE NEUROPROTETORA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Aristolochia cymbifera* SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E PERIFÉRICO DE VERTEBRADOS/ Helena Balk Melo.

42 p.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação)- Universidade Federal do Pampa, CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2016.

"Orientação: Cháriston André Dal Belo".

1. Plantas neuroprotetoras. 2. Sistema Nervoso. 3. Veneno de serpentes. I. Título.

HELENA BALK MELO

**ATIVIDADE NEUROPROTETORA DO EXTRATO ETANÓLICO DE
Aristolochia cymbifera SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E PERIFÉRICO DE
VERTEBRADOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Trabalho De Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 07 de dezembro de 2016.

Banca examinadora:

Prof^o. Dr. Cháriston André Dal Belo

Orientador

UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Patricia de Brum Vieira

UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Thais Posser

UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pois entreguei a ele quando os pensamentos ruins pairavam em mim e assim fui encaminhada até aqui.

Aos meus pais, Rudi e Alzira, por sempre, mesmo na distância me apoiaram, me incentivaram e me deram forças quando as coisas ficavam difíceis e o desânimo e o choro batiam. Hoje só posso dizer que realizei meu grande sonho graças a vocês que sempre serão meus grandes heróis, fonte do maior amor que eu sinto. Não existem palavras para descrever o tamanho da minha gratidão. Muito obrigada!

Aos meus orientadores, Chariston André dal Belo e Lucia Helena do Canto Vinadé, pela atenção e pelos ensinamentos durante a minha graduação que carregarei comigo.

Aos colegas do laboratório LANETOX por toda e qualquer ajuda, direta ou indireta que me deram durante a graduação, especialmente aos colegas Raquel e Allan pela paciência ao me auxiliarem com o aprendizado das técnicas.

Há uma verdade maravilhosa ao se dizer que depois de estar certo nesse mundo, o melhor de todas as coisas é estar clara e definitivamente errado, porque assim você vai chegar a algum lugar.

T. H. Huxley

RESUMO

O Brasil é detentor da maior biodiversidade vegetal mundial. Várias das espécies de plantas aqui encontradas possuem potenciais medicinais. O Brasil sendo um país de clima tropical apresenta o maior índice de acidentes por animais peçonhentos. Assim, sabe-se que o tratamento principal para esses acidentes é o uso de soro antiofídico, mas que muitas vezes, não previne efeitos neurotóxicos periféricos e centrais. Dentre as várias plantas medicinais conhecidas por sua atividade sobre o sistema nervoso central está a *Aristolochiacymbifera*, popularmente chamada de cipó mil homens, uma planta comumente conhecida como um agente neuroprotetor, pois apresenta terpenóides, lignóides, flavonóides na sua composição, já conhecidos por tal efeito. Desta maneira, neste trabalho propusemo-nos a comprovar a atividade neuroprotetora do extrato etanólico de *Aristolochiacymbifera* (EEAC) contra o veneno da cascavel brasileira sobre o sistema nervoso central por meio de ensaios de viabilidade celular hipocámpais de camundongos utilizando o método MTT, que consiste na redução do sal MTT ao sal formazan e também foram feitos ensaios de potenciação de longa duração (LTP) utilizando hipocampo de ratos, analisando-se os potenciais excitatórios pós-sinápticos de campo. E para avaliar a neuroproteção sobre o sistema nervoso periférico empregou-se a preparação de junção neuromuscular, utilizando *biventer cervicis* de pintainhos. Os nossos resultados demonstraram que ocorreu neuroproteção no sistema nervoso central. Quando o extrato foi incubado com o tratamento em contraposição ao veneno, observou-se um crescimento na viabilidade celular, conforme aumentava as concentrações do extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera*, 30% \pm 1 55% \pm 1 e 75% \pm 2 para as concentrações de 200, 400 e 800 μ g/ml, respectivamente. Nos ensaios de LTP, sem a adição do extrato, a amplitude dos potenciais excitatórios foi de 190.6 \pm 10mV. A perfusão do EAAC (200 μ g/ml) durante 5 minutos sobre as fatias de hipocampo reduziu para 140 \pm 0.7mV. Porém nas preparações de junção neuromuscular o extrato etanólico não apresentou neuroproteção para o sistema nervoso periférico. Com base nesses resultados podemos inferir que o extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* foi benéfico ao sistema nervoso central e que, provavelmente devido a uma concentração consideravelmente alta do veneno de cascavel não pode observar-se a neuroproteção periférica.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Neuroproteção. *Aristolochia cymbifera*. *Crotalus durissus terrificus*.

ABSTRACT

Brazil detains the richest biodiversity in the world, with several species of plant presenting medicinal properties. Brazil has the highest rate of accidents by venomous animals. And the main treatment for these accidents is the use of antiofidic serum, wich many times do not prevent peripheral and central neurotoxic effects. Among the several medicinal plants known for their activity on the central nervous system is *Aristolochia cymbifera*, a plant popularly known as a neuroprotective agent, because it presents terpenoids, lignoids, flavonoids in its composition, already known for such an effect. In this way, in this work we propose to prove the neuroprotective activity of the ethanolic extract of *Aristolochia cymbifera* against venom of the Brazilian rattlesnake on the central nervous system by means of hippocampal cell viability assays of mice using the MTT method, which consists in the reduction of salt MTT to the formazan salt, and long-duration potentiation (LTP) assays were also performed using rat hippocampus, analyzing field post-synaptic excitatory potentials. And to evaluate the neuroprotection on the peripheral nervous system was used to neuromuscular junction preparations, using *biventer cervicis* of chicks. Our results demonstrated that neuroprotection occurred in the central nervous system. When the extract was incubated with the treatment as opposed to the venom, an increase in the cellular viability was observed, as the concentrations of ethanolic extract of *Aristolochia cymbifera* increased, $30\% \pm 1$, $55\% \pm 1$ and $75\% \pm 2$ for the concentrations of 200, 400 and 800 $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectively. In the LTP assays, without the addition of the extract, the amplitude of the excitatory potentials was $190.6 \pm 10\text{mV}$. The infusion of EAAC (200 $\mu\text{g} / \text{ml}$) for 5 minutes on the hippocampal slices reduced to $140 \pm 0.7\text{mV}$. However, in the neuromuscular junction preparations the ethanolic extract did not present neuroprotection to the peripheral nervous system. Based on these results we can infer that the ethanolic extract of *Aristolochia cymbifera* was beneficial to the central nervous system and that probably due considerably concentration of the venom of rattlesnake can not be observed the peripheral neuroprotection.

Keywords: Medicinal plants. Neuroprotection. *Aristolochia cymbifera*. *Crotalus durissus terrificus*..

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: <i>Aristolochia cymbifera</i>	13
Fig. 2: <i>Crotalus durissus terrificus</i>	16
Fig. 3: Efeito neuroprotetor induzido pelo extrato etanólico de <i>Aristolochia cymbifera</i> (EEAC) em contraposição ao veneno de Cdt em fatias de hipocampo de camundongos.....	23
Fig. 4: Atividade do extrato etanólico de <i>Aristolochia cymbifera</i> sobre a amplitude dos potenciais pós-sinápticos excitatórios de campo.....	24
Fig. 5: Atividade do EEAC em contraposição ao veneno de Cdt em junção neuromuscular de <i>biventer cervicis</i> de pintainhos.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

EEAC – Extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera*

Cdt – *Crotalus durissus terrificus*

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium

LTP – Potenciação de longa duração

PPSC- Potenciais excitatórios pós-sinapticos de campo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 PLANTAS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS.....	11
1.2 NEUROPROTEÇÃO A PARTIR DE EXTRATOS VEGETAIS.....	12
1.3 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DA <i>Aristolochia cymbifera</i>	13
1.4 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DA <i>Aristolochia cymbifera</i>	14
1.5 ASPECTOS GERAIS DE VENENO DE SERPENTES.....	15
1.6 ASPECTOS BIOLÓGICOS DO VENENO DE <i>Crotalus durissus terrificus</i>	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 REAGENTES	19
3.2 SOLUÇÕES NUTRITIVAS	19
3.3 EXTRATOS ETANÓLICO DA <i>Aristolochia cymbifera</i>	19
3.4 VENENO DE <i>Crotalus durissus terrificus</i> (<i>Cdt</i>)	19
3.5 ANIMAIS	20
3.5.1 RATOS	20
3.5.2 CAMUNDONGOS	20
3.5.3 PINTAINHOS	20
3.6 PREPARAÇÕES E ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	20
3.6.1 TÉCNICA DE MTT PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	20
3.6.2 PREPARAÇÃO DAS FATIAS DE CÉREBRO DE RATOS PARA OS ENSAIOS DE POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO (LTP)	21
3.6.3 PREPARAÇÃO MÚSCULO <i>biventer cervicis</i> DE PINTAINHO	22
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	22
4. RESULTADOS	22
4.1 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR.....	23
4.2 ANÁLISE DA PREPARAÇÃO DOS ENSAIOS DE POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO (LTP).....	23
4.3 ANÁLISE JUNÇÃO NEUROMUSCULAR EM PREPARAÇÃO MÚSCULO <i>biventer-cervicis</i> DE PINTAINHOS.....	25
5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÕES	27

REFERÊNCIAS	29
ANEXOS	30

1. INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Fitomedicamentos são preparados de plantas com propriedades potencialmente medicinais presentes em alguns vegetais como um todo, ou apenas em parte dele. A utilização do potencial terapêutico desses extratos vegetais é usada há muito tempo, e está intimamente relacionada com a própria evolução humana. Por exemplo, a sociedade primitiva já fazia uso dessas plantas como fármacos, valendo-se de suas próprias experiências empíricas de acerto e erro e da observação do uso de plantas pelos animais (OLIVEIRA; SIMÕES; SASSI, 2006).

O Brasil é um dos maiores detentores de biodiversidade e dispõe da flora mais rica do mundo. Segundo o Ministério do Meio Ambiente e a Secretaria de Biodiversidade e Florestas, nosso país possui cerca de 55 mil espécies de plantas (aproximadamente 22% do total mundial), incluindo vegetais com potenciais medicinais. No Brasil o uso empírico de plantas medicinais contribui de forma relevante para a popularização das potencialidades terapêuticas desses vegetais. Devido a isso, essas plantas são largamente empregadas no tratamento de doenças, mesmo que geralmente, não tenham seus constituintes químicos conhecidos ou sido estudados cientificamente. Por outro lado, esse conhecimento tem despertado o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica (MACIEL et al., 2002).

Segundo CALIXTO (2003) é estimado que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo que 25% têm sua origem em plantas. O mercado mundial de fitoterápicos é milionário e pode ser considerado uma nova forma de aproveitar a nossa flora. Por outro lado a produção de medicamentos produzidos a partir de plantas da biodiversidade brasileira é incipiente (JOLY, 2011). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), em meados de 2011, lançou uma lista contendo 66 medicamentos fitoterápicos indicados para as mais diversas patologias, sendo eficazes para casos simples ou mais graves, como distúrbios do sistema nervoso, doenças neurodegenerativas, epilepsias e no tratamento de acidentes por animais peçonhentos.

Não obstante, o Brasil é um país de clima tropical que apresenta um dos maiores índices de acidentes por animais peçonhentos do mundo. Nesse sentido, o tratamento principal para esses acidentes é o uso de soro antiofídico, mas que muitas vezes não previne efeitos neurotóxicos centrais e periféricos, nem mesmo a destruição do tecido muscular, devido a

presença de enzimas fosfolipásicas A_2 nos venenos (CHAGAS, 2007). Assim, o uso de plantas medicinais que possam ser utilizadas como coadjuvantes ao tratamento convencional, torna-se uma alternativa importante.

1.2 NEUROPROTEÇÃO A PARTIR DE EXTRATOS VEGETAIS

Os extratos vegetais que exibem propriedade neuroprotetora agem, por exemplo, contra os efeitos neurotóxicos centrais ou periféricos desencadeados por substâncias tóxicas naturais ou sintéticas (ADAMS; OLIVERA, 1994). Segundo GAGLIARDI (2000) compostos neuroprotetores são um grupo de drogas que reduzem a excitotoxicidade causada em razão de substâncias neurotóxicas, reagindo à liberação excessiva de aminoácidos excitatórios e seus efeitos intracelulares.

A excitotoxicidade refere-se ao processo neurodegenerativo iniciado pela ativação excessiva de receptores do glutamato. Este processo é um dos mais extensivamente estudados e tem uma participação importante em muitas doenças do sistema nervoso central, incluindo trauma, isquemia, epilepsia e doenças neurodegenerativas (DINGLELINE, 1999). Os principais receptores envolvidos no mecanismo da excitotoxicidade neuronal são o AMPA e o NMDA (NMetil-D-Aspartato). A ativação do AMPA determina uma entrada no neurônio pós-sináptico de íons sódio, facilitando a despolarização neuronal. Esta facilita a entrada íons cálcio no neurônio pós-sináptico, através de canais específicos, e também pela atuação do glutamato no receptor NMDA.

Portanto, o estudo dos efeitos de plantas medicinais em modelos animais permite aumentar o conhecimento sobre a patofisiologia de doenças, ao mesmo tempo em que demonstra o potencial desses compostos para o tratamento e prevenção de transtornos do sistema nervoso central (ZENI,2011).

Dentre as várias plantas medicinais conhecidas por sua atividade sobre o sistema nervoso central está a *Aristolochia cymbifera*, uma planta popularmente conhecida com um agente neuroprotetor.

1.3 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DA *Aristolochia cymbifera*

A *Aristolochia cymbifera*, popularmente conhecida como cipó-mil homens, é uma planta trepadeira herbácea da família Aristolochiaceae, vigorosa, de ramos finos e flexuosos, cujo caule é engrossado com a casca corticosa fissurada. Apresenta folhas simples e flores solitárias em forma de urna muito característica. Nativa do Brasil é encontrada nas regiões Sul e Sudeste até o estado da Bahia, em florestas e capoeiras (LORENZI E MATOS, 2008). Abaixo a imagem de *Aristolochia cymbifera*:



Figura 1: *Aristolochiacymbifera*.
Fonte: <http://www.buyrareseeds.com>

Conforme (LEMOS et. al., 1993) as plantas deste gênero têm sido extensivamente estudadas, principalmente devido as suas propriedades farmacológicas, como por exemplo, atividades pesticidas, antibióticas e antifúngicas. LORENZI & MATOS (2008) descreveram que a planta é utilizada na medicina popular como diurética, sedativa, anti-séptica, sendo também empregada em algumas regiões contra anorexia e dispepsia.

1.4 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DA *Aristolochia cymbifera*

Análises fitoquímicas realizadas no caule e na raiz da *Aristolochia cymbifera* apontaram a presença de terpenoides (mono, sesquiterpenos e diterpenos), lignoides, flavonoides, ácidos graxos e constituintes nitrogenados como os ácidos aristolóquicos (alcalóides), comuns ao gênero, são correlacionados à toxicidade da planta (TABACHET et al., 2013).

Os terpenoides conforme PASSOS (2009) como substâncias derivadas de unidades do isopreno. Derivados terpênicos têm sido utilizadas tanto na medicina popular quanto na clínica médica como sedativos, tranquilizantes e anticonvulsivantes.

Segundo MACHADO et al. (2008), os flavonoides de plantas, possuem diversas funções, entre elas, a proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alelopática, atividade anti-inflamatória e inibição enzimática.

Os lignoides que também são encontrados na espécie *Aristolochia cymbifera* são uma derivação genérica para caracterizar micromoléculas que possuem o esqueleto formado exclusivamente pelo grupo fenilpropânico (C₆-C₃). Apresentam diversas funções, tais como: ação antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, antialérgica e anti-hepatotóxica (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1994).

PELLETIER (1983) cita que um alcalóide é uma substância orgânica cíclica contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. Para fins terapêuticos é relatada sua ação com ação anestésica, analgésica, neurodepressora (SIMÕES, 1999).

Em pesquisa realizada na Espanha por MORENO (1993) demonstrou-se que o ácido aristolóquio pode inibir *in vitro* a fosfolipase A₂ (PLA₂) e também reduzir edemas induzidos por veneno de serpentes e fluido sinovial humano (PLA₂). Os resultados demonstraram que o ácido aristolóquio foi capaz de inibir a inflamação induzida por complexos imunológicos e agentes não imunológicos tais como óleo de cróton. Os autores então propuseram que o mecanismo de atividade anti-inflamatória dos alcalóides ocorra pelo bloqueio da liberação da PLA₂. Além disso, este estudo demonstrou que o ácido aristolóquico poderia também inibir outras etapas envolvidas na liberação dos eicosanóides, tais como as vias da ciclo-oxigenase e lipoxigenase. SILVA et al. (2013) também comprovou o potencial antibacteriano do extrato de *Aristolochia cymbifera* contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Shigella flexneri*.

1.5 ASPECTOS GERAIS DE VENENO DE SERPENTES

No Brasil o envenenamento por picada de serpentes peçonhentas constitui um sério problema de saúde pública, devido ao grande número de pessoas atingidas anualmente e da própria gravidade dos casos (DOS SANTOS et al., 1995). Estima-se que 5,4-5,5 milhões de pessoas são picadas por serpentes a cada ano, o que resultaria em cerca de 400.000 amputações e aproximadamente 125.000 mortes (DAL BELO et al., 2013). No país existem cerca de 360 espécies de serpentes sendo que dessas, 55 são peçonhentas (BERNARDE, 2009).

O veneno de serpentes é uma mistura de várias toxinas, apresentando-se como uma mistura heterogênea e complexa de várias substâncias de origem protéica ou não. Substâncias iônicas simples como o cálcio, que é um importante cofator de ação de algumas enzimas proteolíticas e das fosfolipases A₂, o magnésio e o zinco são importantes para a ação das principais metaloproteases do veneno, como as hemorraginas. Substâncias complexas como proteínas, principalmente as enzimas e neurotoxinas atuam sinergicamente e são responsáveis pela atividade tóxica do veneno (DAL BELO et al., 2005).

Melgarejo (2003) classifica em quatro grupos as serpentes que podem causar acidentes ofídicos no Brasil: Grupo I (Gêneros *Bothrops*: *Bothriopsis* e *Bothrocophias*; popularmente conhecidas como jararacas, caissaca, urutú-cruzeiro, jararacussu); Grupo II: (Gênero *Crotalus*; popularmente conhecidas como cascáveis); Grupo III: (Gênero *Lachesis*; popularmente conhecidas como surucucu-bico-de-jaca); Grupo IV: (Gênero *Microruse* *Leptomicrurus*; conhecidas popularmente como corais-verdadeiras). Dentre essas, o gênero *Crotalus* apresenta um veneno extremamente neurotóxico, que causa danos sobre o sistema periférico e central em mamíferos (DOS SANTOS et al., 1995).

1.6 ASPECTOS BIOLÓGICOS DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*

Como dito anteriormente, as serpentes do gênero *Crotalus* possuem venenos extremamente neurotóxicos. Dessa forma, nesse trabalho foi utilizado o veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, popularmente conhecida como cascavel. Essas serpentes são encontradas nos cerrado do Brasil central, em regiões áridas e semi-áridas do Nordeste, em campos e áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte (BERNARDE, 2009).

Segundo o Ministério da Saúde (1998) espécies do gênero *Crotalus* são as que apresentam maior índice de letalidade (1,87%) devido à frequência com que o acidente evolui para insuficiência renal aguda, sendo a mais seria complicação do envenenamento crotálico

humano (BERNARDE, 2009). Abaixo a imagem da espécie *Crotalus durissus terrificus* cascavel brasileira:



Figura 2: *Crotalus durissus terrificus*.

Fonte: http://s436.photobucket.com/user/Tex_05/media/DSC05291.jpg.html

O veneno desidratado da cascavel brasileira é constituído por 90% de proteínas. As proteínas são moléculas carregadas que se ligam com cátions ou ânions. Muitas enzimas presentes nesses venenos requerem íons para exibir suas atividades. Em alguns casos, os íons (Mg^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2}) servem de cofatores sem os quais a enzima não apresenta atividade catalítica. Carboidratos também são encontrados, geralmente na forma de glicoproteínas (TU, 1982). Quanto às enzimas, a fosfolipase A_2 (PLA_2) é a mais facilmente detectada. Também estão presentes no veneno *Crotalus durissus terrificus* neurotoxinas pré-sinápticas, compostas de subunidades ácidas e básicas cuja principal representante é a crotoxina (BEGHINI, 2001).

PINHO; PEREIRA (2001) divide os efeitos do veneno crotálico em três principais atividades com importância clínica conhecida: 1) Atividade neurotóxica, com ação periférica, causando paralisia flácida da musculatura esquelética, principalmente ocular, facial e em alguns casos, da respiração, conseqüentemente levando a insuficiência respiratória. 2) Atividade coagulante que provoca a ocorrência de sangramento e distúrbios da coagulação por consumo de fibrogênio. 3) Atividade miotóxica sistêmica, causando rabdomiólise generalizada que resulta da morte das fibras musculares, que liberam seu conteúdo para a corrente sanguínea podendo evoluir para insuficiência renal aguda, pois afeta os rins, que não conseguem, remover os resíduos concentrados da urina (CARVALHO, 2015).

O veneno crotálico é um dos mais neurotóxicos, em que os efeitos sistêmicos residem principalmente na neurotoxicidade periférica. A neurotoxicidade induzida pelo veneno de *Crotalus* em sistema nervoso periférico está essencialmente relacionada com a presença das

toxinas crotoxina e crotamina. Assim a busca por agentes neuroprotetores é relevante, de modo a complementar a soroterapia e neutralizar os danos causados por envenenamento de serpentes. (DAL BELO et al., 2013).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Nesse trabalho propusemo-nos comprovar a atividade neuroprotetora do extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* contra o veneno da cascavel brasileira (*Cdt*) em sistema nervoso central e periférico de vertebrados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito neuroprotetor induzido por diferentes concentrações do extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* contra o veneno de *Cdt* sobre a viabilidade celular de meio da técnica MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium).
- Investigar o efeito neuroprotetor central induzido por diferentes concentrações do extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* por meio da análise da potenciação de longa duração (LTP).
- Investigar o efeito neuroprotetor induzido por diferentes concentrações do extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* contra o veneno de *Cdt* sobre a junção neuromuscular em preparação músculo *biventer cervicis* de pintainhos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho foram obtidos de empresas certificadas, como a Sigma Aldrich e Merck, sendo todos de alto grau de pureza.

3.2 SOLUÇÕES NUTRITIVAS

Foram utilizadas duas soluções nutritivas. A de Krebs e a HEPES-salina, descritas a seguir:

Krebs: 68 mM NaCl, 1,66 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 47,6 mM NaHCO₃, 1,2 mM MgSO₄, 2,4 mM KH₂PO₄ e 22 mM de glicose.

HEPES-salina: 124 mM de NaCl, 4 mM KCl, 1 mM de CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, glucose 12 mM, e 25 mM; pH 7,4.

3.3 EXTRATOS ETANÓLICO DE *Aristolochia cymbifera*

Os caules secos foram gentilmente cedidos pela Universidade Federal de Uberlândia. Posteriormente, os caules secos foram macerados em EtOH (4x500 ml) à temperatura ambiente durante 24h. Posteriormente foi feita uma filtração usando-se um filtro ultra fino, sendo o solvente removido por evaporação rotativa. O resultado dessa extração foi um extrato semi-sólido, o qual foi liofilizado e armazenado a temperatura de -4°C até sua utilização.

3.4 VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* (Cdt)

O veneno de Cdt foi doado pelo Prof. José Carlos Cogo do Centro de Estudos da Natureza (CEN) da Universidade do Vale do Paraíba- UNIVAP.

3.5 ANIMAIS

3.5.1 RATOS

Ratos machos da linhagem *Wistar* adultos, pesando 150g (30-45 dias) que foram fornecidos pelo centro de bioterismo da PUCRS- CEMB.

3.5.2 CAMUNDONGOS

Camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* SPF, pesando entre 25 e 30g (30-120 dias).

3.5.3 PINTAINHOS

Pintainhos *HY-Line*, pesando entre 40 e 50 g (4-10 dias), comprados em casas agropecuárias. Todos os animais usados nesse trabalho foram alojados em vivário com temperatura controlada ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) com livre acesso à água e ração.

3.6 PREPARAÇÕES E ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.6.1 TÉCNICA DE MTT PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Após anestesia por tiopental sódico 100mg/kg os camundongos foram decapitados, em seguida os cérebros foram dissecados e umidificados imediatamente em solução tampão HEPES-salina (124 mM de NaCl, 4 mM KCl, 1 mM de CaCl_2 , 1,2 mM MgSO_4 , glucose 12 mM, e 25 mM; pH 7,4), aerado previamente com oxigênio por 30 minutos e mantido em gelo. As fatias de hipocampo (0,4 mm) foram obtidas utilizando um fatiador de tecidos McIlwainChopper. Em seguida as fatias dos hipocampos foram separadas e transferidas para placas de ELISA, mantidas em pré-incubação com tampão HEPES-salina a 37°C durante 30 minutos em 200 μl /fatia. Subsequentemente após o período de pré-incubação, o meio foi descartado e substituído por tampão fresco.

Para os ensaios, as fatias foram incubadas com *Cdt*, de EEAC e tratamento contendo 1 $\mu\text{g/ml}$ de *Cdt* mais concentrações 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ e 800 $\mu\text{g/ml}$ de EEAC em poços separados. A placa foi incubada durante 1 hora (37°C).

Após este período, o meio foi retirado e as fatias incubadas com MTT (sal de coloração amarela e solúvel em água) por 30 min a 37°C (0,05% em tampão HEPES-salina – 200 µL). Após, o meio com MTT foi retirado e substituído por 200 µl de DMSO por 30 min para a solubilização dos cristais de formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água) e as placas foram lidas em Leitor de ELISA a 540 nm. A redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

3.6.2 PREPARAÇÃO DAS FATIAS DE CÉREBRO DE RATOS PARA OS ENSAIOS DE POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO (LTP)

Os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental e em seguida os cérebros foram removidos e as fatias de hipocampo coronais (200 e 400 µm de espessura) foram cortadas com um fatiador do tipo vibroslicer (MA752, Campden Instruments, EUA) e sustentados durante pelo menos 1 h, na presença de gás de carbogênio (95%, O₂, 5% de CO₂) saturados com solução artificial de fluido cérebro-espinhal (ACSF) contendo (em mM) 130NaCl, 3,5 KCl, 1,3 NaH₂PO₄, 2 Mg²⁺, 2 CaCl₂, 10 d-glicose, e 24 NaHCO₃, pH 7,4 a 23-25°C. Fatias individuais foram transferidas para uma câmara de registro de tipo submersão e submersas abaixo da perfusão contínua de gás (95%, O₂, 5% de CO₂) com ACSF à taxa de 3,0 ml/min. Os potenciais excitatórios pós-sinápticos de campo (PPSC) foram gerados por estimulação elétrica (vinte pulsos por segundo) através de uma corrente alternada (Isoflex M.P.I., Israel). O eletrodo de estimulação consistia de um par torcido bipolar de 75 µm fios de platina-irídio (A M-Systems, Carlsborg, WA, EUA). Os potenciais foram registrados usando microeletrodos capilares de vidro (1-10 mohms) preenchidos com ACSF.

Os PPSC foram registrados utilizando um amplificador Axoclamp 2-B (Axon Instruments, Foster City, CA, EUA), ligado a um computador. No início de cada registro, foi feita uma curva para a amplitude PPSC em relação à intensidade do estímulo (aumento em 50µA de uma forma passo a passo na gama de 50 a 250 µA) sendo feito registros até a saturação das amplitudes PPSC. Esta intensidade de corrente foi ajustada para evocar uma linha de base PPSC. As respostas da linha de base com estímulos de até 0,05 Hz por pulsos pareados (0,2 ms) foram registradas durante 20 minutos antes da indução da LTP. Após a verificação da estabilidade da linha de base foi evocada a resposta de alta frequência. O protocolo de estimulação foi aplicado e os potenciais foram evocados aplicando-se pulsos tetanizantes pareados de 100 Hz, 0,2 ms, 5-10V. Os potenciais de campo foram monitorizados durante pelo menos 60 minutos após o estímulo tetânico. Os PPSC evocados foram amplificados a 600 Hz

(CyberAmp 320, Axon Instruments), digitalizados (Digidata 1322A, Axon Instruments) e registrados (Axoscope 9.2, Axon Instruments). A amplitude da resposta sináptica evocada foi medida pelo software Clampfit 9.2 (Axon Instruments). Os valores registrados foram normalizados, e em seguida, representados como a média de 2 min (PPSC) de uma a três fatias por rato (1 e 10 dias após a indução de epilepsia por administração de pilocarpina 40mg/kg durante dois dias).

3.6.3 PREPARAÇÃO MÚSCULO BIVENTER CERVICIS DE PINTAINHO

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método descrito por Rostelato (2011). Os músculos *biventer cervicis* foram obtidos a partir de pintainhos machos, sacrificados com isoflurano, montados sob uma tensão de 1g em um banho de órgãos em cuba de 5 ml à 37°C, contendo solução de Krebs aerada (95% O₂ + 5% de CO₂, v/v) com a seguinte composição: 68 mM NaCl, 1,66 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 47,6 mM NaHCO₃, 1,2 mM MgSO₄, 2,4 mM KH₂PO₄ e 22 mM de glicose; pH 7,5. Um eletrodo bipolar de anel de platina foi colocado em torno do tendão dentro do qual o tronco do nervo que inerva o músculo é estimulado. A estimulação (0,1 Hz, 0.2ms, 4-6V) foi feita com um estimulador elétrico (AVS Projetos, São Carlos, SP). As contrações musculares e contraturas foram registradas isometricamente através de um transdutor de deslocamento de força acoplado a um fisiógrafo AVS através de um amplificador universal. As contraturas foram evocadas pela aplicação exógena de Acetilcolina -ACh- (110 µM) e Cloreto de potássio -KCl- (20 µM), como um teste para a presença de atividades miotóxicas e neurotóxicas. As preparações foram deixadas estabilizar durante pelo menos 20 minutos antes da adição do controle negativo com *Cdt* (20 µg/ml) e os tratamentos contendo 60µg/ml e 100µg/ml do extrato etanólico com a presença de 20µg/ml de *Cdt* ao banho. As respostas de contração muscular foram registradas durante 120 minutos.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram representados como a média ± erro padrão da média e as diferenças entre os tratamentos foram confirmadas por meio do teste ANOVA e *t* de Student onde $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

A análise de viabilidade celular foi obtida medindo-se a porcentagem de células viáveis após a exposição aos tratamentos (Fig. 3). O ensaio do EEAC (200, 400 e 800 $\mu\text{g/ml}$) isoladamente não induziu alterações no número de células viáveis ($n=3$, $p>0.05$ respectivamente). Quando o extrato foi incubado 30 minutos antes com o veneno de *Cdt* foi observado um aumento na viabilidade celular quando comparado ao *Cdt* ($70\pm 2\%$, $85\pm 4\%$ e 60% , para as concentrações de 200, 400 e 800 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, $n=3$, $p<0.05$).

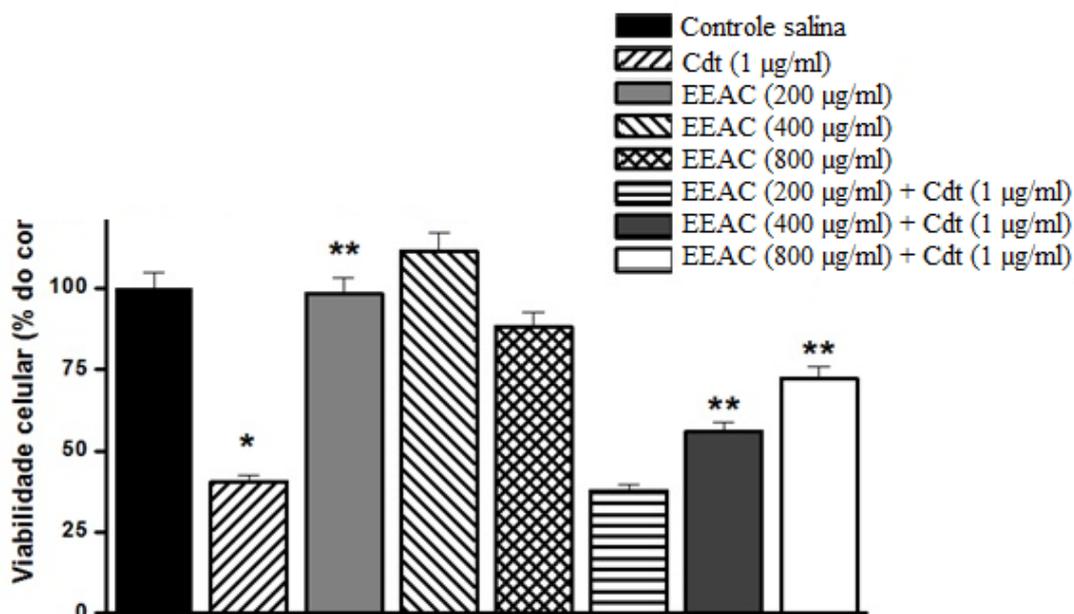


Fig. 3: Efeito neuroprotetor induzido pelo EEAC contra o veneno *Cdt* em fatias de cérebro de camundongos. No gráfico cada barra representa a média \pm E.P.M. de no mínimo três experimentos. Note que conforme aumentava as concentrações do EEAC maior era a proteção contra o efeito excitotóxico do veneno de cascavel. * $p<0.05$ em comparação com o controle salina; ** $p<0.05$ em comparação ao EEAC.

4.2 ANÁLISE DA PREPARAÇÃO DOS ENSAIOS DE POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO (LTP)

A análise do LTP foi obtida a partir da porcentagem amplitude normalizada dos potenciais excitatórios pós-sinápticos de campo. Assim, na preparação controle, sem adição do extrato, a amplitude dos potenciais excitatórios foi de 190.6 ± 10 mV ($n = 6$). A perfusão do EAAC (200 μ g/ml) durante 5min sobre as fatias de hipocampo reduziu para 140 ± 0.7 mV, $n=6$, $p<0.05$ ($40\pm 5\%$) a amplitude dos PPSC ($n=6$, $p<0.05$), ou seja, inibiu significativamente a atividade excitatória do hipocampo de ratos (Fig.4).

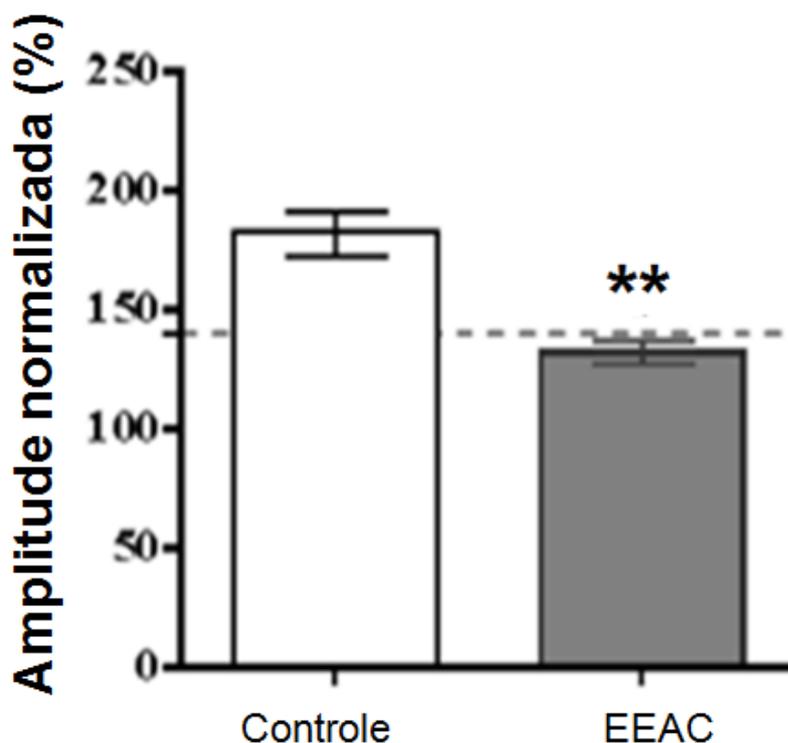


Fig. 4: Atividade do extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* (EEAC) sobre a amplitude dos potenciais pós-sinápticos excitatórios de campo (PPSC). Note que a aplicação do EEAC induziu uma diminuição significativa na amplitude média dos PPSC. No gráfico a linha pontilhada significa o linear para o início da potenciação de longa duração (LTP).** $p<0.05$.

4.3 ANÁLISE JUNÇÃO NEUROMUSCULAR EM PREPARAÇÃO MÚSCULO *biventer cervicis* DE PINTAINHOS

A preparação da junção neuromuscular utilizando *biventer cervicis* de pintainhos, exibiu retardamento do efeito de *Cdt* no sistema nervoso periférico quando se utilizou concentrações de 100µg/ml de EEAC, havendo bloqueio irreversível após 1 hora de registro. Não houve resultados significativos na concentração de 60µg/ml em comparação ao controle feito com *Cdt* (Fig. 5).

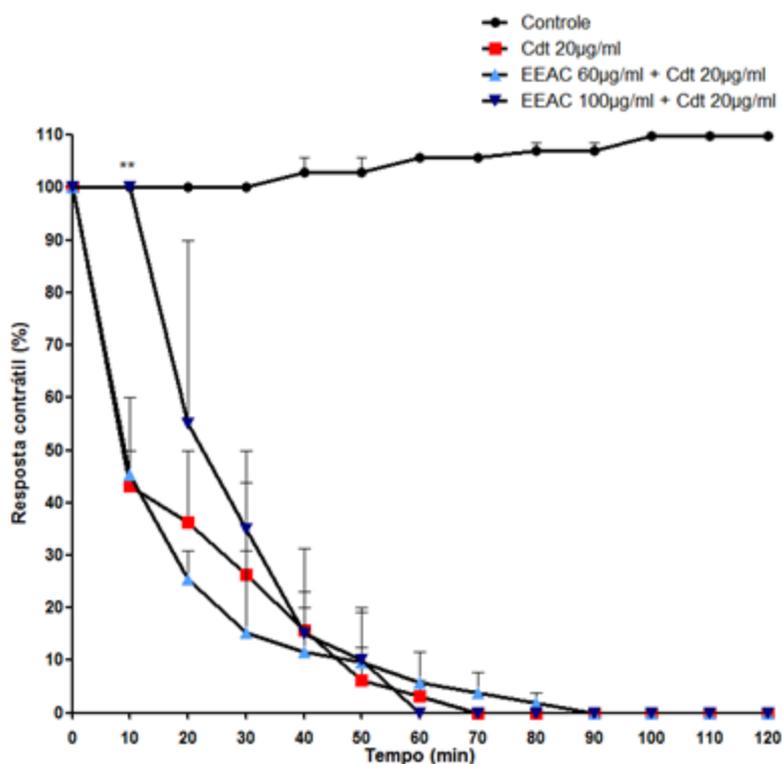


Fig. 5: Atividade do EEAC em contraposição ao veneno de *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*) em preparação músculo *biventer cervicis* de pintainhos. No gráfico cada ponto representa a média \pm E.P.M. de no mínimo três experimentos. Note que a maior concentração utilizada de EEAC (100µg/ml) induziu um retardo significativo do efeito bloqueador do veneno nos primeiros 10min. ** $p < 0,05$ em comparação com a preparação tratada apenas com *Cdt*.

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho comprovaram o potencial neuroprotetor do EEAC, principalmente sobre o sistema nervoso central de vertebrados.

Primeiramente por meio dos ensaios de viabilidade celular verificou-se que o extrato da planta não é tóxico para o sistema nervoso e que o veneno *Cdt* diminuiu significativamente a viabilidade das células do hipocampo. Feito isso, foi observada neuroproteção utilizando o EEAC como tratamento em contraposição ao *Cdt* após uma hora de incubação.

A LTP é descrita como um aumento na amplitude dos potenciais excitatórios pós-sinápticos após a aplicação de um breve estímulo tetânico. Essa repetida estimulação de um grupo de neurônios, resulta em mecanismos semelhantes a epilepsia (FRISON, 2003). Deste modo podemos inferir através dos resultados obtidos que o extrato da *Aristolochia cymbifera*, além de apresentar potencialidade neuroprotetora, também pode exibir características anti-epilépticas, pois após 5 minutos da perfusão do EAAC (200 µg/ml) sobre as fatias de hipocampo, reduziu a amplitude dos PPSC em comparação ao controle.

De fato, FARDE e SHOJAI (2013) demonstraram um efeito neuroprotetor similar sobre o sistema nervoso de ratos, usando o extrato etanólico de *Terminalia chebula*. Além disso, várias outras plantas, também já foram investigadas quanto à mesma capacidade.

HEDGE et al. (2009) cita como fator subjacente a epilepsia um aumento nos ácidos glutâmicos, que é um neurotransmissor excitatório, e inibição de GABA. Nesse sentido, Johnston et al. (2006) ressalta que compostos naturais vegetais apresentam uma vasta gama de flavonoides e terpenos que modulam a função de receptores ionotrópicos que atuam na via gabaérgica para inibir o processo de neurotoxicidade causado por estados convulsivos. Desta forma, pode-se induzir que se um excesso de glutamato estivesse causando danos excitotóxicos para o sistema nervoso, a liberação de GABA poderia atuar diminuindo a entrada de cálcio excessiva e prevenindo a ativação de vias celulares que levariam a morte das células, ou seja, apresentaria ação neuroprotetora. (SOUZA, 2010). Portanto, podemos inferir que a ação de *Aristolochia cymbifera* mostra ação semelhante a de outras plantas já estudadas que apresentam capacidade moduladora de GABA.

Nas preparações de junção neuromuscular utilizando *biventer cervicis* de pintainhos observou-se um atraso do efeito do veneno *Cdt* quando incubado juntamente com o tratamento de EEAC com a concentração mais alta utilizada (100 µg/ml). Porém, após aproximadamente 50 minutos de registro ocorreu um bloqueio irreversível com as concentrações usadas (60 µg/ml e 100µg/ml).

Podemos concluir que não pode-se concluir que o extrato da *Aristolochia cymbifera* apresenta efeito neuroprotetor contra o efeito do veneno *Cdt* no sistema nervoso periférico, pois a dose usada para as preparações de junção neuromuscular foi consideravelmente alta. Ensaios futuros com doses menores estão em andamento.

Assim, os dados corroboram que, em parte foi confirmada a atividade neuroprotetora da *Aristolochia cymbifera* no sistema nervoso, agindo principalmente no sistema nervoso central.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados alcançados e nos aspectos discutidos, a dose de 800 $\mu\text{g/ml}$ de EEAC apresentou maior ação neuroprotetora em hipocampo de camundongo. E que a diminuição nas amplitudes dos potenciais excitatórios pós-sinápticos de campo após a perfusão de 200 $\mu\text{g/ml}$ do EEAC nas fatias hipocampais de rato, corroboram este potencial neuroprotetor no sistema nervoso central de vertebrados. E, apesar disso não foi comprovada a neuroproteção em sistema nervoso periférico.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. E., OLIVEIRA B. M. **Neurotoxins**: overview of anemerging research technology. Trends in Neurosciences, v. 17, n. 4, p. 151-155, 1994.
- BERNARDE P. S. **Acidentes ofídicos**. Laboratório de Herpetologia- UFAC, 2009.
- CALIXTO, J. B. **Biodiversidade como fonte de medicamentos**. Biodiversidade/artigos, p. 37, 2003.
- CARVALHO, A. C. B.; BRANCO P. F.; FERNANDES L. A.; MARQUES R. F. DE O. CUNHA S. C., PERFEITO J. P. S. **Brazilian Regulation on Medicinal Plants and Herbal Medicines**. Revista Fitos, v. 7, n. 1, jan./mar. 2012.
- CASTRO, I. de. **Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase a toxicidade renal**. O mundo da saúde de São Paulo, v. 30, p. 644-653, out./dez./2006. CHAGAS, G. **Uma droga contra veneno de serpente**. Jornal UNESP, ano XX, nº 219, jan./fev. 2007.
- DAJAS F, RIVERA F., BLASINA F., URBANAVICIUS J., ARREDONDO F, LAFON L, COSTA G., ECHEVERRY C., FERREIRA M., MORQUIO A. **Mechanisms of neuroprotection. The contribution of quercetin in focal ischemia and cell culture**. Federação de Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental (FESBE), Salvador, BA, Brazil, 28-31,2002.
- DAL BELO C. A., LUCHO A. P. B., VINADÉ L., ROCHA L., FRANÇA H.S., MARANGONI S., RODRIGUES-SIMIONI L. **In Vitro Antiophidian Mechanisms of *Hypericum brasiliense* Choisy Standardized Extract: Quercetin-Dependent Neuroprotection**, Biomed Research International, p. 6, 2013.
- FARD M. H., SHOJAI A. **Efficacy of Iranian Traditional Medicine in the Treatment of Epilepsy**. Biomed Research International, p. 8, 2013.
- FRISON, T. B. **Estudo da potenciação de longa duração em fatias de hipocampo de ratos com períodos distintos de epilepsia do lobo temporal induzida pela pilocarpina**. Programa de pós-graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS, 2003.
- GAGLIARDI, J. R. **Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists**. Arquivo Neuropsiquiatria, 583-588, 2000.
- HEDGE K., THAKKER S. P., JOSHI A. B., SHASTRY CS., CHANDRASHEKHAR KS. **Anticonvulsant Activity of *Carissa carandas* Linn. Root Extract in Experimental Mice**. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, p. 117-125, v. 8, 2009.
- JIA, L. G.; SHIMOKAWA, K. I.; BJAMSON, J. B., FOX, J. W. **Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins**. Toxicon, 34: 1269-76, 1996.

JOLY, C. A., HADDAD C. F. B., VERDADE L. M., OLIVEIRA M. C., BOLZANI V. Da S., BERLINCK R. G. S., **Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil**. Revista USP, p. 127, 2011.

JOHNSTON G. A. R., HANRAHAN J.R., CHEBIB M., DUKE R. K., MEWETT K. N. **Modulation of Ionotropic GABA Receptors by Natural Products of Plant Origin**. Advances in pharmacology, v. 54, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, p. 544, 2008.

MACIEL M. A. M., PINTO A. C., VEIGA V. F. JR., GRYNBERG N. F., ECHEVARRIA A., **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. Química Nova, v. 25, n. 3, 429-438, 2002.

MACHADO H., NAGEM T. J., PETERS V. M., FONSECA C. S., OLIVEIRA T. T. de. **Flavonóides e seu potencial terapêutico**. Boletim do Centro de Biologia de Reprodução, v. 27, p. 33-39, 2008.

MARIGO, F. A., CRONEMBERGER S., CALIXTO N. **Neuroproteção: situação atual no glaucoma**. Arq. Bras. Oftamol, v. 64, p. 167, 2001.

MORENO, J. J. **Effect of aristolochic acid on arachidonic acid cascade and in vivo models of inflammation**. Immunopharmacology, v. 26, p 1-9, 1993.

MORSW.B., Nascimento M. C do., Pereira B. M. R. Pereira N. A. **Plant natural products active against snakebite – the molecular approach**. Phitochemistry, v. 55, p. 627-642, 2000.

OLIVEIRA, M. J. R., SIMÕES, M. J. S., SASSI, C.R.R. **Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil**. Revista Brasileira Plantas Mediciniais, v.8, n.2, p.39-41, 2006.

PASSOS, C. S., ARBO, M. D., RATES S. M. K., VON POSER, G. L. **Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC)**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 19, p. 140-149, jan./mar. 2009.

PINHO F. M. O., PEREIRA I. D., **Ofidismo**. Rev. Ass. Med. Brasil, v. 47, 2001.

RAUBER, C. **Avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto®) em ratos Wistar**. Programa de pós graduação em Ciências Veterinárias, 2006.

ROSTELATO-FERREIRA, S., DAL BELO C. A., CRUZ-HÖFLING M. A. da, HYSLOP S., RODRIGUES-SIMIONI L. **Presynaptic effect of a methanolic extract of toad (*Rhinella schneideri*) poison in avian neuromuscular preparation**. Journal of venom research, 2011, v. 2, p. 32-36.

SANTOS, M. C. dos, MARTINS M., BOECHAT A. L., SÁ-NETO R. P., OLIVEIRA M. E de. **Serpente de interesse médico da Amazônia: biologia, veneno e tratamento de acidentes.** Associação Brasileira das editoras universitárias, 1995, 75 p.

SILVA W. F. JR., CECÍLIO, S. G., MAGALHÃES C. LB., FERREIRA J. MS., TÓTOLA A. H., MAGALHAES J. C DE. **Combination of extracts from *Aristolochia cymbifera* with streptomycin as a potential antibacterial drug.** Springer Plus Journal, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** 5 ed.. Ed. Guanabara Kooga,, 387 p, 1994.

SOUZA, E. M. G. **Caracterização dos efeitos dos receptores metabotrópicos de glutamato no sistema gabaérgico ao longo do desenvolvimento da retina de pinto.** Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal Fluminense, 2010.

TU, A. T. **Venoms of crotalidae (Crotalids, pit vipers).** In: **Venoms: Chemistry and Molecular Biology.** New York: John Wiley& Sons, p. 211, 1977.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. **Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins.** Biochim Biophys Acta, v.1488, n.1-2, p.59-70, 2000.

ZENI, A. L. B. **Estudo fitoquímico, toxicológico e dos efeitos neuroprotetor e tipo antidepressivo do extrato aquoso de *Aloysia gratissima* (gill et hook) troncoso (erva santa).** Programa de pós-graduação em Neurociencias, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, 2011.

WELTON A. F., TOBIAS LD & Fiedler-Nagy C. **Effect of flavonoids on arachidonic acid metabolism.** Progress in Clinical and Biological Research, 213: 231-242,1986.

ANEXOS

RESUMO ANAIS DE CONGRESSO- SIEPE 2014

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEUROTÓXICA INDUZIDA PELO EXTRATO HIDROALCOOLICO DE *Aristolochia cymbifera* SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CAMUNDONGOS

Helena Balk, Chariston Andre Dal Belo, Carlos Gabriel Moreira de Almeida, Lucia Helena do Canto Vinadé

Atualmente diversos estudos científicos têm investigado as propriedades biológicas de espécies vegetais, as quais têm contribuído para o tratamento de diversas patologias. Nos acidentes por animais peçonhentos a neurotoxicidade central e periférica é um fenômeno comum. Nesse aspecto, as plantas medicinais brasileiras têm sido utilizadas tradicionalmente como alternativa para o tratamento dos sintomas pelo envenenamento ofídico. A *Aristolochia cymbifera* é uma planta nativa da região do cerrado. Já foi comprovado que plantas desse gênero possuem estruturas químicas como alcaloides, ácidos aristolóquicos, flavonoides, esterres fenólicos e óleos voláteis, que são conhecidos por exercerem atividade neuroprotetora. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do extrato aquoso de *Aristolochia cymbifera* (EAAC) em contrapor o efeito neurotóxico induzido pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*) sobre o hipocampo de camundongos. Foram usados camundongos adultos fêmeas da linhagem Balb-C pesando entre 25-30g. Os animais foram alojados em vivário com temperatura controlada (25-27 Célsius) com água e ração *ad libitum*. Os resultados foram plotados como a média \pm EPM. O teste t de Student foi usado para a análise estatística. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0.05$. Foram ensaiadas diferentes concentrações do EAAC utilizando a técnica do MTT na ausência e presença do veneno de *Cdt*. A técnica do MTT consiste na avaliação da viabilidade celular pela atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais, quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água). A redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular. Assim, o ensaio do EAAC (200, 400 e 800 $\mu\text{g/ml}$) isoladamente não induziu alterações significativas no número de células viáveis ($n=3$, $p > 0.05$ respectivamente). O veneno de *Cdt* 5 $\mu\text{g/ml}$ induziu redução de $70 \pm 2\%$ no número de células viáveis ($p < 0.05$, $n=3$). Quando o extrato foi incubado 30min antes com o veneno de *Cdt* 5 $\mu\text{g/ml}$ foi observado um aumento significativo na viabilidade celular quando comparado ao controle com *Cdt* ($70 \pm 2\%$, $85 \pm 4\%$ e 60% , respectivamente para as concentrações de 200, 400 e 800 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, $n=3$, $p < 0.05$ em relação ao veneno de *Cdt*). O extrato aquoso de *Aristolochia cymbifera* demonstrou eficácia em contrapor a neurotoxicidade induzida pelo veneno da cascavel brasileira sobre o sistema nervoso central de mamíferos. Ensaios bioquímicos futuros para a medida da atividade PLA₂ poderão reforçar o potencial antiofídico dessa planta.

RESUMO ANAIS CONGRESSO- SIEPE 2015

EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Aristolochia cymbifera* SOBRE A NEUROPROTEÇÃO E A MEMÓRIA EM MAMÍFEROS

Helena Balk Melo , Carlos Gabriel Moreira de Almeida, Simone Denise Salamoni, Zaquer Costa Ferro, Lucia Helena Vinadé, Cháriston André Dal Belo

RESUMO: Os extratos vegetais tem se destacado como alternativa comum em estados patológicos que envolvem o sistema nervoso central, agindo em sintomas de excito toxicidade. Dentre esses extratos vegetais está a *Aristolochia cymbifera*, plantas desse gênero exibem em sua composição metabólitos secundários com estruturas químicas já conhecidas por exercerem atividade neuroprotetora. O objetivo do estudo foi avaliar o potencial do extrato etanólico de *Aristolochiacymbifera* em contrapor ao efeito neurotóxico induzido pelo veneno de *Crotalusdurissusterrificus* sobre o hipocampo de camundongos através de ensaios de viabilidade de células por meio da técnica do MTT. Também objetivou-se investigar a atividade do extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* sobre a potenciação de longa duração em fatias de hipocampo de ratos por meio de registros extracelulares de potenciais excitatórios pós sinápticos de campo. O extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* induziu neuroproteção em hipocampo de camundongos, também se observou uma diminuição na amplitude por meio de registros extracelulares de potenciais excitatórios pós sinápticos de campo, sugerindo uma atividade benéfica potencial do extrato de doenças neurodegenerativas.

Palavras-Chave: *Aristolochia cymbifera*, hipocampo, atividade antineurotóxica, viabilidade celular, LTP

INTRODUÇÃO Atualmente diversos estudos científicos têm investigado as propriedades medicinais de espécies vegetais, as quais têm contribuído para o tratamento de várias patologias. A neurotoxicidade é um fenômeno comum em estados patológicos que envolvem o sistema nervoso central. Doenças como o Alzheimer, Parkinson e as epilepsias envolvem em algum de seus estágios o desenvolvimento de fenômenos excito tóxicos e a liberação excessiva do íon cálcio (GASIORA et al., 2006). Nesse aspecto, as plantas medicinais brasileiras tornam-se uma excelente alternativa como coadjuvantes no tratamento dos sintomas relacionados à excito toxicidade. A *Aristolochia cymbifera* é uma planta nativa da região do cerrado. Plantas desse gênero exibem metabólitos secundários com estruturas químicas de alcalóides, ácidos aristolóquicos, flavonoides, ésteres fenólicos e óleos voláteis (TREASE; EVANS, 1980), que são conhecidos por exercerem atividade neuroprotetora. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* (EEAC) em contrapor o efeito neurotóxico induzido pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) sobre o hipocampo de

camundongos. Também objetivou-se investigar a atividade do EEAC sobre a potenciação de longa duração (LTP) em fatias de hipocampo de ratos.

METODOLOGIA: Para os ensaios de viabilidade celular foram usados camundongos adultos fêmeas da linhagem Balb-C pesando entre 25-30g. Para os ensaios de LTP usaram-se ratos machos juvenis (100g) da linhagem *Wistar*. Os animais foram alojados em vivário com temperatura controlada (25-27° C) com água e ração ad libitum. Os resultados foram plotados como a média \pm EPM. Foram usados os testes “t” de Student e ANOVA/MANOVA para as análises estatísticas. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0.05$ respectivamente). O veneno de Cdt 5 μ g/ml induziu redução de 70 \pm 2% no número de células viáveis ($p < 0.05$)

RESULTADOS E DISCUSSÃO: O ensaio do EEAC (200, 400 e 800 μ g/ml) isoladamente não induziu alterações significativas no número de células viáveis ($n=3$, $p > 0.05$ respectivamente). O veneno de Cdt 5 μ g/ml induziu redução de 70 \pm 2% no número de células viáveis ($p < 0.05$, $n=3$). Quando o extrato foi incubado 30min antes com o veneno de Cdt 5 μ g/ml foi observado um aumento significativo na viabilidade celular quando comparado ao controle com Cdt (70 \pm 2%, 85 \pm 4% e 60%, para as concentrações de 200, 400 e 800 μ g/ml respectivamente, $n=3$, $p < 0.05$ em relação ao veneno (Cdt). A perfusão do EAAC (200 μ g/ml) durante 20min sobre as fatias de hipocampo reduziu em 40 \pm 5% a amplitude dos PPSC ($n=6$, $p < 0.05$)

CONCLUSÕES: Em conclusão o extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* apresentou efeito neuroprotetor contrapondo a neurotoxicidade induzida pelo veneno da cascavel brasileira sobre o sistema nervoso central de camundongos. Também ficou evidenciado o potencial do EEAC em inibir a formação da potenciação de longa duração no hipocampo de ratos. Esse último dado sugere uma atividade inibidora sobre os neurônios excitatórios ou mesmo um reforço na neurotransmissão inibitória do hipocampo, pelos compostos químicos presentes no extrato. Os dados reforçam ainda o potencial do extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* no tratamento de doenças neurodegenerativas, como as epilepsias. Futuros ensaios de cromatografia e análise bioguiada dos compostos presentes no extrato poderão indicar os princípios ativos envolvidos na modulação das respostas sinápticas sobre o sistema nervoso central.