

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL DE PROJETO PIBIC

**ESTUDO DO EFEITO DO EXTRATO DE *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE COMPORTAMENTO.**

PESQUISADOR: Mayra Evangelista de Almeida

Orientadora: Prof^ª Dr^a Cinthya Iamille Frithz Brandão de Oliveira.

MANAUS
Junho – 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL DE PROJETO PIBIC

**ESTUDO DO EFEITO DO EXTRATO DE *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE COMPORTAMENTO.**

Pesquisador: Mayra Evangelista de Almeida

Trabalho apresentado como Relatório Final de projeto no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC, sob orientação da Prof^a Dr^a Cinthya Iamille Frithz Brandão de Oliveira.

MANAUS
Junho - 2012

RESUMO

Extratos vegetais brutos são potenciais agentes bioativos que podem alterar vários processos biológicos. *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, popularmente conhecida como "cerveja de índio", pertence à família Rhamnaceae, e é uma espécie encontrada na região norte do Brasil, especialmente no Estado do Amazonas. Já foram identificados vários constituintes químicos, dentre eles: triterpenos, saponinas e lupeol. **Objetivo:** Estudar os efeitos farmacológicos do extrato das raízes de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, em modelos de comportamento experimental em animais de laboratório, visando obter informações sobre sua possível ação sobre o comportamento geral, a agitação mecânica e o sono. **Metodologia:** Foram utilizados camundongos Swiss para realização de modelos de comportamento já consagrados em muitos outros estudos. Os testes escolhidos para o projeto foram o Teste de Comportamento Geral, Modelo do Campo Aberto, Modelo de Sono Induzido por Pentobarbital. **Resultados:** Nós observamos que os extratos de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke podem ter uma ação energética, conforme é relatado por populações indígenas. Além desta ação analgésica, também pudemos perceber que a via que melhor reproduz a ação estimulatória dos extratos e frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke foi a via oral, uma vez que ao ser utilizada a via intraperitoneal (no modelo experimental do campo aberto) o resultado obtido não foi o esperado, sendo a metabolização uma possível explicação para o fato. **Discussão:** Apesar do seu uso popular, o projeto não tinha, no início, uma definição específica da função do extrato das raízes de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, já que não há estudos publicados a respeito do tema. Por isso seu objetivo principal era de estudar seus efeitos farmacológicos em modelos de comportamento experimental. Nos testes realizados, além de analisar possíveis efeitos dos extratos sobre o comportamento do animal, também pudemos observar as diferenças entre as várias formas de extrato. **Conclusão:** Estes resultados deram um direcionamento sobre a possível ação do extrato de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, assim, é importante que sejam feitos mais estudos com um enfoque em uma possível ação analgésica que foi visualizada.

Palavras-chave: cerveja de índio, efeitos farmacológicos, camundongos.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	E
erro! Indicador não definido.	
2. OBJETIVOS	6
3. METODOLOGIA	7
3.1. Isolamento dos constituintes químicos das espécies de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke.....	6
3.2. Animais e considerações de ética.....	7
3.3. Modelos experimentais.....	7
3.3.1 Teste do efeito das drogas no comportamento geral de camundongos.....	7
3.3.2 Atividade motora, modelo do Campo Aberto.....	8
3.3.3 Atividade hipnosedativa, modelo de Sono Induzido por Pentobarbital.....	8
3.4. Análise Estatística.....	9
4. RESULTADOS	9
4.1. Teste do efeito das drogas no comportamento geral de camundongos	9
4.2. Atividade motora, modelo do Campo Aberto.....	12
4.3. Atividade hipnosedativa, modelo de Sono Induzido por Pentobarbital.....	13
5. DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÃO	17
7. REFERÊNCIAS	
.....	Erro! Indicador não definido.
8. CRONOGRAMA.....	22
9. ANEXOS	23

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento, a manipulação e a utilização de plantas medicinais no Brasil devem seus primeiros registros históricos aos diários dos naturalistas que acompanharam as expedições exploratórias às terras do Novo Mundo (PIRES et al, 1984).

Uma resolução da Organização Mundial de Saúde (OMS) alerta para a importância das plantas medicinais nos sistemas de saúde dos países em desenvolvimento (AKERELE et al, 1985). O programa de Medicina Tradicional da OMS ressalta a importância do estudo das plantas usadas na medicina popular com o objetivo de verificar, tanto seu possível efeito terapêutico, como também a possível presença de substâncias tóxicas que podem existir nestas plantas. Estes fatos enfatizam a necessidade de metodologia científica adequada para caracterizar os efeitos fisiológicos, farmacológicos e toxicológicos das plantas medicinais. Soma-se a isto, a necessidade de isolamento e purificação dos eventuais compostos que apresentem as atividades biológicas atribuídas a tais plantas, o que poderia levar ao desenvolvimento de compostos mais seguros e potentes no tratamento de diversas alterações fisiopatológicas.

O Brasil, com mais de 120.000 variedades de plantas, possui uma enorme diversidade biológica sendo considerado, portanto, um dos últimos celeiros da flora e fauna do Planeta. Nos últimos anos, numerosas pesquisas com plantas medicinais usadas como remédio ou veneno, na medicina popular, têm sido desenvolvidas no Brasil.

A utilização de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos para a recuperação da saúde é uma prática generalizada, sendo o resultado do acúmulo secular de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais por diversos grupos étnicos (SIMÕES et al, 1986). Considerada em tempos remotos como uma manifestação divina, a utilização de plantas medicinais é tão antiga quanto a própria civilização (YAMADA et al, 1998). O potencial das plantas superiores como fonte de medicamentos é pouco explorado, estima-se a existência de 250.000-500.000 espécies de plantas no mundo, mas o estudo fitoquímico foi realizado em apenas uma minúscula parcela. Neste estudo iremos analisar o efeito causado pelo uso agudo e o crônico do extrato de *Ampelozizyphus*

amazonicus Ducks em modelos comportamentais, utilizando animais experimentais (ratos e camundongos).

2. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

- Estudo dos efeitos farmacológicos do extrato das raízes de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, em modelos de comportamento experimental em animais de laboratório.

Objetivos Específicos

- Avaliar os extratos de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke obtidos quanto à sua eficácia, tempo de ação, duração de seus efeitos, toxicidade e confiabilidade através do Teste Inicial de Avaliação do Efeito das Drogas no Comportamento Geral de Camundongos;

- Avaliar o efeito farmacológico do extrato das raízes de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke na atividade motora, no modelo de campo aberto;

- Avaliar o efeito farmacológico do extrato das raízes de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke nas atividades hipnóticas e sedativas, em modelo de sono induzido por pentobarbital.

3. METODOLOGIA

a. Isolamento dos constituintes químicos das espécies de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke:

Os extratos e frações isoladas das cascas de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke foram fornecidos pela equipe do Prof. Dr. Jefferson do Departamento de Química/UFAM, que realizou a marcha fitoquímica e a identificação das frações.

b. Animais e considerações de ética:

Foram utilizados camundongos Swiss, machos e fêmeas (20-30g), oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno e mantidos sob temperatura média de 22°C, em ciclos claro/escuro de 12/12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade. Todos os protocolos seguiram estritamente as normas internacionais de cuidados com animais de laboratório e foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal da UFAM.

c. Modelos experimentais:

A atividade comportamental dos animais, especialmente roedores, pode ser avaliada em vários equipamentos de laboratório podendo resultar em diferentes tendências ou impulsos, isto é, pode ser uma atividade específica relacionada à exploração do ambiente ou à esquiva de aspectos particulares do ambiente, ou ainda, simplesmente uma atividade geral inespecífica (Lapa et al., 2003).

d. Teste do efeito de extratos e frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* em modelo de comportamento geral de camundongos.

Os animais foram separados em grupos (n = 6), e tratados via oral com 12 substratos relativos à *A. amazonicus*, controle positivo (cafeína, 50 mg/kg) e veículo (10 mL/kg). Foram anotados o comportamento dos camundongos nos tempos de: 0 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos e 90 minutos, para que pudéssemos futuramente analisar o tempo do início da ação de cada extrato, a melhor dose a ser utilizada, a toxicidade em

relação à dose e ao tipo específico de extrato e se havia diferenças quanto ao efeito dos diferentes tipos de extrato, estabelecendo assim a curva de tempo de ação de cada extrato e seus possíveis efeitos. A tabela de avaliação usada em tal experimento encontra-se no anexo (Tabela 1).

e. Efeito dos extratos e frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* na atividade motora utilizando o modelo do Campo Aberto.

A atividade exploratória de animais de laboratório pode ser analisada pela tarefa do campo aberto que permite observar como o animal se comporta em um ambiente amplo (HO et al., 2002). A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo ambiente (MONTGOMERY et al., 1955). O objetivo deste teste é avaliar a atividade estimulante ou depressora do extrato, podendo ainda indicar atividades mais específicas como ansiolítica/ansio gênica. O teste é realizado em uma caixa de madeira com dimensões 30x30x15 cm, em que o fundo é dividido por linhas pretas em 12 quadrados iguais. Neste experimento é avaliada a movimentação espontânea entre as divisões da caixa que indica a atividade exploratória dos animais. Pode-se avaliar também o medo dos animais que se reflete pela imobilidade na caixa e a capacidade de exploração do ambiente e fuga. Avalia-se a atividade exploratória dos animais: sua movimentação espontânea (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo), o número de comportamentos de autolimpeza (“grooming”) e de levantar (“rearing”), registrados durante um período de 4 minutos, após os tratamentos. Os camundongos foram divididos em grupos (n=6) e tratados, por via intraperitoneal, divididos em grupos: Grupo 1: Casca pelo método Rodrigues (CaR); Grupo 2: Casca pelo método Brandão (CaB); Grupo 3: EDCCAA na concentração de 50 mg/kg e veículo (10 mL/Kg) e 30 minutos após foram colocados no centro do campo aberto para início do teste. Os animais permaneceram na caixa por 5 minutos, sendo que o primeiro minuto não é computado, pois é o tempo para ambientação do animal ao local.

f. Efeito na atividade hipnosedativa dos extratos e frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* no modelo de Sono Induzido por Pentobarbital.

Os animais foram divididos em grupos (n = 6) e receberam, por via oral, extrato e frações isoladas na concentração de 50 mg/kg e veículo (10 mL/Kg). Após uma hora da administração, os animais receberam pentobarbital sódico (60 mg/Kg, i.p.). Então observamos os camundongos para que pudéssemos analisar o tempo de latência e o tempo total de sono durante os 120 minutos de experimento. Observamos também, a duração da perda do reflexo postural (tempo de recuperação) dos animais, após a administração do barbitúrico registrada em minutos.

4. Análise Estatística

Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle serão feitos utilizando-se o Teste T de Student e ou ANOVA. Os valores serão considerados significativos quando $p < 0,05$ e expressos como média \pm erro padrão da média.

5. RESULTADOS

a. Efeito de extratos e frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* em modelo de comportamento geral de camundongos.

Foram testadas 12 amostras de *Ampelozizyphus amazonicus*, a saber: EEERAA, EECRAA, Precipitado Saponínico, EDCCAA, ECECAA Acetato, ECECAA MeOH, Ácido Betulínico, Pó da casca pelo método Rodrigues, Extrato saponínico sem tratamento, Extrato saponínico com tratamento, Pó da casca pelo método Brandão e ECCRAA.

Este modelo tem a finalidade de avaliar os efeitos gerais dos extratos e frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, levando em consideração tempo de ação, duração de seus efeitos, toxicidade e confiabilidade. Desta forma, este experimento serviu para nos dar um direcionamento quanto aos outros experimentos que foram realizados posteriormente. A partir dele pudemos definir qual eram os melhores extratos a serem utilizados, seu tempo de ação.

Observou-se que:

Fração EEERAA

50 % dos camundongos apresentaram uma analgesia leve entre 30-60 minutos.

Fração EECRAA

Todos os animais apresentaram uma analgesia leve entre 30-60 minutos, com redução da motilidade no mesmo período.

Fração de Precipitado Saponínico

Os animais apresentaram aumento da frequência respiratória desde os 5 minutos de experimento e permaneceram assim até o final do mesmo (90 minutos). Além disto, houve uma analgesia leve que se iniciou aos 30 minutos de experimento e aos 60 minutos estava ausente ou quase imperceptível.

Fração EDCCAA

Neste grupo, além do aumento da frequência respiratória, que se iniciou em média aos 15 minutos, houve também no mesmo período (a partir dos 15 minutos de experimento) aumento da motilidade, espasmos abdominais

frequentes e leve analgesia que permaneceram em média até os 60 minutos de experimento.

Outra manifestação que dois dos quatro camundongos apresentaram foi redução da defecação e da micção, além de notável ataxia, que surgiram aos 30 minutos de experimento e permaneceram até o final do mesmo (90 minutos).

Fração ECECAa Acetato

Neste grupo, notamos que todos os camundongos tiveram aumento da frequência respiratória e redução da defecação e da micção a partir dos 10 minutos de experimento, permanecendo assim até o final do mesmo (90 minutos). Houve também ptose e ataxia em dois dos quatro camundongos, tendo início aos 30 minutos de experimento e permanecendo até os 60 minutos do mesmo. A alteração mais significativa encontrada foi a analgesia, que podia ser percebida a partir dos 15 minutos de experimento.

Fração EECECAa MeOH

A principal alteração ocorrida neste grupo foi a leve analgesia, que pôde ser notada nos quatro camundongos a partir dos 15 minutos de experimento. Em dois dos quatro camundongos houve também aumento da frequência respiratória a partir dos 10 minutos de experimento, durando até os 90 minutos do mesmo e entre 15 e 60 minutos foram notados espasmos abdominais.

Fração Ácido Betulínico

Neste grupo, o único sinal apresentado pelos camundongos era a analgesia, que se iniciou a partir dos 15 minutos de experimento e permaneceu até o final do experimento (90 minutos).

Fração Pó da casca pelo método Rodrigues

Neste grupo, houve aumento da frequência respiratória que se iniciou aos 30 minutos de experimento e persistiu até o final do mesmo. Aos 60 minutos, houve agitabilidade dos animais. Somente aos 90 minutos de teste que se pode notar aumento da atividade exploratória.

Fração Extrato saponínico sem tratamento

Neste grupo, a única alteração encontrada foi o aumento da frequência respiratória que se iniciou aos 30 minutos de experimento e durou até o final do mesmo aos 90 minutos.

Fração Extrato saponínico tratado

Neste grupo, a única alteração encontrada também foi o aumento da frequência respiratória que se iniciou aos 30 minutos de experimento e durou até o final do mesmo aos 90 minutos.

Fração Pó da casca pelo método Brandão

Com início aos 30 minutos de experimento, houve aumento da frequência respiratória com aumento da atividade exploratória. Este comportamento persistiu até os 90 minutos.

Fração ECCRAa

Neste grupo, houve diminuição da motilidade, que pôde ser percebida a partir dos 30 minutos de teste e persistiu até os 90 minutos do mesmo.

b. Efeito na atividade hipnosedativa dos extratos e frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* no modelo de Sono Induzido por Pentobarbital.

Os animais foram divididos em seis grupos (n = 6), além do grupo controle salina (n = 6). Os extratos utilizados foram:

Grupo 1 = Casca pelo método Rodrigues

Grupo 2 = Casca pelo método Brandão

Grupo 3 = ECCRAa

Grupo 4 = EDCCAA

Grupo 5 = Extrato Saponínico sem tratamento

Grupo 6 = Extrato Saponínico

Nos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 não se pode observar sedação completa dos animais. O decúbito dorsal não foi a posição na qual os mesmos permaneceram. Houve uma leve sedação de todos os animais, mas estes se mantiveram acordados.

Nos grupos 3, 4 e 5 houve aumento nítido da frequência respiratória durante todo o experimento, com diminuição, mas não extinção, em média, aos 89 minutos de experimento.

Embora os animais não estivessem em sedação completa (uma vez que os mesmos ao serem colocados sobre a bancada não permaneciam em decúbito dorsal e ainda tinham capacidade de se locomoverem pela bancada, mesmo com movimentos lentificados e esteriotipados) podia-se notar certo grau de sedação

leve. Quando eram colocados na gaiola, os animais ficavam imóveis, porém ao toque leve movimentavam-se por toda a gaiola.

Não houve sedação completa por longos períodos nos grupos 2, 3, 4 e 5.

Nos grupos salina e 6, houve sedação completa e duradoura em 80% dos animais.

Conforme é mostrado na Figura 1, notou-se, com a realização deste experimento, que o período de latência não diferiu entre os extratos, no entanto, todos os extratos diferiram do veículo.

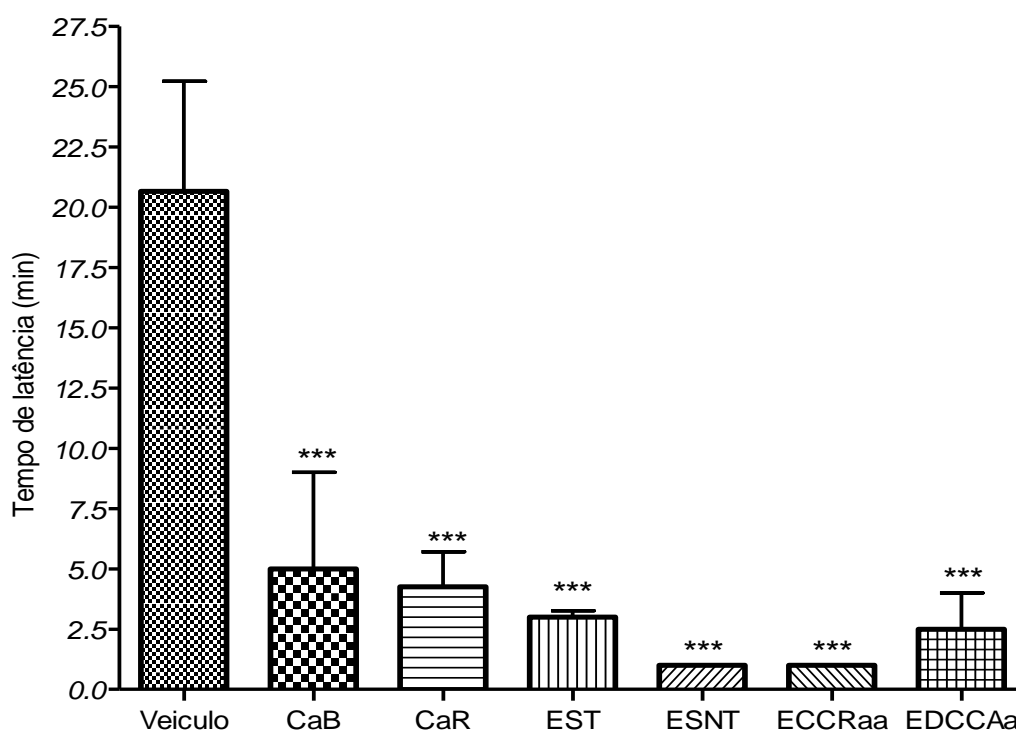


Figura 1: Efeito de diferentes frações de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, na concentração de 50 mg/kg, no tempo de latência do sono no modelo de sono induzido por pentobarbital em camundongos. *** $p < 0,001$ vs Veículo. (ANOVA, seguido do Teste de Multi-comparação de Newman-Keuls). Onde: CaB = Casca pelo método Rodrigues; CaR = Casca pelo método Brandão; EST = Extrato Saponínico; ESNT = Extrato Saponínico sem tratamento; ECCRAa; EDCCAa.

Quanto ao tempo de sono, a Figura 2 mostra que todos os extratos diferem do veículo, no entanto, os extratos não diferem entre si, com exceção do extrato saponínico (EST). Assim, os grupos entre si diferem do grupo EST.

A Tabela 1 demonstra estatisticamente a relação entre extrato usado e tempo de latência e o tempo de sono.

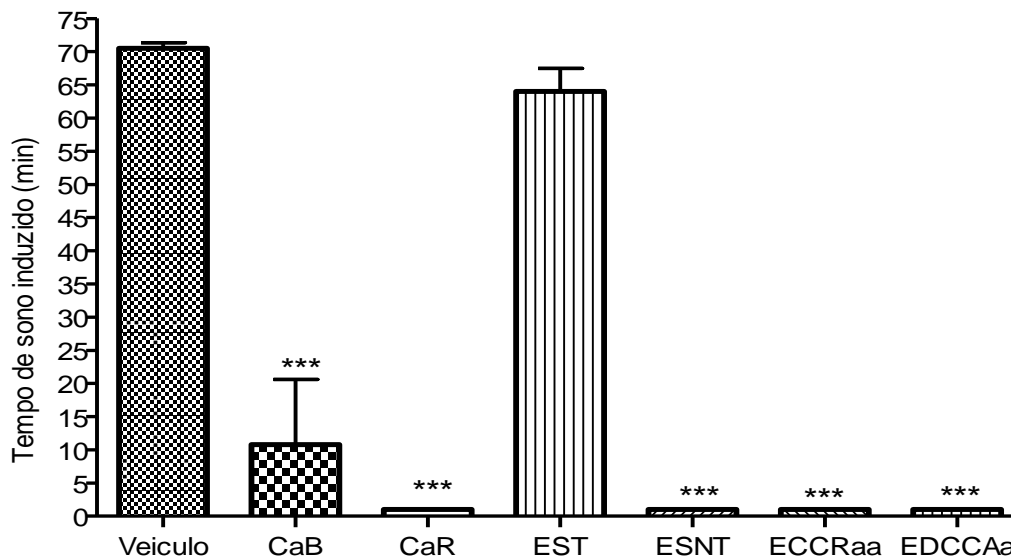


Figura 2: Efeito de diferentes frações de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, na concentração de 50 mg/kg, no tempo total de sono induzido por pentobarbital em camundongos. *** $p < 0,001$ vs Veículo e EST. (ANOVA, seguido do Teste de Multi-comparação de Newman-Keuls). Onde: CaB = Casca pelo método Rodrigues; CaB = Casca pelo método Brandão; EST = Extrato Saponínico tratado; ESNT = Extrato Saponínico não tratado; ECCRAa; EDCCAa.

c. Efeito dos extratos e frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* na atividade motora utilizando o modelo do Campo Aberto

Os animais foram divididos em três grupos ($n=4$), além dos grupos salina e controle (administração de pentobarbital). A dose de escolha foi a de 50mg/kg devido a pouca quantidade de material fornecido para esta pesquisa.

Este teste avalia a atividade exploratória dos animais: sua movimentação espontânea (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões dos campos) na periferia (atividade exploratória) e no centro (atividade ansiolítica ou sedativa), o número de comportamentos de auto-limpeza, de levantar, assim como o tempo em que o animal permaneceu parado (imobilidade = sedação ou medo). No entanto, levando em consideração aos experimentos anteriores, que demonstraram que algumas frações de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke apresentam atividade estimulatória sobre o comportamento dos camundongos, tal teste foi definido como inconclusivo, conforme está ilustrado nas Figuras 1, 2, 3 e 4, uma vez que está em oposição ao que foi relatado nestes outros experimentos. Uma alternativa desta resposta pode estar relacionada à via de administração utilizada neste modelo, que foi a via intraperitoneal e portanto, desviando a via metabólica de primeira passagem, que possivelmente a amostra deva sofrer quando administrada pela via oral. Desta forma, é importante que tal

teste seja feito, com um numero maior de animais e por via oral para avaliar esta teoria. A falta de animais foi uma determinante para a não realização destes testes comprobatórios posteriores.

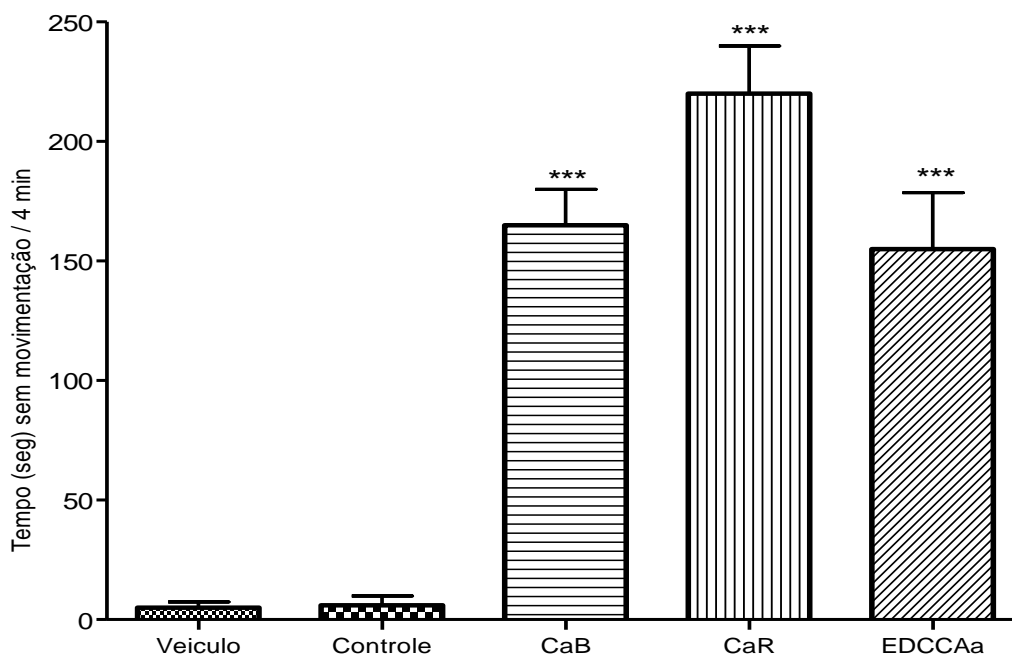


Figura 3: Efeito de frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke no comportamento animal de camundongos no modelo do Campo Aberto: movimentação na caixa. *** $p < 0,001$ vs Veículo e Controle.

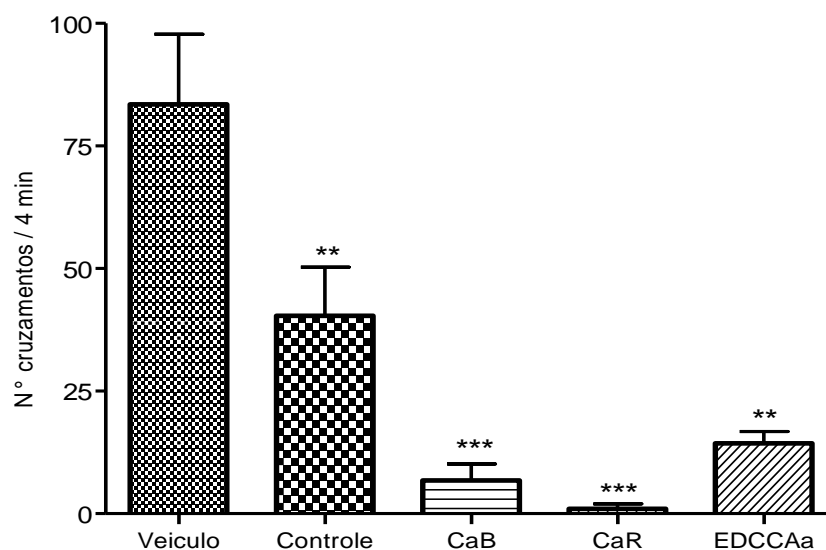


Figura 4: Efeito de frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke no comportamento animal de camundongos no modelo do Campo Aberto: números de cruzamentos na caixa. *** $p < 0,001$ vs Veículo e Controle.

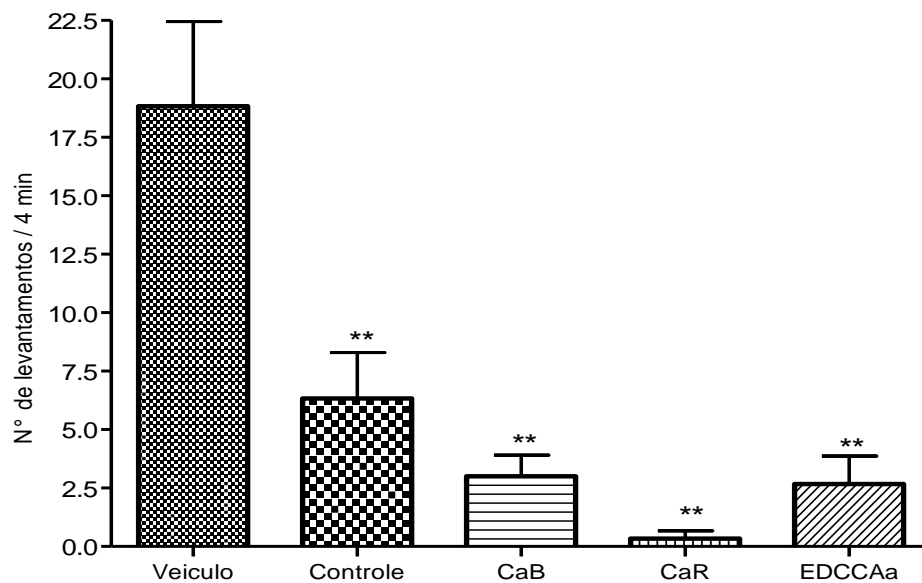


Figura 5: Efeito de frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke no comportamento animal de camundongos no modelo do Campo Aberto: números de vezes que o animal levanta o corpo na caixa. ** $p < 0,01$ vs Veículo.

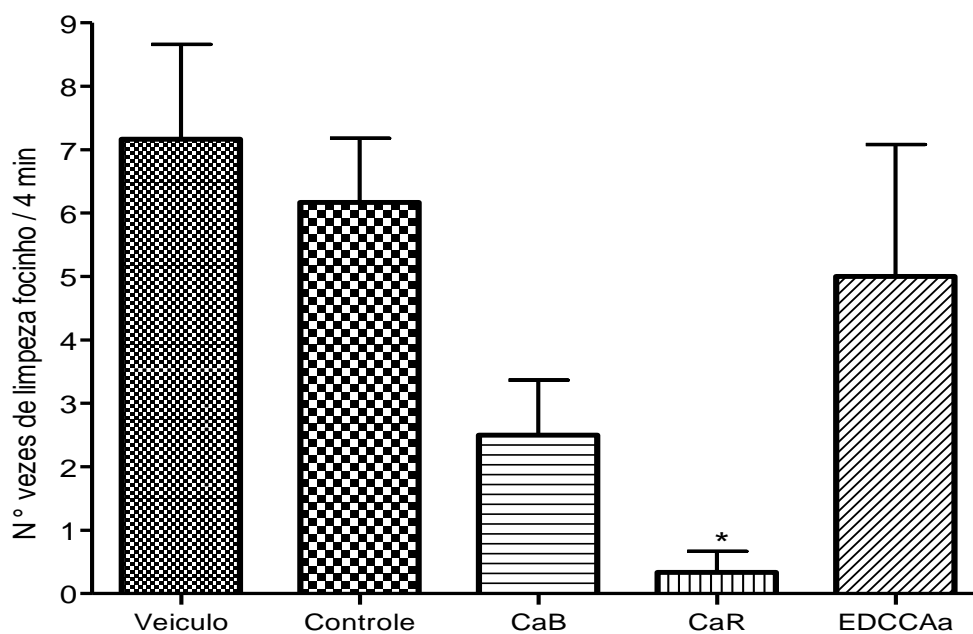


Figura 6: Efeito de frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke no comportamento animal de camundongos no modelo do Campo Aberto: números de vezes que o animal limpa/coça o focinho na caixa. * $p < 0,05$ vs Veículo.

6. DISCUSSÃO

Das cascas e raízes de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke pode ser preparada uma bebida aquosa com espuma abundante e de sabor amargo, semelhante à cerveja, o que lhe confere os nomes de "cervejinha", "cervejeira", "cerveja-do-mato" e "cerveja-de-índio". Essas propriedades estão relacionadas ao elevado teor de saponinas na espécie. Um estudo recente demonstrou a presença de 48,4% de saponinas em um extrato aquoso das raízes de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, sendo que algumas delas já foram isoladas e descritas na literatura, como: 3-O-[β -D-glicopiranosil(1 \rightarrow 2) α -L-arabinopiranosil]-20-O- α -L-ramnopiranosil-jujubogenina, e ampelozigenina-15a-O-acetil-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo (OLIVEIRA, et al 2011).

Apesar do seu uso popular, o projeto não tinha, no início, uma definição específica da função do extrato das raízes de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, já que não há estudos publicados a respeito do tema. Por isso seu objetivo principal era de estudar seus efeitos farmacológicos em modelos de comportamento experimental. Nos testes realizados, além de analisar possíveis efeitos dos extratos sobre o comportamento do animal, também pudemos observar as diferenças entre as várias formas de extrato, cedidas pela equipe do Prof. Dr. Jefferson do Departamento de Química/UFAM.

De acordo com o resultado obtido nos testes realizados neste projeto, posteriores trabalhos poderão ser direcionados para a realização de testes adicionais para averiguação de possíveis outros efeitos, tais como a analgesia.

7. CONCLUSÃO

Propomos que de acordo com os resultados obtido através deste trabalho, haja o direcionamento para futuras pesquisas a serem realizadas através de testes adicionais mais específicos, havendo assim um detalhamento sobre o que foi encontrado através destes experimentos, já que os experimentos realizados foram inespecíficos e abrangentes.

Apesar de o modelo experimental do campo aberto ter sido inconclusivo, é possível verificar o efeito estimulatório sobre o comportamento de camundongos, uma vez que os outros testes demonstram tal ação.

Este estudo, além de ser um direcionamento para trabalhos futuros, também foi útil para que pudéssemos diferenciar as várias formas do extrato quanto à sua efetividade, tais formas foram cedidas pela equipe do Prof. Dr. Jefferson do Departamento de Química/UFAM. Assim, pelo conhecimento das ações dos diferentes extratos a perspectiva de uma formulação energética a base desta planta, no entanto a continuidade de testes para avaliar estas respostas é extremamente importante.

8. REFERÊNCIAS

ANDRADE NETO, V., BRANDÃO, M.G.L., NOGUEIRA, F., ROSÁRIO, V.E., KRETTLI, A.U. ***Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae), amedicinal plant used to prevent malaria in the Amazon Region, hampers the development of *Plasmodium berghei* sporozoites.** International Journal for Parasitology 38, 1505–1511. 2008.

AKERELE, O. **The word health organization tradicional medicine programme: policy and implementation.** International Tradicional Medicine Newsletter, v.1, p.1-3, 1985.

BRANDÃO, M.G.L., LACAILE-DUBOIS, M.A., TEIXEIRA, M.A., WAGNER, H. **Triterpene saponins from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*.** Phytochemistry 31, 352–354. 1992.

BRANDÃO, M.G.L., LACAILE-DUBOIS, M.A., TEIXEIRA, M.A., WAGNER, H. **A dammarane-type saponins from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*.** Phytochemistry 34, 1123–1127. 1993.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica e farmacognosia.** Zaragoza: Acriba, 1991. 594p.

CRUZ-MORALES SE, SANTOS NR, BRANDÃO ML. **One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat.** Pharmacol Biochem Behav 72:973-8, 2002.

GLAUBERT, A.M., DINGLE, J.T., LUCY, J.A. **Action of saponin on biological cell membranes.** Nature 196, 952–955. 1962.

GONIN, S., DESCHÊNES, G., ROGER, F., BENS, M., MARTIN, P.Y., CARPENTIER, J.L., VANDEWALLE, A., DOUCET, A., FÉRAILLE, E. **Cyclic AMP increases cell surface expression of functional Na,K-ATPase**

units in mammalian cortical collecting duct principal cells. *Molecular Biology of the Cell* 13, 255–264. 2001.

HARUNA, M., TANAKA, M., SUGIMOTO, T., KOJIMA, R., SUZUKI, Y., KONOSHIMA, T., KOZUKA, M., ITO, K. **Alteration of Na⁺ permeability in human erythrocytes as studied by ²³Na-NMR and inhibition of the kidney Na⁺,K⁺-ATPase activities with saponins: interaction of *Gleditsia saponins* with human erythrocyte membranes.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 5, 827–828. 1995.

HO YJ, EICHENDORFF J, SCHWARTING RK. **Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression.** *Behav Brain Res* 136:1-12, 2002.

JORGENSEN, P.L., SKOU, J.C.H.R. **Purification and characterization of (Na⁺–K⁺)-ATPase: the influence of detergents on the activity of (Na⁺–K⁺)-ATPase in preparations from the outer medulla of rabbit kidney.** *Biochimica et Biophysica Acta* 233, 366–380. 1971.

KARABALIEV, M., KOCHEV, V. **Interaction of solid supported thin lipid films with saponin.** *Sensors and Actuators B: Chemical* 88, 101–105. 2003.

KREYDIYYEH, S.I., USTA, J., KNIO, K., MARKOSSIAN, S., DAGHER, S. **Anised oil increases glucose absorption and reduces urine output in the rat.** *Life Sciences*. 74, 663–673. 2003.

LACAILLE-DUBOIS, M.A., WAGNER, H. **A review of the biological and pharmacological activities of saponins.** *Phytomedicine* 2, 363–386. 1996.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; LIMA, T.C.M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais.** Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, 119 p., Porto Alegre, 2003.

MONTGOMERY, K.C. **The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior.** *Journal of Complementary Physiology and Psychology*, 48(4): 254 – 260, 1955.

OLIVEIRA, D.R. et al. **Estudo etnofarmacognóstico da saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke), uma planta medicinal usada por comunidades quilombolas do Município de Oriximiná-PA, Brasil.** *Acta Amaz.*, Manaus, v. 41, n. 3, 2011 .

PIRES, M. J. P. **Aspectos históricos dos recursos genéticos de plantas medicinais.** *Rodriguesia*, 36, 59, 61-66, 1984.

QUIGNARD, E.L., POHLIT, A.M., NUNOMURA, S.M., PINTO, A.C.S., SANTOS, E.V.M., MPRAIS, S.K.R., ALECRIM, A.M., PEDROSO, A.C.S., CYRINO, B.R.B., MELO, C.S., FINNEY, E.K., GOMES, E.O., SOUZA, K.S., OLIVEIRA, L.C.P., DON, L.C., SILVA, L.F.R., QUEIROZ, M.M., HENRIQUE, M.C., SANTOS, M., PINTO, P.S., SILVA, S.G. **Screening of plants found in amazonas state for lethality towards brine shrimp.** *Acta Amazonica* 33, 93–104. 2003.

RHIOUANI, H., SETTAF, A., LYOUSSI, B., CHERRAH, Y., LACAILLE-DUBOIS, M.A., HASSAR, M. **Effects of saponins from *Herniaria glabra* on bloos pressure and renal function in spontaneously hypertensive rats.** *Therapie* 54, 735–739. 1999.

ROSAS, L.V., CORDEIRO, M.S.C., CAMPOS, F.R., NASCIMENTO, S.K.R., JANUÁRIO, A.H., FRANÇA, S.C., NOMIZO, A., TOLDO, M.P.A., ALBUQUERQUE, S. and PEREIRA, P.S. ***In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae).** *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40(5), 2007.

SANTOS, A.M.S., KAHWAGE, C.C., FERREIRA, M.R.C., SAMPAIO, N.A. **Traditional medicines in the Rio Negro Valley (Amazonas state, Brazil). Observations on the ethnopharmacology and the use of the plant saracura-**

mirá (*Ampelozizyphus amazonicus*): pharmacological activity and/or symbolic efficacy. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas 1, 137–147. 2005.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R.; **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul Porto Alegre:** Editora da Universidade/UFRGS. 1986.

SOUZA, A.M., LARA, L.S., PREVIATO, J.O., LOPES, A.G., CARUSO-NEVES, C., SILVA, B.P., PARENTE, J.P. **Modulation of sodium pumps by steroidal saponins.** *Zeitschrift fur Naturforschung.* Journal of Biosciences C 59c, 432–436. 2004.

WAGNER, H., OTT, S., JURCIC, K., MORTON, J., NESZWELYI, A. **Chemistry, ¹³C-NMR study and pharmacology of two saponins from *Colubrina asiatica*.** *PlantaMedica* 48, 136–141. 1983.

YAMADA, C. S. B.; **Fitoterapia: sua historia e importância.** *RevRacine* 1998.43: 50-51.

9. CRONOGRAMA

Nº	Descrição	Agosto 2011	Set	Out	Nov	Dez	Janeiro 2012	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Pesquisa bibliográfica e treinamento da equipe	R	R										
2	Obtenção de drogas e animais		R	R	R								
3	Modelos de experimentação in vivo			R	R	R	R	R	R	R			
4	Análise de resultados						R	R	R	R			
5	Análise de dados						R	R	R	R			
6	Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória)										R	R	
7	Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)											x	x

10. ANEXOS

Tabela 1: Efeito das drogas no comportamento geral de camundongos.

Parâmetro	Tempo de observação						
	0 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	90 min
Aumento da motilidade							
Redução da motilidade							
Aum. Freq. Respiratória							
Red. Freq. Respiratória							
Piloereção							
Exoftalmia							
Mov. Esteriotipados							
Convulsão clônica							
Convulsão tônica							
Tremores							
Catalepsia							
Ptoze palpebral							
Analgesia							
Ataxia							
Cianose (orelha)							
Hiperemia (orelha)							
Palidez (orelha)							
Aumento micção							
Redução micção							
Aumento defecação							
Redução defecação							
Diarréia							
Contorção							
Ereção da cauda							
Salivação							
Morte							

Tabela 1: Tabela que foi preenchida durante o experimento que visava o efeito das drogas no comportamento geral de camundongos.

Tabela 2: Atividade hipnosedativa, modelo de Sono Induzido por Pentobarbital.

	Tempo de sono	Tempo de latência
Veículo	70,5 +/- 0,87	20,67 +/- 4,57
CaB	10,80 +/- 9,8 ***	5,0 +/- 4,0
CaR	1,0 +/- 0,0 ***	4,25 +/- 1,46
EST	64,0 +/- 3,49	3,0 +/- 0,26
ESNT	1,0 +/- 0,0 ***	1,0 +/- 0,0
ECCRAa	1,0 +/- 0,0 ***	1,0 +/- 0,0
EDCCAa	1,0 +/- 0,0***	2,5 +/- 1,5

Tabela 2: Efeito de diferentes frações de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, na concentração de 50 mg/kg, no tempo de latência do sono e no tempo de sono no modelo de sono induzido por pentobarbital em camundongos. *** p<0,001 vs Veículo. (ANOVA, seguido do Teste de Multi-comparação de Newman-Keuls). Onde: CaB = Casca pelo método Rodrigues; CaB = Casca pelo método Brandão; EST = Extrato Saponínico; ESNT = Extrato Saponínico sem tratamento; ECCRAa ; EDCCAa.

Tabela 3: Atividade motora, modelo do Campo Aberto.

	Cruzar	Levantar	Limpar	TempoParado (segundos)
Veículo	83,5 +/- 14,29	18,83 +/- 3,62	7,17 +/- 1,49	5,00 +/- 2,42
Controle	40,33 +/- 9,98	6,33 +/- 1,96	6,17 +/- 1,01	6,00 +/- 3,87
CaB	6,75 +/- 3,40	3,00 +/- 0,91	2,50 +/- 0,87	165,00 +/- 15,00
CaR	1,00 +/- 1,00	0,33 +/- 0,33	0,33 +/- 0,33	120,00 +/- 20,00
EDCCAa	14,33 +/- 2,40	2,67 +/- 1,20	5,00 +/- 2,08	155,00 +/- 23,63

Tabela 3: Efeito de diferentes frações de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, na concentração de 50 mg/kg, na Atividade motora, modelo do Campo Aberto em camundongos. *** p<0,001 vs Veículo. (ANOVA, seguido do Teste de Multi-comparação de Newman-Keuls). Onde: CaB = Casca pelo método Rodrigues; CaB = Casca pelo método Brandão; EST = Extrato Saponínico; ESNT = Extrato Saponínico sem tratamento; ECCRAa; EDCCAa.