



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E PATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

THALLITA KARLA SILVA DO NASCIMENTO GONZAGA

**ESTUDO NÃO CLÍNICO DO EFEITO ANSIOLÍTICO SÍMILE E
ANTIDEPRESSIVO SÍMILE DO ÁLCOOL PIPERONÍLICO EM CAMUNDONGO**

JOÃO PESSOA-PB, BRASIL

2020

THALLITA KARLA SILVA DO NASCIMENTO GONZAGA

**ESTUDO NÃO CLÍNICO DO EFEITO ANSIOLÍTICO SÍMILE E
ANTIDEPRESSIVO SÍMILE DO ÁLCOOL PIPERONÍLICO EM CAMUNDONGO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - PGPNSB, como requisito para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

JOÃO PESSOA-PB, BRASIL

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

G642e Gonzaga, Thallita Karla Silva do Nascimento.

Estudo não clínico do efeito ansiolítico símile e antidepressivo símile do álcool piperonílico em camundongo. / Thallita Karla Silva do Nascimento Gonzaga. - João Pessoa, 2020.

85 f.

Orientação: Reinaldo Nóbrega de Almeida.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Álcool piperonílico. 2. Estimulante. 3. Sistema serotoninérgico. 4. Ansiedade. 5. Depressão. I. Almeida, Reinaldo Nóbrega de. II. Título.

UFPB/BC

THALLITA KARLA SILVA DO NASCIMENTO GONZAGA

**ESTUDO NÃO CLÍNICO DO EFEITO ANSIOLÍTICO SÍMILE E
ANTIDEPRESSIVO SÍMILE DO ÁLCOOL PIPERONÍLICO EM CAMUNDONGO**

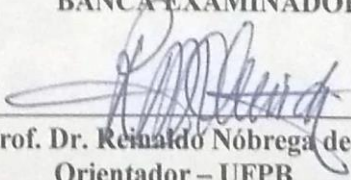
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - PGPNSB, como requisito para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

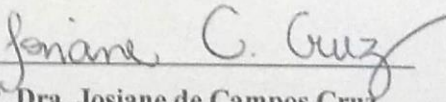
Área de Concentração: Farmacologia

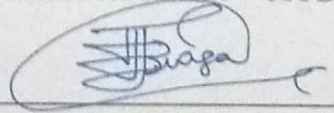
Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Aprovada em: 13/02/2020

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Orientador – UFPB


Prof.ª Dra. Josiane de Campos Cruz
Examinador Interno – UFPB


Prof. Dr. João Euclides Fernandes Braga
Examinador Externo - UFPB

JOÃO PESSOA-PB, BRASIL

2020

*Dedico esta obra ao meu irmão Isaac Nícolas, por ter me incentivado a dar o meu
melhor a cada dia.
Ao meu pai Luiz Alberto, minha mãe Sulamita e ao meu irmão Matheus Henrique pelo
amor, paciência, apoio e pelas orações que me sustentaram.*

A realidade está bem distante
e é muito profunda;
quem pode descobri-la?
Por isso dediquei-me a aprender,
a investigar, a buscar a sabedoria
e a razão de ser das coisas,
para compreender
a insensatez da impiedade
e a loucura da insensatez.

(Eclesiastes 7: 24 e 25)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, aquele quem colocou os sonhos que tenho em meu coração e que me concedeu graça, força, ânimo e saúde para realizá-los, chegar até aqui e alcançar muito mais do que eu posso imaginar.

À minha **família**, Alberto, Sulamita, Matheus e Isaac que foram meu porto seguro em todo o tempo e me deram suporte, apoio e incentivo para que minhas metas se tornassem realidade. Obrigada por terem acreditado no meu potencial e acreditado que os nossos esforços dariam frutos, sim, nossos esforços.

Aos **familiares** que mesmo de longe torciam, oravam e comemoravam cada passo dado.

Aos **amigos** de perto e de longe que me ajudaram na caminhada, me incentivando a ser uma pessoa melhor a cada dia. Em especial a Valdir que me acompanhou durante a maior parte desta jornada.

Ao **professor Dr. Reinaldo** pela excelente orientação e convivência nestes dois anos e pelos ensinamentos.

Aos **amigos do laboratório de Psicofarmacologia da UFPB** que me ensinaram o que sei hoje. Em especial a Álefe e a Humberto Hugo que prontamente estenderam a mão amiga quando necessitei.

À **Universidade Federal da Paraíba** e ao **Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** que proporcionaram meu aperfeiçoamento profissional e pessoal através de prestigiados professores que nos incentivam a oferecermos nosso melhor em sala de aula e no ambiente de pesquisa.

Ao **professor Dr. Damião Pergentino** por ter gentilmente cedido a substância para que eu pudesse realizar minha pesquisa.

E aos demais **profissionais do IpeFarm** que direta ou indiretamente contribuíram para o meu trabalho.

À **CAPES** e pelo apoio financeiro.

RESUMO

As alterações neurocomportamentais tem atingido considerável parcela da população mundial, dentre estes transtornos estão a ansiedade e a depressão que causam limitações tanto psicológicas, como também físicas. E muitas plantas medicinais tem sido alvo de estudos na psicofarmacologia, com intuito de contribuir para a produção de novos fármacos psicoativos com menor apresentação de efeitos adversos. O piperonal, sendo um composto derivado do safrol, produto obtido da *Piper hispidinervum*, possui comprovada ação antibacteriana, na prevenção da esteatose hepática, na prevenção da resistência a insulina e possível atividade ansiolítica. O álcool piperonílico é um metabólito do piperonal, obtido de espécies do gênero *Piper* spp. ou da biotransformação da piperina e piperonal em ratos. Portanto, o estudo objetivou investigar a influência álcool piperonílico no sistema nervoso central e seus efeitos ansiolítico similar e antidepressivo similar através da análise de alterações neurocomportamentais em camundongos e melhor caracterização do seu mecanismo de ação. Em estudos iniciais o álcool piperonílico apresentou efeito estimulante no teste de triagem farmacológica, também a dose letal 50 foi definida acima de 5.000 mg/kg, caracterizando, previamente, uma substância com baixa toxicidade. A investigação da atividade ansiolítica foi realizada no teste do labirinto em cruz elevado e teste da placa perfurada, em que o composto diminuiu o comportamento ansiogênico causado pelo aparato nos camundongos nas doses escolhidas, sendo a dose de 50mg/kg a melhor. Os métodos para investigação de efeito tipo antidepressivo foram o teste de nado forçado, no qual a diminuição do tempo de imobilidade foi melhor obtida nas doses de 25 e 50 mg/kg e o teste de suspensão da cauda em que apenas a dose de 50mg/kg apresentou redução significativa sobre o tempo de imobilidade. E para validar os resultados obtidos e comprovar que o efeito tipo antidepressivo do álcool piperonílico não foi devido a um efeito estimulante no sistema nervoso central, foram realizados os teste de campo aberto em que o animal não apresentou alteração motora em relação ao grupo controle na avaliação da ambulação espontânea e também, o teste do rota-rod com o qual não se observou alterações motoras induzidas pelo composto. O último teste realizado foi para investigar a atuação do álcool piperonílico na via serotoninérgica através do teste de nado forçado, então utilizando a cetanserina 1mg/kg, antagonista do receptor 5-HT₂, verificou-se uma reversão da redução do tempo de imobilidade obtida com o álcool

piperonílico, obtendo-se um tempo de imobilidade do grupo tratado com cetanserina 1mg/kg /álcool piperonílico 50mg/kg similar ao observado no grupo controle, caracterizando um possível envolvimento do sistema serotoninérgico na atividade ansiolítica símile e antidepressiva símile do álcool piperonílico. É possível concluir, diante dos resultados obtidos que o álcool piperonílico apresentou atividade significativa tipo antidepressiva e na redução do comportamento ansiogênico dos animais.

Palavras-chave: álcool piperonílico, estimulante, sistema serotoninérgico, ansiedade, depressão.

ABSTRACT

Neurobehavioral alterations reach considerable amount of worldwide population, among these disorders, anxiety and depression that are cause of psychological and physical limitations. And many medicine plants have been a target on psychopharmacological studies to produce new psychoactive drugs with less adverse effects. Piperonal is derived from safrol, and obtained from *Piper hispidinervum* has proven antibacterial activity, prevention of liver steatosis, insulin resistance and possible anxiolytic-like activity. Piperonyl alcohol is obtained from *Piper*. Spp. Species or from piperine biometabolism in rats. Therefore the main goal of this study is to investigate the piperonyl alcohol influence on central nervous system and its anxiolytic-like and antidepressant-like effects, through the evaluation of neurobehavioral alterations on mice and the elucidation of its mechanism of action. The compound in initial tests presented stimulant effect on pharmacological screening and its lethal dose 50 was defined above 5.000mg/kg characterizing, previously, a low toxicity substance. The investigation of anxiolytic activity was performed at cross elevated test and hole board test, it was observed that the compound decreased the anxiogenic behavior caused by the apparatus in the mices at the chosen doses, and 50mg/kg it is the better dose. The methods to investigate antidepressant-like activity it was forced swim test, that decreased the immobility time at the doses of 25mg/kg and 50mg/kg and the tail suspension test that the dose of 50mg/kg showed significant effect on immobility time. To validate the results obtained and prove that the antidepressant like effect of piperonyl alcohol it is not a stimulant effect on central nervous system it was realized the open field test, the animals treated with piperonyl alcohol did not show locomotor alterations compared to control groups, results confirmed by rota-rod test, where the animals also did not show any locomotor alteration induced by drug test. The last test performed it was forced swim test to investigate the involvement of serotonergic via at anxiolytic like and antidepressant like effect, then it was used ketanserin 1mg/kg, as 5-HT₂ receptor antagonist, it was verified an increase of immobility time, abolishing the piperonyl alcohol effect. The immobility time of the group treat with ketanserin 1mg/kg / piperonyl alcohol 50mg/kg it was similar to control group, characterizing a possible involvement of serotonergic system at anxiolytic like and antidepressant like effect of drug. It is possible to conclude from obtained results that the piperonyl alcohol

showed significant antidepressant like effect and reduced anxiogenic behavior in the mice.

Keywords: piperonyl alcohol; stimulant; serotonergic system; anxiety; depression.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------------------|--|
| 5 – HT | 5- hidroxitriptamina (serotonina) |
| 5-HT₁ | Receptor serotoninérgico tipo 1 |
| 5-HT_{2A/C} | Receptor serotoninérgico tipo 2A e 2C |
| 5-HT₃ | Receptor serotoninérgico tipo 3 |
| ADT | Antidepressivo tricíclico |
| AP | Álcool piperonílico |
| ANOVA | Análise de variância |
| BDNF | Fator neurotrófico derivado do cérebro |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| CET | Cetanserina |
| cm | Centímetros |
| DL₅₀ | Dose letal 50 |
| DSM | Manual de diagnóstico e estatístico de transtornos mentais |
| DZP | Diazepam |
| ERK | Cinase regulada por sinal extracelular |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FLX | Fluoxetina |
| GABA | Ácido γ – aminobutírico |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IPeFarm | Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos |
| ISRS | Inibidores seletivos da recaptação de serotonina |
| ISRSN | Inibidores seletivos da recaptação de serotonina e norepinefrina |
| kg | Kilograma |

| | |
|----------------|--|
| LCE | Teste do labirinto em cruz elevado |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| mg | Miligrama |
| OECD | Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico |
| RRT | Teste de rota-rod |
| s | Segundos |
| SERT | Transportador de serotonina |
| Sinitox | Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| TAG | Transtorno de ansiedade generalizada |
| TDM | Transtorno de depressão maior |
| TNF | Teste de nado forçado |
| TSC | Teste de suspensão da cauda |
| UFPB | Universidade Federal da Paraíba |

LISTA DE SÍMBOLOS

γ gama

μ mí

\pm mais ou menos

$<$ menor que

® marca registrada

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Estrutura química do piperonal..... | 7 |
| Figura 2 | Estrutura química do álcool piperonílico..... | 7 |
| Figura 3 | Esquema do processo de biotransformação de piperina em ratos | 8 |
| Figura 4 | Desenho esquemático dos testes realizados para investigar a atividade psicofarmacológica do álcool piperonílico..... | 17 |
| Figura 5 | Protocolo OECD para determinação da DL ₅₀ em animais, iniciando o teste a partir da dose de 300mg/kg..... | 19 |
| Figura 6 | Aparato utilizado no teste de rota-rod..... | 22 |
| Figura 7 | Aparato utilizado no teste de campo aberto..... | 23 |
| Figura 8 | Parâmetros avaliados no teste de campo aberto..... | 23 |
| Figura 9 | Aparato utilizado no teste de labirinto em cruz elevado..... | 25 |
| Figura 10 | Aparato utilizado no teste da placa perfurada..... | 26 |
| Figura 11 | Avaliação do tempo de imobilidade no teste de nado forçado..... | 27 |
| Figura 12 | Avaliação do tempo de mobilidade no teste de suspensão da cauda..... | 27 |
| Figura 13 | Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg via i.p. sobre o tempo de permanência na barra giratória no teste de rota-rod..... | 33 |
| Figura 14 | Efeito do álcool piperonílico em 25, 50 e 100mg/kg via i.p. sobre o número de cruzamentos | 34 |
| Figura 15 | Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100mg/kg via i.p. sobre o número de <i>rearings</i> (levantamento) no teste de campo aberto..... | 36 |
| Figura 16 | Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg via i.p. no tempo de <i>grooming</i> (auto-limpeza) no teste de campo aberto..... | 37 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 17 | Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg via i.p. sobre o número de entradas nos braços abertos no teste do LCE..... | 38 |
| Figura 18 | Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg via i.p. sobre o tempo permanência nos braços abertos..... | 39 |
| Figura 19 | Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100mg/kg via i.p. sobre o número de <i>head-dippings</i> (mergulhos) no teste de placa perfurada..... | 41 |
| Figura 20 | Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100mg/kg via i.p. sobre o tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao teste de nado forçado..... | 43 |
| Figura 21 | Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100mg/kg via i.p. no tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao teste de suspensão da cauda..... | 44 |
| Figura 22 | Investigação da via serotoninérgica como possível mecanismo de ação do álcool piperonílico através do teste do nado forçado. | 47 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Quadro 1 | Parâmetros avaliados no teste de triagem psicofarmacológica e teste de DL ₅₀ para novas substâncias..... | 19 |
| Quadro 2 | Grupos e substâncias administradas no teste de investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico na atividade do álcool piperonílico..... | 28 |
| Quadro 3 | Alterações comportamentais observadas em camundongos Swiss <i>Mus musculus</i> pelo uso álcool piperonílico na dose de 300 mg/kg, em administração única por via intraperitoneal..... | 30 |
| Quadro 4 | Alterações comportamentais observadas em camundongos fêmeas Swiss <i>Mus musculus</i> causadas pelo álcool piperonílico na dose de 2.000 mg/kg, em administração única por via intraperitoneal..... | 31 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 Considerações gerais do transtorno de ansiedade e depressão | 2 |
| 1.2 Tratamento para a ansiedade e depressão..... | 4 |
| 1.3 Álcool Piperonílico..... | 6 |
| JUSTIFICATIVA | 10 |
| OBJETIVOS | 13 |
| 3.1 Objetivo Geral | 14 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 14 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 15 |
| 4.1 Substâncias | 16 |
| 4.2 Animais..... | 16 |
| 4.3 Condições experimentais..... | 16 |
| 4.4 Métodos | 17 |
| 4.4.1 Teste de triagem farmacológica comportamental e investigação da dose letal 50 (DL ₅₀) | 18 |
| 4.4.2 Teste de rota-rod (RRT) | 21 |
| 4.4.3 Teste do campo aberto..... | 22 |
| 4.4.4 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)..... | 24 |
| 4.4.5 Teste da placa perfurada | 25 |
| 4.4.6 Teste do nado forçado (TNF) | 26 |
| 4.4.7 Teste da suspensão da cauda (TSC) | 27 |
| 4.4.8 O papel do sistema serotoninérgico na atividade do álcool piperonílico | 28 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| 5.1 Testes preliminares | 30 |
| 5.1.1 Triagem farmacológica e teste de toxicidade aguda..... | 30 |

| | |
|---|----|
| 5.2 Avaliação da atividade locomotora | 32 |
| 5.2.1 Teste de rota-rod (RRT) | 32 |
| 5.3 Avaliação da atividade ansiolítica símile | 34 |
| 5.3.1 Teste do campo aberto..... | 34 |
| 5.3.2 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)..... | 38 |
| 5.3.3 Teste da placa perfurada | 40 |
| 5.4 Avaliação da atividade antidepressiva símile | 42 |
| 5.4.1 Teste do nado forçado (TNF) | 42 |
| 5.4.2 Teste da suspensão da cauda (TSC) | 44 |
| 5.5 Investigação do mecanismo de ação..... | 45 |
| 5.5.1 Investigação da ação do álcool piperonílico sobre o sistema serotoninérgico | 45 |
| CONCLUSÃO..... | 49 |
| REFERÊNCIAS | 51 |
| ANEXO | 64 |
| Anexo 1 | 65 |

INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais do transtorno de ansiedade e depressão

A ansiedade é caracterizada por uma sensação de mal-estar psíquico, traduzido em perturbações somáticas, como sintomas gástricos e cardiorrespiratórios (SOUZA, 2017). Esse sentimento é considerado uma patologia quando manifestado de forma exagerada frente ao estímulo ansiogênico (SOARES, 2017).

Estes estímulos podem ser um episódio de estresse, como um trauma, assim como o indivíduo desenvolver ansiedade/depressão diante de estresse crônico, como viver em um grande centro urbano (MARTINS, 2018). Em estudo realizado por Ogawa e colaboradores (2019), de que a falta de uma quantidade adequada de horas de sono e atividade física, são fatores intimamente associados ao desenvolvimento de quadro de ansiedade/ depressão em adolescentes.

A depressão junto à ansiedade está associada ao prejuízo das relações sociais e a redução da qualidade de vida. O desenvolvimento do transtorno de ansiedade generalizada (TAG) associado ao transtorno depressivo maior (TDM) tem diagnóstico mais frequente do que a ocorrência dos transtornos isoladamente (PATRIQUIN, 2018), sendo a estimativa da do TAG/TDM em torno de 50 a 60% dos casos. Atentando ao fato de que desenvolver um quadro de ansiedade aumenta o risco do desenvolvimento de sintomas depressivos e vice-versa (GARCIA, 2018).

Os sinais e sintomas mais comuns da ansiedade ocorrem pela via de ativação do sistema simpático que promove sudorese e tremor, aumento da frequência cardíaca (palpitações), tontura e tensão muscular, náuseas, hiperventilação ou parada respiratória, além de hipersecreção gástrica e aumento da motilidade intestinal (SOEIRO, 2017), assim como sintomas psíquicos, como irritabilidade, insônia, falta de concentração, nervosismo e excesso de preocupação (ALMEIDA, 2006). Quando ocorre com sintomas depressivos podem ser observadas também alterações de humor, alterações vegetativas, com perda de apetite e distúrbios do sono, e alterações cognitivas (MONTEIRO, 2016).

De forma que o desenvolvimento destes transtornos e seus respectivos sinais e sintomas podem ser explicados pela teoria monoaminérgica que afirma ser alterações na quantidade de neurotransmissores e na função de receptores, principalmente dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico, os principais responsáveis por estas patologias (KATZUNG, 2017).

Um dos sistemas envolvidos na neurobiologia da ansiedade é o sistema límbico. Em estudos em animais, estados similares são mediados por estruturas como a amígdala, que possui importante papel na resposta ao medo, hipocampo, córtex pré-frontal, *locus coeruleus* e matéria cinzenta periaquedutal, envolvendo três sistemas de neurotransmissores centrais que são o serotoninérgico, gabaérgico e o noradrenérgico (BASTOS, 2011)

A amígdala tem apresentado importante papel em pacientes diagnosticados com TAG, pois estudos recentes observaram que a conectividade diminuída entre o a amígdala e o córtex pré-frontal está intimamente associado ao diagnóstico de TAG, pois o córtex pré-frontal possui papel crítico no controle da emoção (PATRIQUIN, 2018).

Assim como foi observado em pacientes diagnosticados com depressão que há uma redução no volume da matéria cinzenta e redução do córtex pré-frontal e do hipocampo, regiões que medeiam aspectos cognitivos, como culpa e inutilidade (KRISNAN, 2008).

Nos últimos anos ocorreu um aumento considerável da porção da população que apresenta esta patologia, em resposta as grandes mudanças econômica, social e cultural ocorridas no cenário mundial (BRAGA, 2011; FREITAS, 2013). Seu desenvolvimento ocorre ao longo da vida adulta, tendo início precoce em adultos jovens e pode estar associada a condições como doenças cardíacas ou outras doenças neurológicas e a sua importância se dá pelo aumento gradativo dos custos com o seu tratamento (HARRO, 2017). Além de comprovadamente as mulheres terem o dobro de chances de serem acometidas por transtornos de humor do que os homens (REISNER, 2016)

Os transtornos de ansiedade são classificados em subtipos e segundo o DSM-5 são: transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobia específica, fobia social, transtorno de pânico, agorafobia, TAG, transtorno de ansiedade induzido por substância, transtorno de ansiedade devido a outra condição médica, transtorno de ansiedade especificado e transtorno de ansiedade não especificado (SCHATZBERG, 2017).

Devido à ansiedade se apresentar como uma comorbidade da depressão, e vice-versa, sendo relativamente frequente observar os dois transtornos no mesmo paciente, os tratamentos atuais associam múltiplas drogas, por isso há uma busca por moléculas com superior perfil farmacológico e possivelmente mais efetivos em múltiplos alvos (BENNEH, 2018).

1.2 Tratamento para a ansiedade e depressão

Atualmente entende-se que o desenvolvimento de transtorno depressivo e transtorno de ansiedade advém de uma série de fatores, como mencionado anteriormente, assim como não há um tratamento único para todos os graus de depressão e ansiedade. A primeira opção, para transtornos leves a medianos, é a psicoterapia e acompanhamento do paciente, de forma a focar em suas emoções e pensamentos, outras opções são aliar a terapia a exercícios físicos e atividades, como yoga. Porém para transtornos medianos a severos, junto a terapia cognitiva, os profissionais optam pelo tratamento farmacológico com antidepressivos (ROZANSKI, 2012).

O tratamento farmacológico para transtornos mentais é extensivamente pesquisado desde a Antiguidade, passando por depressores do SNC, como o etanol, até os barbitúricos introduzidos em 1903 na prática médica, porém apenas em 1957 o primeiro benzodiazepínico, clordiazepóxido, foi sintetizado e inserido no mercado em 1960, por Leo Sternbach. E o diazepam, em 1963 (BERNIK, 1990).

Dentre os principais medicamentos ainda utilizados no tratamento para o transtorno de ansiedade estão os benzodiazepínicos e barbitúricos, estes em menor quantidade. Porém acompanhado ao efeito ansiolítico dos sedativos-hipnóticos há uma série de desvantagens que incluem risco de dependência, efeitos amnésicos e efeitos depressores sobre as funções cognitivas e psicomotoras (KATZUNG, 2017).

Devido a ocorrência da comorbidade ansiedade/depressão, a maioria dos casos de transtornos de humor são tratados com antidepressivos de classes mais novas, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e inibidores seletivos da recaptação de serotonina e norepinefrina (ISRSN).

A introdução de benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos (ADT) foi um importante passo na farmacoterapia do transtorno de ansiedade generalizada e depressão, que é caracterizada como uma condição crônica e necessitando de tratamento mais prolongado, segundo Schatzerberg (2017), tendo esses medicamentos demonstrado um nível aceitável de risco/ benefício. Porém, a introdução no mercado de ISRS e ISRSN apresentou um grande avanço principalmente na segurança e nível de risco/benefício no tratamento da ansiedade generalizada e hoje esses fármacos são os

fármacos de escolha para iniciar o tratamento da ansiedade e ansiedade associada a sintomas depressivos (KOEN, 2011).

Tendo em vista que o sistema serotoninérgico tem grande implicação nas mudanças de humor, diminuição da energia, função cognitiva, sono, apetite e libido, alterações vistas comumente em pacientes com transtorno depressivo e outros transtornos de humor, que os principais tratamentos medicamentosos estão voltados para aumentar os níveis de serotonina no cérebro, assim como corrigir a desregulação de outros neurotransmissores, como a norepinefrina (KAUR, 2019).

Tendo sido observado, por imagens do cérebro, que a densidade de transportador de recaptação de serotonina é inversamente proporcional a severidade dos sintomas desenvolvidos em paciente com TAG, assim como dados endossam a hipótese de que a desregulação da sinalização monoaminérgica induz a uma diminuição do receptor 5-HT_{1A} na amígdala e núcleo dorsal da rafe em pacientes com TAG (MARTIN, 2009).

Os ISRSs inibem a recaptação de serotonina na membrana pré-sináptica pela bomba transportadora de 5- hidroxitriptamina (SERT), aumentando a concentração deste neurotransmissor na fenda sináptica. Os medicamentos desta classe disponíveis hoje para uso são citalopram, escitalopram, fluvoxamina, fluoxetina, paroxetina e sertralina (SCHATZBERG, 2017).

Os ISRSNs tem como mecanismo de ação a inibição da recaptação de serotonina e norepinefrina, como a venlafaxina, desvenlafaxina e duloxetina. A venlafaxina é um inibidor mais efetivo da serotonina e a duloxetina um inibidor mais efetivo da norepinefrina. Sendo a venlafaxina o primeiro antidepressivo aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para tratamento do TAG (SCHATZBERG, 2017).

Os benzodiazepínicos possuem efeito ansiolítico se ligando a um sítio específico do receptor do ácido γ -aminobutírico, potencializando o efeito inibitório do GABA. Porém, essa classe de medicamentos não é a primeira escolha para tratamento de ansiedade, devido ao número de efeitos adversos, incluindo sedação, piora da concentração e dependência física (KOEN, 2011). Além de não ser a melhor escolha para tratar pacientes com comorbidade, como TAG/TDM.

Atualmente o tratamento dos sintomas do TAG e TAG/TDM é realizado com os ISRS, de forma que se observa o tratamento dos sintomas e reversão de anormalidades cerebrais, como a elevada atividade da amígdala (MARTIN, 2009).

1.3 Álcool Piperonílico

O uso de produtos naturais iniciou-se há milhares de anos por populações de vários países com o intuito de tratar diversas patologias, para os quais eram utilizados, como forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos (AMARAL, 2010).

Tem crescido, ao redor do mundo, o uso de plantas medicinais para o desenvolvimento de nutracêuticos para o tratamento de depressão e outros transtornos de humor. Há, atualmente, estudos não clínicos envolvendo princípios ativos de plantas que agem por diferentes mecanismos e de diferentes classes fitoquímicas, como esteroides, saponinas, alcaloides, terpenos e fenilpropanóides (MARTINS, 2018).

Sendo os óleos essenciais os produtos mais utilizados. Estes são produtos voláteis de origem vegetal, obtidos por processo físico, como destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método dependendo da localização no vegetal. São encontrados mais frequentemente em flores, folhas e frutos. Atualmente são utilizados nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosmética e aromaterapia (HENRIQUES, 2009).

De fato, os óleos essenciais e alguns de seus principais componentes são largamente utilizados como terapia complementar para transtornos como ansiedade, depressão e estresse (LYRA, 2010).

Dentre os óleos essenciais, está o óleo essencial obtido de plantas da família *Piperaceae*, do gênero *Piper* spp. e coletivamente conhecidas como pimenta preta e pimenta longa. A piperina, constitui cerca de 6 a 11% do óleo essencial da pimenta-preta e é o principal precursor do piperonal e álcool piperonílico (CONCON, 1981).

O piperonal (Figura 1) é normalmente obtido por isolamento do óleo essencial a partir da coleta de *Ocotea Cymbaru* ou *Piper hispidinervum*, porém este processo é caro e demorado. De forma que foi estudada uma nova rota de obtenção do piperonal a partir do álcool piperonílico pela via de oxidação de Oppenauer que é mais econômica e segura (BORZATTA, 2009). Sendo o álcool piperonílico um precursor do piperonal sinteticamente. Assim como o álcool piperonílico pode ser sintetizado a partir do piperonal pela reação com reagente de Grignard (SRINIVAS, 2016).

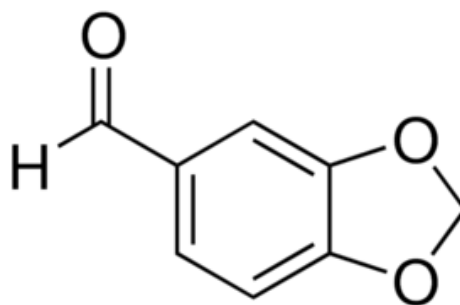


Figura 1 Estrutura química do piperonal.

Fonte: Sigma-Aldrich

O piperonal (ou heliotropina) apresenta aplicações industriais no ramo de cosméticos como fixador de fragrâncias, além de ser matéria prima para componentes de maior valor agregado na indústria farmacêutica. (CREMASCO, 2012). E sua atividade calmante também pôde ser visualizada, uma vez que já foi utilizado por via inalatória como aromaterapia em pacientes submetidos ao exame de ressonância magnética, em que 63% pacientes do grupo mantido em ambiente contendo o piperonal relataram sentir-se menos ansiosos durante o exame. (REED, 1994). Outras atividades também associadas ao piperonal são a prevenção de esteatose hepática e resistência a insulina em camundongos submetidos a dietas hipercalóricas (LI, 2013) e atividade antibacteriana (BOWLES, 1998).

A atividade antidepressiva de algumas espécies do gênero *Piper* spp., como a *Piper longum*, *P. laetispicum*, *P. methysiticum* Fort e *P. tuberculatum*, já foi observada, porém em extratos brutos, não havendo na literatura estudos com os compostos isolados como a piperina, piperonal e o álcool piperonílico (Figura 2) (MARTINS, 2018).

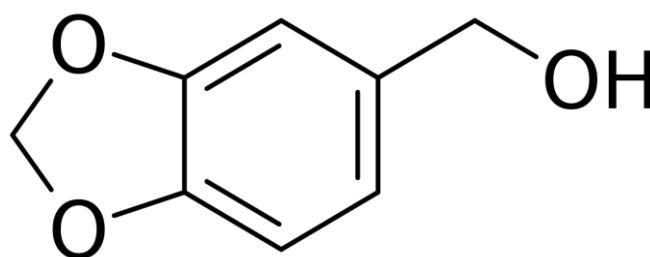


Figura 2 Estrutura química do álcool piperonílico.

Fonte: Sigma Aldrich

O composto é classificado como um monoterprenoide aromático oxigenado (GROSS, 2017), classe que constitui a maior parte dos componentes dos óleos voláteis obtidos por processo de destilação (SIMÕES, 2017).

O anel piperonílico é encontrado em um grande número de compostos naturais e possui comprovada ação antiviral e anticancerígena. No entanto, compostos sintéticos contendo o anel piperonílico, devido a sua maior pureza e facilidade de obtenção para realização de estudos, apresentam muitas atividades biológicas, como anticonvulsivante, anticâncer e antiparasitária (SRINIVAS, 2016).

Em um estudo farmacocinético realizado por Bhat e Chandrasekara, (1987) sobre a metabolização da piperina, principal metabólito das plantas gênero *Piper* spp. demonstrando que a clivagem oxidativa da cadeia lateral da piperina pode levar a formação do piperonal. Subsequentemente forma o aldeído metilenodioxifenil, piperonal e por oxidação forma o ácido piperonílico e por redução, o álcool piperonílico (Figura 3). Observando-se que o álcool piperonílico será formado em toda administração de piperina e piperonal nos organismos.

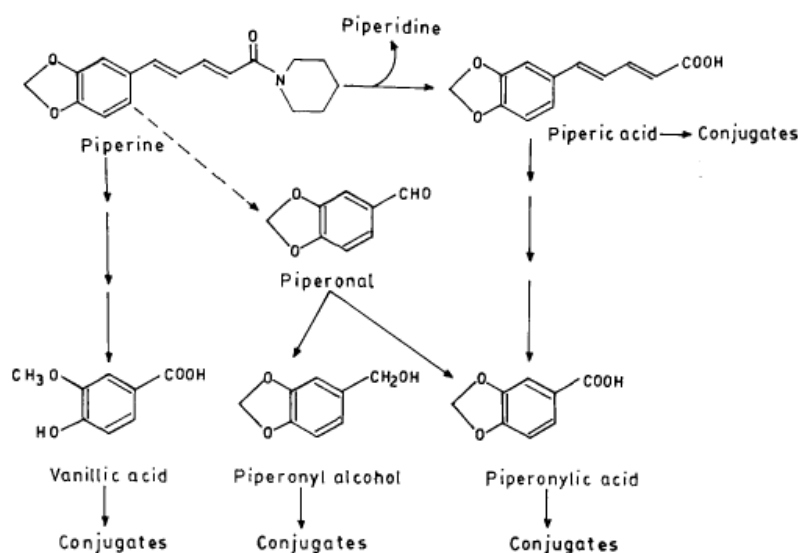


Figura 3 Esquema do processo de biotransformação de piperina em ratos

Fonte: BHAT, G., 1987

Um estudo realizado por Kamienski e Casida, (1970) investigou a metabolização do álcool piperonílico e compostos relacionados, como o piperonal e ácido piperonílico, administrando-os acoplados ao metileno – C¹⁴ – dioxifenil em ratos, camundongos e hamster. Os resultados apontaram que o piperonal é majoritariamente convertido em álcool piperonílico e ácido piperonílico e que na amostra de urina acumulada por 12h, em animais tratados com o álcool piperonílico, piperonilglicina foi o principal metabólito.

Portanto, devido a pouca informação referente ao composto e poucas pesquisas quanto ao seu potencial farmacológico, o presente estudo objetivou investigar a atividade tipo-ansiolítica e tipo-antidepressiva do álcool piperonílico em camundongos Swiss *Mus musculus* e principal mecanismo de ação envolvido.

JUSTIFICATIVA

De acordo com a Organização Mundial da Saúde mais de 300 milhões de pessoas estão sofrendo com a depressão e 1 em cada 13 sofrem com a ansiedade ao redor do mundo, pois a ansiedade associada a outras fobias e o transtorno depressivo maior são os transtornos mentais mais comuns (GOANȚĂ, 2019). Estima-se que a ansiedade seja a segunda causa de incapacitação mundial entre os transtornos psiquiátricos e o Brasil é o quinto colocado no diagnóstico de depressão e lidera na taxa de pessoas diagnosticadas com ansiedade, sendo esta a terceira causa de pedidos de afastamento (SOUZA, 2017).

A relevância de alto grau de comorbidades, prevalência alto índice dos transtornos de ansiedade e depressão, tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos, leva a necessidade de ampliar as opções terapêuticas e melhor conhecer a neuroquímica envolvida no desenvolvimento destes transtornos, tendo em vista os efeitos adversos apresentados pelos antidepressivos e benzodiazepínicos usados nos tratamentos de transtorno de humor (FIORELLI, 2017).

Outra razão para o seguinte estudo são as opções terapêuticas atuais para a ansiedade, que consiste em antidepressivos mais atuais e benzodiazepínicos quando há apresentação de insônia (MANGOLINI, 2019). Além dos efeitos adversos, estas classes de medicamentos estão entre os principais xenobióticos a causar intoxicação de acordo com o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox), podendo causar depressão respiratória e levar a óbito (SECRETARIA DE SAÚDE, 2020).

Um estudo de Reed (1994), demonstrou a atividade do piperonal na redução da ansiedade através da aromaterapia em pacientes submetidos ao exame de ressonância magnética, porém não foram realizados estudos posteriores com a substância para estabelecimento de doses seguras para uso e estudos comportamentais complementares que comprovem seu efeito ansiolítico, assim como não há estudos com o álcool piperonílico, um dos últimos metabólitos formados na biotransformação da piperina (BHAT, G., 1987).

Publicações recentes comprovaram a atividade do piperonal contra a resistência à insulina (LI, X., 2014), diminuição de hiperlipidemia e marcadores como níveis de triglicerídeos, colesterol total e lipoproteína de muito baixa densidade (LDL) (MERIGA, B., 2017) além de possuir efeito modulador neuroendócrino (CHONPATHOMPIKUNLERT, P., 2010). Sabe-se que a diabetes e obesidade podem desenvolver comportamento semelhante a ansiedade, através da diminuição da liberação

de serotonina, inibição da triptofano hidroxilase-2 (PRABHAKAR, V., 2015) pelo aumento de leptina (MORRIS, A. et al, 2012), por isso ansiedade e depressão são os transtornos mentais mais comuns entre pacientes obesos (SHARAFI, 2020). Porém, há pouca informação se o piperonal e seus metabólitos, dentre eles o álcool piperonílico, agem também na melhora de sintomas provocados por estes transtornos, além de melhorar os parâmetros bioquímicos.

Justifica-se, portanto a realização de estudos para investigação de atividade ansiolítica e antidepressiva do álcool piperonílico, sabendo-se que compostos contendo piperazina são agonistas específicos 5-HT_{2C}, induzindo anorexia, perda de peso, efeito ansiolítico e antidepressivo, sem causar mal-estar relacionado ao sistema nervoso central (SINGH, 2019).

OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Inferir a influência do composto álcool piperonílico no sistema nervoso central, através da análise de possíveis alterações neurocomportamentais causadas pelo composto em camundongos.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar ensaio farmacológico não clínico para possível atividade ansiolítica - símile do álcool piperonílico;
- Verificar a segurança das doses escolhidas através do teste de triagem farmacológica
- Determinar a toxicidade aguda pelo teste da DL_{50}
- Avaliar a atividade ansiolítica - símile através de modelos experimentais de labirinto em cruz elevado, teste da placa perfurada e teste do campo aberto;
- Avaliação da atividade antidepressiva-símile através do teste de nado forçado e suspensão da cauda;
- Verificar a possível atuação do álcool piperonílico no sistema serotoninérgico;
- Verificar a existência de possíveis efeitos adversos, como toxicidade, efeito sedativo e alterações motoras mediante o teste de rota rod.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Substâncias

- Álcool Piperonílico (peso molecular: 150,13 g/mol) – Sigma Aldrich
- Cetanserina (peso molecular: 395,43g/mol)– Sigma Aldrich
- Diazepam 10mg/ 2mL – Merck (Brasil);
- Fluoxetina 20mg – Teuto (Brasil)
- Solução salina (NaCl a 0,9 %) – Merck (Brasil);
- Solução de Tween 80 a 2 % (Polissorbato 80) – Vatec (Brasil);
- Tofranil® (cloridrato de imipramina) 25mg – Aspen Pharma (Brasil)

4.2 Animais

Para a realização da triagem farmacológica e subsequentes experimentos foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), albinos, adultos, machos e fêmeas (para estudo da dose letal 50 (DL₅₀)), com peso entre 25-35g, com aproximadamente 3 meses de idade. Os animais serão provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos (IPeFarm) da Universidade Federal da Paraíba.

No Biotério, os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com livre acesso a uma dieta controlada a base de ração tipo pellets e água disponível em garrafas de polietileno com bicos de inox, encaixadas na parte superior da grade metálica da gaiola. Os animais também foram mantidos em ciclos claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6:00 as 18:00 horas e pesados antes da realização dos testes.

Os testes foram realizados após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB), sob o número 6886230818 (Anexo 1).

4.3 Condições experimentais

O ensaio farmacológico não clínico foi realizado no Laboratório de Psicofarmacologia - IPeFarm/UFPB. Os animais foram previamente selecionados, pesados e transferidos ao local de experimentação no dia anterior aos testes, afim de que pudessem se adaptar ao novo ambiente, minimizando o estresse aos animais.

Foram então, mantidos a temperaturas de $21^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e privados de água e ração 30 minutos antes dos testes, os quais foram realizados no período compreendido entre 8:00 às 12:00, sendo os animais utilizados apenas uma única vez e em seguida eutanasiados por deslocamento cervical.

Em todos os procedimentos experimentais a cada aparato utilizado pelos animais foram realizadas limpezas com etanol a 10% a fim de remover qualquer vestígio de cheiro deixado pelo animal que possa interferir nos resultados comportamentais apresentados pelo animal posteriormente analisado.

4.4 Métodos

A sequência de metodologias utilizadas para a avaliação da atividade psicofarmacológica do álcool piperonílico está apresentada na figura abaixo (Figura 4):



INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO

Participação do sistema serotoninérgico

Figura 4: Desenho esquemático dos testes realizados para investigar a atividade psicofarmacológica do álcool piperonílico.

4.4.1 Teste de triagem farmacológica comportamental e investigação da dose letal 50 (DL₅₀)

A triagem farmacológica é realizada com o objetivo de avaliar o resultado deste teste para direcionar o estudo para testes mais específicos como os que investigam atividade antidepressiva, ansiolítica, neuroléptica, anticonvulsivante e analgésica, assim como para a escolha das doses a serem usadas (ALMEIDA, 2006).

Para avaliar o perfil da droga no sistema nervoso central (SNC) foi utilizado o protocolo oferecido pelo guia 423 da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico (OECD) (Figura 5), sendo utilizados camundongos fêmeas (n=3), previamente pesadas e marcadas com aproximadamente 30 minutos antes do experimento, foram divididas em dois grupos, nos quais foram administrados salina 0,9% e álcool piperonílico na dose de 300mg/kg via intraperitoneal, pois como não há nenhuma informação a respeito da toxicidade do composto, preconiza-se iniciar o teste por uma dosagem intermediária. Sendo a solução do álcool piperonílico preparada anteriormente ao experimento, a substância foi pesada em balança de precisão e diluída em tween 80 a 5%.

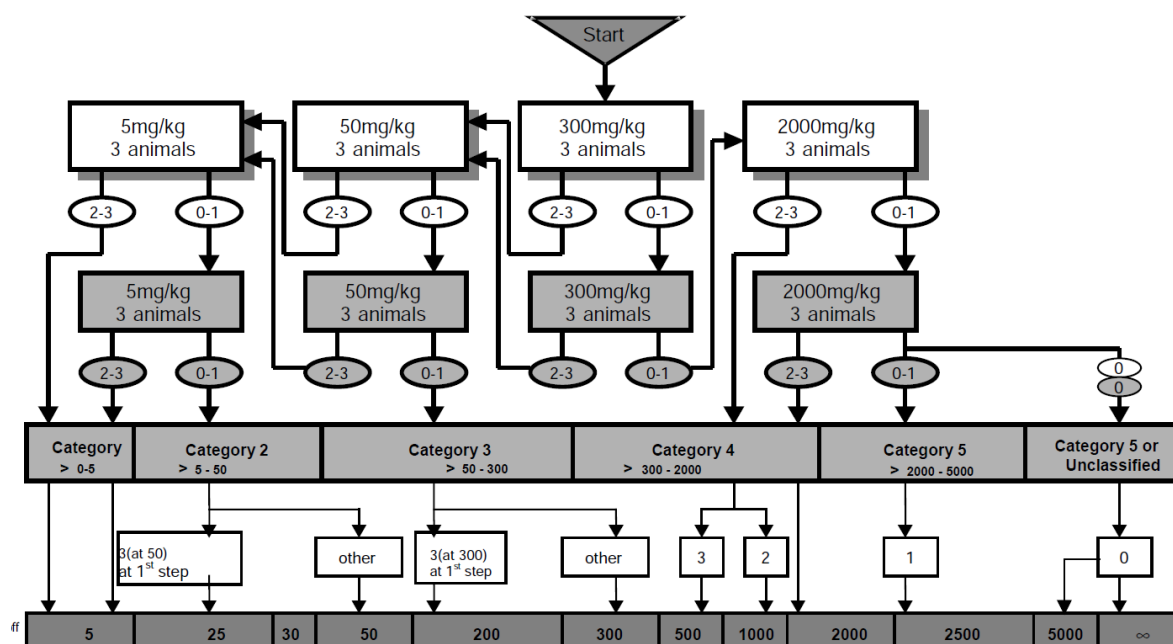


Figura 5 Protocolo OECD para determinação da DL_{50} em animais, iniciando o teste a partir da dose de 300mg/kg.

Após os respectivos tratamentos, todos os animais foram observados para que a identificação de comportamentos ou mesmo as alterações que indicassem a atividade farmacológica no SNC. Foram observadas por 4 horas seguidas, para análise de parâmetros comportamentais e possíveis alterações fisiológicas, de acordo com a ficha esquematizada no quadro 1. Observando possíveis alterações como atividades estimulantes, depressivas do sistema nervoso central e efeitos sobre o sistema nervoso autônomo, como defecação, salivação, micção e piloereção e também por 14 dias consecutivos para avaliação de sobrevivência (ALMEIDA, 2006). De acordo com o quadro apresentado abaixo:

Quadro 1 Parâmetros avaliados no teste de triagem psicofarmacológica e teste de DL_{50} para novas substâncias

| Atividade Farmacológica | Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito aumentado, (++) efeito intenso | | | | |
|-------------------------|---|----|----|----|----|
| | Até 30 min | 1h | 2h | 3h | 4h |
| 1- SNC | | | | | |
| a - estimulante | | | | | |
| Agressividade | | | | | |
| Ambulação aumentada | | | | | |

| | | | | | |
|-------------------------------------|--|--|--|--|--|
| Andar em círculo | | | | | |
| Autolimpeza | | | | | |
| Bocejo | | | | | |
| Contorções abdominais | | | | | |
| Convulsões | | | | | |
| Escalar | | | | | |
| Estereotipia | | | | | |
| Irritabilidade | | | | | |
| Levantar | | | | | |
| Movimentação intensa das vibrissas | | | | | |
| Pedalar | | | | | |
| Sacudir a cabeça | | | | | |
| Saltos | | | | | |
| Tremores | | | | | |
| Vocalização | | | | | |
| b- depressora | | | | | |
| Abdução das patas do trem posterior | | | | | |
| Ambulação diminuída | | | | | |
| Analgesia | | | | | |
| Anestesia | | | | | |
| Ataxia | | | | | |
| Catatonía | | | | | |
| Cauda de Straub | | | | | |
| Hipnose | | | | | |
| Perda do reflexo auricular | | | | | |
| Perda do reflexo corneal | | | | | |
| Ptose palpebral | | | | | |
| Sedação | | | | | |
| 2 – SN Autônomo | | | | | |
| Constipação | | | | | |
| Defecação | | | | | |

| | | | | | |
|--------------------|--|--|--|--|--|
| Diarreia | | | | | |
| Micção | | | | | |
| Lacrimejamento | | | | | |
| Salivação | | | | | |
| Respiração | | | | | |
| Cianose | | | | | |
| Piloereção | | | | | |
| Força para agarrar | | | | | |
| Tônus muscular | | | | | |
| 3 - Morte | | | | | |

Posteriormente outros dois outros grupos de camundongos fêmeas (n=3), previamente pesadas e marcadas com aproximadamente 30 minutos antes do experimento, foram administrados salina 0,9% (controle) e álcool piperonílico na dose de 2.000 mg/kg. Foram observadas por 4 horas seguidas, para análise de parâmetros comportamentais e possíveis alterações fisiológicas e por 14 dias consecutivos para avaliação de sobrevivência (CORSO, 2019).

4.4.2 Teste de rota-rod (RRT)

Foram usados cinco grupos camundongos machos (n=6), controle (solução NaCl 0,9%), diazepam 4mg/kg (DZP 4mg), álcool piperonílico (AP) 25, 50 e 100 mg/kg administrados por via intraperitoneal (i.p.) que foram colocados no aparato, teste que é utilizado para a detecção do comprometimento motor devido a agentes farmacológicos. O aparelho consiste em uma barra de plástico não escorregadia, 3,0 cm de diâmetro, rodando a 10 rpm. Cada camundongo será colocado no aparelho para avaliar a capacidade de caminhar na barra rotativa, com tolerância de até três quedas (PULTRINI, 2006; COSTA, 2013). Os animais foram observados no tempo de 30, 60 e 120 minutos após a administração do composto.

Para evitar um viés de incapacidade não relacionada ao tratamento medicamentoso, os animais serão avaliados em um teste de rotina, 24 horas antes do início do procedimento experimental. Apenas os animais que realizaram satisfatoriamente nesta avaliação inicial serão avaliados no RRT. (COSTA, 2013).



Figura 6 Aparato do teste de rota-rod.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.4.3 Teste do campo aberto

O teste de campo aberto foi em princípios proposto por Hall (1934) para testar a atividade exploratória de roedores em ambientes não familiares. A tendência natural do animal em um ambiente novo é de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado pelo ambiente novo (MONTGOMERY, 1955).

Estudos têm mostrado que alterações na capacidade exploratória do animal apresenta correlação com a ansiedade em humanos (TREIT; 2009). Assim o teste de campo aberto é um procedimento experimental conveniente para avaliar o potencial de drogas que atuam no sistema nervoso central.

Os parâmetros experimentais avaliados foram: o número total de cruzamentos, levantar, autolimpeza e defecação, de acordo com a figura 8.

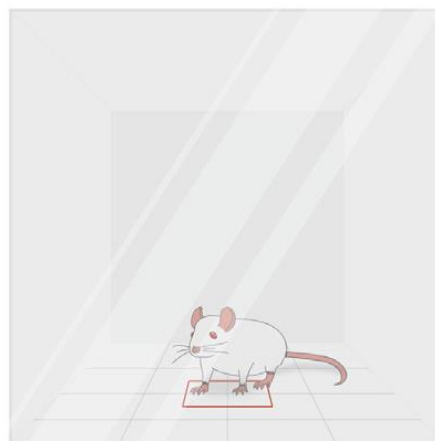
No procedimento experimental desta etapa, foram utilizados cinco grupos de 06 camundongos (machos), divididos em 03 doses: AP 25, 50, 100 mg/kg (grupo experimental), controle (solução NaCl 0,9%) e padrão (DZP 1 mg/kg), via i.p., de maneira que cada animal foi submetido individualmente ao aparelho, apresentado na

figura 7, por 5 minutos. Sendo o aparato constituído de uma base de 30 x 30 cm, marcado em uma circunferência interna e externa e uma redoma medindo 30 cm de altura x 30 cm de diâmetro em acrílico transparente.



Figura 7 Aparato utilizado no teste de campo aberto.

Fonte: Arquivo pessoal



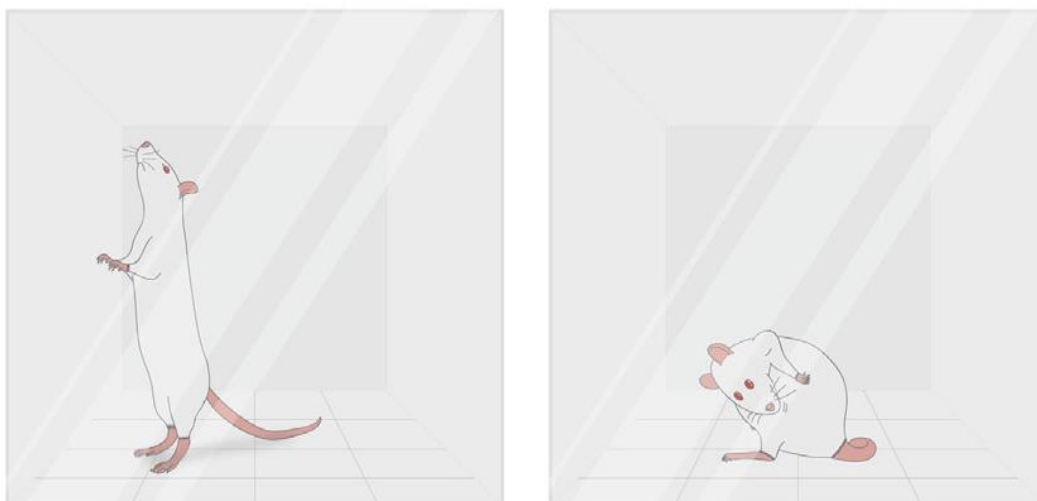


Figura 8 Parâmetros avaliados no teste de campo aberto – de cima para baixo: cruzamento; comportamento de risco, levantamento (*rearing*) e auto-limpeza (*grooming*).

Fonte: Valvassori, 2017.

4.4.4 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto consiste de um aparato feito em acrílico, de cor cinza com quatro braços, sendo dois braços abertos e dois braços fechados por paredes de 30 cm de altura. Cada braço mede 15 cm de comprimento por 5 cm de largura. O labirinto é apoiado sob um suporte com 38,5 cm elevado em relação ao solo (Figura 9) (BIALA; KRUK, 2008; LEITE, 2008). O teste tem como finalidade verificar os possíveis efeitos ansiolíticos (LISTER, 1987; BARETTA, 2012).

Após meia hora da administração dos tratamentos, os animais foram levados ao LCE. Os animais foram colocados, individualmente na plataforma, sendo registrado o número de vezes que eles entraram nos braços aberto e fechado, bem como o tempo de permanência durante 5 minutos. Considerando-se entrada nos braços quando o animal encontrar-se com as quatro patas dentro dos limites dos mesmos (PELLOW, 1985.; LEITE, 2008).

Foram utilizados cinco grupos de 06 camundongos (machos), divididos em 03 doses do grupo experimental AP 25,50 e 100mg/kg, controle (salina) e DZP 1mg, via i.p, de maneira que cada animal foi avaliado por 5 minutos, logo após 30 minutos completados da administração da substância, de acordo com o grupo previamente separado, pesado e identificado.



Figura 9 Aparato utilizado no teste de labirinto em cruz elevado.

Fonte: Arquivo pessoal

4.4.5 Teste da placa perfurada

O teste da placa perfurada é um teste comportamental para avaliação da atividade ansiolítica do álcool piperonílico (ALMEIDA, 2006). A substância foi administrada nos animais que 30 minutos depois foram colocados no centro da placa por 5 minutos para livre exploração. Neste teste foram utilizados cinco grupos de 06 camundongos (machos), divididos em 03 doses do grupo experimental AP 25,50 e 100mg/kg, controle (salina) e DZP 1mg, via i.p, de maneira que cada animal foi avaliado por 5 minutos.

. A placa perfurada é constituída de um material de acrílico (50 X 50cm) com 4 buracos equidistantes em cada linha e coluna (Figura 10). Foram avaliados o número de quadrantes percorridos e o número de mergulhos (*head-dipping*) da cabeça do animal nos buracos da placa (TAKEDA, 1998). Após cada avaliação o aparato foi limpo com álcool etílico 10%.

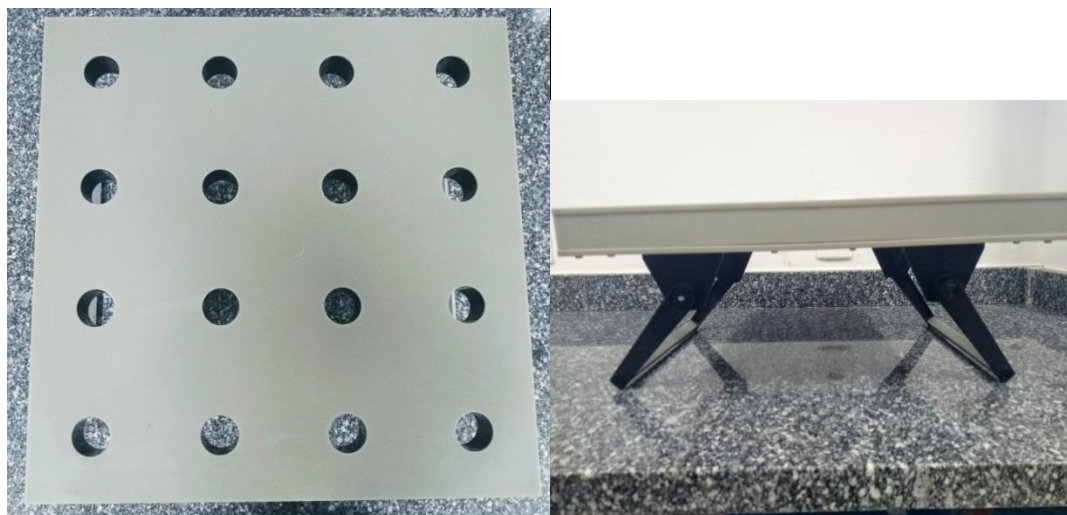


Figura 10 Aparato utilizado no teste da placa perfurada

Fonte: Arquivo pessoal

4.4.6 Teste do nado forçado (TNF)

O teste de nado forçado (TNF) é um teste comportamental usado para avaliação de drogas antidepressivas, eficácia antidepressiva de novos compostos e manipulações experimentais que tem como objetivo prevenir estados semelhantes a depressão. Sendo os camundongos colocados em um tanque transparente que é preenchido com água e é medida a mobilidade relacionada ao comportamento de escape (Figura 11) (ALMEIDA, 2006; VALVASSORI, 2017).

Neste teste foram utilizados cinco grupos de 06 camundongos (machos), divididos em 03 doses de AP 25, 50 e 100mg/kg, controle (salina) e DZP 1mg, via i.p., de maneira que cada animal foi avaliado por 5 minutos, logo após 30 minutos completados da administração da substância, de acordo com o grupo previamente separado, pesado e identificado.



Figura 11 Avaliação do tempo de imobilidade no teste de nado forçado.

Fonte: Valvassori, 2017

4.4.7 Teste da suspensão da cauda (TSC)

O teste de suspensão da cauda (TSC), semelhantemente a TNF, avalia a possível atividade antidepressiva / estimulante da substância de acordo com a redução do tempo de imobilidade do camundongo suspenso, em local sem escape, durante 5 minutos.

Neste teste foram utilizados cinco grupos de 06 camundongos (machos), divididos em 03 doses do grupo experimental (AP 25, 50, 100 mg/kg), controle (salina) e DZP 1 mg/kg, via i.p., e após 30 minutos da administração das substâncias, os animais foram submetidos ao teste (ALMEIDA, 2006).

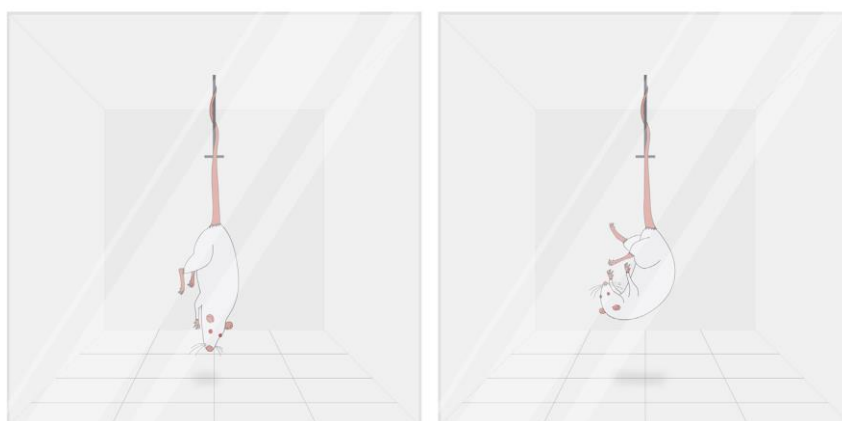


Figura 12 Avaliação do tempo de mobilidade no teste de suspensão da cauda.

Fonte: Valvassori, 2017.

4.4.8 O papel do sistema serotoninérgico na atividade do álcool piperonílico

Para investigar uma possível contribuição do sistema serotoninérgico, os animais foram divididos em 6 grupos, em 2 destes grupos, os animais foram tratados com cetanserina (1 mg/kg, via i.p). Decorridos 15 minutos da administração da cetanserina, foi administrado fluoxetina 10 mg/kg ou álcool piperonílico na dose de 50 mg/kg, antes do experimento. Nos outros grupos os animais foram testados com salina (NaCl 0,9%), cetanserina 1mg/kg, imipramina 30mg/kg e fluoxetina 10 mg/kg. E passado 30 minutos do tratamento, os animais foram submetidos ao TNF e observados por 5 minutos.

Quadro 2. Grupos e substâncias administradas no teste de investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico na atividade do álcool piperonílico.

| Grupos | Drogas e concentração |
|-----------|---|
| Grupo I | Salina 0,9% |
| Grupo II | Fluoxetina 10 mg/kg |
| Grupo III | Imipramina 30 mg/kg |
| Grupo IV | Cetanserina 1 mg/kg |
| Grupo V | Cetanserina 1mg/kg + Fluoxetina 10 mg/kg |
| Grupo VI | Cetanserina 1mg/kg + Álcool Piperonílico 50 mg/kg |

4.5 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados, foi utilizado o GraphPadPrism (version 7.00, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Mediante os resultados foram definidos os testes estatísticos mais apropriados após análise do teste de normalidade, foram utilizados ANOVA seguido pelo teste de Tukey e teste de Kruskal – Wallis seguido pelo teste de Dunn. Os resultados foram considerados significativos quando apresentaram um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testes preliminares

5.1.1 Triagem farmacológica e teste de toxicidade aguda

Para identificar a possível DL_{50} do composto, foi realizado o teste de acordo com o Guia 423 (OECD, 2001) em que, inicialmente, foi administrada a dose de 300mg/kg via i.p em 3 camundongos fêmeas e observados por 4 horas após a administração e, após isso, os animais foram observados até o décimo quarto dia, quanto a sobrevivência, perda ou ganho de peso, micção, defecação e alterações motoras.

Durante as 4 horas foram observadas alterações comportamentais em relação ao grupo controle que apresentou características que indicaram ação estimulante no sistema nervoso central em animais tratados com álcool piperonílico, como consta no quadro 3:

Quadro 3: Alterações comportamentais observadas em camundongos Swiss *Mus musculus* pelo uso álcool piperonílico na dose de 300 mg/kg, em administração única por via intraperitoneal.

| Atividade Farmacológica | Efeitos observados | | | | |
|---------------------------------|--------------------|--------|---------|---------|---------|
| | Até 30 min | 60 min | 120 min | 180 min | 240 min |
| Sistema Nervoso Central | | | | | |
| a - Estimulante | | | | | |
| Autolimpeza | + | + | + | + | + |
| Escalar | - | + | + | + | - |
| Levantar | + | + | + | + | + |
| Sistema Nervoso Autônomo | | | | | |
| Força para agarrar | + | + | + | + | + |

Legenda: (0) Efeito ausente, (-) Efeito diminuído, (+) Efeito presente, (++) Efeito intenso.

Durante as quatro horas iniciais, os principais aspectos observados foram a manifestação de ações da estimulação do sistema nervoso central (SNC), como a o comportamento de auto-limpeza, escalar e levantar, não apresentando alterações que caracterizassem depressão do SNC, nem alterações que inviabilizassem o

prosseguimento dos testes como convulsões, piloereção ou contorção abdominal. Todos os animais do grupo controle e do grupo tratado sobreviveram por 14 dias.

Baseado no estudo de Hagan (1965), em que foi demonstrado em um precursor do álcool piperonílico, o piperonal, tem meia-vida de 2.700 mg/kg em administração por via oral em dose única, três camundongos fêmeas foram submetidas ao teste com a dose de 2.000 mg/kg via i.p. e foram monitoradas por 14 dias, semelhantemente quando testados com a dose de 300mg/kg.

Quadro 4: Alterações comportamentais observadas em camundongos fêmeas Swiss (*Mus musculus*) causadas pelo álcool piperonílico na dose de 2.000 mg/kg, em administração única por via intraperitoneal.

| Atividade Farmacológica | Efeitos observados | | | | |
|---------------------------------|---------------------------|--------|---------|---------|---------|
| | Até 30 min | 60 min | 120 min | 180 min | 240 min |
| Sistema Nervoso Central | | | | | |
| a - Estimulante | | | | | |
| Autolimpeza | - | + | + | + | + |
| Escalar | - | - | - | + | + |
| Levantar | - | + | + | + | + |
| b - Depressora | | | | | |
| Ambulação diminuída | + | - | 0 | 0 | 0 |
| Perda do reflexo auricular | 0 | + | + | + | + |
| Resposta ao toque diminuída | 0 | + | + | + | + |
| Sistema Nervoso Autônomo | | | | | |
| Força para agarrar | - | - | - | + | + |

Legenda: (0) Efeito ausente, (-) Efeito diminuído, (+) Efeito presente, (++) Efeito intenso.

Os efeitos iniciais foram redução da ambulação nos 30 primeiros minutos, resposta ao toque, assim como reflexo auricular e força para agarrar diminuídos nas primeiras horas após a administração, efeitos reversíveis, pois estes parâmetros retornaram à normalidade no dia seguinte a administração.

Visto que nenhum animal morreu durante os 14 dias de observação, o teste foi repetido em mais três camundongos fêmeas, com a dose de 2.000 mg/kg, pela mesma via e todos os animais sobreviveram.

Visto que nenhum animal morreu ao final dos 14 dias de observação estima-se que a DL_{50} do álcool piperonílico esteja classificada na categoria 5, acima de 5.000 mg/kg, sendo um composto com boa segurança, de acordo com os dados preliminares. Indo ao encontro das novas descobertas e pesquisas para novos medicamentos usados para transtornos de humor, como a depressão, e transtornos de ansiedade (SCHATZBERG, 2017). Principalmente, os inibidores seletivos da receptação de serotonina que são populares como primeira escolha de tratamento para a depressão e outros transtornos de humor, devido a sua segurança na *overdose* (BARBEY, 1998)

5.2 Avaliação da atividade locomotora

5.2.1 Teste de rota-rod (RRT)

O RRT foi desenvolvido em 1968 por Jonas e Roberts para avaliar a performance neuro-motora de roedores e até hoje é extensamente usado para a investigar alteração da coordenação motora induzida por substâncias, neurotoxicidade e efeitos adversos neurológicos como ataxia e sedação (CHA, 2016)

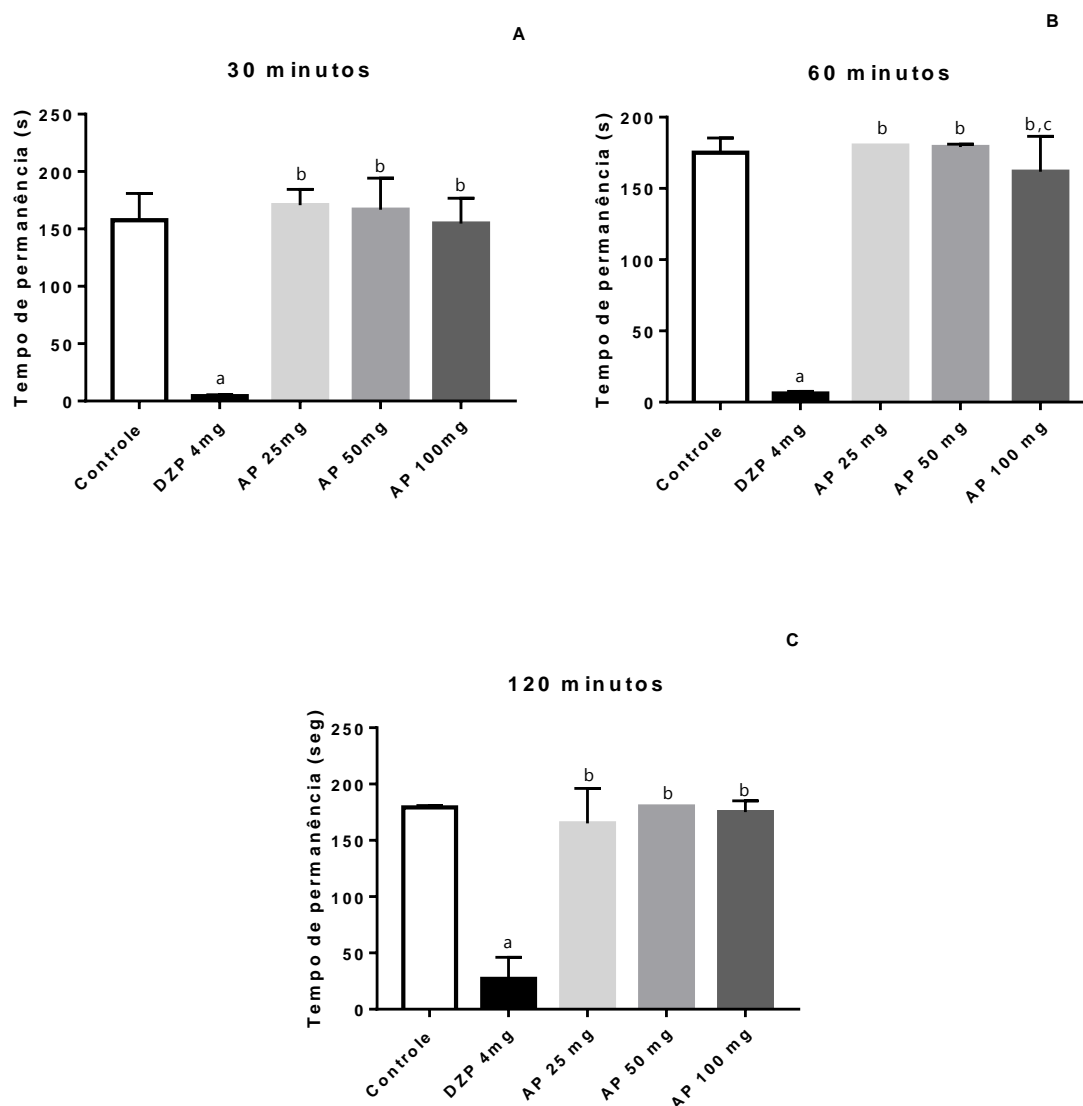


Figura 13 Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg via i.p. sobre o tempo de permanência na barra giratória no teste de rota-rod (A) 30 minutos (B) 60 minutos e (C) 120 minutos após administração da substância. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=6). ANOVA uma via seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: “a”, “b” e “c” vs CONTROLE, DZP 4mg e AP 25mg respectivamente, quando $p < 0,05$. DZP 4mg = diazepam 4mg/kg, AP 25mg = álcool piperonílico 25mg/kg.

Os animais tratados com o álcool piperonílico nas concentrações de 25mg/kg ($170,8 \pm 4,85s$), 50 mg/kg ($166,7 \pm 9,75s$) e 100 mg/kg ($154,6 \pm 8,38s$) não apresentaram nenhuma alteração significativa em relação ao controle ($157,7 \pm 8,25s$) quanto ao efeito miolorrelaxante no tempo de 30 minutos após administração das substâncias (Figura 13A). Os animais tratados com o diazepam na dose de 4mg/kg ($4,17 \pm 0,44s$), que possui ação comprovadamente sedativa, diminuiu significativamente o

tempo dos animais na barra giratória. Ratificando que compostos depressores do SNC (barbitúricos, neurolépticos, benzodiazepínicos e etanol), assim como miorrelaxantes, diminuem o tempo de permanência do animal na barra giratória, devido ao efeito sedativo adverso apresentado por essas substâncias (PENHA, 2014).

O grupo diazepam durante o tempo observado de 60 minutos ($6 \pm 0,53s$) (Figura 13B) e 120 minutos ($27 \pm 6,74s$) (Figura 13C) após administração da substância apresentou diminuição do efeito sedativo, permanecendo mais tempo na barra giratória, porém tempo significativamente menor em relação ao grupo controle nos tempos de 60 ($175 \pm 3,66$) e 120 minutos ($179,2 \pm 0,61$). Demonstrando o efeito sedativo do diazepam, ao contrário do álcool piperonílico que não apresentou efeito qualquer miorrelaxante ou sedativo nas três doses testadas.

5.3 Avaliação da atividade ansiolítica símile

5.3.1 Teste do campo aberto

Como avaliação para investigar o potencial ansiolítico do composto os animais tratados com o álcool piperonílico nas concentrações de 25, 50 e 100mg/kg e o resultado obtido não refletiu o perfil estimulante do composto frente ao diazepam. Já que o teste de campo aberto é usado para promover uma mensuração qualitativa e quantitativa da atividade exploratória e locomotora de roedores (VALVASSORI, 2017).

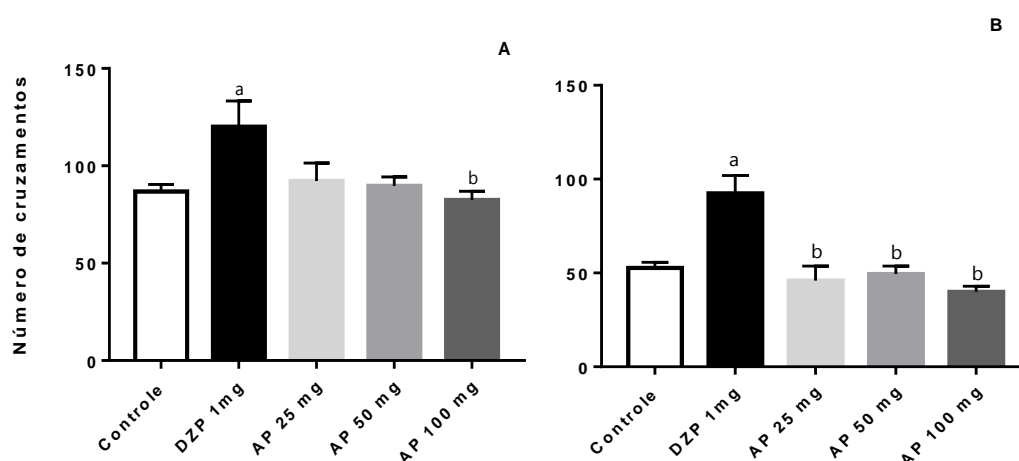


Figura 14 Efeito do álcool piperonílico em 25, 50 e 100mg/kg via i.p. sobre o número de cruzamentos. (A) No teste de campo aberto. (B) No teste de placa perfurada. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=6). ANOVA “one way” seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: “a” e “b” vs CONTROLE e DZP 1mg respectivamente, quando $p < 0,05$. DZP 1mg = diazepam 1mg/kg.

Na avaliação da ambulação espontânea verificou-se que o composto não prejudicou a atividade motora, não apresentando diferença significativa da ambulação espontânea dos grupos tratados nas doses de 25 ($92,15 \pm 9,26$), 50 ($86,83 \pm 3,58$) e 100mg/kg ($82,43 \pm 4,56$) comparado grupo controle ($86,83 \pm 3,58$) (Figura 14A), sendo um bom indicativo de que o álcool piperonílico não alterou, nas concentrações propostas, a locomoção dos animais. Corroborando o resultado obtido no teste de rota-rod, de que não possui efeito sedativo nessas doses, assim como não há atividade estimulante que poderia induzir a um resultado falso-positivo nos testes de nado forçado e de suspensão da cauda, realizados neste estudo para investigação de possível atividade tipo antidepressiva (OLIVEIRA, 2016).

O parâmetro foi avaliado por um segundo teste para investigar atividade ansiolítica, o teste de placa perfurada. Este aparato mostrou ter sensibilidade para avaliação de drogas psicoestimulantes (SOUZA, 2016).

O álcool piperonílico nas doses de 25 mg/kg ($45,88 \pm 7,85$), 50mg/kg ($48,38 \pm 4,36$) e 100mg/kg ($39,88 \pm 3,08$) apresentou, em concordância ao resultado obtido no teste de campo aberto, resultado similar no teste de placa perfurada, não mostrando diferença significativa em relação ao grupo salina ($52,63 \pm 3,03$), porém obteve-se diferença significativa em relação ao grupo tratado com diazepam 1mg/kg ($92,43 \pm 9,50$) (Figura 14B).

Na avaliação do número de levantamentos (*rearing*) não houve diferença significativa no comportamento exploratório dos camundongos tratados com a substância teste em relação ao grupo controle. Entretanto, os animais tratados com diazepam 1mg/kg ($27,17 \pm 4,25$) apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle ($43,33 \pm 3,22$) e ao grupo tratado com o álcool piperonílico na dose de 25mg/kg ($43,15 \pm 3,66$) (Figura 15), possivelmente devido ao efeito sedativo do diazepam que diminuiu o número de levantamentos. Corroborando os resultados obtidos no teste de rota-rod em que apenas os animais tratados com o diazepam apresentaram redução no tempo de permanência na barra devido ao seu efeito sedativo.

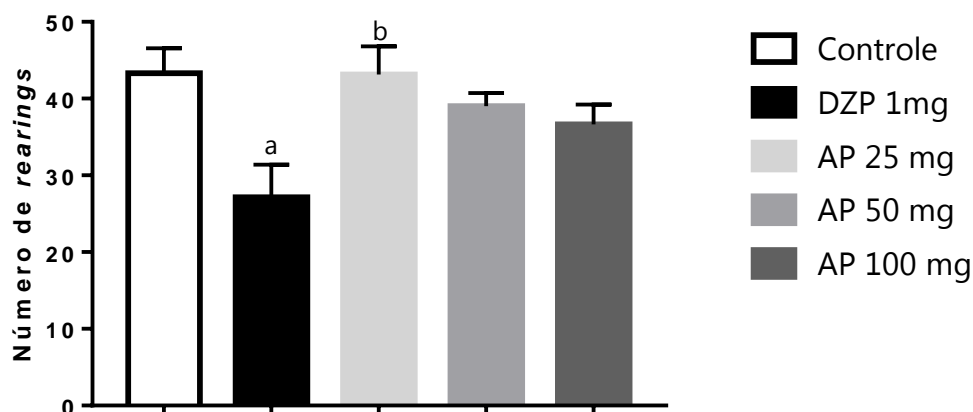


Figura 15 Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100mg/kg via i.p. sobre o número de *rearings* (levantamento) no teste de campo aberto. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=6). ANOVA “one way” seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: “a” e “b” vs CONTROLE e DZP 1mg respectivamente, quando $p < 0,05$. DZP 1mg = diazepam 1mg/kg.

O resultado obtido é justificado por um estudo realizado por Hlíňák e colaboradores, (2009) em que se observou que apesar do diazepam ser um fármaco ansiolítico, a partir da dose de 1 mg/kg, o número de levantamentos era menor que do grupo controle, talvez pelo efeito sedativo apresentado pela dose, já que em doses menores o número de levantamentos foi maior. Achado ratificado por Casarrubea e colaboradores, (2011) em que o número de cruzamentos de ratos tratados com dosagens não sedativas do diazepam, no teste de placa perfurada aumentou, demonstrando atividade ansiolítica por deixar os animais menos ansiosos em ambiente não familiar, mas não aumentou o número de *rearings*, pois o aumento deste parâmetro também é avaliado na caracterização do perfil ansiolítico do composto.

A alteração do comportamento de auto-limpeza também foi avaliada, pois seu aumento pode ser intensificado por alguns procedimentos moderadamente estressantes tais como a agitação da caixa de transporte do animal, transportar e alocar o animal em um novo ambiente ou a imersão em água (GUILD, 1981).

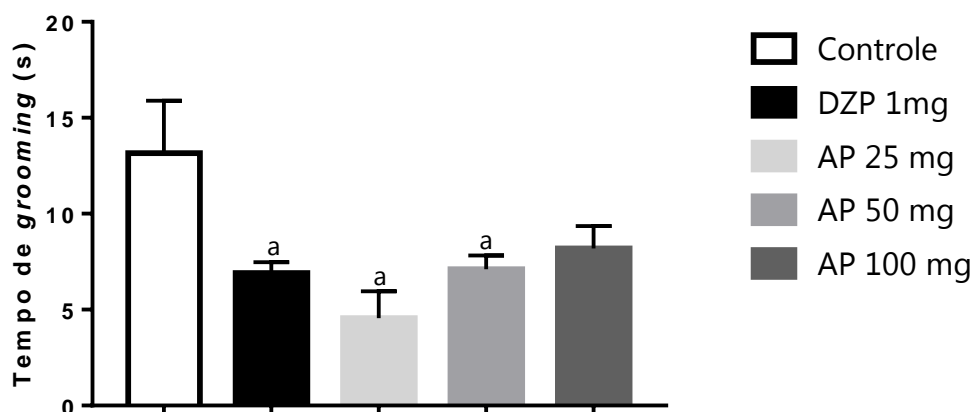


Figura 16 Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg via i.p. no tempo de *grooming* (auto-limpeza) no teste de campo aberto. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=6). ANOVA “one way” seguido pelo teste de Tukey. Valor significativo: “a” vs CONTROLE quando $p < 0,05$

De acordo com o resultado obtido podemos afirmar que a redução do tempo de *grooming* do grupo tratado com o diazepam 1mg/kg ($6,91 \pm 0,56s$) e as dosagens de 25 ($4,55 \pm 1,40s$) e 50mg/kg ($8,2 \pm 1,15s$) em relação ao grupo controle ($13,17 \pm 2,72s$), conforme representado na figura 16, caracteriza o perfil ansiolítico do benzodiazepínico, assim como diminuição do comportamento ansiogênico com o grupo tratado com a substância teste em todas as doses.

O estudo realizado por Hlíňák e colaboradores, (2009) corrobora os resultados obtidos neste experimento, pois também demonstrou diminuição significativa do tempo de *grooming* em relação ao grupo controle, nas dosagens de diazepam de 0,1, 0,3 e 1 mg/kg. Confirmando a atividade ansiolítica do diazepam, podendo-se pressupor pronunciada atividade ansiolítica do álcool piperonílico na dose de 25 e 50 mg/kg.

Acredita-se que o comportamento de *grooming*, por ser uma atividade locomotora que envolva não somente o sistema colinérgico, mas também, diferentes populações de receptores dopaminérgicos, principalmente D1 e D2 (GUILD, 1981).

Esta hipótese foi confirmada por Taylor e colaboradores, (2010) em que o SKF38393, um composto agonista do receptor D1, aumentou o tempo, assim como o número de *groomings*, mas o haloperidol, um antagonista do receptor D2 - dopaminérgico usado no tratamento da síndrome de Tourette, aboliu os efeitos de SKF38393 e suprimindo o *grooming*, confirmando o envolvimento do sistema dopaminérgico nesse comportamento (TAYLOR, 2010).

Diante do exposto e do resultado de inibição do *grooming* apresentado pelos grupos tratados com o álcool piperonílico, evidencia-se a necessidade de maiores investigações da atuação do composto sobre os sistemas colinérgicos e dopaminérgicos.

5.3.2 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE tem sido descrito como um método simples para análise da resposta ao comportamento semelhante a ansiedade causada em roedores (PELLOW, 1985). Ele evoca o medo de altura e de espaços abertos demonstrado pelos camundongos (BENNEH, 2018).

É amplamente realizado para investigação de drogas com possível atividade ansiolítica, a maioria delas compostos semelhantes às benzodiazepinas, classe que possui comprovada atividade ansiolítica (CASARRUBEA, 2015). Assim como, benzodiazepínicos, baixas doses de álcool aumentam a permanência em braços abertos, assim como substâncias ansiogênicas o diminuem (PELLOW, 1985).

Porém foi demonstrado que substâncias com ação inibitória sobre a recaptação de serotonina (ISRS) que são usados em distúrbios de ansiedade, não apresentam efeitos tipo ansiolíticos no modelo de labirinto em cruz elevado. Pois, camundongos tratados crônica e agudamente com antidepressivos (inibidores da monoaminoxidases (IMAO), ADT e ISRS) e avaliados no LCE apresentaram comportamento ansiogênico, sendo este modelo altamente sensível para fármacos benzodiazepínicos ou que atuem sobre o sistema gabaérgico (BORSINI, 2002).

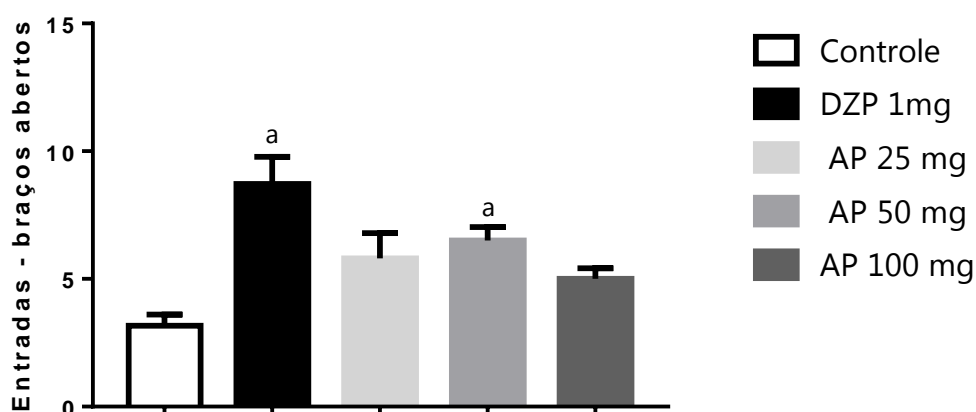


Figura 17 Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg via i.p. sobre o número de entradas nos braços abertos no teste do LCE. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=6).

ANOVA “one way” – Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Valor significativo: “a” vs CONTROLE quando $p < 0,05$.

Para verificar provável atividade ansiolítica foi realizado o teste com o álcool piperonílico (AP) nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg comparado ao grupo controle e ao diazepam 1mg/kg (DZP 1mg) (controle positivo). Apenas a dose de 50mg/kg ($6,5 \pm 0,53$) apresentou resultado significativo em relação ao controle ($3,17 \pm 0,44$), aumentando o número de entradas nos braços abertos (Figura 17). Indicando efeito ansiolítico – similar do composto no comportamento do animal, diferentemente do padrão comportamental normal dos camundongos, que frente a um ambiente novo apresenta, como comportamento predominante, se esconder em ambiente fechado, piloereção e congelamento (*freezing*) (VATAEVA, 2003). Pois, o comportamento relacionado a ansiedade, como conhecido, reforça o medo e facilita o armazenamento de memórias relacionadas a ele (WANG, 2019)

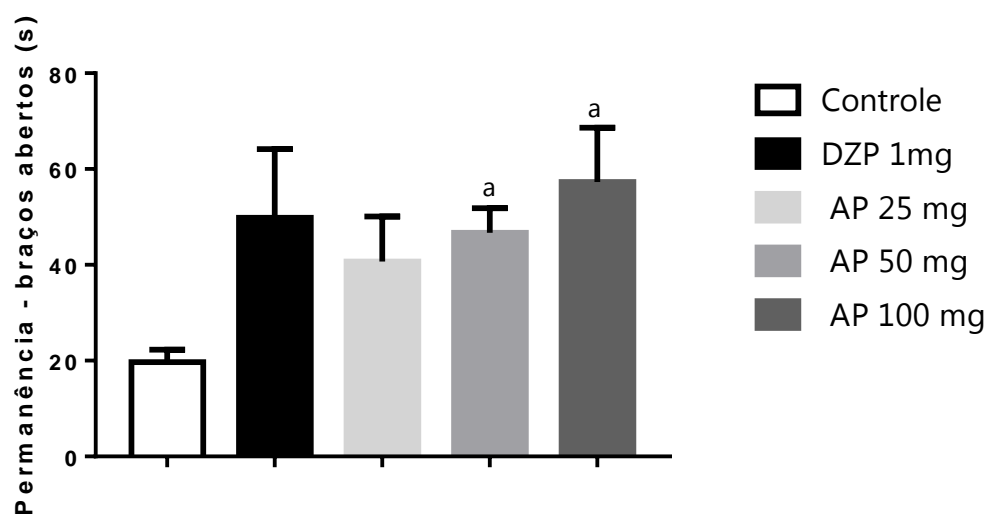


Figura 18 Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg via i.p. sobre o tempo permanência nos braços abertos. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n=6$). ANOVA “one way” – Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Valor significativo: “a” vs CONTROLE quando $p < 0,05$.

No mesmo teste verificou-se que as doses de 50mg/kg ($46,68 \pm 5,16s$) e 100mg/kg ($57,33 \pm 11,28s$) aumentaram significativamente o tempo que os camundongos permaneceram nos braços abertos em relação ao grupo controle ($19,68 \pm 2,61s$), sendo um indicativo de que o álcool piperonílico diminuiu o comportamento

ansio gênico causado pela altura e exposição aos braços abertos do aparato, ambiente não protegido, nos animais (Figura 18). Comportamento ratificado por Odeon e colaboradores, (2019) que considera a permanência nos braços abertos no LCE como um indicativo de baixos níveis de ansiedade (ODEON, 2019).

Todavia, há evidências e inúmeros registros de que os roedores tem clara preferência durante os 5 minutos do teste pelos braços fechados e que a permanência nos braços abertos apenas indica uma diminuição do nível de ansiedade (CASARRUBEA, 2015).

Camundongos em geral caminham mais livremente nos braços fechados, permanecendo mais tempo neste espaço, mas quando estão sob efeitos de ansiolíticos alteram seu comportamento normal e passam mais tempo nos braços abertos, assim como aumentam a porcentagem de entrada (BENNEH, 2018). Tendo em vista estas afirmações pode-se indicar que o álcool piperonílico na dose de 50 mg/kg apresentou significativa atividade tipo ansiolítica símile por aumentar o número de entradas e o tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos.

5.3.3 Teste da placa perfurada

O teste em questão é largamente utilizado para investigação de atividade ansiolítica. Desenvolvido por Boissier e Simon em 1962 (BOISSIER, 1962) e oferece um método fácil para avaliar o comportamento de camundongos a ambientes não familiares, avaliando o número de mergulhos (*head-dips*) (CASARRUBEA, 2010)

O fundamento do teste se baseia na teoria de que a diminuição do nível de ansiedade aumenta a exploração de ambiente novo pelo animal (ambulação) e o número de mergulhos (*head-dip*), assim como um comportamento ansioso diminui a exploração na placa perfurada (CASARRUBEA, 2010; CASARRUBEA, 2011).

Quando o animal está sob efeito de um fármaco ansiolítico observa-se um aumento do comportamento de mergulhar a cabeça nos furos da placa, portanto a medida em que o animal perde o medo tende a aumentar o comportamento exploratório (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2003). Contudo, o comportamento natural do animal é evitar as áreas não protegidas do aparato, como a área central, devido ao medo natural de predação (SOUZA, 2016).

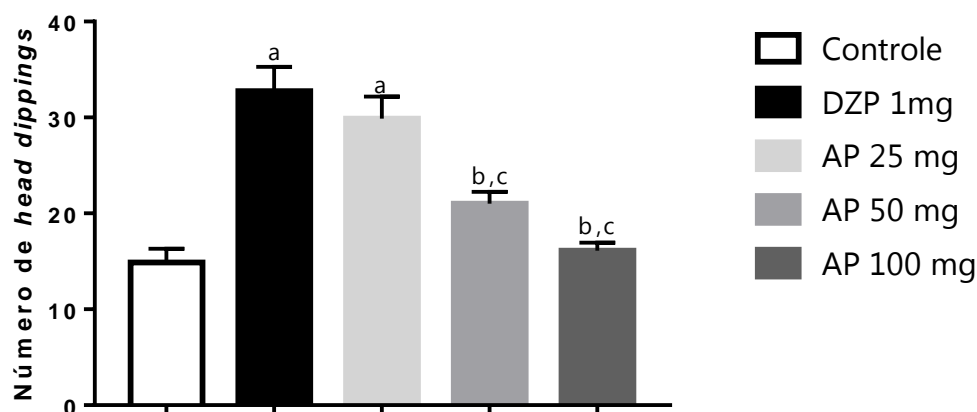


Figura 19 Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100mg/kg via i.p. sobre o número de *head-dippings* (mergulhos) no teste de placa perfurada. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=6). ANOVA “one way” seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: “a”, “b” e “c” vs CONTROLE, DZP 1mg e AP 25mg respectivamente, quando $p < 0,05$. DZP 1mg = diazepam 1mg/kg, AP 25mg = álcool piperonílico 25mg/kg.

Para confirmar o efeito ansiolítico do álcool piperonílico apresentado pelos resultados obtidos em testes anteriores, no teste de placa perfurada observou-se que o álcool piperonílico induziu a um aumento do comportamento exploratório dos camundongos na dosagem de 25 mg/kg ($29,88 \pm 2,29$) em relação ao grupo controle ($14,88 \pm 1,44$) (Figura 19), corroborando a premissa da diminuição do número de mergulhos em níveis altos de ansiedade, e aumento, em níveis de ansiedade baixos. (CASARRUBEA, 2017).

Houve diferença também entre as concentrações, em que se observa que as melhores doses para atividade ansiolítica-símile são a de 25mg/kg e 50mg/kg, reiterando o observado nos testes para atividade ansiolítica realizados neste estudo. As doses de 50mg/kg ($21 \pm 1,25$) e 100mg/kg ($16,13 \pm 0,81$) indicam o que houvera afirmado Takeda e colaboradores, (1998) de que a atuação sobre o sistema serotoninérgico pode não alterar o número de mergulhos, como nas doses de 50 e 100mg/kg, ou até mesmo diminuí-los comparado aos animais do grupo controle (KLIETHERMES, 2006). Indicando que o álcool piperonílico pode agir em mais de um sistema envolvido na regulação do comportamento.

Contudo o teste de placa perfurada isoladamente não apresenta resultados sensíveis e precisos sobre a atividade tipo ansiolítica do composto, necessitando de

complementariedade (CASARRUBEA, 2017), dada pelos teste de LCE e campo aberto que atestam o efeito ansiolítico - símile do álcool piperonílico.

5.4 Avaliação da atividade antidepressiva símile

5.4.1 Teste do nado forçado (TNF)

O TNF foi realizado para avaliação de atividade antidepressiva induzida pelo álcool piperonílico. Visando simular condições estressantes a fim de produzir condições comparáveis ao quadro de depressão e ansiedade caracterizado em humanos (QI, 2007). Tendo em vista que o nado forçado vem sendo relacionado a mudanças dos níveis de fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF), mudanças dos níveis de serotonina e diminuição dos níveis de cinase regulada por sinal extracelular (ERK 1/2) em regiões hipotalâmicas (FRANÇA, 2016).

A exposição a condições estressoras agudas de forma repetida leva ao desenvolvimento de estresse crônico em humanos e em animais, sendo este uma das principais condições para o desenvolvimento de ansiedade e depressão (QI, 2007)

O uso do TNF para induzir estresse em ratos e camundongos é amplamente disseminado (BADOWSKA-SZALEWSKA, 2010). E a postura imóvel adotada pelo animal estaria relacionada a um estado de “desistência”, de “desespero comportamental”, que se assemelharia a sentimentos de tristeza, retardo psicomotor e fadiga de um indivíduo deprimido, correlacionando-se assim, à síndrome depressiva humana (DIXON, 1998).

Porém, apenas a exposição aguda causaria estresse, pois foi verificado que a exposição crônica de camundongos ao TNF, se assimila a um exercício leve, diminuindo o comportamento semelhante a ansiedade em animais (FRANÇA, 2016).

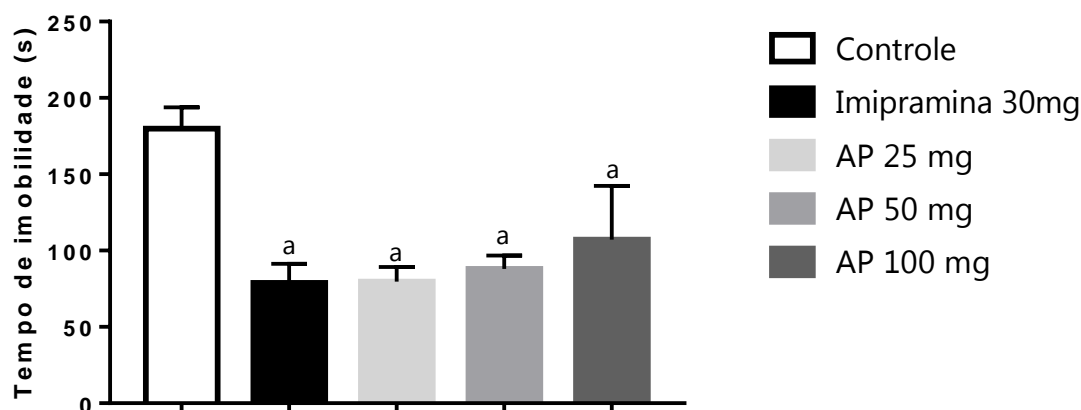


Figura 20 Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100mg/kg via i.p. sobre o tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao teste de nado forçado. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=6). ANOVA “one way” seguido pelo teste de Tukey. Valor significativo: “a” vs CONTROLE quando $p < 0,05$.

Neste teste foi realizada a exposição aguda de camundongos, sem treinamento prévio, ao TNF, observando-se que tanto a imipramina 30mg/kg ($78,88 \pm 12,46s$), quanto às concentrações de 25mg/kg ($79,63 \pm 9,69s$), 50mg/kg ($88 \pm 8,80s$) e 100mg/kg ($107,1 \pm 12,44s$) do álcool piperonílico diminuíram o tempo de imobilidade dos camundongos em relação ao grupo controle ($179,9 \pm 13,94s$) (Figura 20). Demonstrando que a droga tem possível atividade tipo antidepressiva. Sendo esta atividade mais pronunciada nas menores concentrações (25 e 50mg/kg), diminuindo na concentração de 100mg/kg.

Uma diminuição do tempo de imobilidade é considerado um bom valor preditivo na avaliação de potenciais agentes antidepressivos (VINOD, 2012). Tendo em vista que o TNF, assim como o teste de suspensão da cauda (TSC) são altamente sensíveis e relativamente específicos para a maioria das classes de antidepressivos, como os IMAOs, ADT e ISRS.

Isto é de fato observado comparando a diminuição da imobilidade de animais tratados com imipramina, um clássico antidepressivo tricíclico, que atua inibindo a recaptação de serotonina e norepinefrina e aumentando a concentração destes neurotransmissores na fenda sináptica onde ativam seus respectivos receptores (RIBEIRO, PUPO, 2015)

Apesar de específico, substâncias estimulantes como a cafeína e cocaína podem gerar resultados falso-positivo no TNF, assim como o TSC, devido ao aumento a atividade locomotora e não à atividade antidepressiva da substância (OLIVEIRA, 2016).

Por isso todos os animais foram submetidos ao teste de campo aberto, no qual foi demonstrado que não houve alteração significativa da atividade locomotora espontânea dos camundongos, validando o resultado obtido do TNF e TSC.

5.4.2 Teste da suspensão da cauda (TSC)

O procedimento foi desenvolvido por Steru e colaboradores (1985) e avalia a imobilidade do camundongo quando suspenso pela cauda por determinado período (PALUCHA-PONIEWIEIRA, 2014), tendo o mesmo fundamento do TNF em que o aumento do tempo de imobilidade está relacionado a uma ação de “desistência” do animal, indicando um comportamento depressivo. O TSC assim como o TNF são ferramentas comportamentais amplamente utilizadas na investigação de atividade antidepressiva de várias drogas (ZENI, 2012).

Após a obtenção do resultado do TNF, o TSC foi então realizado de modo a complementar o resultado obtido anteriormente no TNF, em que o tempo de imobilidade foi analisado em animais tratados com salina, imipramina e álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100mg/kg, conforme gráfico abaixo:

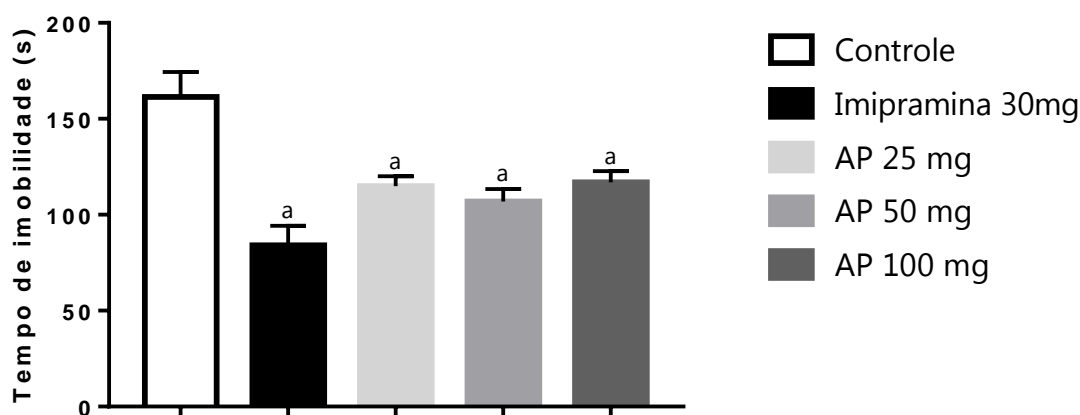


Figura 21 Efeito do álcool piperonílico nas doses de 25, 50 e 100mg/kg via i.p. no tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao teste de suspensão da cauda. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=6). ANOVA “one way” seguido pelo teste de Tukey. Valor significativo: “a” vs CONTROLE quando $p < 0,05$.

Os animais foram avaliados durante 5 minutos ininterruptos e observou-se que as todas as concentrações escolhidas diminuíram o tempo de imobilidade (25mg/kg: $114,9 \pm 5,2s$; 50mg/kg: $106,9 \pm 6,6s$; 100mg/kg: $116,9 \pm 5,8s$) dos animais sem diferença significativa entre os grupos tratados com a substância teste e a substância

padrão (imipramina 30mg/kg) ($84,13 \pm 10,2s$) em relação ao grupo controle ($161,5 \pm 12,94s$) (Figura 21).

O tempo de imobilidade no TSC tem relação direta com a concentração de serotonina, demonstrada através da depleção de 5-HT em camundongos e bloqueio da ação antidepressiva da fluoxetina, assim como com a ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A/2C}, que quando antagonizado aumentou o tempo de imobilidade dos animais (PALUCHA – PONIEWIEIRA, 2014).

5.5 Investigação do mecanismo de ação

5.5.1 Investigação da ação do álcool piperonílico sobre o sistema serotoninérgico

De acordo com a hipótese monoaminérgica, o neurotransmissor 5-HT está envolvido na neurobiologia da depressão e que alterações na função e quantidades na fenda sináptica da serotonina, noradrenalina e dopamina induz o aparecimento de sintomas depressivos (KRISHNAN, 2008).

Atualmente, o sistema serotoninérgico é considerado o principal sistema envolvido na neurobiologia da depressão e existem vários fármacos antidepressivos cujo mecanismo de ação se baseia no aumento de 5-HT na fenda sináptica (HAYASHI, 2008). Dentre estas classes de medicamentos, estão ISRS, porém sabe-se que apesar de aumentar os níveis de serotonina rapidamente, o efeito clínico é observado com semanas de tratamento (KRISHNAN, 2008; BASTOS, 2011).

Um estudo realizado por Gross e colaboradores, (2017), constatou a interação do álcool piperonílico com o receptor de tiramina em *Rhipicephalus micropolus*, podendo ocorrer como modulador alostérico, apresentando similaridade estrutural com a tiramina. A tiramina, por sua vez, não ativa diretamente os receptores adrenérgicos, mas pode ser um substrato para sistemas de recaptação de serotonina e é degradada pela monoaminoxidase, prolongando a ativação adrenérgica (DeCS, 2019).

Mao e colaboradores, (2011) observou que a piperina, molécula precursora do álcool piperonílico, diminuiu o tempo de imobilidade nos testes do nado forçado e da suspensão da cauda, ratificando a atividade tipo antidepressiva anteriormente observada em outros estudos (LI, 2007). Posteriormente, constatou-se que este efeito foi devido à regulação para cima do nível de serotonina no cérebro e sua atuação em receptores 5-HT. Pois, a hipótese serotoninérgica da depressão sugere que os sintomas depressivos

estão relacionados à redução da concentração do 5-HT nas sinapses cerebrais e que o reforço em sua concentração ou mimetização da molécula deste neurotransmissor é capaz de induzir ação antidepressiva (MAO, 2014).

Contudo dados recentes demonstraram a ação da piperazina sobre receptores 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C} (SINGH, 2019), pois a ativação de receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ tem implicação direta na regulação do humor e alteração na modulação destes receptores está diretamente relacionada na etiologia da depressão (TAKEDA, 1998; ZENI, 2012). A atuação sobre receptores 5-HT₂ ativa diretamente interneurônios gabaérgicos no núcleo basolateral da amígdala (WANG, 2019).

Portanto para investigar a atuação do álcool piperonílico sobre o sistema serotoninérgico utilizou-se cetanserina 1mg/kg (CET 1mg), antagonista seletivo do receptor 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} (LEVIN, 2008), largamente utilizada para investigar a atuação de compostos sobre o sistema serotoninérgico e em sua atividade antidepressiva e ansiolítica (BORSINI, 1994; PINHEIRO, 2002; SANTOS, 2003). Assim como a imipramina usada como controle positivo em testes como o TNF e o TSC por atuar sobre o sistema serotoninérgico e noradrenérgico (KAUR, 2019) e a fluoxetina (FLX 10mg) por ter atuação específica sobre o sistema serotoninérgico.

Sendo a cetanserina utilizada isoladamente, para comparar seu efeito no TNF, como um controle negativo, em relação aos demais grupos e utilizado em combinação com a fluoxetina (substância padrão) e o álcool piperonílico (substância teste) a fim de avaliar sua ação antagonista sobre o efeito das substâncias antidepressivas utilizadas.

Diante dos resultados dos testes anteriores verificou-se que a dose de 50mg/kg do álcool piperonílico foi a que apresentou os melhores resultados nos testes realizados, revelando não ser uma substância com efeito dose-dependente, devido a uma possível saturação do sítio ativo, apresentando efeitos significativos nas menores doses (ZENI, 2012), por isso esta dose foi escolhida.

Objetivou-se então verificar possível reversão do efeito antidepressivo-símile apresentado pelo álcool piperonílico no teste de nado forçado e suspensão da cauda, realizados anteriormente. A cetanserina foi administrada e 15 minutos após, a substância padrão ou a substância teste foi administrada. Sendo todos os grupos avaliados 30 minutos depois.

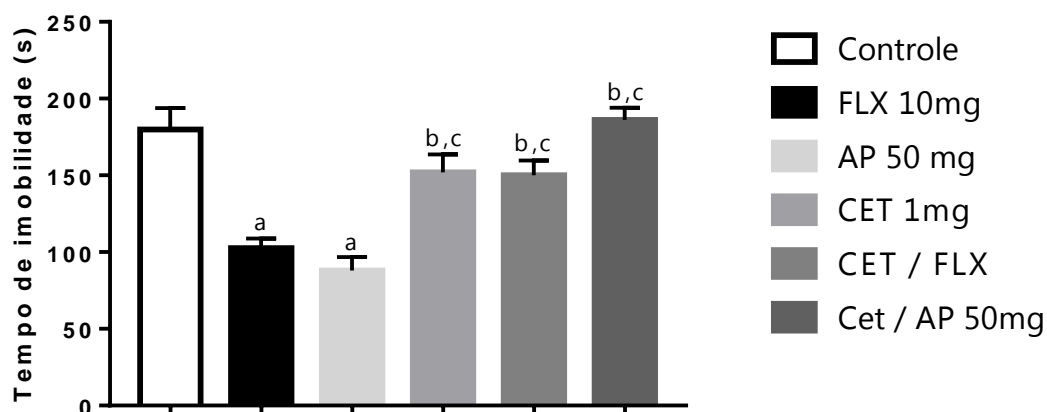


Figura 22 Investigação da via serotoninérgica como possível mecanismo de ação do álcool piperonílico através do teste do nado forçado. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n=6$). ANOVA “one way” seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: “a” “b” e “c” vs CONTROLE, FLX 10mg e AP 50mg respectivamente, quando $p<0,05$.

A ação anti-imobilidade no teste de nado forçado é provavelmente mediada pelos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C}, porém apenas a diminuição da concentração de serotonina na fenda sináptica não altera este parâmetro (BORSINI, 1994). Por esta razão no grupo tratado apenas com a cetanserina ($152 \pm 11,74s$) ocorreu um aumento no tempo de imobilidade.

De acordo com o resultado apresentado na figura 22, observa-se aumento do tempo de imobilidade nos grupos tratados com cetanserina/ fluoxetina 10mg/kg ($150,1 \pm 9,52s$) e cetanserina/ álcool piperonílico 50mg/kg ($186,1 \pm 8,02s$) em relação ao tempo de imobilidade da fluoxetina 10mg/kg ($102,6 \pm 6,32s$) e ao álcool piperonílico 50mg/kg ($88 \pm 8,81s$), caracterizando a ação antidepressiva – símile e ansiolítica-símile do álcool piperonílico devido a sua atuação sobre receptores do tipo 5-HT_{2A/C}, pois o composto teste não foi capaz de reverter a ação da cetanserina sobre receptores do tipo 5-HT₂.

É possível que o álcool piperonílico também aumente a concentração sináptica de serotonina, tendo em vista que camundongos tratados com piperina, em um estudo realizado por Mori e colaboradores, (1985) a substância foi capaz de aumentar a concentração de 5-HT, fato que será investigado em estudos posteriores, mas que fundamenta-se no resultado obtido principalmente no TSC em que a redução do tempo

de imobilidade tem estreita relação com a concentração de serotonina na fenda sináptica.

O sistema serotoninérgico atua não somente no quadro de depressão, mas também sobre a ansiedade, sendo os receptores 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ os principais envolvidos na atividade ansiolítica (BARNES, 1999). Pois, Mello e Brandão (1995) já mostraram o efeito ansiolítico, em rato, da μ - metil - 5 - hidroxitriptamina, um agonista 5-HT₂ altamente seletivo, pelo teste de labirinto em cruz elevado (PINHEIRO, 2002).

Pode-se então inferir que o efeito ansiolítico – símile e antidepressivo – símile do álcool piperonílico é devido a sua atuação sobre receptores 5-HT₂ demonstrado através dos testes comportamentais realizados neste estudo.

CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos conclui-se que não foram observados efeitos adversos graves no uso de álcool piperonílico, apresentando-se como uma substância consideravelmente segura, com DL_{50} definida acima de 5.00mg/kg.

O composto causou reduções significativas no comportamento ansiogênico dos animais nas concentrações de 25 e 50mg/kg, além da atividade antidepressiva símile caracterizada nos testes do nado forçado e suspensão da cauda, devido ao provável envolvimento do sistema serotoninérgico com a evidente participação de receptores do tipo 5-HT₂.

Todavia os testes comportamentais necessitam de complementaridade para melhor compreensão dos aspectos neuroquímicos alterados pelo composto e sua atuação sobre outros sistemas em seu mecanismo de ação, como o gabaérgico e noradrenérgico, que serão investigados a posteriori.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. N. D. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2006

AMARAL, J. **Efeito ansiolítico e antidepressivo do desidrodieugenol (Bis – eugenol) em camundongos: estudo neurocomportamental e neuroquímico**. Tese de Doutorado (Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Programa de Pós-graduação em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, 2010.

BADOWSKA-SZALEWSKA, E.; SPODNIK, E.; KLEJBOR, I *et al.* Effects of chronic forced swim stress on hippocampal brain-derived neutrophic factor (BDNF) and its receptor (TrkB) immunoreactive cells in juvenile and aged rats. **Acta Neurobiologiae. Experimentalis Journal**, v.70, p. 370–381, 2010.

BARBEY, J.; ROOSE, S. SSRI safety in overdose. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 59, p. 42 – 48, 1998.

BARETTA, I. P.; FELIZARDO, R. A.; BIMBATO, V. F. *et al.* Anxiolytic-like effects of acute and chronic treatment with *Achillea millefolium* L. extract. **Journal of ethnopharmacology**, v.140, n.1, p. 46-54, 2012.

BARNES, N.M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, n.38, p. 1083-1152, 1999.

BASTOS, T.C. **Neurobiologia da Depressão**. Dissertação de Mestrado (Faculdade de Medicina – Mestrado Integrado em Medicina), Universidade do Porto, 2011.

BENNEH, C.K; BINNEY, R.P; ADONGO, D.W. *et al.* Anxiolytic and Antidepressant Effects of *Maerua angolensis* DC. Stem Bark Extract in Mice. **Depression Research and Treatment**. v. 2018, 17 p., 2018.

BERNIK, M.; SOARES, M.; SOARES, C. Benzodiazepínicos: Padrões de uso, tolerância e dependência. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 48, n. 1, p. 131 – 137, 1990.

BHAT. G; CHANDRASEKHARA, N. Metabolic disposition of piperine in the rat. **Toxicology**, v. 44, p. 99 – 106, 1987

BIALA, G.; KRUK, M. Calcium channel antagonists suppress cross-tolerance to the ansiogenic effects of D- amphetamine and nicotine in the mouse elevated plus maze test. **Progress in Neuro- Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 32, p. 54 – 61, 2008.

BOISSIER, J. R.; SIMON, P. The exploration reaction in the mouse. **Preliminary note, Thérapie**, v. 17, p. 1225–1232, 1962.

BORSINI, F. Balance between cortical 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptor function : hypothesis for a faster antidepressant action. **Pharmacology Research**, v.30, p. 1 – 11, 1994.

BORSINI, F.; PODHORN, J. MARAZZITI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? **Psychopharmacology**. v. 163, p. 121 – 141, 2002.

BORZATTA, V.; CAPARELLA, E.; CHIAPINO, R. et al. Oppenauer's oxidation by paraformaldehyde of piperonyl alcohol to heliotropine. **Catalysis Today**, v. 140, p. 112 – 116, 2009.

BOWLES, B.L., JUNEJA, V.K. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by naturally occurring food additives. **Journal of Food Safety**. v. 18, p. 101–112, 1998

BRAGA, J. E. F.; PORDEUS, L. C.; DA SILVA, A. T. *et al.* Ansiedade patológica: bases neurais e avanços na abordagem psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 14, n.2, p.93-100, 2011.

CASARRUBEA, M.; SORBERA, F.; SANTANGELO, A. *et al.* Microstructure of rat behavioral response to anxiety in hole-board. **Neuroscience Letters**, v. 481, p. 82 – 87, 2010.

CASARRUBEA, M.; SORBERA, F.; MAGNUSSON, M.; CRESCIMANNO, G. T-pattern analysis of diazepam-induced modifications on the temporal organization of rat behavioral response to anxiety in hole board. **Psychopharmacology**, v. 215, p. 177 – 189, 2011.

CASARRUBEA, M.; FAULISI, F.; SORBERA, F.; CRESCIMANNO, G. The effects of different basal levels of anxiety on the behavioral shift analyzed in the central platform of the elevated plus maze. **Behavioural Brain Research**, v. 281, p. 55 – 61, 2015.

CASARRUBEA, M.; FAULISIA, F.; PENSABENE, M. *et al.* Effects of the benzodiazepine inverse agonist FG7142 on the structure of anxiety-related behavior of male Wistar rats tested in hole board. **Psychopharmacology**, v. 234, p. 381 – 391, 2017.

CHA, H.; KIM, Y.; JEON, S. *et al.* Neurotoxicity induced by alkyl nitrites: Impairment in learning/ memory and motor coordination. **Neuroscience Letters**, v.619, p. 79 – 85, 2016.

CHONPATHOMPIKUNLERT P, WATTANATHORN J, MUCHIMAPURA S. Piperine: the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48, n. 3, p.798–802, 2010.

CONCON, J.; SWERCZEK, T.; NEWBURG, D. **Potential carcinogenicity of black pepper (*Piper nigrum*)**. Antinutrients and Natural Toxicants in Foods. Connecticut: Food and Nutrition Press, p. 359 – 374, 1981.

CORSO, C.R; STIPP, M.C; ADAMI, E.R *et al.* *Salvia lachnostachys* Benth has antitumor and chemopreventive effects against solid Ehrlich carcinoma. **Molecular Biology Reports**. v. 46, n.35, p. 4.827 – 4841, 2019.

COSTA, C.; CURY, T.; CASETTARI, B. *et al.* *Citrus aurantium* L. essential oil exhibitis anxiolytic – like activity mediated by 5-HT1A receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 1 – 10, 2013.

CREMASCO, M. A.; BRAGA, N. P. Síntese do piperonal a partir do óleo essencial de *Pimenta longa* (*Piper hispidinervum* C. DC). **Acta Amazônica**. v. 42, n. 2. p. 275-278, 2012.

Descritores em Ciências da Saúde. Tiramina. **Biblioteca Virtual em Saúde**. Site: <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/?IsisScript=../cgi-bin/decserver/>

decserver.xis&task=exact_term&previous_page=homepage&interface_language=p&search_language=p&search_exp=Tiramina. Acessado em: 05/12/2019

DIXON, K. Ethological strategies for defence in animals and humans: their role in some psychiatric disorders. **British Journal of Medical Psychology**, v. 71, n. 4, p. 417 – 445, 1998.

FIORELLI, K.; ASSINI, F. L. A prescrição de benzodiazepínicos nos Brasil: uma análise da literatura. **ABCS Health Science**, v. 42, n. 1, p. 40 – 44, 2017.

FRANÇA, A.; RUFINO, F. *et al.* Nado forçado crônico diminui a ansiedade em camundongos. **Revista de Biologia**. v. 16, n.1, p. 15 – 23, 2016.

FREITAS, F. D. F. **Avaliação dos efeitos psicofisiológicos da L-teanina em modelo de ansiedade em humanos**. Dissertação de Mestrado (Centro de Ciências da Saúde – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição). Universidade Federal de Paraíba, 2013.

GARCIA, A.; BERZINS, T.; ACOSTA, M. *et al.* The anxiety depression distress inventory-27 (ADDI-27): new evidence of factor structure, item-level measurement invariance, and validity. **Journal of Personality Assessment**, v.100, n.3, p. 321 – 333, 2018.

GOANȚĂ, M.; BUDU, V.; STĂNCIULESCU, A. *et al.* Anxiety dizziness. **ORL.ro**, v.45, p. 36 – 38, 2019.

GUILD, A.; DUNN, A. Dopamine involvement in ACTH-induced grooming behavior. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 17, p. 31–36, 1981.

GROSS, A; TEMEYER, K.; DAY, T. *et al.* Interaction of plant essential oil terpenoids with the southern cattle tick tyramine receptor: A potential biopesticide target. **Chemico-Biological Interactions**, v. 263, p. 1 – 6, 2017.

HALL, C.S Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p.385 – 403, 1934.

HAGAN, E.; JENNER, P. *et al.* Toxic Properties of Compounds Related to Safrole.

Toxicology and Applied Pharmacology, v. 7, p.18 – 24, 1965.

HARRO, J. Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. **Behavioural Brain Research**. 2017.

HAYASHI T.; SU T.P. An update on the development of drugs for neuropsychiatric disorders: focusing on the sigma 1 receptor ligand. **Expert Opinion Therapeutic Targets**. v. 12, n. 1, p. 45 – 58, 2008

HENRIQUES, A., SIMÕES-PIRES, C., & APEL, M. Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas In:YUNES, RA & FILHO, VC Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. **Editora UNIVALI**, Itajaí, 221, 2009.

HLIŇÁK, Z.; HYNIE, S.; KREJČÍ, I.; *et al.* Novel and simple behavioral paradigm for assessing anxiety in rats: effect of diazepam. **Neuroendocrinology Letters**, v. 30, n.1, p. 25 – 31, 2009.

KAMIENSKY, F.; CASIDA, J. Importance of demethylenation in the metabolism in vivo and in vitro of methylenedioxyphenyl synergists and relates compounds in mammals. **Biochemical Pharmacology**, v.19, p. 91 – 112, 1970.

KATZUNG, B.G.; TREVOR, A. **Farmacologia Básica e Clínica**. 13ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

KAUR, J.; BHATIA, M.; NAIN, P. Antidepressant activity of *Citrus limetta* leaves in mice using battery of behavior models modulating via serotonergic systems. **Bangladesh Journal Pharmacology**, v. 14, p. 181 – 187, 2019.

KLIETHERMES, C.; CRABBE, J. Pharmacological and genetic influences on hole-board behaviors in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 57 – 65, 2006.

KRISHNAN V.; NESTLER E.J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**. v. 455, p.894-902, 2008.

KOEN, N.; STEIN, D.J. Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. **Dialogues Clinical Neuroscience**. v. 13, p. 423 – 437, 2011.

LEITE, M.; FASSIN JR, J.; BAZILONI, E. *et al.* Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p.661 – 666, 2008.

LEVIN, E.D.; SLADE, S. JOHNSON, M. *et al.* Ketanserin, a 5-HT₂ receptor antagonist, decreases nicotine self-administration in rats. **European Journal Pharmacology**, v.600, p. 93 – 97, 2008.

LI, S.; WANG, C., WANG, M. *et al.* Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms. **Life Science**, v.80, p.1373 – 1381, 2007.

LI, X.; CHOI, Y.; YANAKAWA, Y. Piperonal prevents high-fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice via activation of adiponectin/AMPK pathway. **International Journal of Obesity**. v.38, n.1, p. 140-147, 2014.

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

LYRA, C.; NAKAI, L.; MARQUES, A. Eficácia da aromaterapia na redução de níveis de estresse e ansiedade em alunos da graduação da área de saúde: estudo preliminar. **Fisioterapia e Pesquisa**, v.17, n.1, p. 13 – 17, 2010.

MANGOLINI, V.I.; ANDRADE, L.H.; WANG, Y.P. Epidemiologia dos transtornos de ansiedade em regiões do Brasil: uma revisão da literatura. **Revista de Medicina**, v.98, n.6, p.415 – 422, 2019.

MAO, Q.; HUANG, Z.; IP, S. *et al.* Role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the antidepressant-like effect of piperine in the forced swim test. **Neuroscience Letters**, v. 504, p. 181 – 184, 2011.

MAO, Q.; HUANG, Z.; ZHONG, X. *et al.* Piperine Reverses Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Behavioral and Biochemical Alterations in Rats. **Cell Molecular Neurobiology**, v. 34, p. 403 – 408, 2014.

MARTIN, E.; RESSLER, K.; BINDER, E. *et al.* The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. **Psychiatric Clinics of North America**, v.32, n.3, p. 549 – 575, 2009.

MARTINS, J.; BRIJESH, S. Phytochemistry and pharmacology of anti-depressant medicinal plants: a review. **Biomedicine and Pharmacoteray**, v. 104, p. 343 – 365, 2018.

MELO, L. L.; BRANDÃO, M. L. Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the inferior colliculus in aversive states induced by exposure of rats to the elevated plus-maze test. **Behavioural Pharmacology**, v. 6, p. 413-417, 1995.

MERIGA, B.; PARIM, B.; CHUNDURI, V., *et al.* Antiobesity potential of piperonal: promising modulation of body composition, lipid profiles and obesogenic marker expression in HFD- induced obese rats. **Nutrition and Metabolism**. v. 14, n. 72, p. 1-14, 2017.

MONTGOMERY, K.C. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploration behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**. v.48, p.254 – 260, 1955.

MONTEIRO, B. **Determinação do perfil fitoquímico e do efeito antidepressivo-símile do extrato hidroetanólico das folhas da *Annona coriacea* Mart. e do ácido cafeico em camundongos e seu possível mecanismo de ação.** Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular). Universidade Regional do Cariri, 2016.

MOREIRA, J.V. **Estudo termodinâmico da região linear das isotermas de adsorção em sílica C18 para os componentes da síntese do piperonal a partir do óleo essencial da *Piper hispidinervum*.** Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, 2013.

MORI, A., KABUTO, H., PEI, Y. Effects of piperine on convulsions and on brain serotonin and catecholamine levels in E1 mice. **Neurochemical Research**, v. 10, n. 9, p. 1269 – 1265, 1985.

MORRIS, A.; AHMED, Y.; STOYANOVA, N. et al. The Association Between Depression and Leptin is Mediated by Adiposity. **Psychosomatic Medicine**. v. 74, p. 483 – 488, 2012.

ODEON, M. M.; ACOSTA, G.B. Repeated maternal separation: Alcohol consumption, anxious behavior and corticosterone were reversed by a non-pharmacological treatment. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 95, 2019.

OGAWA, S.; KITAGAWA, Y.; FUKUSHIMA, M. et al. Interactive effect of sleep duration and physical activity on anxiety/ depression in adolescents. **Psychiatry Research**, v. 273, p. 456 – 460, 2019.

OLIVEIRA, D. **Avaliação da atividade tipo antidepressiva do óleo essencial das folhas de *Spiranthera odoratissima* a. st.-hil. e de seu componente majoritário, β -cariofileno**. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Goiás, 2016.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guide 423: OECD Guideline for testing of chemicals**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001

PAŁUCHA-PONIEWIERA, A.; BRAŃSKI, P.; WIEROŃSKA, J. et al. The antidepressant-like action of mGlu5 receptor antagonist, mTEP, in tail suspension test in mice is serotonin dependent. **Psychopharmacology**, v. 231, p. 97 – 107, 2014.

PATRIQUIN, M.; MATHEW, S. The neurobiological mechanisms of generalized anxiety disorder and chronic stress. **Chronic Stress**, v.1, 2018.

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

PENHA, A. **Atividade antinociceptiva e antioxidante do derivado tiofênico 2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-benzotiofeno-3-carbonitrila (6CN) em camundongos**. Tese de Doutorado (Centro de Ciências da Saúde – Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, 2014.

PINHEIRO, G., ALVEZ, S., MURCE, P., CRUZ, A. Envolvimento dos receptores 5-HT₂ da amígdala nos níveis de ansiedade induzidos pela exposição de ratos ao labirinto em cruz elevado. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**. v. 18, n.3, p. 329 – 335, 2002.

PRABHAKAR, V.; GUPTA, D.; KANADE, P. et al. Diabetes-associated depression: The serotonergic system as multifunctional target. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 47, n.1, p. 4 – 10, 2015.

PULTRINI, A. D. E. M., GALINDO, L. A., COSTA, M. Effects of essential oils from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. **Life Sciences**, v.78, n.15, p.1720–1725, 2006.

QI X; LIN, W.; LI, J.; PAN, Y. The depressive-like behaviors are correlated with decreased phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in rat brain following chronic forced swim stress. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 2, p. 233 – 240, 2007.

RAVINDRAN, L. N., & STEIN, M. B. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. **The Journal of clinical psychiatry**. v.71, n.7, p.839-854, 2010.

REED, W.; MANNE, S. et al. Fragrance Administration to Reduce Anxiety during MR Imaging. **Journal Magnetic Resonance Imaging** . v. 4, n. 4, p. 623 – 626, 1994.

REISNER, S.; KATZ-WIZE, S.; GORDON, A. *et al.* Social epidemiology of depression and anxiety by gender identity. **Journal of Adolescent Health**, v.59, n.2, p.203 – 208, 2016.

RIBEIRO, C.; PUPO, A. Involvement of α 1B-adrenoceptors in the anti-immobility effect of imipramine in the tail suspension test. **European Journal of Pharmacology**, v. 750, p. 39 – 42, 2015.

ROZANSKI, A. Exercise as medical treatment for depression. **Journal of American College of Cardiology**, v. 60, n.12, p.1064 – 1066, 2012.

SCHATZBERG, A. F.; DEBATTISTA, C. **Manual de Psicofarmacologia Clínica**. 8^a ed. Artmed. Porto Alegre, 2017.

SANTONS, H. P.; VENUGOPAL, R.; NILAKASH, A. S.; KUNJBIHARI, S.; MANGALA, L. Antidepressant activity of methanolic extract of *Passiflora foetida* leaves in mice. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 3, n. 1, p. 112-115, 2011.

SANTOS, A.R. **Estudo do mecanismo de ação antidepressiva e antinociceptiva da melatonina em camundongos**. Dissertação de Mestrado (Centro de Ciências Biológicas – Programa de Pós-graduação em Neurociências). Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

SECRETARIA DE SAÚDE DO PARANÁ. **Intoxicações por medicamentos**. Paraná, PR, 2020.

SHARAFI, S.; GARMAROUDI, G.; GHAFOURI, M. *et al.* Prevalence of anxiety and depression in patients with overweight and obesity. **Obesity Medicine**, v.17, 2020.

SIMÕES, C.M., SCHENKEL, P. E *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed. Porto Alegre, 2017

SINGH, K.; SONA, C.; OJHA, V. *et al.* Identification of dual role of piperazine-linked phenyl cyclopropylmethanone as positive allosteric modulator of 5-HT_{2C} and negative allosteric modulator of 5-HT_{2B} receptors. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 164, p. 499 – 516, 2019.

SOARES, J. A.; TRAUTENMULLER, A. L.; GODOI, M. M.; DE PAULA, J. A. M.; AMARAL, V. C. S. 2017. Avaliação da atividade ansiolítica do extrato seco das folhas de *Momordica charantia* L. em ratos wistar. **Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG**. Volume 3.

SOUZA, I.; MACHADO-DE-SOUZA, J. Brazil: world leader in anxiety and depression rates. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.39, n.4, p.384, 2017.

SOUZA, L.; SILVA, E.; SANTOS, W. *et al.* Lithium and valproate prevent methylphenidate-induced mania-like behaviors in the hole-board test. **Neuroscience Letters**, v.629, p. 143 – 148, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Porto Alegre: Victor Emanuel Carlson. 2003.

SOEIRO, C. **Efeito da administração aguda de agomelatina sobre o comportamento de ratos Wistar machos e fêmeas no labirinto T elevado.** Dissertação de Mestrado Centro de Biociências – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.

SRINIVAS, A; SUNITHA, M. Synthesis of piperonyl triazoles as anti-microbial agents. **Indian Journal of Chemistry**, v. 55B, p.102 – 109, 2016.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. Tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, p. 367 – 370, 1985.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, M. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 350, p. 21 – 29, 1998.

TAYLOR, J., RAJBHANDARI, A. *et al.* Dopamine receptor modulation of repetitive grooming actions in the rat: potential relevance for Tourette syndrome. **Brain Research**, v. 1322, p. 92 – 101. 2010.

TREIT, D.; ENGIN, E.; MCEOWN, K. Animal Models of Anxiety and Anxiolytic Drug Action. **Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment**. v. 2, p. 121 – 160, 2009.

VALVASSORI, S.; VARELA, R.; QUEVEDO, J. Animal Models of Mood Disorders: Focus on Bipolar Disorder and Depression. **Academic Press**, p. 991-1002. Londres, 2017.

VATAEVA, L.A. Age-Related Changes of the Anxiety Level of Male and Female Rats in Elevated Cross-Maze Test. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 39, n. 4, p. 474 – 479, 2003

VINOD, P.; AKHAD, A *et al.* Antidepressant - like effects of Acorus calamus in forced swimming and tail suspension test in mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. p. S17 – S19, 2012.

ZENI, A.; ZOMKOWSKI, A.; MARASCHIN, M. *et al.* Ferulic acid exerts antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: Evidence for the

involvement of the serotonergic system. **European Journal of Pharmacology**, v. 679, p. 68 – 74, 2012.

WANG, Y., LIU, Y. *et al.* Reduced serotonin impairs long-term depression in basolateral amygdala complex and causes anxiety-like behaviors in a mouse model of perimenopause. **Experimental Neurology**. v. 321, 2019..

ANEXO

Anexo 1



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo não-clínico da atividade psicofarmacológica do piperonal", protocolada sob o CEUA nº 6886230818 (ID 000407), sob a responsabilidade de **Reinaldo Nóbrega de Almeida e equipe; Thallita Karla Silva do Nascimento Gonzaga** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 01/11/2018.

We certify that the proposal "Non-clinical study of piperonal psychopharmacological activity", utilizing 216 Heterogenics mice (216 males), protocol number CEUA 6886230818 (ID 000407), under the responsibility of **Reinaldo Nóbrega de Almeida and team; Thallita Karla Silva do Nascimento Gonzaga** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 11/01/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **10/2018** a **10/2019**

Área: **Fisiologia E Patologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **60 a 90 dias**

N: **216**

Linagem: **Mus musculus - Swiss**

Peso: **25 a 30 g**

Local do experimento: O ensaio farmacológico não clínico será realizado no Laboratório de Psicofarmacologia - CCS/UFPB e no biotério Prof. Thomas George do Centro de Ciências da Saúde (CCS da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)).

João Pessoa, 06 de novembro de 2018

Profa. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba