



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

**MARIA CLÉCIA PENHA SENA**

**O CONSUMO CRÔNICO DE AGUARDENTE DE CANA-DE-**  
**AÇÚCAR INDUZ EFEITOS ANSIOLÍTICOS EM**  
**CAMUNDONGOS**

**JOÃO PESSOA - PB**

**2012**

**MARIA CLÉCIA PENHA SENA**

**O CONSUMO CRÔNICO DE AGUARDENTE DE CANA-DE-  
AÇÚCAR INDUZ EFEITOS ANSIOLÍTICOS EM  
CAMUNDONGOS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Área de concentração: Farmacologia.**

**ORIENTADOR:**

Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

**CO-ORIENTADORA:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liana Clébia Soares Lima de Moraes

**JOÃO PESSOA- PB**

**2012**

**MARIA CLÉCIA PENHA SENA**

**O CONSUMO CRÔNICO DE AGUARDENTE DE CANA-DE-  
AÇÚCAR INDUZ EFEITOS ANSIOLÍTICOS EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação de mestrado aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga  
Orientador/ UFPB

---

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida  
Examinador interno/ UFPB

---

Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal  
Examinador externo/ UFPB

**JOÃO PESSOA- PB**  
**2012**

## AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, essência da minha vida, meu fundamento, minha finalidade neste mundo, tudo só foi possível porque ELE permitiu;

À **minha família**, pelo amor incondicional e carinho que sempre me fortalece. Mesmo distantes vocês sempre estiveram presentes em minha mente e coração. Vocês representam a razão de tudo que sou e de tudo que me tornarei, em vocês me fortaleço e sei também que vocês se fortalecem com o meu sucesso.

Ao **Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga**, pelas valiosas e sábias orientações, pela confiança, dedicação e apoio fundamental durante a realização deste trabalho.

A **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Liana Clébia Soares Lima de Moraes**, pela colaboração ao longo da realização deste trabalho, além de todo carinho, respeito, amizade e incentivo.

Ao **Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida**, por ter me aceitado como membro do laboratório de Psicofarmacologia de forma bastante acolhedora, permitindo a realização deste estudo, pelas orientações prestadas, e exemplo de ser humano tanto profissional como pessoalmente.

À banca examinadora, nominalmente ao **Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida, Prof.Dr. Daniel Breseghello Zoccal**, bem como os suplentes, **Prof.Dr Luis Carlos Reis, Prof.Dr Demetrius Antonio Machado de Araújo** pelas significantes contribuições. Foi uma honra e satisfação ter professores de tão grande qualidade na avaliação desta dissertação.

A todos que fazem/fizeram parte do **Laboratório de Psicofarmacologia** (André Pinho, Bruno Vinícius, Fernando Oliveira, Flávia Negromonte, Franklin Nóbrega, Guilherme Carneiro, Kildare Feitosa, Leandra Eugênia, Paula Salgado e Rubens Benedito) pela excelente recepção e auxílio durante a execução dos experimentos, e pelo compartilhamento de informações valiosas durante este estudo, em especial, as amigas Antônia Rosângela, Camila Carolina Santos, Marcela Rodrigues, Miriam, Vanine Mota e Maria Raquel Vitorino, que não mediram esforços para me ajudar, e me apoiar em todos os momentos.

À coordenadora do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, **Profa. Dra. Maria Fátima de Agra**, que atendeu seus alunos com prontidão.

A todos os professores que fizeram parte do curso pelos ensinamentos prestados, em especial as professoras Demetrius, Margareth F. F.Melo Diniz; Bagnólia Araújo;

A todos os meus amigos da turma de mestrado, em especial Everton; Janiere; Patrícia; Ricardo, pelo companheirismo e ajuda;

A **José Crispim Duarte e Luís Cordeiro** por cuidar bem dos animais utilizados nos testes e pela ajuda a nós dispensada;

Respeitosamente aos animais que foram utilizados nos experimentos;

A **todos** que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos!

“Não to mandei EU? Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes; porque o SENHOR TEU DEUS é contigo, por onde quer que andares.”

Josué 1: 9

## RESUMO

SENA, M.C.P. **O consumo crônico de aguardente de cana-de-açúcar induz efeitos ansiolíticos em camundongos.** 79p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Área de Concentração: Farmacologia)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

A aguardente de cana-de-açúcar, uma bebida genuinamente brasileira obtida por fermentação seguida de destilação do mosto de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*, L.), é apreciada não só no Brasil, mas mundialmente. Embora o consumo da aguardente de cana-de-açúcar seja um fator importante para o aumento do alcoolismo no Brasil, pouco se sabe sobre o seu consumo crônico na ansiedade ou efeitos ansiolíticos. No presente estudo, investigou-se se o consumo crônico da aguardente de cana-de-açúcar é responsável por induzir efeitos ansiolíticos. Camundongos Suíços machos com 3-3,5 meses de idade foram expostos ao paradigma de livre escolha com duas garrafas por seis semanas. Camundongos do grupo A foram tratados com aguardente de cana-de-açúcar + água destilada (n = 16); do grupo B com etanol + água destilada (n=15); e do grupo C (controle) com água destilada + água destilada (n = 14). O conteúdo de etanol nas bebidas oferecidas aos grupos A e B foi de 2% na primeira semana, de 5% na segunda semana e 10% nas 4 semanas restantes. No final dos tratamentos, os animais foram submetidos aos testes do labirinto em cruz elevado e da placa perfurada para avaliação dos comportamentos relacionados com a ansiedade. Os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase foram determinados. As concentrações de etanol, acidez volátil, ésteres, aldeídos, furfural, álcoois superiores (n-propílico, isobutílico e isoamílico), metanol, cobre e chumbo da aguardente de cana-de-açúcar também foram determinados. O tempo gasto nos braços abertos foi aumentado em camundongos expostos ao consumo crônico de etanol (32±8 vs 7±2 s, p<0.05) ou de aguardente de cana-de-açúcar (36±9 vs 7±2 s, p<0.05), quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, o tempo gasto nos braços fechados diminuiu significativamente nos animais que consumiram etanol (183±6 vs 214±4 s, p<0.05) ou aguardente de cana-de-açúcar (150±8 vs 214±4 s, p<0.05), quando comparado ao grupo controle. Além disso, a razão entre o tempo gasto nos braços abertos sobre o tempo total gasto em ambos os braços abertos e fechados foi significativamente aumentado (etanol 34±8 vs 6±2 s; aguardente de cana-de-açúcar 43±12 vs 6±2 s, p <0,05). No teste de placa perfurada, os camundongos tratados com etanol ou aguardente de cana-de-açúcar mostraram um aumento no número de mergulhos, quando comparado ao grupo controle (grupo controle: 16±1; etanol: 27±2; aguardente de cana-de-açúcar: 31±3, p<0.05). Além disso, a atividade motora no teste da placa perfurada também foi aumentada em ambos os grupos etanol ou aguardente de cana-de-açúcar, quando comparado ao grupo controle (grupo controle: 21±2; etanol: 34±2; aguardente de cana-de-açúcar: 40±4, p<0.05). A análise da composição química mostrou que as concentrações de etanol, acidez volátil, ésteres, aldeídos, furfural, álcoois superiores (n-propílico, isobutílico e isoamílico), metanol, cobre e chumbo na aguardente de cana-de-açúcar estavam abaixo do limite superior permitido pelos regulamentos do Ministério da Agricultura para a produção de bebidas destiladas. Em conclusão, aqui relatamos que o consumo crônico de aguardente de cana-de-açúcar produz lesão hepática e efeitos ansiolíticos em camundongos. A lesão hepática mais acentuada causada pela aguardente de cana-de-açúcar, como sugerido pela relação AST/ALT pode ter sido causado por outros compostos orgânicos presentes nesta bebida, enquanto o efeito ansiolítico parece ser causado tanto pelo etanol como pelos outros compostos presentes na

aguardente de cana-de-açúcar. Os mecanismos pelos quais a aguardente de cana-de-açúcar leva a lesão hepática mais rápida do que o etanol devem ser examinados em futuras investigações.

Palavras-chaves: Alcoolismo, Atividade Ansiolítica, Labirinto em cruz elevado, fígado

## ABSTRACT

SENA, M.C.P. **Sugarcane spirit consumption induces anxiolytic-like effects in mice.** 79p. Dissertation (Master in Bioactive Synthetic and Natural Products – Area: Pharmacology) – Federal University of Paraiba, João Pessoa, 2012.

Distilled sugarcane spirit is a genuine Brazilian beverage produced by distillation after fermentation of sugarcane and is appreciated not only in Brazil but worldwide. Although sugarcane spirit consumption is an important drive to increase alcoholism in Brazil, little is known about its chronic consumption on anxiety/anxiolytic effects. In the present study, we investigated whether the chronic consumption of sugarcane spirit is responsible for inducing anxiolytic-like effects. Male 3-3.5 month-old Swiss mice were exposed to the two-bottle free-choice paradigm for six weeks. Mice in group A were treated with sugarcane spirit + distilled water (n=16); in group B with ethanol + distilled water (n=15); and in group C (control) with distilled water + distilled water (n=14). The content of ethanol in beverages offered to groups A and B was 2% in the first week, 5% in the second week and 10% in the 4 remaining weeks. At the end of the treatments, animals were submitted to the elevated plus maze and the hole board test for assessment of anxiety-related behaviors. Serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine amino transferase (ALT) levels were determined. The concentrations of ethanol, volatile acidity, esters, aldehydes, furfural, higher alcohols (n-propylic, isobutylic and isoamylics), methanol, copper and lead of the sugar cane were also determined. Time spent in open arms was increased in mice exposed to chronic ethanol (32±8 vs 7±2 s, p<0.05) or sugarcane spirit (36±9 vs 7±2 s, p<0.05), when compared to the control group. Conversely, the time spent in the closed arms was significantly decreased in animals drinking ethanol (183±6 vs 214±4 s, p<0.05) or sugarcane spirit (150±8 vs 214±4 s, p<0.05), when compared to the control group. In addition, the ratio of the time spent in the open arms over the total time spent in both closed and open arms was significantly increased (ethanol 34±8 vs 6±2 s; sugarcane spirit 43±12 vs 6±2 s, p<0.05). In the hole board test, mice treated with ethanol or sugarcane spirit showed an increase in the number of head-dipping behaviors, when compared to the control condition (control group: 16±1; ethanol: 27±2; sugarcane spirit: 31±3, p<0.05). In addition, motor activity in the hole board test was also increased in both ethanol and sugarcane spirit groups, when compared to the control condition (control group: 21±2; ethanol: 34±2; sugarcane spirit: 40±4, p<0.05). The chemical composition analysis showed that the concentrations of ethanol, volatile acidity, esters, aldehydes, furfural, higher alcohols (n-propylic, isobutylic and isoamylics), methanol, copper and lead in the sugarcane spirit were below the upper limits allowed by the Ministry of Agriculture regulations for the production of spirits. In conclusion, here we report that chronic consumption of sugarcane spirit produces liver injury and anxiolytic-like effects in mice. The more pronounced liver injury caused by sugarcane spirit as suggested by the AST/ALT ratio might have been caused by other organic compounds present in the sugarcane spirit while the anxiolytic-like effect seems to be caused by both ethanol and other compounds present in sugarcane spirit. The mechanisms by which sugarcane spirit leads to more rapid liver injury than does ethanol should be examined in future investigations.

Key-words: Alcoholism, Anxiolytic Activity, elevated plus maze, liver

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mercado total de bebidas no Brasil .....	20
<b>Figura 2</b> - Produção cachaça por estado da federação.....	21
<b>Figura 3</b> - Principais mercados de destino da cachaça, em valor .....	21
<b>Figura 4</b> - Principais mercados de destino da cachaça, em volume .....	22
<b>Figura 5</b> - Consumo de álcool per capita, em litros, de etanol puro em pessoas com 15 anos ou mais em 2005.....	23
<b>Figura 6</b> - Mapas da cidade de São Paulo dividida por distritos em 2005 .....	26
<b>Figura 7</b> - Esquema simplificado das ações agudas convergentes das drogas de abuso no complexo ATV-NAcc.....	34
<b>Figura 8</b> - Camundongo <i>Suíço</i> macho e albino .....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição dos grupos de tratamento.....	47
<b>Tabela 2</b> - Análises físico-química para as amostras de cachaça .....	52
<b>Tabela 3</b> - Valores médios obtidos para concentração de alguns compostos voláteis majoritários presentes nas amostras de cachaça em mg/100 mL de álcool anidro.....	54
<b>Tabela 4</b> - Concentração média de contaminantes nas amostras de cachaça .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AST - Aspartato aminotransminase

ALT - Alanina aminotransminase

ATV – Área tegmental ventral

CB<sub>1</sub> – Receptores tipo 1 para canabinóides endógenos

CEPA - Comitê de Ética em Pesquisa Animal

CID-10: Classificação Internacional de Doenças

CG – FID – Cromatógrafo de fase gasosa equipado com detector de ionização de chama

DSM-IV - Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais

GABA - Ácido gama amino butírico

GABA<sub>A</sub> - Receptor de ácido gama amino - butírico tipo A

GABA<sub>B</sub> - Receptor de ácido gama amino - butírico tipo B

IAL – Instituto Adolfo Lutz

ITEP - Instituto Tecnológico de Pernambuco

LTF - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros

LCE - Labirinto em Cruz Elevado

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NAc – Núcleo *accumbens*

nACh – Receptores nicotínico neuronais para acetilcolina

NMDA – N-metil-D-aspartato

OMS - Organização Mundial de Saúde

pH – Potencial de hidrogênio

SNA - Sistema Nervoso Autônomo

SNC - Sistema Nervoso Central

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

5HT - Serotonina

° C - Grau Celsius

# **SUMÁRIO**

<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>18</b>
2.1 História e importância econômica da cachaça no Brasil .....	19
2.2 Alcoolismo como Problema de Saúde Pública.....	22
2.3 Alcoolismo e Ansiedade .....	27
2.4 Neurobiologia da Adição.....	32
2.4.1 Modelos Animais de Dependência .....	35
2.4.1.1 Modelos que Estudam as Propriedades Reforçadoras Positivas .....	36
2.4.1.2 Modelos que Estudam as Propriedades Reforçadoras Negativas .....	37
<b>3- OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>4- MATERIAL .....</b>	<b>42</b>
4.1 Animais.....	42
4.1.1 Condições experimentais.....	42
4.2 Equipamentos .....	43
4.2.1 Aparelho do Labirinto em cruz elevado .....	43
4.2.2 Aparelho da Placa Perfurada .....	43
<b>5- MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
5.1 Determinações Físico-Químicas.....	44
5.1.1 Graduação alcoólica .....	44
5.1.2 Determinação da Acidez Fixa, Volátil e Total .....	44
5.1.3 Determinação do pH.....	45
5.1.4 Análise dos padrões de identidade e qualidade de cachaça.....	45
5.1.4.1 Determinação de Componentes Voláteis Majoritários .....	46
5.1.4.2 Determinação dos Contaminantes .....	46
5.2 Avaliação Comportamental .....	46

5.2.1 Protocolo experimental - Modelo de autoadministração crônica .....	46
5.2.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	47
5.2.3 Placa Perfurada .....	48
5.3 Avaliação do consumo de água e alimento e evolução ponderal .....	49
5.4 Avaliação Bioquímica .....	49
5.5 Análise Estatística .....	49
<b>6- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
6.1 Determinações Físico-químicas.....	52
6.1.1 Graduação alcoólica .....	52
6.1.2 Acidez Fixa, Volátil e Total .....	53
6.1.3 pH .....	53
6.1.4 Análise dos padrões de identidade e qualidade de cachaça.....	54
6.1.4.1 Determinação de Componentes Voláteis Majoritários.....	54
6.1.4.2 Determinação dos Contaminantes .....	56
6.2 Avaliação Comportamental .....	58
6.2.1 Avaliação da atividade ansiolítica .....	58
6.2.1.1 Efeito da aguardente de cana-de-açúcar no teste do labirinto em cruz elevado.....	59
6.2.1.2 Efeito da aguardente de cana-de-açúcar no teste da placa perfurada .....	61
6.3 Avaliação das Alterações Metabólicas .....	64
6.3.1 Efeito da aguardente de cana-de-açúcar na evolução ponderal.....	64
6.3.2 Efeito da aguardente de cana-de-açúcar no consumo de ração .....	64
6.3.3 Efeito da aguardente de cana-de-açúcar no consumo de bebidas e água .....	65
6.4 Avaliação Bioquímica .....	67
6.4.1 Efeito da aguardente de cana-de-açúcar nos parâmetros bioquímicos .....	67
<b>7- CONCLUSÕES .....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>72</b>

*Introdução*

---

## 1 – INTRODUÇÃO

O consumo excessivo de álcool e bebidas alcoólicas é um hábito com elevado custo socioeconômico e com fortes impactos sobre a saúde sendo, portanto, considerado como um grave problema de saúde pública. Seus efeitos e consequências atingem o usuário, a família e a sociedade em números significativos (GUO; REN, 2010; GUNZERATH et al., 2011).

Os transtornos causados pelo uso de álcool incluem abuso e dependência. O abuso do álcool é descrito como o beber continuado a despeito de diversos efeitos adversos sobre a saúde, família, trabalho ou relações pessoais, problemas interpessoais ou problemas relacionados ao seu consumo (APA, 2003; NIAAA, 2001). A característica essencial do abuso de uma substância é o padrão mal adaptativo de sua utilização, o que resulta em dano devido ao uso repetido (GENDEL, 2006).

O mais severo tipo de problema com essa droga é a dependência do álcool ou alcoolismo, doença crônica caracterizada por um padrão de autoadministração repetida, que, geralmente, resulta em sintomas físicos de abstinência por ocasião da falta de consumo da bebida ou a necessidade de ingerir grandes quantidades apesar de continuados sintomas deletérios nas esferas cognitiva, comportamental e fisiológica envolvidos com a droga (NIAAA, 2000).

Os custos individuais, familiares e sociais decorrentes do uso excessivo de álcool tornam cada vez mais urgentes um conjunto de intervenções estratégicas de saúde pública. As consequências do uso excessivo de álcool são percebidas tanto na perda da liberdade individual quanto nas consequências físicas e psíquicas desses indivíduos, como na inexorável perda da estrutura familiar, com frequência ligada a atos de violência, quando não criminais; no aumento considerável dos acidentes de trânsito provocados por motoristas alcoolizados; assim como no absenteísmo ao trabalho, causando perdas incalculáveis para as empresas e para os indivíduos acometidos (SEIBEL, 2000).

Os fatores que podem contribuir para o início do consumo e/ou uso contínuo do etanol é a utilização com frequência por indivíduos ansiosos como forma de recompensa frente aos altos níveis basais de ansiedade (CORREIA et al., 2009; PEREIRA, 1991; OLIVEIRA et al., 2009), decorrentes da agitada dinâmica existencial atual (BALLONE et al., 2005). Esta associação pode ser descrita em diversos estudos, que apontam o consumo agudo como capaz de exercer efeitos ansiolíticos (POLIVY; HERMAN, 1976; BEDFORD; MCIVER, 1978), enquanto a interrupção abrupta de um consumo prolongado pode levar a ansiedade (SPARTA

et al., 2007; CORREIA et al., 2009). Corroborando com essa ideia, Spanagel (2009) afirma que as principais razões para o consumo excessivo estão relacionadas com a capacidade de o álcool produzir estimulação dos estados de humor e causar efeitos ansiolíticos.

Além destas alterações comportamentais, o consumo de etanol está igualmente relacionado ao desenvolvimento de condições ou estado fisiopatológicos. Dentre as diversas doenças que podem se desenvolver com o uso crônico de bebidas alcoólicas, as disfunções hepáticas são as mais comuns (FONTES; FIGLIE; LARANJEIRA, 2006; LU et al., 2010). O álcool exerce ação tóxica direta sobre o fígado, produzindo alterações estruturais e funcionais. O consumo excessivo de álcool pode provocar lesão hepatocelular por vários mecanismos, quer pela produção de metabólitos tóxicos durante a metabolização do etanol a nível hepático, que provocam agressão da membrana celular, quer por meio das citocinas, ou pela alteração da resposta imunitária a proteínas hepáticas. Todos estes mecanismos condicionam alterações histológicas, levando ao desenvolvimento de esteatose hepática, hepatite alcoólica e cirrose (CHEDID et al., 1991; FILIPPIN et al., 2004). Muitos autores utilizam a determinação do índice AST/ALT no diagnóstico da doença hepática alcoólica. A relação AST/ALT igual ou maior que 1,5 é sugestiva de doença hepática alcoólica (NIEMELÄ; ALATALO, 2010; SALASPURO, 1987).

No Brasil, o alcoolismo, além de atingir uma boa parcela da população adulta constituindo um grave problema de saúde pública, atinge também, de modo preocupante, milhões de crianças e adolescentes. De acordo com Veronese (2002), em pesquisa realizada pelo Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas e Psicotrópicos, órgão ligado à Escola Paulista de Medicina, entre estudantes da rede estadual de primeiro e segundo grau da cidade de São Paulo, 70,04% dos jovens começam a beber entre os 10 e os 12 anos de idade (nos Estados Unidos o índice é de 50,02%). Esse problema é especialmente relevante nas regiões com populações de baixa renda, onde as bebidas alcoólicas são vendidas a preço acessíveis, principalmente a cachaça e a cerveja, tradicionalmente consumidas.

A cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil com graduação alcoólica de 36 a 54% em volume a 20°C, considerada como uma bebida genuinamente brasileira obtida por fermentação seguida de destilação do mosto de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*, L.). A bebida é constituída principalmente de etanol e água, entretanto diversos compostos secundários tais como outros alcoóis, como o metanol, ésteres, ácidos graxos, aldeídos e outros, estão presentes em pequenas quantidades e são responsáveis pelas características sensoriais da bebida.

Apesar da tradição e importância econômica desta bebida, representada por uma produção atual em torno de 1,3 bilhão de litros por ano e por um alto consumo pelos brasileiros que a colocam como segunda bebida alcoólica mais consumida no país (BRASIL, 2007) e ainda pelos índices crescentes de exportação que geram uma alta receita ao país (IBRAC, 2011), pouco se sabe sobre os seus efeitos decorrentes de um consumo crônico sobre a ansiedade.

Portanto, pesquisas que buscam os conhecimentos acerca dos efeitos neurológicos e comportamentais provocados pelo consumo crônico das cachaças artesanais são de singular relevância, devido à ampla utilização dessa substância nas diferentes populações mundiais.

*Fundamentação Teórica*

---

## 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 HISTÓRIA E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CACHAÇA NO BRASIL

A cachaça, bebida feita da fermentação e destilação do melaço proveniente da cana-de-açúcar, foi descoberta pelos escravos dos engenhos de açúcar em meados do século XVI. Era considerada uma bebida de baixo *status* perante a sociedade, pois era consumida apenas por escravos e brancos pobres, enquanto a elite brasileira da época preferia vinhos e bagaceira (aguardente de bagaço de uva), trazidos de Portugal (MAPA, 2007).

A aguardente de cana-de-açúcar produzida no Brasil começou a ganhar espaço junto à classe média da época, tornando-se a bebida alcoólica mais consumida no Brasil Colônia, levando à diminuição do consumo da bagaceira, importada de Portugal e, conseqüentemente, arrecadando menos impostos. Com isso, sob a justificativa de que o consumo dessa bebida pelos escravos poderia ameaçar a segurança e a ordem da Colônia, e que prejudicava, também, o rendimento dos trabalhadores das minas de ouro e no comércio local, a Corte Portuguesa proibiu sua produção, comercialização e consumo (MAPA, 2007).

O consumo da cachaça atingiu o ápice do prestígio no século XIX, quando se transformou em símbolo da brasilidade sendo empregada como instrumento de resistência nacional, contra a colonização e o imperialismo português. Na época o país vivia as lutas da Independência, como a Revolução Pernambucana de 1817, e erguer brindes com vinho ou outra bebida qualquer era considerado um alinhamento com os portugueses. Verdadeira personagem da história brasileira, a cachaça vem nos últimos anos se firmando como um importante produto do agronegócio brasileiro recebendo atenção especial dos produtores, que se empenham em melhorar sua qualidade e dar a ela uma imagem de sofisticação (SILVEIRA, 2007).

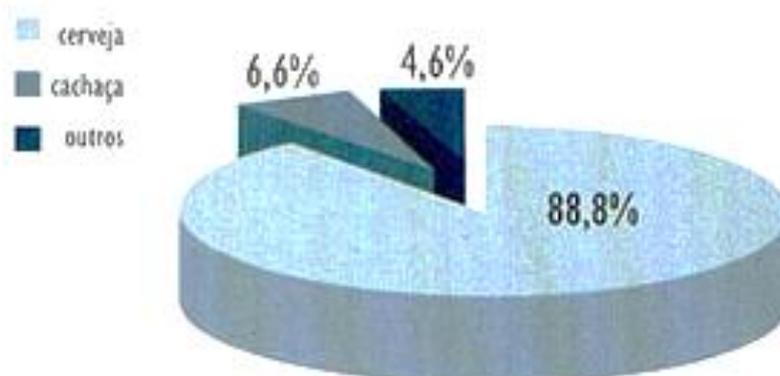
A importância econômica e social da cachaça brasileira pode ser facilmente reconhecida, se considerarmos seu volume de produção. Hoje é a terceira bebida destilada mais consumida no planeta de acordo com o ranking mundial do consumo de destilados publicado pelo Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Cachaça (PBDAC). Tendo em vista este ranking, a cachaça perde somente para a vodca e o sochu (bebida obtida da destilação do mosto fermentado de arroz, adicionado ou não de tubérculo, raiz amilácea e

cereal, em conjunto ou separadamente), e ganha de várias bebidas destiladas bastante tradicionais como: rum, gim, uísque e conhaque (VERDI, 2006).

Estima-se que, no Brasil, são produzidos aproximadamente 1,3 bilhão de litros de cachaça por ano, sendo, porém, a presença de pequenas destilarias espalhadas pelo país, muitas das quais clandestinas, ao lado da sonegação fiscal certamente existente, tornam muito difícil determinar o volume real da cachaça produzida (ABRABE, 2007).

Atualmente, são mais de 40 mil produtores e 4 mil marcas. As microempresas correspondem a 99% do total de produtores e suas atividades agropecuárias incluem, além da produção de cachaça, a produção de milho, feijão, café, e leite, entre outras. O setor da cachaça é responsável pela geração de mais de 600 mil empregos diretos e indiretos (IBRAC, 2009b).

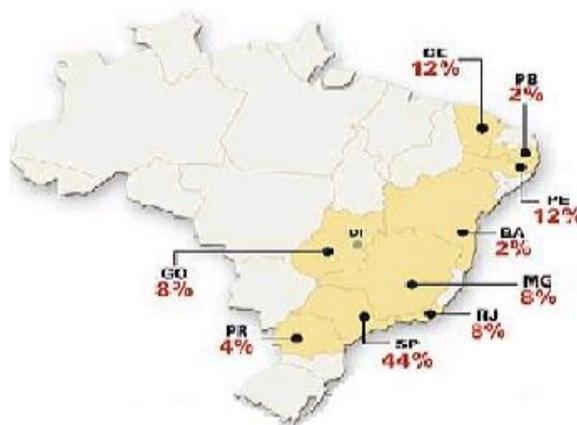
Conforme dados divulgados pela Associação Brasileira de Bebidas (ABRABE) em 2008, baseados nos levantamentos de mercado da agência Nielsen de pesquisa e a publicação especializada *International Wines and Spirits Review* (IWSR), o mercado nacional de bebidas, em relação ao volume, está dividido entre cerveja (88,8%) e cachaça (6,6%), sendo o restante para as demais bebidas (4,6%) (Figura 1).



**Figura 1-** Mercado total de bebidas no Brasil.

Fonte: <http://www.abrabe.org.br/mercado.php>

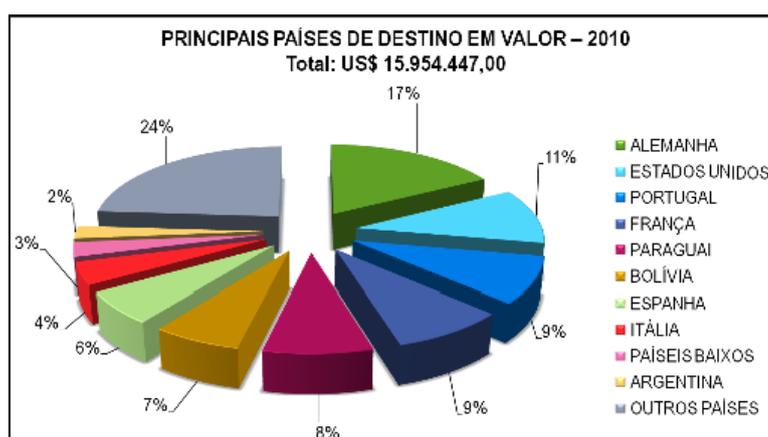
A cachaça é produzida em todos os estados brasileiros, mesmo naqueles onde o cultivo da cana-de-açúcar não é favorável. Os estados brasileiros que mais se destacam na produção da cachaça são: São Paulo, Pernambuco, Ceará, Minas Gerais e Paraíba (Figura 2).



**Figura 2- Produção cachaça por estado da federação.**

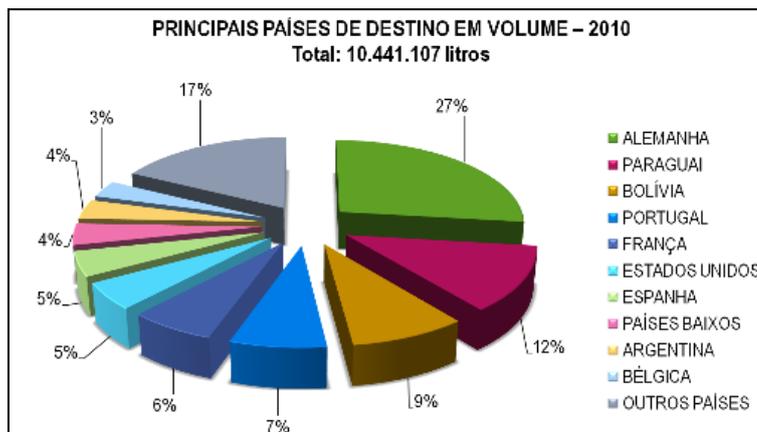
Fonte: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>

Mesmo com a produção de 1,3 bilhão de litros, menos de 1% da cachaça produzida anualmente é exportada. Essa baixa participação das exportações revela que aparentemente o Brasil ainda não está explorando adequadamente o potencial gerador de valor da exportação dessa bebida. Dentre os mercados de destino da cachaça figuram países como Alemanha, Estados Unidos e França. Segundo o Instituto Brasileiro da Cachaça - IBRAC (2011), em 2010 foram exportados para mais de 60 países 10,44 milhões de litros de cachaça gerando uma receita de US\$ 15,95 milhões. Os principais mercados de destino da cachaça, em valor, estão apresentados na Figura 3. Na Figura 4, encontram-se os principais mercados de destino da cachaça, em volume.



**Figura 3- Principais mercados de destino da cachaça, em valor.**

Fonte: MDIC – ALICE WEB – NCM 2208.40.00/Elaboração: Instituto Brasileiro de Cachaça –IBRAC.



**Figura 4- Principais mercados de destino da cachaça, em volume.**

Fonte: MDIC – ALICE WEB – NCM 2208.40.00/ Elaboração: Instituto Brasileiro de Cachaça –IBRAC.

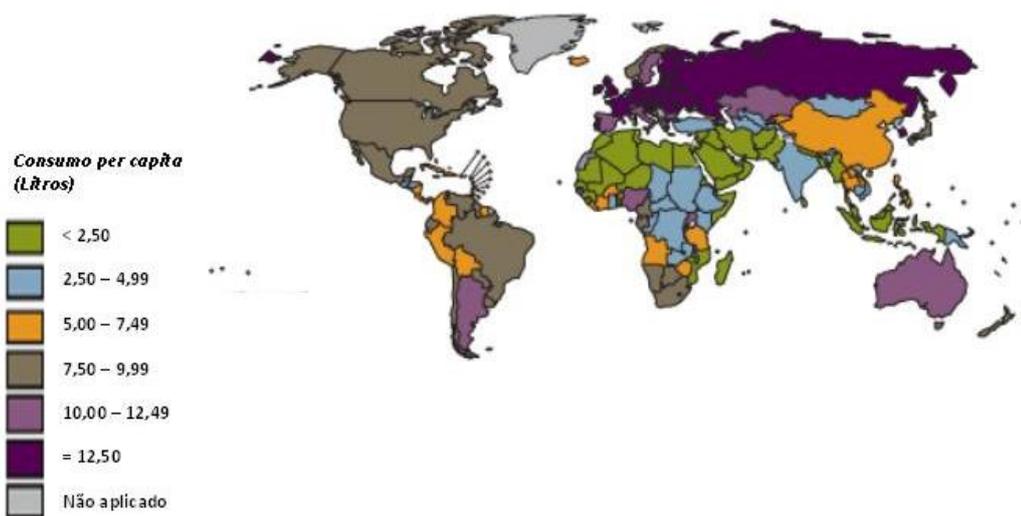
## 2.2 ALCOOLISMO COMO PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA

O uso do álcool impõe às sociedades de todos os países uma carga global de agravos indesejáveis e extremamente dispendiosos, que acometem os indivíduos em todos os domínios de sua vida representados pelo domínio físico, psicológico, relações sociais e do meio ambiente (OMS, 1995).

Os problemas decorrentes direta e indiretamente do consumo de álcool como acidentes, violência e perda de produtividade geram grandes prejuízos econômicos e sociais, por isso, representa o maior problema de saúde pública tanto no Brasil como em outros países (JAMAL; BOERNGEN-LACERDA, 2008).

O etanol é uma droga lícita, de baixo custo e fácil acesso, sendo considerada uma das substâncias psicoativas mais consumidas em todo o mundo. De fato, o consumo mundial per capita de bebidas alcoólicas, em 2005 foi igual ou 6,13 litros de álcool puro consumido por todas as pessoas com 15 anos ou mais. A grande variação no consumo per capita existente em adultos está representada na Figura 5. Os maiores níveis de consumo podem ser encontrados em países desenvolvidos, principalmente no Hemisfério Norte, mas também na Argentina, Austrália e Nova Zelândia. Níveis de consumo médio podem ser encontrados na África do Sul e na América do Norte e do Sul. Níveis de consumo baixo podem ser encontrados nos países

do Norte da África e da região Sub-saariana, na Ásiado Sul e nas regiões do Mediterrâneo Oriental e do Oceano Índico, sendo estes resultados atribuídos por nessas regiões apresentarem uma grande população de fé islâmica, que têm elevadas taxas de abstinência (OMS, 2011).



**Figura 5: Consumo de álcool per capita, em litros, de etanol puro em pessoas com 15 anos ou mais em 2005.**

Fonte: WHO, 2011.

O uso de grandes quantidades de álcool causa transtornos para a saúde e grandes impactos socioeconômicos sobre a população mundial. Estima-se que o consumo nocivo de álcool provoque a morte de 2,5 milhões de pessoas no mundo inteiro por ano, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em seu mais recente relatório, em que exorta os governos a adotarem medidas destinadas a prevenir os hábitos de consumo de bebidas que prejudicam a saúde e causam outros problemas sociais (OMS, 2011).

Segundo o relatório, cerca de 4% das mortes ocorridas no mundo estão relacionadas com o álcool e, na sua maioria, essas mortes são provocadas por lesões, câncer, doenças cardiovasculares e cirrose hepática. A porcentagem de mortes por álcool é maior do que as de mortes causadas por AIDS e tuberculose. A nível mundial, 6,2% do total de mortes de indivíduos do sexo masculino está relacionadas com o álcool, em comparação com 1,1% das mortes de mulheres (OMS, 2011). No Brasil, os índices demonstram que uma em cada dez pessoas tem problemas consequentes ao uso indevido de álcool (SILVA et al., 2010). De acordo com o segundo levantamento domiciliar realizado pelo CEBRID (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicótropicas) em 2005, aproximadamente 12,3% da população

pode ser considerada dependente de álcool de acordo com os critérios da CID-10 e do DSM-IV (CARLINI et al, 2007).

O abuso no consumo de álcool e a sua dependência são problemas que afetam mais de 25 milhões de brasileiros. Sendo a prevalência de 17,1% entre a população masculina e 5,7% na população feminina. A prevalência de dependentes é mais alta na região Nordeste, com porcentagens quase de 14 %. Fato mais preocupante é a constatação de que, no Brasil, 5,2 % dos adolescentes (12 a 17 anos de idade) são dependentes do álcool. No Norte e Nordeste, essa porcentagem está próxima dos 9 % (CARLINI et al., 2007). Adolescentes que consomem bebidas alcoólicas podem ter consequências negativas tão diversas como problemas nos estudos, problemas sociais, praticar sexo sem proteção e/ou sem consentimento, maior risco de suicídio ou homicídio e acidentes relacionados ao consumo (FADEN, 2005). A dependência alcoólica assume uma alta prevalência quando comparada com muitas outras doenças e atualmente representa, em termos nacionais, um dos maiores problemas de saúde pública (BRASIL, 2004a).

O álcool leva a diversas complicações clínicas decorrentes de seu uso. Enquanto vários estudos da literatura sugerem que o consumo de pequenas doses diárias de vinho tinto podem atuar protegendo o sistema cardiovascular (DAS et al., 2010; DAS et al., 2006), os efeitos maléficos provocados pelo consumo excessivo de bebidas alcoólicas também tem sido amplamente estudados. Dentre os efeitos deletérios do álcool, Anstey et al. (2006) demonstraram que o consumo semanal de álcool provoca atrofia cerebral em idosos. Além disso, outro efeito deletério atribuído ao consumo crônico de álcool está relacionado ao sistema imunológico, uma vez que prejudica a resposta imune inata e adaptativa, mesmo na ausência de doença hepática alcoólica crônica (SZABO; MANDREKAR, 2009; LASO et al, 2010). Embora o consumo de etanol possa comprometer o funcionamento de vários órgãos prejudicando funções vitais, o fígado é o mais intensamente afetado (MINCIS, 2004). Esquemáticamente, cerca de 2% a 10% da quantidade de álcool ingerida são eliminadas via rins e pulmões, sendo o restante oxidado principalmente no fígado, que contém a maior quantidade de enzimas capazes de metabolizá-lo. Nesse sentido, diversos trabalhos demonstraram a hepatotoxicidade provocada pelo etanol, o principal álcool encontrado na maioria das bebidas alcoólicas, a qual está intimamente relacionada ao metabolismo desse álcool (MINCIS, 2002; MANN et. al., 1991; SMART et al, 1993).

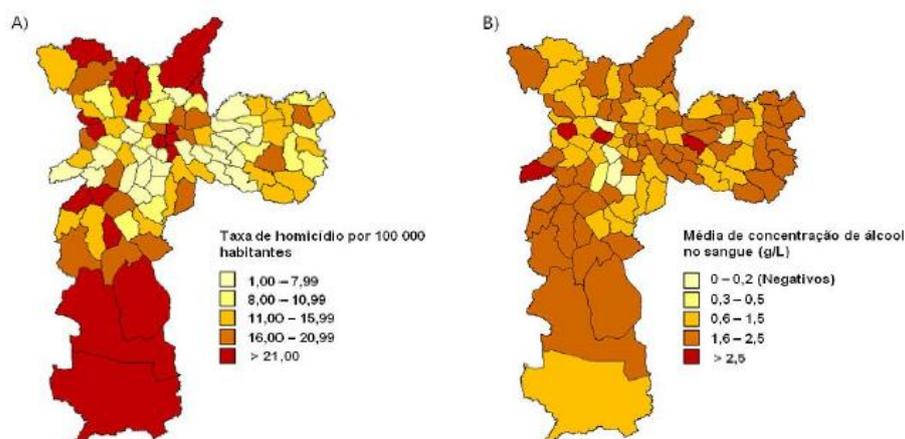
A oxidação do etanol se processa em duas fases. A primeira fase da biotransformação do etanol compreende sua oxidação a acetaldeído. No hepatócito, esta transformação é realizada através de três caminhos distintos: via álcool desidrogenase, no citosol ou na parte

solúvel da célula, via sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS), localizada no retículo endoplasmático ou, então, via catalase, localizada nos peroxissomas. Cada um destes três processos produz metabólitos específicos e resultam na produção de acetaldeído, um produto também tóxico (LIEBER, 1997). O processo através da álcool desidrogenase (ADH), localizada no citosol, é catalisado por esta enzima, tendo como cofator a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), que é convertida a sua forma reduzida, NADH. Na segunda fase o aldeído acético é transformado em acetato e acetil-CoA, com a participação da enzima aldeído desidrogenase (ALDH). Em consequência da oxidação do etanol ocorrem importantes modificações bioquímicas: aumento da relação NADH/NAD, formação de aldeído acético, proliferação microsomal (pela indução do sistema MEOS), maior redução do piruvato a lactato, entre outras, que integram o conjunto de mecanismos capazes de causar dano ao fígado (MINCIS; MINCIS, 1997; JUNIOR et al., 1998). Existe ainda uma forte associação entre o consumo de álcool e a infecção pelo HIV e outras doenças sexualmente transmissíveis (BALIUNAS et al., 2009b; FISCHER; BANG; KAPIGA, 2007). No entanto, novas pesquisas são necessárias para fundamentar essa causalidade (SHUPER et al., 2010).

A relação entre o consumo de álcool e a saúde é complexa, muitas vezes resultante de uma série de fatores, muitos dos quais estão relacionados a níveis e padrões de consumo de álcool, mas também a outros fatores, tais como a cultura de beber, a regulação do álcool ou a falta desta, e qualidade de bebida alcoólica (OMS, 2011). O uso de forma nociva aumenta os índices de absenteísmo nas relações de trabalho e o desenvolvimento de várias patologias físicas e psíquicas. Baan et al. (2007) identificaram o consumo de álcool como carcinogênico para algumas categorias de câncer, como o câncer de cólon e reto, mama feminina, laringe, fígado, cavidade oral, faringe e esôfago. Além disso, 90% das internações em hospitais psiquiátricos no Brasil por dependência de drogas acontecem devido ao álcool (NICCOLS, 2007).

O consumo excessivo de álcool é um fator importante no desencadeamento de situações de violência, o que sugere uma associação entre a ingestão de álcool e a vitimização por homicídio. Entretanto, mesmo sem existir uma relação casual simples e unidirecional para explicar essa associação complexa, vários modelos teóricos são propostos para entender este fenômeno, como, por exemplo, a hipótese de que o uso de álcool conduziria ao crime, principalmente por suas propriedades psicofarmacológicas. Do ponto de vista farmacológico, alguns efeitos da intoxicação – incluindo distorção cognitiva e de percepção, déficit de atenção, julgamento errado de uma situação e mudanças neuroquímicas – poderiam originar ou estimar comportamentos violentos (LARANJEIRA et al., 2007).

A associação entre uso de álcool e a vitimização por homicídios foi recentemente demonstrada em um estudo elaborado por Andreuccettiet al. (2009). Nesse estudo, determinou-se a alcoolemia (concentração de álcool no sangue) de 2.042 vítimas de homicídios do ano de 2005 em São Paulo. Do total de vítimas de homicídio analisadas, 43% apresentaram alcoolemia positiva (maior que 0,2 g/l), mostrando que o consumo de álcool foi um fator frequente entre as vítimas. Os distritos da cidade em estudo com maiores taxas de homicídio foram coincidentes com os distritos que apresentaram maiores médias de concentração de álcool no sangue das vítimas de homicídio, como pode ser visto na análise geoespacial apresentada na Figura 6. A prevalência de alcoolemia positiva foi maior entre os homens (44,1%) do que em mulheres (26,6%), assim como os níveis médios de alcoolemia (homens: 1,56 +/- 0,86 g/l; mulheres: 1,21 +/- 0,65 g/l). Além disso, 26,1% e 37,6% das vítimas com alcoolemia positiva tinham entre 15 e 24 anos e entre 25 e 34 anos, respectivamente.



**Figura 6- Mapas da cidade de São Paulo dividida por distritos em 2005.** A) Taxa de homicídio por 100.000 habitantes, calculada através da divisão do número de vítimas submetidas ao exame de alcoolemia pela população estimada de cada distrito em 2005 (n=1583). B) Média da concentração de álcool no sangue das vítimas de homicídio por distrito (n=1583).

Fonte: Andreuccetti et al. (2009).

Pessoas que apresentam valores de alcoolemia maior que 0,2 g/l, podem apresentar instabilidade emocional, decréscimo da inibição, prejuízo visual, perda de julgamento crítico, enfraquecimento da compreensão, debilidade no equilíbrio e incoordenação muscular, o que

corroborar a hipótese dos efeitos psíquicos do álcool ao induzir comportamentos violentos e descuido às situações de potencial risco de vida, acabando por predispor o indivíduo alcoolizado a se tornar vítima de delitos, tais como, homicídios (DUBOWSKI, 1980; ANDREUCCETTI et al., 2009).

Há evidências na literatura do uso de álcool em acidentes. Considerando pesado fardo econômico-social, resultante dos prejuízos materiais, médicos e perda da produtividade, pode ser considerado importante problema de saúde pública. O uso de bebidas alcoólicas proporciona aos motoristas falsas sensações de confiança, prejudicando assim as habilidades como atenção ao volante, coordenação e tempo de reação às situações inesperadas. Mesmo abaixo dos limites legais, as chances são altas de acontecer acidentes automobilísticos (SCHULTS et al., 2001). O risco de acidentes de trânsito começa a aumentar a uma concentração de álcool no sangue de 0,04% (BLOMBERG et al., 2009).

A partir da implantação da Lei Seca de 20 de junho de 2008, dados do Ministério da Saúde, em 2009, ressaltam que houve uma diminuição considerável dos acidentes de trânsito no Brasil (BRASIL, 2009). Ao mesmo tempo, as hospitalizações decorrentes desses foram em menor número de 24.545, representando uma queda de 23%, comparado ao ano de 2007. Em relação aos óbitos, constatou-se que no segundo semestre de 2008 foram registradas 2.723 óbitos relacionados aos acidentes de trânsito, contrapondo aos 3.519 registrados no segundo semestre de 2007, com uma redução de 22,5% (ABRAMET, 2009a).

Nessa perspectiva, os acidentes de trânsito podem gerar perdas de vidas humanas, incapacidades físicas devido às lesões cerebrais e na medula espinhal. Além desses fatores, o custo anual do evento nas rodovias brasileiras alcançou em torno de 22 bilhões de reais, o que equivale a 1,2% do PIB brasileiro. A maior parte refere-se à perda de produção associada à morte das pessoas ou interrupção de suas atividades, seguido dos custos de cuidados em saúde além daqueles associados aos veículos (BRASIL, 2006).

### 2.3 ALCOOLISMO E ANSIEDADE

A ansiedade é definida como uma resposta condicionada ao medo, sendo que no medo há uma ameaça definida e na ansiedade o perigo iminente não está bem qualificado. Portanto, nos estados ansiosos, as reações normais ao medo ocorrem de uma maneira antecipada (NAZAR et al., 1999; CHEN et al., 2006 b), sendo observados aumento da tensão muscular,

os comportamentos defensivos, as emoções negativas e disfunção do sistema nervoso autônomo (SNA) que compreendem aumento da frequência cardíaca, inotropismo, alterações respiratórias, hipersecreção gástrica e urgências de micção e defecação (GRAEFF; GUIMARÃES, 2000; RANG et al., 2004; RAMIREZ et al., 2006). No entanto, em situações diversas relacionadas à vida em sociedade, como fazer uma prova difícil ou discutir com o chefe, esses comportamentos são referidos como ocorrências psicológicas desagradáveis, pois embora o perigo seja real, ele não vem sob a forma de uma ameaça física, mas, sim, de uma ameaça ao bem-estar subjetivo de uma forma geral. Assim, tais efeitos acabam sendo disfuncional, já que a forma adequada de lidar envolve o emprego de habilidades sociais e de raciocínio, que podem ser inibidos pela ansiedade (RANGE; MUSSOI, 2007).

A ansiedade é um sintoma presente em vários quadros psicopatológicos, como depressão e esquizofrenia, ou como um quadro patológico, com características relativamente bem definidas. De acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais (DSM-IV), os principais transtornos classificados como de ansiedade são: pânico, com ou sem agorafobia, agorafobia sem história de pânico, fobia específica, fobia social, transtorno obsessivo compulsivo e os transtornos de estresse (ALMEIDA, 2006).

A tentativa de automedicação destes transtornos é frequente com o uso do álcool, pela crença de que este diminui o estresse e a ansiedade e melhora o desempenho social, o que favorece a manutenção do seu uso (CARRIGAN; RANDALL, 2003; BITTENCOURT; OLIVEIRA; SOUZA, 2005). Robinson et al (2009) em seus estudos relataram que a prevalência de automedicação variou de 18,3% (automedicação com álcool para transtorno de ansiedade generalizada) a 3,3% (automedicação com álcool e outras drogas para fobia específica e transtorno do pânico com agorafobia), mostrando assim que essa prática é um comportamento comum entre pessoas com transtornos de ansiedade.

O álcool é uma droga que afeta vários sistemas de neurotransmissores, dentre os quais se destacam os sistemas gabaérgico, glutamatérgico, dopaminérgico e serotoninérgico, entre outros envolvidos no desenvolvimento da dependência (HEINZ; GOLDMAN, 2000; PIVAC et al., 2004; BEECROFT et al., 2010).

Dados bioquímicos, eletrofisiológicos e comportamentais apontam para o receptor GABA<sub>A</sub> como um importante alvo para as ações *in vivo* do etanol. O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório no cérebro. Ele atua através de dois subtipos de receptores, denominados GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>. O receptor GABA<sub>A</sub> é um canal iônico para Cl<sup>-</sup> dependente de ligante envolvido na transmissão inibitória rápida no sistema nervoso central (SNC). O receptor GABA<sub>B</sub> é do tipo metabotrópico e atua por meio de uma

proteína G para aumentar a condutância de canais  $K^+$  (TUNNICLIFF; MALATYNSKA, 2003). O álcool pode potencializar a atividade de GABA no cérebro através de dois mecanismos gerais: ele pode atuar no neurônio de liberação do GABA(ou seja, pré-sináptico), resultando no aumento da liberação de GABA, ou ele pode atuar sobre o neurônio pós-sináptico, facilitando a atividade do receptor  $GABA_A$  (GILPIN; KOOB, 2008).

O consumo de bebidas alcoólicas é diminuído por compostos que interferem com a ação do receptor  $GABA_A$  (isto é, os antagonistas dos receptores  $GABA_A$ ), bem como os compostos que estimulam os receptores  $GABA_B$  (agonistas  $GABA_B$ ) no núcleo *accumbens*, na amígdala e outras regiões cerebrais (KOOB, 2004; GILPIN; KOOB, 2008). Destas, o núcleo central da amígdala, uma região do cérebro importante na regulação dos estados emocionais, é particularmente sensível à supressão da ingestão de álcool por compostos que atuam sobre o sistema GABAérgico (HYTTIA; KOOB, 1995; GILPIN; KOOB, 2008). Na verdade, a exposição aguda e crônica de álcool produzem aumentos na transmissão GABA nesta região do cérebro (ROBERTO et al., 2004a).

A exposição crônica do álcool também leva a alterações nos sistemas GABAérgicos. Por exemplo, em algumas regiões do cérebro, o álcool afeta a expressão de genes que codificam componentes do receptor  $GABA_A$ . Isto tem sido demonstrado por alterações na composição das subunidades do receptor nessas regiões, sendo a mais constante alteração observada como uma diminuição das subunidades  $\alpha 1$  e um aumento das subunidades  $\alpha 4$ , que resultam na modificação da eficácia e do tempo de transmissão sináptica inibitória (GILPIN; KOOB, 2008; LOVINGER, 2008).

A exposição crônica ao álcool pode produzir uma diminuição e aumento da liberação de GABA em diferentes regiões cerebrais. No entanto, a maioria dos efeitos visíveis pode ocorrer durante a abstinência do álcool, onde sintomas como ansiedade e até mesmo ataques convulsivos possam ser mediados em parte pela redução da função dos receptores  $GABA_A$  no cérebro, caracterizada pela hiperexcitabilidade do sistema nervoso central que se manifesta na retirada abrupta da droga (LOVINGER, 2008; BEECROFT et al., 2010).

A função dos receptores  $GABA_A$  também é regulada por moléculas conhecidas como esteroides neuroativos, a exemplo da progesterona, que são produzidos, tanto no cérebro como em outros órgãos periféricos, apresentando a capacidade de modificar a atividade neural (DUBROVSKY, 2006). O álcool aumenta os níveis cerebrais de muitos esteroides neuroativos. Essa atividade aumentada de esteroides neuroativos no cérebro, após a exposição ao álcool não é dependente da sua produção por parte dos órgãos periféricos. Juntos, estes resultados sugerem que os esteroides são potenciais moduladores-chaves da alteração da

função do GABA durante o desenvolvimento da dependência do álcool, talvez por uma ação direta nos receptores GABA<sub>A</sub> (GILPIN; KOOB, 2008).

O glutamato é um importante neurotransmissor excitatório no cérebro, que exerce seus efeitos através de vários subtipos de receptores, incluindo um chamado de N-metil-D-aspartato (NMDA) (GILPIN; KOOB, 2008). Em contraste aos seus efeitos nos receptores GABA, o etanol agudamente inibe a transmissão sináptica glutamatérgica, principalmente a mediada por receptores NMDA, em uma região do cérebro chamada corpo estriado, que consiste de três importantes subdivisões: o núcleo caudado, o putamen e o estriado ventral, o qual inclui o núcleo *accumbens*, uma região envolvida com a emoção e memória (DeLONG, 2000; VASCOLELOS et al., 2008).

O álcool inibe a atividade do glutamato nos receptores NMDA, que pode causar perda de memória durante a intoxicação e ao longo do tempo reduzir a capacidade de aprendizagem. O envolvimento dos receptores NMDA no alcoolismo é especialmente interessante, porque eles também desempenham um papel na neuroplasticidade, um processo caracterizado através da reorganização neural, que provavelmente contribui para a hiperexcitabilidade durante a abstinência de álcool (GILPIN; KOOB, 2008).

A exposição crônica ao etanol resulta em um aumento no número e na função de receptores NMDA, particularmente no hipocampo, tálamo e córtex cerebral, explicando a hiperatividade glutamatérgica que ocorre na síndrome de abstinência alcoólica, como hiperexcitabilidade, convulsões, morte celular e danos neuronais irreversíveis (GILPIN; KOOB, 2008; LOVINGER, 2008).

As propriedades reforçadoras do álcool, um de seus efeitos mais importantes e característicos, que podem ser entendidas como a capacidade que a droga tem de criar e manter hábitos e comportamentos são desempenhadas pela sua ação sobre os neurônios dopaminérgicos do sistema mesolímbico, desinibindo-os. Essa ação é importante nos comportamentos de gratificação, prazer, motivação e instintos de alimentação e reprodução (LIMA, 2003). Estudos pré-clínicos têm demonstrado que a administração sistêmica de álcool aumenta a liberação de dopamina no núcleo *accumbens* de ratos (WEISS; LORANG; BLOOM, 1993; BEECROFT et al., 2010). Ao contrário dos estimulantes que possuem um efeito direto sobre a dopamina, o álcool age de forma indireta modulando neurotransmissores. Por exemplo, a administração aguda de álcool leva a inibição do GABA na área tegmental ventral (ATV), desinibindo os neurônios dopaminérgicos, que irão liberar dopamina para o núcleo *accumbens* (NAcc), ativando processos de recompensa (GILPIN; KOOB, 2008; CLAPP; BHAVE; HOFFMAN, 2008).

A exposição aguda ao álcool aumenta a taxa de disparos de neurônios dopaminérgicos o que parece conduzir ao aumento dos níveis de dopamina extracelular nas regiões do cérebro em que esses neurônios se projetam. Por exemplo, o consumo de álcool pode ser bloqueado pela injeção de doses baixas de um antagonista da dopamina, um composto que interfere com a atividade normal desse neurotransmissor diretamente no núcleo *accumbens* (HODGE et al, 1997; RASSNICK; PULVIRENTI; KOOB, 1992). O consumo crônico de álcool pode levar a um estado hipodopaminérgico que motiva os indivíduos a buscarem beber o álcool a fim de restabelecer os níveis desejados do neurotransmissor (VOLKOW et al., 2007), fortalecendo a hipótese de que a dopamina é um neurotransmissor fundamental na mediação do efeito de reforço e recompensa de substâncias de abuso no cérebro. Entretanto, apesar dessas constatações, farmacoterapias visando o sistema dopaminérgico não mostraram eficácia na redução da ingestão de álcool, quer em modelos animais ou em humanos com desordens de abuso de álcool (LOVINGER, 2008).

A dopamina está ainda envolvida no equilíbrio entre os impulsos ascendentes e o controle descendente das vias do sistema nervoso central, que é responsável pela resposta a estímulos aversivos e provocativos (SIEVER, 2008). Mozley et al. (2001), encontraram em seus estudos uma diferença no nível cerebral dopaminérgico entre os sexos, sugerindo haver mais dopamina nas mulheres no núcleo estriado, devido a sua maior afinidade a esses receptores o que pode justificar, apesar do crescente envolvimento de mulheres, o maior envolvimento dos homens com drogas. As alterações na quantidade e afinidade dos receptores dopaminérgicos estão diretamente ligadas a disfunções no circuito de recompensa e a hiperperfusão da dopamina pode prejudicar a tomada de decisão (PINER et al., 2010). Além disso, Limosin et al. (2003) relataram que a maior procura pelo álcool e pela sensação de prazer que este proporciona relacionou-se à sensibilidade da dopamina aos receptores pós-sinápticos apenas nos homens.

A serotonina (também conhecido como 5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é uma monoamina originada, principalmente, em pequenos grupamentos de neurônios localizados na base do encéfalo (núcleos da rafe). Tem sua ação através de 15 tipos de receptores, a maioria deles acoplados a proteína G (5-HT-1, 2, 4, 5, 6, 7 e seus subtipos) e um receptor inotrópico (5-HT3, canal de sódio). Esse neurotransmissor está diretamente ligado à capacidade de influenciar uma variedade de funções cerebrais, incluindo sensações relacionadas aos estímulos do ambiente, percepção da dor, a aprendizagem e a memória, sono e humor (KANDEL et al. 2000; LOVINGER, 2008).

A serotonina também parece estar envolvida no comportamento que leva ao consumo abusivo de álcool. Estudos apontam que alterações da função serotoninérgica influenciam as emoções humanas e os comportamentos decorrentes, indicando que a mudança de excitabilidade do circuito límbico em resposta a um estímulo emocional pode desencadear respostas de ansiedade e aumentar o risco para transtornos afetivos bem como para a dependência alcoólica (LESCH, 2005). Agudamente, o etanol tem efeitos mistos sobre a transmissão serotoninérgica. É observada uma maior demora a que ocorra a receptação da serotonina da fenda sináptica, e a potencialização da função do receptor 5-HT<sub>3</sub>. Cronicamente, o etanol interage de várias formas com esse sistema o que pode alterar a ansiedade e o estado afetivo (LOVINGER, 2008).

Os receptores 5-HT<sub>2</sub> parecem sofrer mudanças adaptativas após consumo crônico de álcool, como aumento do número e da atividade dos receptores 5-HT<sub>2</sub>. A atividade aumentada do receptor 5-HT<sub>2</sub>, causada pela exposição crônica ao álcool, pode também contribuir para a síndrome de abstinência ao álcool (LOVINGER, 1997; SILVA et al., 2010).

O alto consumo de álcool foi associado com níveis diminuídos de serotonina central em humanos e em animais, por ação direta pelos efeitos reforçadores do álcool, ou por influências indiretas por meio da ação serotoninérgica sobre a dopamina (BROWN et al., 2007). Níveis baixos de serotonina resultam em um comportamento impulsivo, incluindo uma inabilidade para modular a ingestão de álcool (PETRAKIS; KRYSTAL, 1997; GILPIN; KOOB, 2008). Apesar de existirem diversos trabalhos na literatura científica, a serotonina modula os efeitos neurais e comportamentais do etanol (DAWS et al., 2006), mas a exata natureza da relação entre a serotonina e alcoolismo ainda é desconhecida.

## 2.4 NEUROBIOLOGIA DA ADIÇÃO

A grande maioria da sociedade ocidental moderna consome regularmente álcool. As principais razões para esse consumo excessivo estão relacionadas com a capacidade do álcool em produzir estimulação dos estados de humor e causar efeitos ansiolíticos (SPANAGEL, 2009). Esta droga psicoativa apresenta propriedades reforçadoras, isto é, ela é capaz de sustentar e aumentar a chance de ocorrência dos comportamentos procedentes e necessários ao consumo da droga. Alguns autores definem dois tipos de reforço: o reforço positivo e o reforço negativo. De maneira geral, considera-se que o reforço positivo seja atribuído a

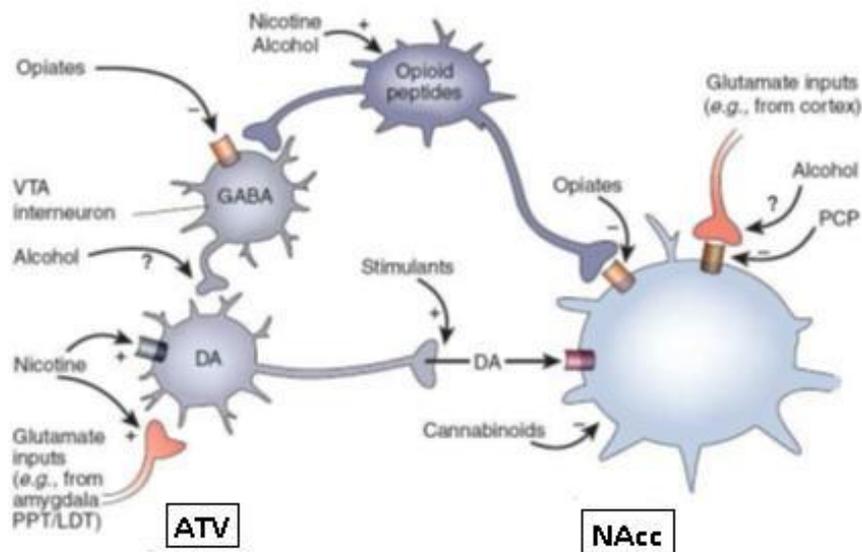
capacidade da droga de produzir efeitos agradáveis e sensações prazerosas. O reforço negativo caracteriza-se pela capacidade da droga de diminuir sensações desagradáveis. Em muitos casos é difícil separar qual o tipo de reforço predominante em determinada situação (ALMEIDA, 2006). Essas características são fundamentais para que a droga seja capaz de induzir dependência, uma vez que esta pode ser entendida por (1) compulsão para buscar e consumir a droga, (2) perda de controle sobre o consumo e (3) a emergência de um estado emocional negativo (por exemplo, disforia, ansiedade, irritabilidade) quando o acesso à droga é impedido (KOOB, 2009a).

O uso inicial da droga pode ser voluntário, na busca de prazer, das suas propriedades reforçadoras, mas para a pessoa que apresenta adição a escolha pelo uso da droga não é mais voluntária. Ocorre uma neuroadaptação semelhante ao que ocorre no aprendizado de uma tarefa e o indivíduo procura a droga mesmo na evidência de consequências pessoais negativas e graves (CHOU; NARASIMNHAN, 2005). Para compreender os fatores que levam algumas pessoas a beber excessivamente, as pesquisas neurobiológicas atuais têm se focado na identificação dos mecanismos neurofarmacológicos e neuroadaptativos dentro dos circuitos neurais específicos que medeiam à transição do uso ocasional controlado da droga para a perda de controle comportamental sobre a busca e o consumo de drogas, que consiste na característica principal da dependência (KOOB, 2009).

Existem várias evidências clínicas e experimentais mostrando, que todas as drogas de abuso convergem a um circuito comum no sistema límbico cerebral. Esse circuito de recompensa inclui o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico que começa com os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (ATV) do mesencéfalo e se projeta para o núcleo *accumbens* (NAcc) e prosencéfalo incluindo o estriado dorsal (KOOB; NESTLER, 1997). O NAcc é considerado uma interface motora do sistema límbico, onde os estímulos relevantes são processados para a iniciação do comportamento (MOGENSON et al., 1980; THOMAS et al., 2008). O estriado dorsal, por sua vez, está associado com o aprendizado e resposta comportamental (JOHNSON, 2004).

Esta via, ATV-NAcc, é alvo de diversas pesquisas que procuram demonstrar como, apesar de seus diferentes mecanismos de ação, todas as drogas de abuso convergem a essa via, tendo assim efeitos agudos reforçadores comuns (Figura 7) (NESTLER, 2005). Opióides inibem interneurônios gabaérgicos na ATV, levando a maior atividade dessa região, também agem diretamente como agonistas dos receptores opióides, encontrados em neurônios do NAcc, ativando a via da proteína Gi, de maneira semelhante ao que se observa na ativação do receptor D2 da dopamina. Os mecanismos dos canabinóides parecem complexos, e envolvem

a ativação dos receptores tipo 1 para canabinóides endógenos (CB1), que são acoplados a proteína Gi em terminais nervosos glutamatérgicos e gabaérgicos no NAcc e diretamente nos seus corpos neuroniais. A nicotina parece ativar neurônios dopaminérgicos da ATV diretamente via estimulação dos receptores nicotínicos da acetilcolina e, indiretamente, pela ativação de neurônios glutamatérgicos que inervam as células dopaminérgicas. O álcool, pela ativação de receptores GABA<sub>A</sub>, inibe terminais gabaérgicos desinibindo os neurônios dopaminérgicos e também inibe terminais glutamatérgicos que inervam o núcleo accumbens. Há alguns indícios de que o álcool e a nicotina podem ativar as vias opióides endógenas e que essas e outras drogas de abuso parecem ativar o sistema canabinóide endógeno (NESTLER, 2005).



**Figura 7- Esquema simplificado das ações agudas convergentes das drogas de abuso no complexo ATV-NAcc.** PPT/LDT: tegumento pedúnculo pontínio / tegumento dorso lateral; DA: dopamina; VTA: área tegmental ventral; NAcc: núcleo *accumbens*.

Fonte: NESTLER, 2005.

Os principais efeitos do álcool são observados no sistema nervoso central. Por serem propostos distintos mecanismos de ação, o etanol tem sido considerado um agente farmacológico inespecífico, no entanto, apesar dessa opinião os recentes estudos em farmacologia molecular demonstraram que o álcool tem apenas alguns alvos conhecidos. Estes são os receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), do ácido-gama-aminobutírico (GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>), de glicina, de 5-hidroxitriptamina tipo 3 (5-HT<sub>3</sub>) e receptores nicotínicos neuronais (nACh), bem como canais de cálcio tipo - L e algumas

proteínas G (VENGELIENE et al., 2008). No nível celular, o efeito do álcool é puramente depressor, e as principais teorias que explicam esse fato são: 1) potencialização da inibição mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), semelhante à ação dos benzodiazepínicos; 2) inibição da entrada do cálcio pelos canais de cálcio regulados por voltagem; 3) inibição da função dos receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) (VIENNE et al., 2010).

#### 2.4.1 Modelos Animais de Dependência

Diversos modelos animais existem para estudar e analisar alguns efeitos do álcool que podem contribuir para o abuso e a dependência dessa droga. No entanto, esses modelos apresentam limitações devido à grande complexidade dos problemas relacionados ao abuso de álcool e ao alcoolismo, resultados da ampla interação entre fatores genéticos, psicológicos, ambientais e socioculturais. Embora essas limitações sejam intransponíveis, os resultados experimentais com os modelos têm contribuído de forma significativa para o desenvolvimento da neurociência (ALMEIDA, 2006). Em geral, algumas características dos distúrbios dos seres humanos são selecionadas e condições semelhantes a estas são replicadas em modelos experimentais (CUNNINGHAM et al., 2000; KOOB, 2000; SPANAGEL; HÖLTER, 2000).

Durante os últimos anos, os pesquisadores desenvolveram novos modelos animais que mimetizam os diferentes aspectos característicos da dependência em humanos, tais como o “*craving*” (ou fissura, desejo persistente pela droga), a recaída e a perda de controle sobre o consumo, que são aspectos importantes da dependência (SPANAGEL; HÖLTER, 2000). Estes modelos almejam dois objetivos principais. O primeiro deles visa estudar as consequências do uso crônico das drogas, incluindo o desenvolvimento de tolerância/sensibilização e a dependência física/síndrome de abstinência. Nesses modelos, a droga é administrada pelo pesquisador de maneira forçada através da dieta, de intubação gástrica, por injeção ou até mesmo por inalação. O segundo objetivo visa estudar no animal o comportamento de procura a droga. Os modelos de comportamento de procura a droga tentam demonstrar as propriedades reforçadoras das drogas, as quais se acreditam desempenhem um papel central no desenvolvimento da dependência (SPANAGEL, 2000; MEISCH, 2001). Alguns desses modelos foram validados com compostos que são classificados farmacologicamente como “*anti-craving*” que são utilizados clinicamente para o tratamento de dependentes químicos (SPANAGEL; HÖLTER, 2000).

As implicações comportamentais, neuroquímicas e moleculares no consumo e preferência pelo álcool em humanos têm sido abordadas empregando-se modelos animais desenvolvidos para melhor entender as propriedades motivacionais e reforçadoras desta droga. Esses podem ser classificados em três grupos: modelos que estudam as propriedades reforçadoras positivas, modelos que estudam as propriedades reforçadoras negativas e modelos que tentam mimetizar aspectos diferentes da adição, como o uso compulsivo (craving), a recaída e a perda do controle sobre o uso (SHIPPENBERG; KOOB, 2002; SPANAGEL, 2000).

#### 2.4.1.1 Modelos que Estudam as Propriedades Reforçadoras Positivas

Um efeito reforçador é definido operacionalmente como “qualquer evento que aumenta a probabilidade de uma resposta”, e é frequentemente utilizado alternativamente como “recompensa”. Em geral, as drogas de abuso funcionam como reforçadores positivos ou condicionados em virtude de seus efeitos de recompensa, sendo essa sua propriedade a base conceitual para a autoadministração (SHIPPENBERG; KOOB, 2002). Assim, efeitos motivacionais positivos produzidos pelo álcool podem incluir aumento nos estados prazerosos (por exemplo, a euforia), bem como alívio dos estados não prazerosos, como aqueles produzidos pelo estresse, ansiedade, ou dependência física e abstinência (CUNNINGHAM et al., 2000).

O desenvolvimento da autoadministração pode ser descrito a partir de duas abordagens principais: a preferência oral e o comportamento operante. Na primeira abordagem, os animais tem, em suas gaiolas-casas, livre acesso à droga e escolhem livremente entre água e uma ou várias soluções contendo diferentes concentrações da droga. Quando é dada aos animais uma escolha entre soluções (álcool e água, por exemplo), a proporção entre a ingesta relativa de álcool e a ingesta total (razão de preferência) é frequentemente usada para caracterizar o comportamento do animal. Nos experimentos, as garrafas estão disponíveis 24 horas por dia (livre escolha), ou apenas em pequenos períodos do dia (acesso limitado). Os roedores são cautelosos ao consumir substâncias com um sabor estranho, fenômeno denominado neofobia. Uma estratégia comum é introduzir o álcool em uma concentração relativamente baixa e aumentá-la ao longo do tempo. Outro artifício é misturar o álcool com

uma substância de sabor agradável, como a sacarose ou sacarina, cuja concentração pode ser gradualmente reduzida ao longo do tempo (CUNNINGHAM et al., 2000).

Na abordagem que utiliza o condicionamento operante, os animais são expostos a aparelhos que geralmente consistem de dois ambientes neutros, que podem diferir quanto ao tipo de estímulo, incluindo cor, textura, odor e luz (FELTENSTEIN; SEE, 2008). É um modelo no qual um estímulo ambiental, pareado com a exposição à droga, é capaz de levar a propriedades motivacionais de incentivo (TZSCHENTKE, 1998, 2007). A autoadministração operante é observada após treinar os animais para obter água ou droga pressionando uma de duas alavancas (uma para cada líquido) existentes na gaiola ou aprender a percorrer um túnel para obter a droga. A quantidade da droga que o animal consome está relacionada à quantidade de trabalho que ele realiza. Esses estudos permitem avaliar não somente a preferência pela droga, mas também a motivação do animal para trabalhar para obter a droga em diferentes condições e demonstram claramente as propriedades reforçadoras positivas das drogas (KOOB, 2000). A auto estimulação elétrica de certas áreas do cérebro é recompensadora para animais e humanos (OLDS; MILNER, 1954). Há uma boa correspondência entre a capacidade de as drogas de abuso em diminuir o limiar para autoadministração intracraniana e o seu potencial de abuso (KORNETSKY; ESPOSITO, 1979). Nesse procedimento ratos que tiveram eletrodos implantados em determinadas regiões cerebrais, relacionadas com a mediação dos efeitos reforçadores do etanol, podem se auto administrar choques nessas regiões via condicionamento operante padrão (GILPIN; KOOB, 2008).

#### 2.4.1.2 Modelos que Estudam as Propriedades Reforçadoras Negativas

Os efeitos motivacionais negativos produzidos pelo álcool podem contribuir para o retorno ao uso da droga, uma vez que, a retirada dessa após uso prolongado pode incluir estados não prazerosos como disforia, mal-estar e ressaca, ou mesmo diminuição dos estados prazerosos, como uma redução da euforia (CUNNINGHAM et al., 2000).

Os efeitos reforçadores negativos do etanol podem ser estudados usando os modelos descritos anteriormente para o reforço positivo, com a diferença que o animal é testado durante a abstinência forçada do etanol (GILPIN; KOOB, 2008). Vários modelos animais tem abordado esse fenômeno, seja induzindo uma dependência física através da administração

forçada da droga (inalação em uma câmara, infusão intragástrica, dieta líquida balanceada contendo a droga como única fonte de líquido e alimento), ou da ingestão voluntária por condicionamento operante ou não. Quando o animal desenvolve a dependência física e então, apresenta a síndrome de abstinência na retirada da droga, observa-se que o consumo na reapresentação da droga pelos animais dependentes é maior do que pelos não dependentes, mesmo quando os sintomas da abstinência são brandos. As respostas dos animais ao longo de sessões de abstinência tornam-se mais estáveis, sugerindo que eles aprendem a responder de uma forma controlada para minimizar e evitar os sintomas da abstinência (US DEPARTMENT, 2000).

Modelos para avaliar ansiedade em animais, como o labirinto em cruz elevado, caixa claro-escuro, esconder objetos, interação social, entre outros, também são empregados para avaliar as propriedades reforçadoras negativas de algumas drogas que causam efeito ansiolítico, como o etanol e o diazepam. Desta forma, pode-se estudar o efeito ansiolítico manifestado após a administração aguda ou crônica destas drogas, além da sua presença na síndrome de abstinência (BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGONI, 2000).

*Objetivos*

---

### **3 – OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

- Avaliar o possível efeito ansiolítico/ansiogênico promovido pelo consumo crônico da cachaça no modelo de autoadministração em camundongos.

#### **3.2. Específicos**

- Determinar a composição físico-química da cachaça comercializada no estado da Paraíba;
- Avaliar o perfil comportamental de camundongos em testes de ansiedade após administração crônica da cachaça;
- Avaliar as possíveis alterações nos marcadores da função hepática decorrentes do consumo crônico da cachaça.
- Avaliar as possíveis alterações metabólicas decorrentes do consumo crônico da cachaça.

*Material e Métodos*

---

## 4 – MATERIAL

### 4.1 Animais

No desenvolvimento do presente estudo, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos albinos da linhagem Suíça, com 2 a 3 meses de idade, pesando entre 25 a 35 g (Figura 8), provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

No biotério, os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, contendo 20 camundongos, mantidos sob condições controladas de temperatura equivalente a  $21 \pm 1^\circ \text{C}$ , com livre acesso a uma dieta controlada a base de ração tipo pellets (Purina) e água disponível em garrafas de polietileno com bicos de inox, encaixadas na parte superior da grade metálica da gaiola. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6:00 às 18:00 horas.



**Figura 8** – Camundongo *Suíço* macho e albino.

Fonte: foto da autora

#### 4.1.1 Condições experimentais

Os testes foram realizados no Biotério Prof. Dr. Thomas George, onde os camundongos foram previamente alojados em gaiolas de polietileno, contendo quatro animais cada, com pelo menos 60 minutos de antecedência à execução dos testes, visando minimizar as possíveis alterações comportamentais do animal decorrentes da mudança de ambiente, bem como permitir uma adaptação à sala de experimentação. Os camundongos foram mantidos a temperatura de  $21 \pm 1^\circ \text{C}$  e privados de água e ração 60 minutos antes dos testes.

Antes de cada procedimento, a bancada foi limpa com etanol 70%, entretanto, durante os testes foi utilizado etanol de baixa graduação (10%). Os experimentos foram executados no período compreendido entre as 07:00 e 12:00 horas.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do LTF / UFPB, sob a certidão nº 0305 / 10.

## **4.2. Equipamentos**

### **4.2.1. Aparelho do Labirinto em Cruz Elevado**

O Labirinto em Cruz Elevado é feito de plástico e consiste em quatro braços, sendo dois braços com paredes laterais e sem cobertura (braços fechados), medindo 30 cm de comprimento por 6 cm de largura e 16 cm de altura, colocados perpendicularmente a dois braços desprovidos de paredes laterais (braços abertos) com o mesmo comprimento e largura. Cada braço é posicionado a  $90^\circ$  do braço adjacente e cruzam-se numa área central onde o animal é posicionado. O labirinto é apoiado sob um suporte com 25 cm elevado em relação ao solo.

### **4.2.2. Aparelho da Placa Perfurada**

O aparelho da Placa Perfurada (“*holeboard*”) utilizado foi o modelo 6650 da Ugo Basile (Comerio, VA, Itália), sendo constituído de uma área de 40 x 40 cm, possuindo 16 orifícios de 3 cm de diâmetro cada. Estes orifícios são acoplados a fotocélulas sensíveis ao mergulho da cabeça do animal, as quais são conectadas a um monitor que registra o número de mergulhos e contém dispositivos para ligar e zerar o aparato. A placa é posicionada a 18 cm do balcão por meio de dois suportes localizados na parte inferior do mesmo.

## **5- MÉTODOS**

A cachaça obtida foi submetida a testes físico-químicos, comportamentais e bioquímicos, de acordo com as seguintes metodologias:

### **5.1. Determinações físico-químicas**

#### **5.1.1. Graduação alcoólica**

A graduação alcoólica (% de álcool por volume, a 20 ° C) das amostras foi determinada através de densitometria, com leitura direta em alcoômetro de precisão, com certificado de calibração do INMETRO de acordo com metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL)(2008).

#### **5.1.2. Determinação da Acidez Fixa, Volátil e Total**

Seguindo as Normas Analíticas do IAL como também do MAPA (BRASIL, 2005), a acidez total da amostra (mg de ácido acético/100 mL de álcool anidro) foi realizada por titulometria de neutralização. A acidez fixa foi obtida por evaporação da amostra seguida de uma titulação dos ácidos residuais com álcali. E a determinação da acidez volátil foi feita por diferença entre a acidez total e fixa encontrada.

### 5.1.3. Determinação do pH

O pH foi também determinado com o auxílio de um pHmetro digital (Digimed DM-20), segundo as Normas Analíticas do IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

### 5.1.4. Análise dos padrões de identidade e qualidade de cachaça

A análise físico-química exigida para cachaça envolve a determinação de mais de 10 parâmetros. Assim, para facilitar a análise dos dados, os parâmetros foram agrupados em duas categorias, tendo como base a legislação (BRASIL, 2005a): componentes da cachaça e contaminantes da cachaça. São tratados como componentes os parâmetros: ésteres totais, aldeídos, furfural e álcoois superiores. Do mesmo modo, como contaminantes têm-se: álcool metílico, acroleína, álcool sec-butílico, álcool n-butílico, arsênio, chumbo e cobre.

Segundo Cardoso (2006) os compostos secundários da cachaça são formados no processo de produção da bebida, durante as fases de fermentação, destilação e armazenagem. Esses compostos resultam da ação de enzimas, provenientes de certos microrganismos, tais como as leveduras, que ao longo do processo de fermentação transformam os açúcares presentes no mosto em etanol, gás carbônico, glicerina e outros produtos formados em quantidades menos relevantes, como ácidos carboxílicos, metanol, ésteres, aldeídos e álcoois superiores (NOVAES, 1974).

#### 5.1.4.1. Determinação de Componentes Voláteis Majoritários

As concentrações de álcoois superiores, aldeídos, ésteres e furfural, foram determinadas por meio de análises físico-químicas de acordo com o Manual de Análises de Bebidas e Vinagres, do Ministério da Agricultura seguindo a Instrução Normativa nº. 13 de 29 de junho de 2005 (BRASIL, 2005), realizadas no Laboratório de Toxicologia do Instituto Tecnológico de Pernambuco (ITEP). O Laboratório do ITEP é acreditado pelo INMETRO e reconhecido como referência para análises oficiais de bebidas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 5.1.4.2. Determinação dos Contaminantes

As determinações dos contaminantes foram realizadas em cromatógrafo de fase gasosa (modelo FINNIGAN TRACE ULTRA GC), equipado com detector de ionização de chama (CG-FID) e coluna de aço inoxidável, Carbowax 20M. Como gás de arraste foi utilizado Hélio ultra puro, com vazão de 1,5 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram 230°C e de 250°C, respectivamente. O cobre foi quantificado por espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite.

## **5.2. Avaliação Comportamental**

### **5.2.1. Protocolo experimental - Modelo de autoadministração crônica**

Para o experimento de consumo crônico de cachaça e álcool, foi adotada a metodologia da preferência livre conforme o protocolo estabelecido por Lessov et al. (2001). Portanto, cada caixa era equipada com dois bebedouros a serem escolhidos livremente pelos animais. Um bebedouro foi abastecido com água filtrada e o outro continha a bebida teste. Foram utilizados 45 animais, os quais divididos em três grupos conforme a Tabela 1, sendo o grupo 1 tratado com água + água; o grupo 2 tratado com água + etanol; o grupo 3 tratado com água + cachaça. A duração dos tratamentos foi fixada em seis semanas de acordo com Lessov et al. (2001). Foram utilizadas as seguintes fontes alcoólicas (cedidas pelo Engenho Triunfo, localizado na cidade de Areia-PB): a) cachaça; b) Etanol PA. Para facilitar a adaptação dos animais ao consumo de álcool, as garrafas contendo solução alcoólica tiveram as suas concentrações ajustadas progressivamente no decorrer das seis semanas, da seguinte forma: 2% na primeira semana, 5% na segunda semana e 10% nas semanas subsequentes. Estudos de Lessov et al. (2001) mostraram que os animais apresentam maior predileção ao consumo voluntário de álcool quando o mesmo é administrado na concentração de 10%. Um grupo controle com 14 camundongos (n= 14) teve acesso somente à água.

As posições das garrafas foram mudadas a cada dois dias e o consumo dos líquidos medidos volumetricamente, sendo as soluções descartadas e repostas nessas ocasiões.

**Tabela 1.** Composição dos grupos de tratamento.

	<b>Garrafa 1</b>	<b>Garrafa 2</b>
Grupo 1 (n=14)	Água	Água
Grupo 2 (n=15)	Água	Etanol
Grupo 3 (n=16)	Água	Cachaça

### 5.2.2. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Para se estudar os mecanismos neurais envolvidos na ansiedade ou para se determinar a atividade ansiolítica de uma droga, faz-se necessário o emprego de modelos animais experimentais (ALMEIDA, 2006). O mais utilizado e aceito pela comunidade científica é o labirinto em cruz elevado (RODGERS et al., 1997; ZANGROSSI JR.,1997), desenvolvido a partir do trabalho de Montgomery (1955) sendo posteriormente modificado e validado como

um modelo de ansiedade para ratos (PELLOW et al., 1985) e para camundongos (LISTER, 1987). Este teste é baseado, entre outros fatores, na aversão natural que roedores apresentam por braços abertos do labirinto (MONTGOMERY, 1955), pois quando neles confinados, mostram sinais de medo – congelamento, defecação e aumento do nível plasmático do hormônio do estresse, a cortisona (GRAEFF; GUIMARÃES, 1999). Assim, observa-se que em geral, ratos e camundongos expostos ao LCE tendem a entrar com maior frequência e a permanecer nos braços fechados, evitando os braços abertos (RODGERS; DALVI, 1997; WALL; MESSIER, 2001). A proporção da exploração nos braços abertos determina uma medida de ansiedade, de tal modo que o aumento nas percentagens de tempo e de entradas nestes é considerado como indicativo de ação ansiolítica de drogas (PELLOW et al., 1985). Os parâmetros avaliados neste teste serão: tempo de permanência nos braços abertos, tempo de permanência nos braços fechados.

Após seis semanas de consumo dos tratamentos preconizados os animais (n= 14-16) foram avaliados no aparelho, durante 5 minutos, sendo registrados os parâmetros descritos.

### 5.2.3. Placa Perfurada

O teste da placa perfurada (*holeboard*), introduzido por BOISSER e SIMON (1962 e 1964), geralmente é empregado para triagem de drogas com possível atividade ansiolítica. Baseia-se na observação de que a atividade de mergulhos (*headdippings*) dos animais é inversamente proporcional ao estado de “ansiedade” dos mesmos (BOISSER; SIMON; SOUBRIE, 1976; LEITE; SIQUEIRA, 2006). Além disso, as atividades motora e exploratória dos animais são também avaliadas, uma vez que mede a resposta desses quando expostos a um ambiente não familiar (WEI et al., 2007).

Após 42 dias de consumo dos tratamentos preconizadas os animais (n=14-16) foram colocados individualmente no centro da placa perfurada, onde por um período de 3 minutos foi registrado o número total de mergulhos e a ambulação, registrada pelo número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo (LEITE; SIQUEIRA, 2006).

### **5.3. Avaliação do consumo de água e alimento e evolução ponderal**

Neste experimento, foi avaliado o consumo de água, ração e peso corporal. Com relação à água, foram colocadas mamadeiras cheias de água em cada gaiola, sendo no dia seguinte registrado o volume de água ingerida pelos animais com o auxílio de uma proveta.

Quanto ao consumo de alimentos, a ração na forma de “pellets”, foi previamente pesada e colocada, diariamente, na parte superior da gaiola, sendo no dia posterior registrado o peso de ração consumido pelos camundongos. Todos os dias os animais foram pesados para análise da evolução ponderal.

### **5.4. Avaliação Bioquímica**

No 43º dia, antes da eutanásia, os animais foram anestesiados com tiopental sódico na dose de 45 mg/kg (Thiopentax®, Cristália- Produtos Químicos Farmacêuticos). Com agulha heparinizada, o sangue obtido por punção cardíaca, foi coletado em ependorfs, que foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm, para obtenção do soro, destinado a análises bioquímicas das transaminases (aspartato aminotransaminase, AST, e alanina aminotransaminase, ALT). Estes parâmetros bioquímicos foram determinados utilizando-se kits específicos (NanjingJianchengBiological Technology, Inc., China).

### **5.5. Análise Estatística**

Os resultados obtidos nos experimentos comportamentais foram avaliados estatisticamente através do programa GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software

Incorporated, San Diego, USA) empregando-se o Teste “t” de Student ou o Teste de análise variância (ANOVA) one -way, seguido do teste de Tukey. Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.), sendo os resultados considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## *Resultados e Discussão*

---

## 6– RESULTADOS

### 6.1. Determinações físico-químicas

Os resultados das determinações físico-químicas, graduação alcoólica, acidez (fixa, volátil e total) e pH estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Resultados das análises físico-químicas para as amostras de cachaça – média de duas repetições.

AMOSTRA	TEOR ALCOÓLICO% (V/V) a 20°C	ACIDEZ	ACIDEZ	ACIDEZ	pH
		TOTAL	VOLÁTIL	FIXA	
Cachaça	40	51	48	3	5,32

#### 6.1.1. Graduação Alcoólica

A graduação alcoólica de uma bebida é definida pela percentagem volumétrica de álcool puro nela contido. Na cachaça o grau alcoólico está relacionado à quantidade de água arrastada no processo de destilação. A legislação permite a adição de água potável para a padronização da graduação alcoólica do produto final (MARINHO; RODRIGUES; SIQUEIRA, 2009).

A Instrução Normativa n° 13, de 29 de junho de 2005, determina que o teor alcoólico em cachaças deva estar entre 38°G.L. e 54°G.L. (BRASIL, 2005). A amostra analisada apresentou valor de teor alcoólico de 40% (v/v) a 20 ° C, como pode ser observado na Tabela 2, estando esse dentro dos limites estabelecidos pela legislação

### 6.1.2. Acidez Fixa, Volátil e Total

A acidez de uma cachaça constitui fator de qualidade importante uma vez que, durante a destilação e o envelhecimento, os ácidos reagem com os álcoois presentes, aumentando e diversificando a formação dos ésteres, que são os principais constituintes responsáveis pelo seu aroma (CAVALCANTI, 2009). Para os valores de acidez total e fixa foram encontrados valores de 51,0 e 3,0 mg/100 mL de álcool anidro, respectivamente. De acordo com os estudos realizados por Ribeiro e Prado-Filho (1997) foram observados que durante o decorrer da destilação as primeiras porções do destilado (fração cabeça) possuem acidez elevada, diminuindo na parte intermediária (fração coração), voltando a se elevar na parte final (fração cauda).

Com relação aos teores de acidez volátil, percebe-se que a amostra analisada apresenta valor abaixo, como mostra a Tabela 2, do limite máximo estabelecido pela Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005 (BRASIL, 2005a), segundo a qual, o limite máximo permitido é de 150 mg de ácido acético por 100mL de álcool anidro. A legislação mantém elevado o limite máximo de acidez volátil, visando proteger a aguardente envelhecida, cuja acidez sempre aumenta com o decorrer do período de envelhecimento. Desse modo, uma aguardente de baixa acidez inicial pode revelar seu grau de maturação pelo aumento da acidez volátil. Isso, todavia, não desqualifica o produto no aspecto sensorial pelo conjunto agradável que forma com outros componentes (ALCARDE; SOUZA; BELLUCO, 2010), uma vez que o aroma e o sabor das bebidas alcoólicas destiladas podem ser atribuídos a esse parâmetro físico-químico (LIMA; NOBREGA, 2004).

A acidez volátil pode ser controlada em vários níveis na produção da cachaça, como por exemplo, na fermentação do mosto em alambiques bem higienizados e na utilização de culturas de leveduras homogêneas, uma vez que a contaminação com bactérias acéticas pode aumentar o teor de ácidos voláteis. Essa análise também depende de fatores como o adequado controle do tempo e temperatura durante o processo fermentativo e manejo do mosto (BOGUSZ JÚNIOR et al., 2006).

### 6.1.3. pH

O pH médio da cachaça empregada foi de 5,32, como apresentado na Tabela 2. Segundo Bizelli et al. (2000), os componentes que conferem maior acidez ao destilado, permanecem em maior proporção na fração “cauda”, conferindo, portanto, significativo aumento dos valores de pH e diminuição da acidez na fração em estudo chamada de fração “coração”.

#### 6.1.4. Análise dos padrões de identidade e qualidade de cachaça

##### 6.1.4.1. Determinação de Componentes Voláteis Majoritários

Os resultados das concentrações dos compostos voláteis majoritários presentes nas amostras estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Valores médios obtidos para concentração de alguns compostos voláteis majoritários presentes nas amostras de cachaça em mg/100 mL de álcool anidro.

<b>Análises</b>	<b>Valor Encontrado</b> (mg/100mL de álcool anidro)	<b>Valor máximo Permitido*</b> (mg/100mL de álcool anidro)
Ésteres totais (expressos em acetato de etila)	78	200
Aldeídos totais (expressos em acetaldeído)	1,5	30
Furfural	1	5
Soma dos álcoois isobutílicos, isoamílicos e n-propílico	200	300

\***Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005**, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Os ésteres são produzidos durante a fermentação pelas leveduras e também durante o envelhecimento pela esterificação de ácidos graxos com etanol, sendo o acetato de etila o componente majoritário deste grupo (FARIA et al., 2003) e responsável pelo odor agradável das bebidas envelhecidas (LITCHEV, 1989). Com relação à concentração de ésteres, percebe-se que a cachaça analisada não apresenta quantidades acima do limite máximo permitido pela legislação, que é de 200 mg/100 mL de álcool anidro. Este resultado era esperado, já que a cachaça utilizada era recém-destilada, e a concentração deste composto aumenta durante o envelhecimento. Resultados estes que vão de acordo com o trabalho realizado por Miranda et al. (2008), que estudaram o perfil físico-químico de aguardente no processo de envelhecimento por 390 dias, verificando que a aguardente envelhecida apresentou maior concentração de ésteres, sendo que a concentração deste composto praticamente triplicou durante o período.

O acetaldeído, responsável por mais de 90% do conteúdo de aldeídos em uísque, conhaque e rum (NYKANEN, 1986; JERONIMO, 2004), apresentou valores dentro do limite estabelecido pela legislação para aldeídos totais (30,0 mg/100 mL de álcool anidro). O aldeído é um composto que diminui a qualidade da cachaça e, quando ingerido, interfere no sistema nervoso central, portanto é importante quantificá-lo, sendo que sua concentração deverá ser o mínimo possível (VILELA et al., 2007).

O conteúdo de furfural nas amostras de aguardente revelou-se abaixo do limite máximo permitido pela legislação brasileira (5 mg/100 mL de álcool anidro). O furfural é resultante da decomposição química de carboidratos, podendo aparecer no caldo de cana, quando a colheita é precedida da queima da folhagem, que acarreta a desidratação parcial de uma pequena fração de açúcares presentes. A desidratação parcial das pentoses leva à formação de furfural (2-furfuraldeído) (NOVAES et al., 1974). O furfural também pode ser formado pela pirogenação de matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques. O envelhecimento tende a aumentar a concentração de furfural, devido à extração e modificações dos componentes da madeira (SINGLETON, 1995; LIMA, 1992).

Com relação aos álcoois superiores, pode-se perceber que a amostra não apresentou concentração superior ao valor máximo permitido (300 mg/100 mL álcool anidro). Esses são provenientes, em grande parte, de reações de degradação de aminoácidos por leveduras, que ocorrem durante o processo de fermentação, como o álcool D-amílico a partir da D-leucina, o álcool isoamílico da L-leucina e o álcool isobutílico a partir da valina. A baixa concentração de álcoois superiores pode estar relacionada com os cuidados no corte da cana, assim como no

tempo de espera para a moagem e fermentação (VILELA et al., 2007), e ainda com o tipo de levedura, estado nutricional do mosto, pH, quantidade de sólidos em suspensão e oxigênio (ZOECKLEIN et al., 2001).

#### 6.1.4.2. Determinação dos Contaminantes

Na Tabela 4 são apresentados os resultados das análises de contaminantes acroleína, álcool metílico, arsênio, chumbo e cobre para a amostra avaliada.

**Tabela 4:** Concentração média de contaminantes nas amostras de cachaça- médias e desvio-padrão de três repetições.

<b>Análises</b>	<b>Valor Encontrado</b>	<b>Valor máximo Permitido*</b>
Acroleína, em mg/100mL de álcool anidro	< 0,98	5
Álcool metílico, em mg/100mL de álcool anidro	3	20
Arsênio, em µg/L	< 8,0	100
Chumbo, em µg/L	< 10,0	200
Cobre, em mg/L	1,4	5

\*Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Pelos valores descritos na Tabela 4, verificam-se que os teores de acroleína, 2-propenal, estão abaixo do limite de 5 mg/ 100mL estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2005). Oriunda do processo de fermentação, a acroleína pode ser formada pela

desidratação do glicerol na presença de ácidos, a quente, quando em contato com superfícies metálicas do destilador ou por contaminação com bactérias termofermentativas (*Bacillus amaraacrylus* e *Lactobacillus colinoides*) (CARDOSO, 2006). É extremamente tóxico por todas as vias de administração e tem mostrado características mutagênicas, além de provocar irritação no trato respiratório de animais e humanos (FLEET, 2003), daí a importância de sua quantificação em estudos de bebidas. Os vapores de acroleína são lacrimogênicos, muito irritantes aos olhos, nariz e garganta, podendo associar sua presença ao aroma de pimenta das bebidas (NASCIMENTO et al., 1997; ZACARONI et al., 2011).

O teor de metanol da amostra analisada está em conformidade com o limite máximo permitido. Este álcool é proveniente da degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar, a partir do metabolismo secundário das leveduras. A presença dessa substância na bebida pode estar associada à má filtragem do caldo, onde a presença de bagacilhos de cana-de-açúcar originados na moagem ou na passagem pela prensa, podem ser degradados a metanol. É considerado um componente orgânico indesejável na aguardente, por ser altamente tóxico ao homem. O metanol, no organismo, é oxidado a ácido fórmico e, posteriormente, a CO<sub>2</sub>, provocando acidose grave (diminuição do pH sanguíneo), afetando o sistema respiratório, o sistema nervoso, particularmente no nervo óptico. Os sistemas de exposição incluem dor de cabeça, náusea, vômito, cegueira, coma e até morte (MAIA et al., 1994).

Quanto à concentração de arsênio, a amostra analisada apresentou teor abaixo do permitido, estando dentro dos valores permitidos pela legislação. Sua presença está associada com um elevado número de intoxicações aguda e crônica, caracterizada por patologias como as cutâneas (hiperpigmentação, hiperqueratose); gastrintestinais (diarreia, hemorragias gastrintestinais); cardiovasculares (arritmias cardíacas, hipotensão e falha congestiva no coração, problemas no sistema circulatório vascular, levando à gangrena); hematológicos (anemia), pulmonares (fibrose); neurológicos (dores de cabeça, coma); endocrinológicos (problemas no metabolismo de carboidratos e respiração celular); reprodutivos e de desenvolvimento como abortos espontâneos e fetos com baixo peso (USEPA, 2000; OMS, 2001b).

Os valores das concentrações de chumbo encontrados na análise da fração coração como apresentado na Tabela 4, encontram-se muito abaixo dos limites estabelecidos pela legislação. O chumbo tem sido objeto de numerosos estudos e de especial vigilância, devido a sua elevada toxicidade e níveis de ocorrência. Uma vez que esse metal entre em contato com

o organismo, ele não sofre metabolização, sendo complexado por macromoléculas, e então, diretamente absorvido e distribuído pelo organismo. Apenas uma pequena parte da quantidade de chumbo ingerido é de fato absorvida na barreira intestinal e transferida através do sangue para os tecidos, sendo susceptível de se acumular sob a forma mineral, principalmente nos tecidos duros (esqueleto, dentes, cabelo). Os efeitos patológicos do metal fazem-se sentir ao nível do sistema sanguíneo, por inibição da síntese de hemoglobina, ao nível do sistema nervoso provocando encefalopatia crônica, problemas neurológicos e psicomotores, ao nível do sistema renal (nefropatia e alteração progressiva da função renal) e ao nível do sistema cardiovascular (Cármen de la Torre, 1997).

Em relação às concentrações de cobre, a amostra analisada apresentou valor abaixo do permitido pela legislação brasileira que limita o teor desse metal em no máximo 5 mg/100mL de álcool anidro. O cobre encontrado em cachaça é proveniente dos alambiques onde esta é destilada. Na etapa de destilação, o alambique sofre um processo de oxidação lenta por ser exposto ao ar úmido contendo gás carbônico resultando em sua cobertura por uma camada esverdeada composta por  $[\text{CuCO}_3 \text{ Cu}(\text{OH})_2]$ , chamada de “azinhavre”. Esta camada é então dissolvida pelos vapores alcoólicos ácidos, também gerados nesse processo, o que acaba contaminando o produto (BOZA; HORII, 2000).

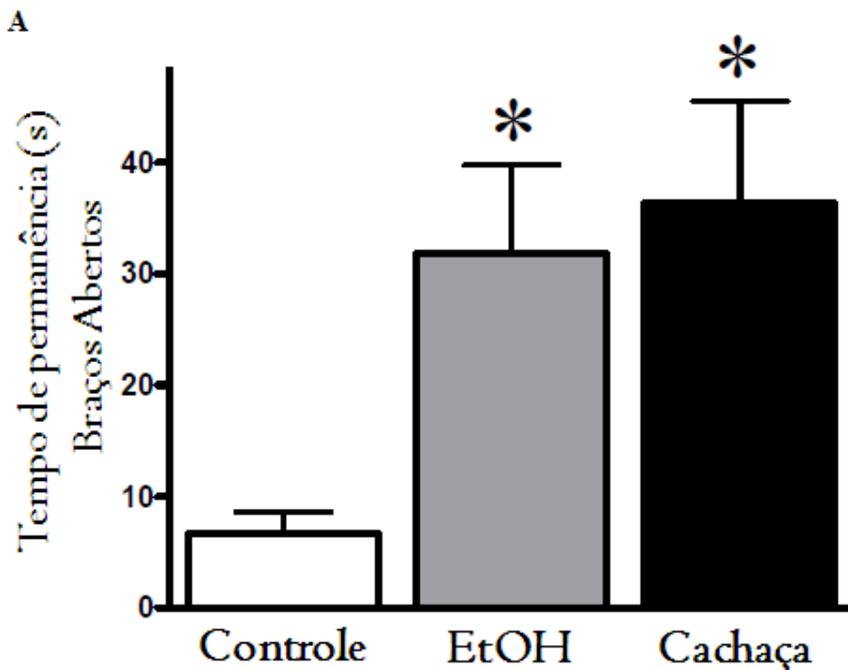
A presença desse metal em pequenas quantidades na bebida é importante para que a aguardente tenha uma boa qualidade sensorial, pois este atua como catalisador de algumas reações reduzindo o teor de compostos sulfurados, aldeídos e a acidez, que conferem ao produto destilado sabor e odor desagradáveis (CARDOSO et al., 2003). No entanto, deve-se ressaltar a importância de sua quantificação, por esse metal quando em altas concentrações ser tóxico ao organismo humano, devido à sua afinidade pelos grupos sulfidrilas de muitas proteínas e enzimas (SARGENTELLI; MAURO; MASSABNI, 1996), podendo acarretar em sérios problemas de saúde.

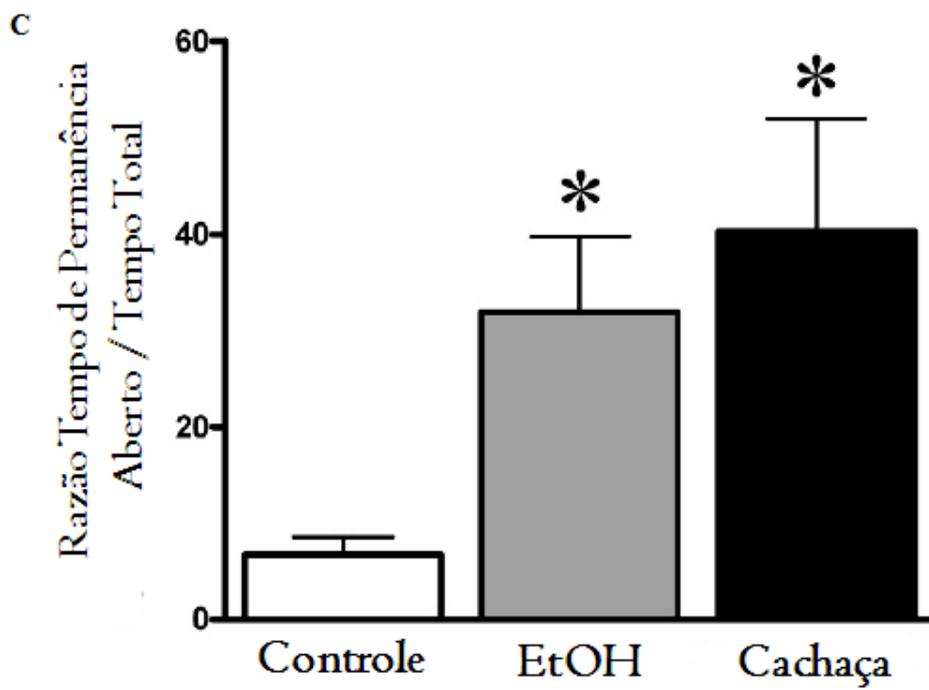
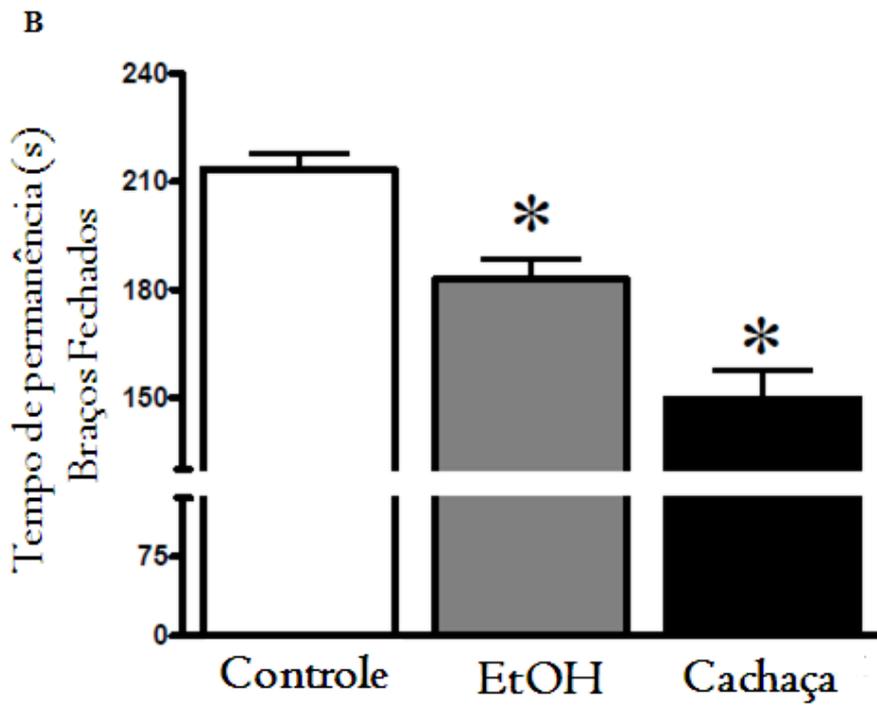
## **6.2. Avaliação Comportamental**

### **6.2.1. Avaliação da atividade ansiolítica**

### 6.2.1.1 Efeito do etanol e da aguardente de cana-de-açúcar no teste do labirinto em cruz elevado

O efeito do etanol e da cachaça sobre o comportamento dos animais nesta metodologia se encontram expressos no gráfico 1. Os animais tratados com o etanol apresentaram alteração significativa em relação ao comportamento do animal nos braços abertos ( $32 \pm 8$  em relação ao controle  $7 \pm 2$ ), e redução no tempo que os animais passaram nos braços fechados ( $183 \pm 6$  vs  $214 \pm 4$ ). A exposição a cachaça promoveu aumento no tempo de permanência dos animais nos braços abertos ( $36 \pm 9$  vs  $7 \pm 2$ ) e concomitante redução do tempo de permanência aos braços fechados ( $150 \pm 8$  vs  $214 \pm 4$ ), em comparação ao grupo controle. Além disso, a razão entre o tempo gasto nos braços abertos e o tempo total gasto em ambos os braços aberto e fechado foi significativamente aumentada em comparação com o controle (etanol  $34 \pm 8$  vs  $6 \pm 2$  s; cachaça  $43 \pm 12$  vs  $6 \pm 2$  s).



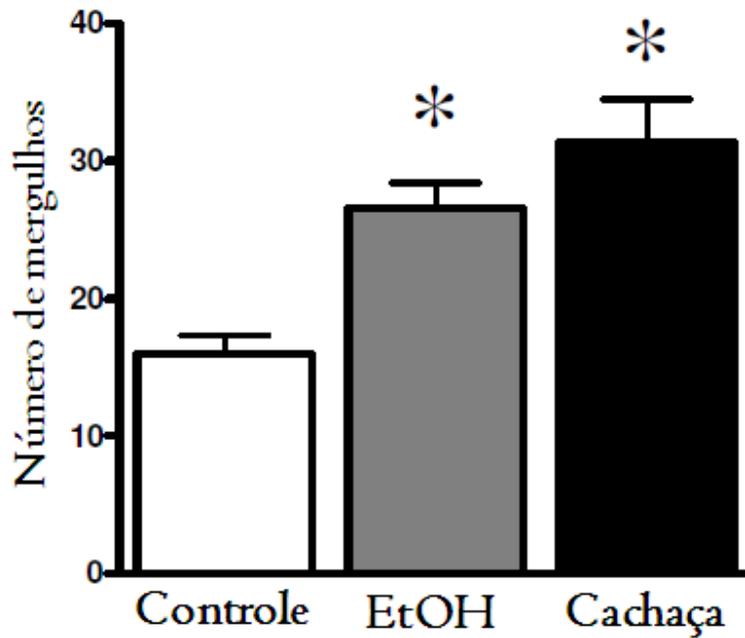


**Gráfico 1-** Efeitos do etanol e da cachaça sobre o tempo de permanência nos braços do labirinto em cruz elevado. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=9), \*  $p < 0,05$  vs respectivo grupo controle controle. **A.** O tempo gasto (em segundos) nos braços abertos durante o período de teste de 5 minutos. **B.** O tempo gasto (em segundos) nos braços fechados durante o período de teste de 5 minutos. **C.** A proporção do tempo gasto nos braços abertos em relação ao total de tempo gasto em ambos os braços durante o período de teste de 5 minutos.

Esses resultados sugerem que o acesso livre à solução de etanol ou de aguardente de cana-de-açúcar ao longo das seis semanas de tratamento é sugestivo da atividade ansiolítica quando os camundongos são testados no labirinto em cruz elevado. De acordo com o que propõem Nogueira et al. em 1998, a redução da aversão aos braços abertos ou a menor afinidade aos braços fechados sugerem afeito ansiolítico uma vez que como afirma Almeida et al.(2004), os roedores, sob condições comportamentais normais, ou seja, na ausência de estímulos que desencadeiem em “possível estado ansioso”, têm maior preferência para braços fechados, que são considerados mais seguros e menos iluminados.

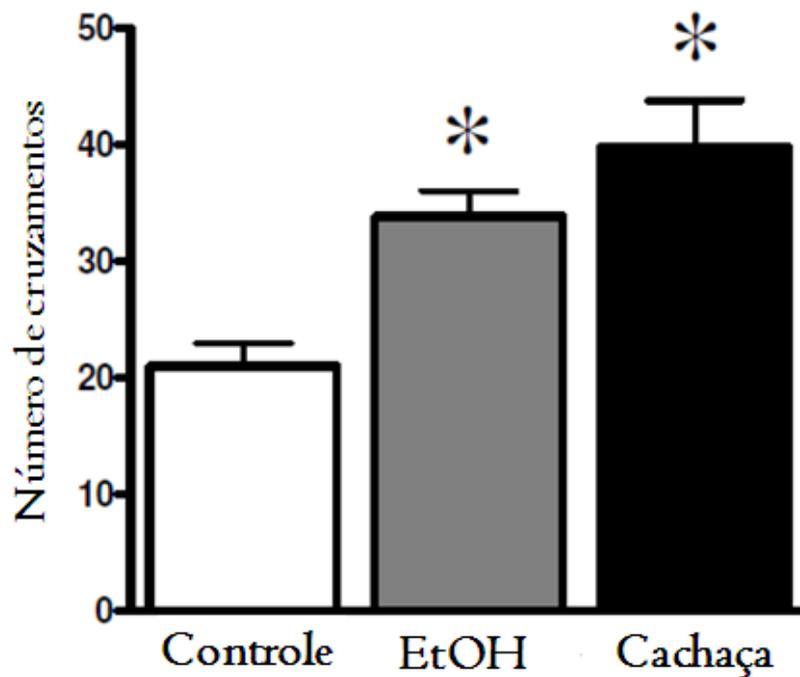
#### 6.2.1.2 Efeito do etanol e da aguardente de cana-de-açúcar no teste da placa perfurada

No teste da placa perfurada o tratamento com o etanol conseguiu aumentar significativamente o número de mergulhos de cabeça do animal nos orifícios ( $27 \pm 2$  vs  $16 \pm 1$ ), resultado também observado pelo grupo tratado com cachaça ( $31 \pm 3$  vs  $16 \pm 1$ ), conforme gráfico 2.



**Gráfico 2** – Efeitos do etanol e da cachaça sobre o número de mergulhos nos orifícios no teste da placa perfurada. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=9), \*  $p < 0,05$  vs respectivo grupo controle (Teste “t” de Student não pareado).

O gráfico 3 mostra que os animais tratados com etanol ( $34 \pm 2$  vs  $21 \pm 2$ ) e com cachaça ( $40 \pm 4$  vs  $21 \pm 2$ ), foram capazes de aumentar a atividade locomotora caracterizada pelo aumento de cruzamentos entre os quadrantes demarcados do equipamento da placa perfurada.



**Gráfico 3** – Efeitos do etanol e da cachaça sobre a atividade exploratória dos animais, expressos pelo número de cruzamentos entre os quadrantes no teste da placa perfurada. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=9), \*  $p < 0,05$  vs respectivo grupo controle (Teste “t” de Student não pareado).

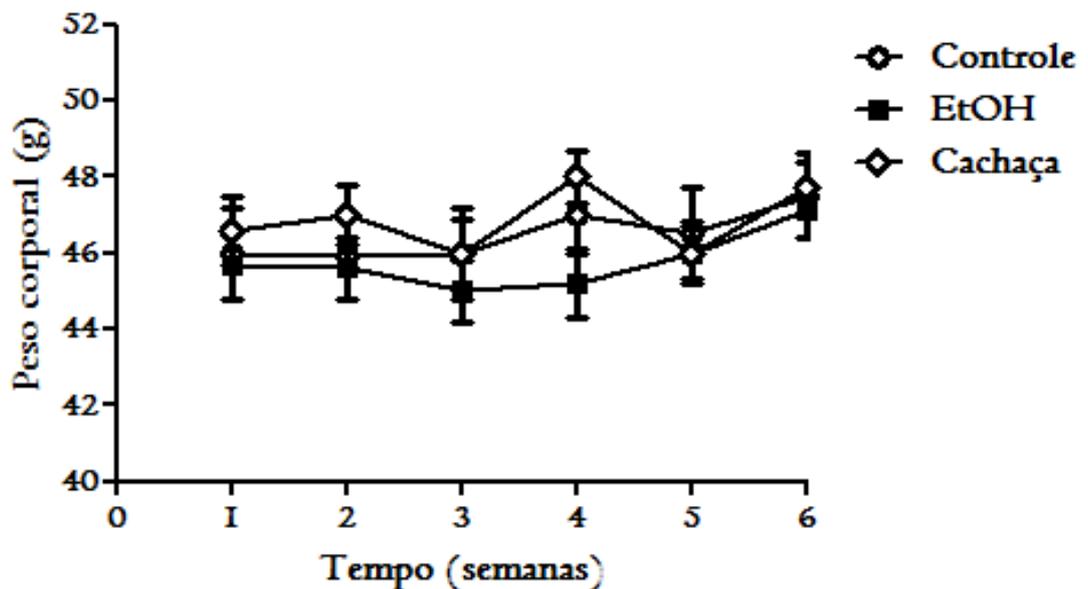
O aumento das atividades exploratórias e o do número de mergulhos no teste da placa perfurada também são considerados resultados favoráveis na avaliação da atividade ansiolítica da aguardente de cana-de-açúcar. Segundo Chen et al. (2005) a placa perfurada possui atualmente popularidade como um modelo de ansiedade, oferecendo um método simples na mensuração da resposta do animal a um ambiente não familiar, com a vantagem de que muitos comportamentos podem ser quantificados no teste.

Saitoh, Hirose, Yamada et al. (2006) afirmaram que o uso do método da placa perfurada como um teste válido na busca de ansiolíticos tem sua crença na hipótese que o comportamento dos animais expostos a uma situação nova resulta numa competição entre sua tendência exploratória e sua tendência de abster-se de explorar. Desta forma, de acordo com esta hipótese, um alto nível de ansiedade resulta na redução do comportamento de mergulho da cabeça, e um nível decrescente de ansiedade se manifesta no aumento do comportamento de mergulhos, sendo este, portanto o parâmetro primordial do teste.

### 6.3. Avaliação das Alterações Metabólicas

#### 6.3.1 Efeito da aguardente de cana-de-açúcar na evolução ponderal

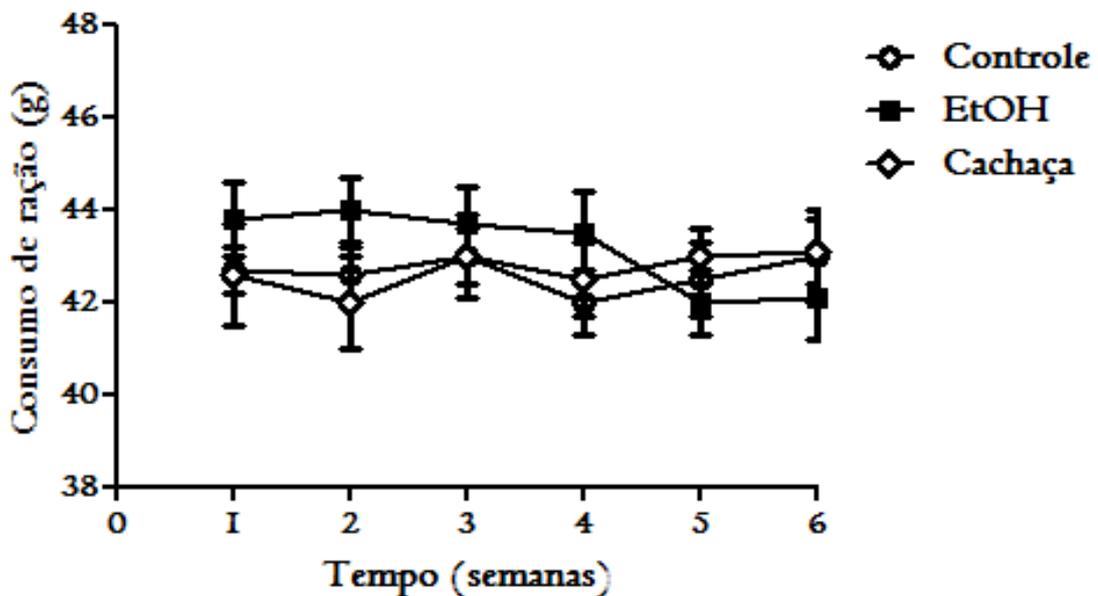
Os resultados expressos no gráfico 4 mostram que o tratamento com a cachaça não interferiu no ganho de peso normal dos animais durante as seis semanas de avaliação (1<sup>a</sup>:  $46,6 \pm 0,9$  e 6<sup>a</sup>:  $47,7 \pm 0,7$ ) em relação ao controle ( $46,0 \pm 1,2$ ;  $47,5 \pm 1,1$ ; respectivamente). O grupo tratado com etanol apresentou resultados estatísticos do ganho ponderal nas seis semanas semelhantes aos demais grupos ( $45,7 \pm 0,9$ ;  $47,1 \pm 1,1$ ).



**Gráfico 4** – Efeito do tratamento crônico com cachaça sobre a evolução ponderal de camundongos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=15), \*p<0,05 vs grupo controle (Teste t-Student).

#### 6.3.2 Efeito da aguardente de cana-de-açúcar no consumo de ração

As médias de peso de ração em gramas obtidas com os camundongos tratados com a cachaça na primeira ( $42,6 \pm 1,1$ ) e sexta semanas ( $43,1 \pm 0,7$ ) mostram que o tratamento com a referida substância não interferiu no consumo de ração ao longo dos 42 dias de tratamento, quando comparadas as do grupo controle ( $42,7 \pm 0,5$ ;  $43,0 \pm 1,0$ ; respectivamente). Os camundongos tratados com etanol não apresentaram alterações no consumo de ração nas seis semanas ( $43,0 \pm 0,8$ ;  $42,1 \pm 0,9$ ), quando comparadas ao controle, como mostra a gráfico 5.



**Gráfico 5** – Efeito do tratamento crônico com cachaça sobre o consumo de ração de camundongos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. ( $n=15$ ),  $*p<0,05$  vs grupo controle (Teste t-Student).

A definição desse parâmetro é um componente essencial no estudo, pois uma nutrição adequada é essencial para o estado fisiológico dos animais e para garantir que a resposta a uma droga testada seja confiável e não uma "falsa" resposta inadequada devido a deficientes condições nutricionais (STEVENS; MYLECRAINE, 1994; IVERSEN; NICOLAYSEN, 2003).

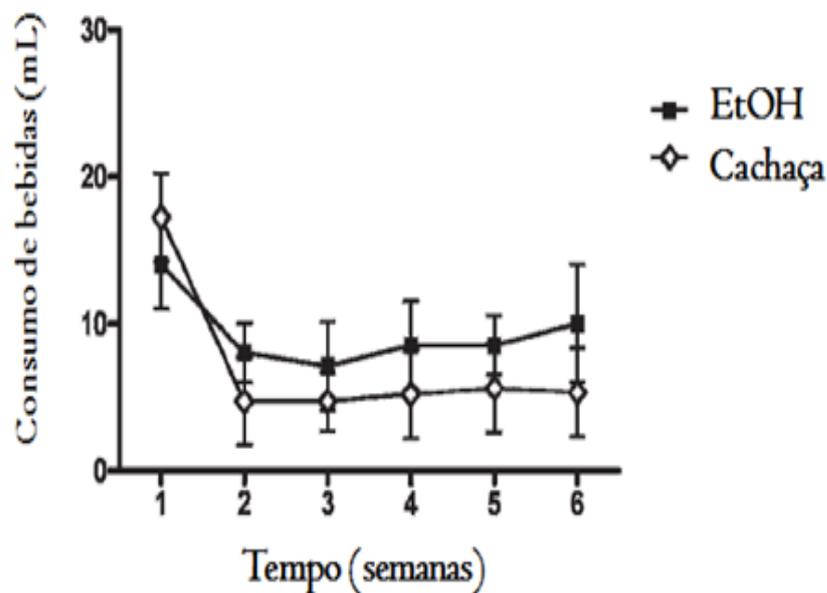
### 6.3.3 Efeito da aguardente de cana-de-açúcar no consumo de bebidas e água

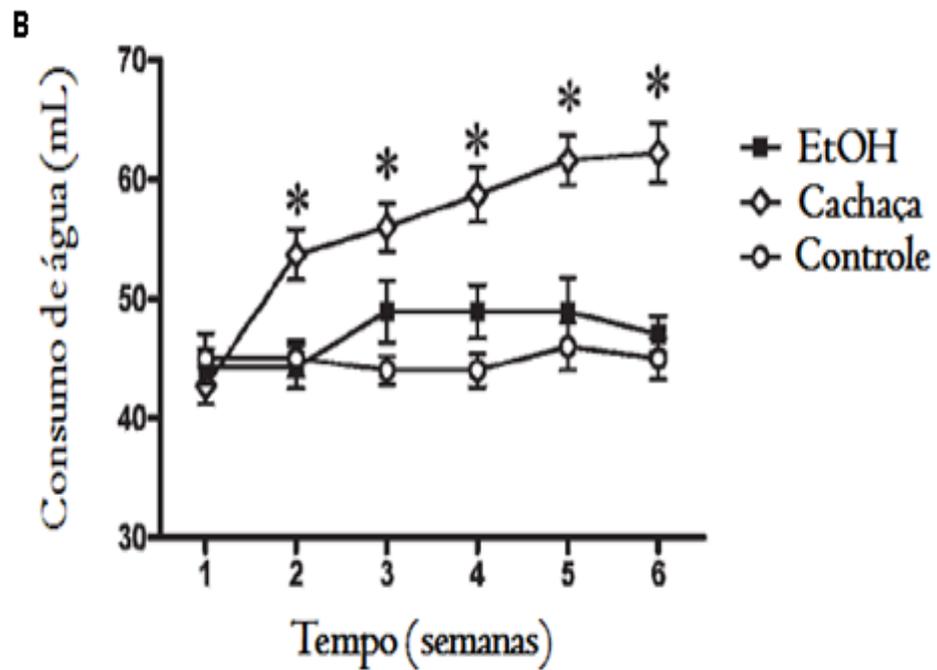
Conforme o gráfico 6, os animais tratados com cachaça e etanol não apresentaram alterações quanto ao consumo destas bebidas nas seis semanas de observação, em comparação ao grupo controle.

O grupo que recebeu cachaça exibiu aumento do consumo de água a partir da segunda semana até a sexta ( $53,7 \pm 2,1$ ;  $62,2 \pm 2,5$ ), quando comparadas aos camundongos tratados com etanol ( $44,3 \pm 1,8$ ;  $47,0 \pm 1,5$ , respectivamente), não sendo observado efeito na primeira semana de avaliação, como mostra a gráfico 6.

A cachaça é conhecida popularmente por induzir ressacas mais severas, apresentando diversos sintomas característicos (por exemplo, dores de cabeça, tremores, náuseas, diarreias, aumento da liberação de vasopressina e sede) (WIESE; SHLIPAK; BROWNER, 2000). Esses fatores podem ser sugeridos como responsáveis pelo aumento do consumo de água em comparação ao grupo tratado com etanol, justificados pela presença na composição da cachaça, além deste, de outros álcoois superiores e aldeídos.

A



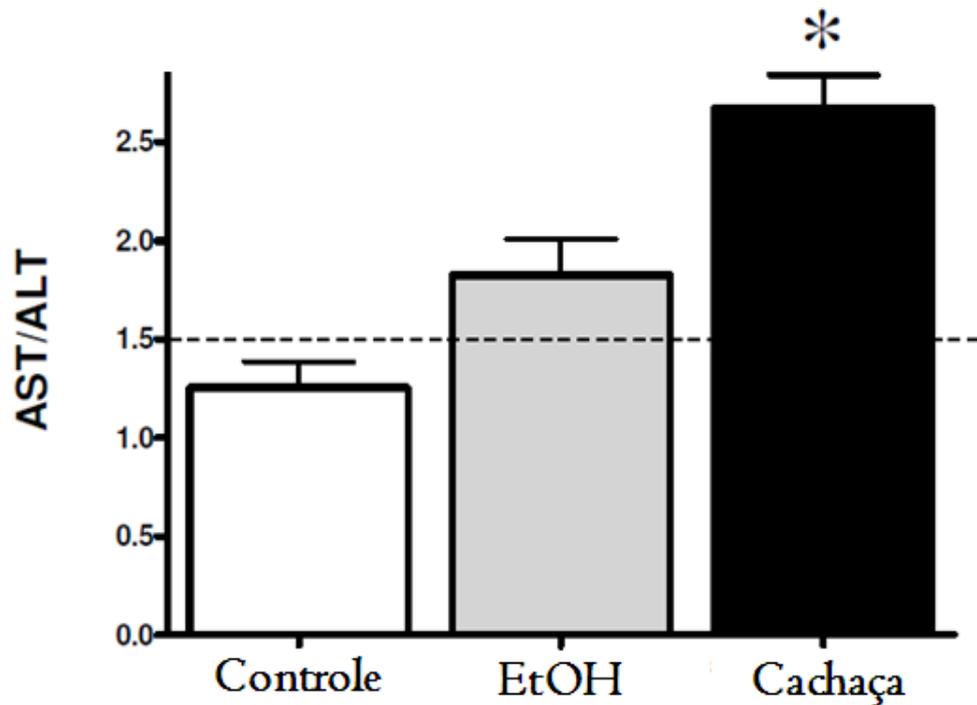


**Gráfico 6 – A.** Avaliação do consumo de etanol e cachaça em camundongos em seis semanas de tratamento. **B.** Efeito do tratamento crônico com cachaça sobre o consumo de água de camundongos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=15), \* $p < 0,05$  vs grupo controle (Teste t-Student).

#### 6.4. Avaliação Bioquímica

##### 6.4.1 Efeito de aguardente de cana-de-açúcar nos parâmetros bioquímicos

De acordo com o gráfico 7, o tratamento com etanol ( $1,82 \pm 0,18$ ), embora com uma razão AST/ALT maior que 1,5 indicativo de uma injúria hepática, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros bioquímicos analisados, em comparação aos animais do grupo controle ( $1,29 \pm 0,17$ ). Já os camundongos tratados com cachaça apresentaram um aumento significativo dos níveis da razão AST/ALT ( $2,67 \pm 0,17$ ), em relação ao grupo controle.



**Gráfico 7** – Efeito do tratamento crônico com cachaça sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. (n=12); \*p<0,05 vs grupo controle (Teste t-Student).

As consequências do abuso do álcool afetam todo o organismo humano, porém causa maiores efeitos no fígado, podendo estes ser reversíveis nas fases iniciais ou irreversíveis, podendo levar o paciente a óbito. O diagnóstico laboratorial baseado na investigação dos níveis séricos das enzimas tem imensa importância clínica. Como células metabolicamente complexas, os hepatócitos contêm concentrações elevadas de inúmeras enzimas. Com a lesão hepática, o dano irreversível à membrana seguido de morte da célula, leva ao extravasamento destas enzimas para o plasma e podem ser úteis para o diagnóstico e monitoramento da lesão hepática. No hepatócito, as enzimas comumente medidas são encontradas em localizações específicas, podendo ser citoplasmáticas como a alanina aminotransferase (ALT), e mitocondriais, como a isoenzima mitocondrial da aspartato aminotransferase (AST) (HENRY, 2008). A relação entre as aminotransferases AST/ALT (Índice DeRites) é empregada para auxiliar no diagnóstico diferencial das hepatopatias. Nos casos de hepatopatia alcoólica, os níveis de ALT encontram-se, frequentemente, menos elevados que os da AST, observando uma proporção  $AST/ALT > 1,5$ . Os resultados obtidos mostram que há indício enzimático de

comprometimento hepático nos animais tratados com etanol e cachaça. No entanto, foram observados valores aumentados significativamente nos camundongos tratados com cachaça em comparação aos demais grupos, os quais podem ser atribuídos a outros componentes presentes nessa bebida, como compostos orgânicos (álcoois superiores, ácidos, ésteres, aldeídos e cetonas) e espécies inorgânicas (Ca, Fe, Mg, K e Na) (NONATO et al., 2001).

*Conclusões*

---

## 7 – CONCLUSÕES

Com base nos dados experimentais é possível concluir que o consumo crônico da aguardente de cana-de-açúcar produz lesão hepática e efeitos ansiolíticos em camundongos. A lesão hepática mais acentuada causada pela aguardente de cana-de-açúcar sugerida pela relação AST / ALT pode ter sido causado por compostos orgânicos presentes na cachaça, enquanto o efeito ansiolítico de parece ser causado pela ação do etanol e outros compostos presentes na aguardente de cana-de-açúcar.

*Referências*

---

## 8 - REFERÊNCIAS

ABRAMET. Ministério da Saúde atribui queda de 23% em acidentes de trânsito à lei seca.2009a. Disponível em: [www.abramet.org/Site/Pagina.aspx?ID=751&MenuID=16#](http://www.abramet.org/Site/Pagina.aspx?ID=751&MenuID=16#)

ANDREUCCETTI, G.; CARVALHO, H.B.; CARVALHO PONCE, J.; CARVALHO, D.G.; KAHN, T.; MUÑOZ, D.R.; LEYTON, V. Alcohol consumption in homicide victims in the city of São Paulo. **Addiction**, v.104, n.12, p.1998-2006, 2009.

ALMEIDA, R. **Psicofarmacologia: Fundamentos práticos**, 1ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ALCARDE, A.R.; SOUZA, P. A.; BELLUCO; A.E.S. Aspects of the chemical composition and sensorial acceptance of sugar cane spirit aged in casks of different types of woods. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, p. 226-232, 2010.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Transtornos relacionados a substâncias. **In: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais**, 4ª edição, Porto Alegre: ARTMED Editora, 2003.

ANSTEY, K.J.; JORM, A.F.; REGLADE-MESLIN, C.; MALLER, J.; KUMAR, R.; VON SANDEN, C.; WINDSOR, T.D.; RODGERS, B.; WEN, W.; SACHDEV, P. Weekly Alcohol Consumption, Brain Atrophy, and White Matter Hyperintensities in a Community-Based Sample Aged 60 to 64 Years. **Psychosomatic Medicine**, v.68, p. 778-785, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BEBIDAS. Produção de cachaça 2003. Disponível em: <<http://www.abrabe.org.br/cachaca>>. Acesso em: 20 abr. 2011.

BAAN, R.; STRAIF, K.; GROSSE, Y.; SECRETAN, B.; GHISSASSI, F.E.; BOUVARD, V.; ALTIERI, A.; COGLIANO, V. Carcinogenicity of alcoholic beverages. **Lancet Oncology**, v. 8, p.292–293, 2007.

BALIUNAS, D.O.; TAYLOR, B. J.; IRVING, H.; ROERECKE, M.; PATRA, J.; MOHAPATRA, S.; REHM, J. Alcohol as a risk factor for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 32, p.2123–2132, 2009b.

BALLONE, G. J. Ansiedade. Disponível em: [http:// www.psiqweb.med.br](http://www.psiqweb.med.br) Revisto em janeiro de 2005. Acesso: Maio de 2011.

BEDFORD, A.; MCIVER, D. A “general instability” and “psychopathy”16PF scales and their relationship to psychiatric mood state. **J Clin Psychol**, v.34, p.417–418, 1978.

BEECROFT, J.; KEMP, A.; LASSILA, S.; SHEEDY, D.; WARD, E. The Biochemical and Pathophysiological Effects of Alcohol Consumption. **Christian Spirituality and Science**, v. 8, p.25-43, 2010.

BITTENCOURT, S.A.; OLIVEIRA, M.S.; SOUZA, C. C. Study of the relation between social phobia and drinking alcohol. **Rev. bras.ter. cogn.**, v.1, n.2, 2005.

BIZELLI, L.C. Influência da condução da dupla destilação nas características físico-químicas e sensoriais da aguardente de cana. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2000.

BLOMBERG, R.D.; PECK, R.C.; MOSKOWITZ, H.; BURNS, M.; FIORENTINO, D. The Long Beach/Fort Lauderdale relative risk study. **J. Safety Res.**, v. 40, p.285–292, 2009.

BOERNGEN-LACERDA, R.; SOUZA-FORMIGONI, M.L.O. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v.67, n.2, p.225-232, 2000.

BOGUSZ JÚNIOR, S.; KETZER, D. C. M.; GUBERT, R.; ANDRADES, L.; GOBO, A. B. Composição química da cachaça produzida na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, 793-798, 2006.

BOISSIER, J. R.; SIMON, P. La reaction d'exploration chez la souris. **Thérapie**, v. 17, p. 1225–1232, 1962.

BOISSER, J. R.; SIMON, P. Dissociation de deux composantes dans le compartiment d'investigation de la souris. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 147, p. 372–387, 1964.

BOISSER, J. R.; SIMON, P.; SOUBRIE, P. In: Central Nervous System and Behavioural Pharmacology, Oxford: Pergamon Press, p. 213-222, 1976.

BOZA, Y.; HORII, J. Influência do grau alcoólico e da acidez do destilado sobre o teor de cobre na aguardente. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 3, n. 20, p. 279-284, 2000a.

BRASIL, Ministério da Saúde - A política do Ministério da Saúde de atenção integral a usuários de álcool e outras drogas, 2ª edição, Brasília, 2004a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.13 de 29 de junho de 2005<sup>a</sup>. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 03 abril 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O setor produtivo da cachaça. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 21 abr. 2011.

BROWN, A. K.; GEORGE, D. T.; FUJITA, M.; LIOW, J. S.; ICHISE, M.; HIBBELN, J.; GHOSE, S.; SANGARE, J.; HOMMER, D.; INNIS, R. B. PET [11C]DASB imaging of serotonin transporters in patients with alcoholism. **Alcohol Clin Exp Res**, v.31, n.1, p. 28-32, 2007.

CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. N.; FRANCO, D. W.; NASCIMENTO, R. F. Influência do material do destilador na composição química das aguardentes de cana. **Quím. Nova.**, v. 26, n. 2, p. 165-169, 2003.

CARDOSO, M.G. (Ed.). **Produção de aguardentes de cana –de- açúcar**. 2ª edição, Lavras: UFLA, 2006.

CARLINI, E. A.; GALDUROZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; FONSECA, A. M.; CARLINI, C. M.; OLIVEIRA, L. G.; NAPPO, S. A.; MOURA, Y. G.; SANCHEZ, Z. V. M. II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do País – 2005; Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas, 2007.

CARMEN DE LA TORRE, M. Les contaminants du vin, aspects toxicologiques et de sécurité alimentaire. **Analisis**, v. 25, n.3, p.21-26, 1997.

CARRIGAN, M. H.; RANDALL, C. Self-medication in social phobia: a review of the alcohol literature. **Addictive Behaviors**, v.28, p. 269-284, 2003.

CAVALCANTI, A. F. Bidestilação em alambiques contendo dispositivos de prata e cobre e sua influência na qualidade da cachaça. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Araraquara, 2009.

CHEDID, A.; MEIRDENHALL, C.L.; GARTSIDE, P.; FRENCH, S.W.; CHEN, T.; RABIN, L. Prognostic factors in alcoholic liver disease. VA Cooperative Study Group. **Am J Gastroenterology**, v.36, p. 210 - 216, 1991.

CHEN, S.; WANG, W.; LI, W.; WANG, R.; LI, Y.; HUANG, Y.; LIANG, X. Anxiolyticlike effects of asiaticoside in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v.85, p. 339-344, 2006.

CHOU, I.; NARASIMHAM, K. Neurobiology of addiction. **Nature neuroscience**, v.8, n.11, p. 1427, 2005.

CLAPP, P.; BHAVE, S.V.; HOFFMAN, P.L. How Adaptation of the Brain to Alcohol Leads to Dependence: A Pharmacological Perspective. **Alcohol Research and Health**, v.31, n.4, p. 310-340, 2008.

CORREIA, D.; RIBEIRO, A.F.; BRUNIALTI GODARD, A.L.; BOERNGEN LACERDA, R. Trait anxiety and ethanol: anxiolysis in high-anxiety mice and no relation to intake behavior in an addiction model. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.33, p.880-8, 2009.

CUNNINGHAM, C. L.; FIDLER, T. L.; HILL, K. G. Animal models of alcohol's motivational effects. **Alcohol Res Health**, v.24, p.85-92, 2000.

DAS, D.K.; MAULIK, N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. **Mol Interv.**, v.6, n.1, p.36-47, 2006.

DAS, D.K.; MUKHERJEE, S.; RAY, D. Resveratrol and red wine, healthy heart and longevity. *Heart Fail Rev.* 2010.

DAWS, L. C.; MONTANEZ, S.; MUNN, J. L.; OWENS, W. A.; BAGANZ, N.L.; BOYCE-RUSTAY, J. M.; MILLSTEIN, R. A.; WIEDHOLZ, L. M.; MURPHY, D. L.; HOLMES, A. Ethanol inhibits clearance of brain serotonin by a serotonin transporter-independent mechanism. **J Neurosci**, v. 26, n.24, p. 6431-6438, 2006.

DUBOWSKI, K.M. Alcohol determination in the clinical laboratory. **Am J Clin Pathol**, v.74, n.5, p.747-50, 1980.

FADEN, V. Recent Developments in Alcoholism: alcohol Problems in Adolescents and Young Adults. San Francisco : Kluwer Academic /Plenum Publishers, 2005.

FARIA, J. B.; FERREIRA, V.; LOPEZ, R.; CACHO, J. The sensory characterisitic defect of “cachaça” distilled in the absence of copper. **Alim. Nutr.**, v. 14, n. 1, p. 11-22, 2003a.

FELTENSTEIN, M. W.; SEE, R. E. The neurocircuitry of addiction: an overview. **Br J Pharmacol**, v. 154, n. 2, p. 261-274, 2008.

FILIPPIN, F.B.; REIS, K.; CEMIN, L.; DUZZIONI, M.; HERMES, E.M.; SOUZA, L.C. Novo Intervalo de Referência para Alanina Aminotransferase Usando o Sistema Automatizado de Bioquímica Dade Behring Ar Dimension. **NewsLab**, v. 65, p.148-160, 2004.

FISHER, J.C.; BANG, H.; KAPIGA, S.H. The association between HIV infection and alcohol use: A systematic review and meta-analysis of African studies. **Sexually Transmitted Diseases**, v.34, p. 856-63, 2007.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavor. **Food Science Technology**, v. 86, p. 11, 2003.

FONTES, A.; FIGLIE, N. B.; LARANJEIRA, R. Drinking behaviour between alcohol users: a follow-up study. **Rev. Psiq. Clín.** , v.33, n. 6, p. 304-312, 2006.

GENDEL, M. H. Substance misuse and substance-related disorders in forensic psychiatry. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 29, p. 649-673, 2006.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos em Farmacologia**. São Paulo: Atheneu, 1999.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, 2000, 240p.

GILPIN, N.W.; KOOB, G.F. Neurobiology of alcohol dependence. **Alcohol research and health**, v.31, n.3, p. 185-195, 2008.

GUO, R.; REN, J. Alcohol and acetaldehyde in public health: from marvel to menace. **Int J Environ Res Public Health**, v.7, p.1285-301, 2010.

GUNZERATH, L.; HEWITT, B.G.; LI, T.K.; WARREN, K.R. Alcohol research: past, present, and future. **Ann N Y Acad Sci.**, v.1216, p.1-23, 2011.

HEINZ, A.; GOLDMANN, D. Genotype effects on neurodegeneration and neuroadaptation in monoaminergic neurotransmitter systems. **Neurochem Inter**, v.37, p.425-432, 2000.

HYYTIA, P.; KOOB, G.F. GABAA receptor antagonism in the extended amygdala decreases ethanol self-administration in rats. **European Journal of Pharmacology** v.283, p.151-159, 1995.

HODGE, C.W.; SAMSON, H.H.; AND CHAPPELLE, A.M. Alcohol self-administration: Further examination of the role of dopamine receptors in the nucleus accumbens. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.21, n.6, p.1083-1091, 1997.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª ed., 1ª Ed. Digital, São Paulo: 2008.

IBRAC. Instituto brasileiro da cachaça. Apresenta dados sobre o mercado de cachaça. Disponível em: < <http://www.ibrac.net>>. Acesso em: 14 de mar. 2011.

IBRAC. Instituto brasileiro da cachaça. **Mercado externo**. Disponível em: <http://www.ibrac.net>. Acesso em: 22 fev. 2011a.

IBRAC. Instituto brasileiro da cachaça. **Mercado interno**. Disponível em: <http://www.ibrac.net>. Acesso em: 22 fev. 2011b.

JAMAL, Y.; BOERNGEN-LACERDA, R. **Avaliação do efeito da Mianserina sobre o padrão de consumo de álcool em camundongos**. Dissertação – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JERONIMO, E. M. **O nitrogênio protéico na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2004.

JOHNSON, B. A. Progress in the development of topiramate for treating alcohol dependence: from a hypothesis to a proof-of-concept study. **Alcohol Clin Exp Res**, v.28, n.8, p. 1137-1144, 2004.

KANDELL, E.R.; SCHAWARTZ, J. H. ; JESSEL, T.M. Fundamentos da neurociência e do comportamento. **Ed. Guanabara-Koogan** : Rio de Janeiro, 2000.

KOOB, G. F. Animal models of craving for ethanol. **Addiction**, v.95, p. 73-81, 2000.

KOOB, G.F.; NESTLER, E.J. The neurobiology of drug addiction. **J. Neuropsychiatry Clin Exp Res**, v. 9, p. 482-497, 1997.

KOOB, G.F. A role for GABA mechanisms in the motivational effects of alcohol. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n.8, p.1515–1525, 2004.

KOOB, G. F. Dynamics of neuronal circuits in addiction: reward, antireward, and emotional memory. **Pharmacopsychiatry**, v. 42, p. 32-41, 2009a.

KORNETSKY, C.; ESPOSITO, R. U. Euphorogenic drugs: effects on the reward pathways of the brain. **Fed Proc**, v. 38, n. 11, p. 2473-2476, 1979.

LARANJEIRA, R.; PINSKY, I.; ZALESKI, M.; CAETANO, R. I Levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira: 2007.

LASO, F.J.; ALMEIDA, J.; TORRES, E.; VAQUERO, J.M.; MARCOS, M.; ORFAO, A. Chronic alcohol consumption is associated with an increase in the cytotoxic profile of circulating lymphocytes that may be related with the development of liver injury. **Alcoholism: Clinical and Experimental**, v.34, n. 5, p. 35-43, 2010.

LESCH, K. P. Alcohol dependence and gene x environment interaction in emotion regulation: is serotonin the link? **Eur Journ Pharmacol**, v. 526, p. 113-124, 2005.

LESSOV, C.N.; PALMER, A.A.; QUICK, E.A.; PHILLIPS, T.J.. Voluntary ethanol drinking in C57BL/6J and DBA/2J mice before and after sensitization to the locomotor stimulant effects of ethanol. **Psychopharmacology**, v.155, p.91–99, 2001.

LIMA, U. A. Produção nacional de aguardentes e potencialidade dos mercados internos e externos. In: MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. (Eds). Aguardente de cana: produção e qualidade. FUNEP, p.151-163, 1992.

LIMA, D. R. **Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia**. Rio de Janeiro; Editora Médica e Científica Ltda., v.1, p.892, 2003.

LIMA, A. K. S.; NOBREGA, I. C. C. Avaliação de parâmetros de qualidade em aguardentes de cana produzidas no Estado da Paraíba. **Boletim CEPPA**, v. 22, n. 1, p. 79-103, 2004.

LIMOSIN, F.; LOZE, J. Y.; ROUILLON, F.; ADÈS, J.; GORWOOD, P. Association between dopamine receptor D1 gene DdeI polymorphism and sensation seeking in alcohol-dependent men. **Alcohol and Clinical Experimental Research**, v.27, n.8, p.1226-8, 2003.

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

LITCHEV, V. Influence of oxidation process on the development of the taste and flavor of wine distillates. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 40, n. 1, p. 31-35, 1989.

LOVINGER, D. M. Alcohols and neurotransmitter gated ion channels: past, present and future. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol**, v. 356, p. 267-282, 1997.

LOVINGER, D. M. Communication Networks in the Brain Neurons, Receptors, Neurotransmitters, and Alcohol. **Alcohol Research & Health**, v. 31, n. 3, p.196-214, 2008.

LU, Y.; WU, D.; WANG, X.; WARD, S.C.; CEDERBAUM, A.I. Chronic alcohol induced liver injury and oxidant stress are decreased in cytochrome P4502E1 knockout mice and restored in humanized cytochrome P4502E1 knock-in mice. **Free Radic Biol Med.**, v.49, p.1406-16, 2010.

MAIA, A. B. Componentes Secundários da Aguardente. **STAB**, v. 12, n. 6, p. 29-34, 1994.

MANN, R.E.; SMART, R.G.; ANGLIN, L.; ADLAF, E.M. Reductions in cirrhosis deaths in the United States: association with per capita consumption and AA membership. **J Stud Alcohol.**, v.52, n.4, p.361-5, 1991.

MARINHO, A.V.; RODRIGUES, J. P. M.; SIQUEIRA, M. I. D. Avaliação da acidez volátil, teor alcoólico e de cobre em cachaças artesanais. **Estudos**, v. 36, n. 1/2, p. 75-93, 2009.

MEISCH, R. A. Oral drug self-administration: an overview of laboratory animal studies. **Alcohol**, v.24, p. 117-128, 2001.

MINCIS, M. Doença Hepática Alcoólica. In: Mincis M, editor. **Gastroenterologia & Hepatologia: diagnóstico e tratamento**. 3ª Edição, São Paulo: Lemos; 2002. p. 695-716.

MINCIS M. Doença hepática alcoólica: diagnóstico e tratamento. **Diagn Tratamento**, v.9, n.2, p.52-60, 2004.

MIRANDA, M.B.; MARTINS, N.G.S.; BELLUCO, A.E.S.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Chemical profile of aguardente - Brazilian sugar cane alcoholic drink - aged in oak casks. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.28, p. 84-89, 2008.

MOGENSEN, G. J.; JONES, D. L; YIM, C. Y. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. **Prog Neurobiol**, v. 14, n. 2-3, p. 69-97. 1980.

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.

MOZLEY, L. H.; GUR, R. C.; MOZLEY, P. D.; GUR, R. E.. Striatal dopamine transporters and cognitive functioning in healthy men and women. **American Journal of Psychiatry**, v.158, p.1492-1499, 2001.

NASCIMENTO, R.F.; BEZERRA, C.W.B.; FUTUYA, S.M.B.; DE SANTÍ, I.A.A.; CAMPO,P.; POLASTRO, L.R.; SCULTZ, M.S.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. A presença de metais nas caninhas brasileiras. **O Engarrafador Moderno**, v.52, p.70-76, 1997b.

NAZAR, M.; SIEMIATKOWSKI, M.; CZLONKOWSKA, A.; SIENKIEWWICZ, H.; PLAZNIK, A. The role of the hippocampus and 5-HT/GABA interaction in the central effects of benzodiazepine receptor ligands. **Journal of Neural Transmission**, v. 106, p.369-381, 1999.

NESTLER, E. J.; Is there a common molecular pathway for addiction? **Nature neuroscience**, v.8, n.11, p. 1445 – 1449, 2005.

NIAAA. **Tenth Special Report to the US Congress on Alcohol and Health from the Secretary of Health and Human Services**. Rockville, M.D.: US Department of Health and Human Services, 2000.

NIAAA. **Alcoholism: getting the facts**. NIH Publications nº 964153. Bethesda, M.D.: US Department of Health and Human Services, 2001.

NIEMELÄ, O.; ALATALO, P. Biomarkers of alcohol consumption and related liver disease. **Scand J Clin Lab Invest.**, v.70, p.305-12, 2010.

NICCOLS, A. Fetal alcohol syndrome and the developing socio-emotional brain. **Brain Cogn**, v. 65, n. 1, p. 135-142, 2007.

NOVAES, F.V. Tecnologia da aguardente. Piracicaba: Centro Acadêmico Luiz de Queiroz, 1974.

NYKÄNEN, L. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **Am. J. Enol. Viticult**, v. 37, n. 1, p. 84-96, 1986.

OLDS, J.; MILNER, P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. **J Comp Physiol Psychol**, v. 47, p. 419-427, 1954.

OLIVEIRA, A.K.P.; LINS, N.F.; ANDRADE, A.C.P.A.; SANTOS, D.L.; SILVA, M.S.P.; BORBA, J. M.C.; ROCHA-DE-MELO, A. P. Early effect of alcohol and overnutrition in adult rats on the performance of the elevated plus maze. **NEUROBIOLOGIA**, v.72, p. 57-64, 2009.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water, Geneva, 2001. Disponível em: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/arsenic3/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/arsenic3/en/)>. Acesso em: 14 mar. 2011.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global status report on alcohol and health. Geneva, 2011. Disponível em: <[http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/en/index.html](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/index.html)>. Acesso em: 10 abr. 2011.

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

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

PEREIRA, MO. Transtorno de ansiedade, dependência a álcool e benzodiazepínicos: comorbidade e aspectos clínicos em comum. **J Bras. Psiquiatria**, v.40, n.1, p. 65-68, 1991.

PETRAKIS, I. L.; KRYSTAL, J. Neuroscience: implications for treatment. **Alc Health Res World**, v. 21, n.2, p.157-16, 1997.

PINER, A.; SHINER, T.; SEYMOUR, B.; DOLAN, R.J. Dopamine, time, and impulsivity in humans. **Journal of Neuroscience**, v.30, n.26, p. 8888-96, 2010.

PIVAC, N.; MÜCK-SELER, D.; MUSTAPIC, M.; NENADIC-SVIGLIN, K.; KOZARICKOVACIC, D. Platelet serotonin concentration in alcoholic subjects. **Life Sci**, v. 76, p. 521-531, 2004.

POLIVY, J.; HERMAN, H. Effects of alcohol on eating behavior: influence of mood and perceived intoxication, **J. Abnormal Psychology**, v.85, p.601- 606, 1976.

RAMIREZ, A.; TREJO, R.; NAVARRETE, A.; GANZALEZ-TRUJANO, M.; MARTINEZ, A. Palmitone isolated from *Annona diversifolia* induces an anxiolytic-like effect in mice. **Planta Médica**, v. 8, p. 703-707, 2006.

RASSNICK, S.; PULVIRENTI, L.; KOOB, G.F. Oral ethanol self-administration in rats is reduced by the administration of dopamine and glutamate receptor antagonists into the nucleus accumbens. **Psychopharmacology**, v.109, p. 92–98, 1992.

RIBEIRO, C.A.F.; PRADO-FILHO, L.G. O cobre contaminante da aguardente de cana. **NAPMA**, Piracicaba, S.P., v.5, 1997.

ROBERTO, M.; MADAMBA, S.G.; STOUFFER, D.G.; PARSONS, L.H.; SIGGINS, G.R. Increased GABA release in the central amygdala of ethanol-dependent rats. **Journal of Neuroscience**, v.24, n.45, p.10159–10166, 2004.

ROBINSON, J.; SAREEN, J.; COX, B.J.; BOLTON, J. Self-medication of anxiety disorders with alcohol and drugs: results from a nationally representative sample. **Journal of anxiety disorders**, v.23, n.1, p. 38-45, 2009.

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. animal models of anxiety: an ethological perspective. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.30, p.289-304, 1997.

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

SALASPURO, M. Use of enzymes for the diagnosis of alcohol-related organ damage. **Enzyme**, v.37, p.87-107, 1987.

SARGETELLI, V.; MAURO, A. E.; MASSABNI, A. C. Aspectos do metabolismo do cobre no homem. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p.290-293, 1996.

SEIBEL, S.D. Álcool. In: SEIBEL, S.D.; TOSCANO JÚNIOR, A. Dependência de Drogas. São Paulo: Atheneu, cap.5, p.51-61, 2000.

SHIPPENBERG, T. S.; KOOB, G. F. Recent advances in animal models of drug addiction. In: Kenneth, L.; Davis et al., (eds) *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress: an official publication of the American College of Neuropsychopharmacol*, p.1381-1397, 2002.

SHUPER, P.A.; NEUMAN, M.; KANTERES, F.; BALIUNAS, D.; JOHARCHI, N.; REHM, J. Causal Considerations on Alcohol and HIV/AIDS — A Systematic Review. **Alcohol & Alcoholism**, v. 45, n. 2, p. 159–166, 2010.

SHULTS, R. A.; ELDER, R. W.; SLEET, D.A.; NICHOLS, J.L.; ALAO, M.O.; CARANDEKULIS, V.G.; ZAZA, S.; SOSIN, D. M.; THOMPSON, S. Reviews of evidence regarding

interventions to reduce alcoholimpaired driving. **American Journal of Preventive Medicine**, v.21, n. 4, p.66–88, 2001.

SIEVER, L. J. Neurobiology of aggression and violence. **American Journal of Psychiatry**, v.165, n.4, p. 429-42, 2008.

SILVA, M.T.B.; ARAÚJO, F.L.O.; FÉLIX, F.H.C.; SIMÃO, A.F.L.; LOBATO, R.F.G.; SOUSA, F.C.F.; FONTELES, M.M.F.; VIANA, G.S.B.; VASCONCELOS, S. M.M. Alcohol and nicotine: mechanisms of dependence. **Rev Neurocienc**, v.18, n.4, p.531-537, 2010.

SILVEIRA, E. Brinde a cachaça. Problemas Brasileiros, São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.sescsp.org.br/sesc/revistas>>. Acesso em: 21 jan. 2011.

SINGLETON, V. L. Maturation of wines and spirits: comparison, facts and hypotheses. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 46, n. 1, p. 98-115, 1995.

SMART, R.G.; MANN, R.E. Recent liver cirrhosis declines: estimates of the impact of alcohol abuse treatment and alcoholics anonymous. **Addiction**, v.88, n.2, p.193-8, 1993.

SPANAGEL, R.; HOLTER, S. M. Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. **Journal of Neural Transmission**, v.107, p. 669 –680, 2000.

SPANAGEL, R. Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. **Physiol Rev**, v. 89, n. 2, p. 649-705, 2009.

SPARTA, D.R.; FEE, J.R.; KNAPP, D.J.; BREESE, G.R.; THIELE, T.E. Elevated anxiety-like behavior following ethanol exposure in mutant mice lacking neuropeptide Y (NPY). **Drug Alcohol Depend**, v.90, p.297-300, 2007.

SZABO, G.; MANDREKAR, P. A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. **Alcohol Clin Exp Res.**, v.33, n.2, p.220-32, 2009.

THOMAS, M. J; KALIVAS, P. W; SHAHAM, Y. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. **Br J Pharmacol**, v. 154, n. 2, p. 327-342. 2008.

TZSCHENTKE, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. **Prog Neurobiol**, v. 56, p. 613-672, 1998.

TZSCHENTKE, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. **Addict Biol**, v. 12, n. 3-4, p. 227-462, 2007.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Special report to the US Congress on Alcohol and Health. **United States: National Institutes of Health**, 10ª Edição, p.78-133, 2000.

USEPA. National primary drinking water regulations, arsenic and clarifications to compliance and new source contaminants monitoring: proposed rule. **Federal Register**, v. 65, n. 121, p. 38888-38983, 2000.

VENGELIENE, V.; BILBAO, A.; MOLANDER, A.; SPANAGEL, R. Neuropharmacology of alcohol addiction. **British Journal of Pharmacology**, v.154, p.299–315, 2008.

VERDI, A. R. Dinâmicas e perspectivas do mercado da cachaça. **Info. Econôm.**, v. 36, n. 2, 2006.

VIENNE J, BETTLER B, FRANKEN P, TAFTI M. Differential effects of GABAB receptor subtypes,  $\gamma$ -hydroxybutyric Acid, and Baclofen on EEG activity and sleep regulation. **J Neurosci**, v. 30, n. 42, p. 194-204, 2010.

VILELA, F. J.; CARDOSO, M. G.; MASSON, J.; A. J. P. Determination of the physical-chemical composition of homemade cachaças produced in the South of Minas Gerais and their mixtures. **Ciênc. Agrotec.**, v. 31, n. 4, p. 1089-1094, 2007.

VOLKOW, N.D.; WANG, G.J.; TELANG, F.; FOWLER, J.S.; LOGAN, J.; JAYNE, M.; MA, Y.; PRADHAN, K.; WONG, C. Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: Possible orbitofrontal involvement. **Journal of Neuroscience**, v.27, n.46, p.12700–12706, 2007.

WALL, P.M.; MESSIER, C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.25, p.275-286, 2001.

WEI, X. Y.; YANG, J. Y.; WANG, J. H.; WU, C. F. Anxiolytic effect of saponins from *Panax quinquefolium* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n.3, p. 613-618, 2007.

WEISS, F; LORANG, M. T.; BLOOM, F. E. Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. **J Pharmacol Ther**, v.267, p. 250-258, 1993.

ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M.G.; SACZK, A. A.; SANTIAGO, W. D.; ANJOS, J.P. Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana. **Quim. Nova**, v.34, p. 320-324, 2011.

ZANGROSSI JR., H. Modelos animais de ansiedade. In: HETEM, A.B.; GRAEFF, F.G. Ansiedade e transtornos de ansiedade. **Científica Nacional**, Rio de Janeiro, cap.4, p.85-120, 1997.

ZOECKLEIN, B. W.; FUGELSANG, K. C.; GUMP, B. H.; NURY, F. S. Análisis e producción de vino. Zaragoza: Acribia, 2001. 613 p.