



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

PROJETO DE PESQUISA

AVALIAÇÃO DO PERFIL PSICOFARMACOLÓGICO E
TOXICOLÓGICO DE *Indigofera suffruticosa* MILL e *Dioclea*
grandiflora Mart. ex. Benth EM ROEDORES.

Coordenador: Prof. Dr. Edvaldo Rodrigues Almeida
Pesquisadores: Prof. Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Alunos: Thaís Malheiros Chaves (Mestranda)
Adelmo Cavalcanti Aragão Neto
Marília Sobral
Manoella Brito da Carvalheira

RECIFE
2008

1. INTRODUÇÃO

Vários estudos farmacológicos têm demonstrado a ação de extratos vegetais em diversas patologias induzidas experimentalmente em animais de laboratório. Isso tem aberto perspectivas favoráveis no sentido de se ter nas plantas uma grande fonte de substâncias, que num futuro próximo, poderão ter emprego na terapêutica convencional (alopatia), através do isolamento e identificação de princípios ativos, para os mais variados males que afligem o homem (CASTRO; FERREIRA, 2001).

O uso de plantas como agentes terapêuticos vêm sendo muito intensos principalmente devido aos efeitos colaterais de grande parte dos produtos alopáticos existentes. Em geral, a população tem uma tendência a supervalorizar as plantas levando em consideração que as mesmas não possuem efeitos colaterais. No entanto, tal afirmação não reflete a verdade, pois o conhecimento inadequado da dose, da parte da planta empregada e dos compostos existentes no extrato pode acarretar sérios problemas ao indivíduo (ABDULLAH et al., 1990; FEHRI et al., 1991).

Além disso, é sabido que chás preparados a partir de plantas de uso popular podem produzir sérios efeitos adversos em animais e em seres humanos (Almeida 1993). Esses e outros aspectos motivaram a intensificação de pesquisas com plantas usadas na medicina popular principalmente visando esclarecer os possíveis efeitos tóxicos e histopatológicos, como também utilizá-las “*in natura*” para as várias patologias e atividades relacionadas com o Sistema Nervoso Central (SNC), dentre elas a analgesia, o efeito ansiolítico e a atividade anticonvulsivante (HUXTABLE, 1980; SCHOENTAL, 1982), além da avaliação bioquímica, hematológica e histopatológica.

Indigofera suffruticosa (Is) Mil (Fabaceae), comum em regiões tropicais e subtropicais, é uma leguminosa utilizada na adubação verde e cobertura dos solos. Essa é anual e perene adaptada à região do semi-árido e agreste do Estado de Pernambuco. A planta é considerada como tintura; as raízes e folhas têm atividade antiespasmódica, sedativa e diurética (BRAGA, 1985).

Dessa forma, é de extrema importância a identificação do perfil psicofarmacológico, como também, de novas informações através do extrato hidroalcoólico das raízes de *Indigofera suffruticosa*, para que se possa comprovar suas ações e seus efeitos colateral/adversos, obtidos através da etnofarmacologia, proporcionando desta forma o seu futuro como um fitoterápico.

A *Dioclea grandiflora* (Dg) Mart. ex. Benth (Leguminosae). É popularmente conhecida no Brasil como "mucunã-de-Caroço", "Olho-de-boi" e "mucunã", medra na caatinga e cerrado das regiões do nordeste do Brasil. A raiz da *Dioclea grandiflora* é muito utilizada na medicina popular contra doenças renais e da próstata (Batista 1993). Bhattacharyya, et al (1995) isolaram e identificaram a diocleina, uma flavonone obtida a partir das raízes desta planta. Mattei, et al (1995) mostrou uma possível ação farmacológica das sementes da *Dioclea grandiflora* e Bhattacharyya, et al (1997) isolaram e identificaram o dioclenol e no ano seguinte a dioflorina (Bhattacharyya, et al (1998). Jenkis, et al no mesmo ano isolaram e identificaram o agrandol, paraibanol e diosalol a partir das raízes da mesma planta. Lemos, et al (1999) demonstraram uma forte ação vasorelaxant na aorta de ratos com diocleina. Almeida, et al (2000) demonstraram a ação farmacológica do dioclenol e da dioflorin em dois modelos experimentais de analgesia, e de Almeida, et al (2003) demonstraram uma ação analgésica centra utilizando extrato hidro-alcoólico das sementes em vários modelos experimentais de analgesia. Silva (2003) em seu estudo demonstrou uma atividade

antibacteriana do extrato hidro-alcoólico da casca do caule da *Dioclea grandiflora*, e ainda uma inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus*. Já o extrato hidro-alcoólico das folhas e raízes inibiram o crescimento das espécies fúngicas, tais como *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Micriporum canis*, e também, encontrou uma atividade antineoplásica contra o sarcoma 180. Foram ainda observados efeitos tóxicos no fígado e nos rins de ambos os extratos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As plantas são, indiscutivelmente, fonte de substâncias bioativas sendo atualmente bastante utilizado pelas populações de vários países, inclusive o Brasil, o qual tem rendido uma inacreditável gama de produtos vegetais e animais, chamando a atenção de farmacologistas no mundo inteiro (SALATINO et al, 2005).

Recentemente, muita atenção tem sido direcionada para extratos e compostos biologicamente ativos isolados de espécies de plantas populares. O uso de plantas medicinais possui vital importância na atenção básica de saúde dos países desenvolvidos e podem oferecer uma nova fonte de agentes antibacterianos, antifúngicos e antivirais com significativa atividade contra microorganismos infecciosos. Conhecida popularmente como “anil do campo” ou “anileira”, *Indigofera suffruticosa* é encontrada do sudoeste dos Estados Unidos (onde foi introduzida por cultivo em 1742) até à Argentina e Brasil (COELHO de SOUZA et al, 2004; ARNOLD, 2005).

À anileira, são atribuídas muitas propriedades medicinais; segundo Lorenzi (1982), a planta é reputada como antídoto ao arsênico e mercúrio, e sua raiz é odontálgica. Vieira (2006), em estudos fitoquímicos de folhas de *Indigofera suffruticosa*, reportou a presença de alcalóides, flavonóides, esteróides, proteínas, carboidratos. Leite et al (2002), demonstrou atividade lectínica em extratos de folhas, caules e sementes de *I. suffruticosa*; enquanto que Kama e Mangla (1993) identificaram, isolaram, e quantificaram seis rotenóides verificando a bioeficácia desta planta contra larvas de *Anopheles* e *Callosobruchus chinensis* adultos.

Roig e Mesa (1974) reportaram que uma das propriedades da *Indigofera suffruticosa* é sua ação antiepilética; mais tarde sendo confirmado por Alejo, Miranda e Rodriguez (1996) que através de experimentos em camundongos, mostram que o

extrato fluido de *Indigofera suffruticosa* na dose de 0,06 g/kg eleva o limiar de crises convulsivas, podendo considerar uma atividade antiepilética. Wong et al (1999), utilizando a mesma dose, evidenciou um efeito protetor sobre a diminuição dos aminoácidos inibitórios taurina e glicina e sobre o aumento do aminoácido excitatório ácido glutâmico.

Bautista et al. (1989) estudaram os efeitos toxicológicos dos extratos de *Indigofera Suffruticosa* em camundongos e encontrou as doses tóxicas de 5,0g/kg e 7,5g/kg para os extratos hexânicos de folha e fruto respectivamente, sendo as principais alterações observadas a nível hepático e pulmonar.

Vieira (2006) observaram a alta efetividade na inibição do crescimento de tumores sólidos do extrato aquoso de folhas de *Indigofera suffruticosa*, resultando em uma alternativa para o tratamento contra o câncer.

Leite et al. (2003) demonstraram ação antiinflamatória do extrato aquoso de folhas de *Indigofera Suffruticosa* em camundongos albinos suíços. Em 2006, foi a vez de comprovar sua ação antifúngica, concluindo que o extrato aquoso obtido por infusão pode ser usado no tratamento de doenças de pele causadas por dermatófitos (LEITE et al, 2006) .

Medeiros et al. (2005) avaliaram que extrato aquoso de folhas de *Indigofera Suffruticosa* interfere no desenvolvimento das larvas do *Aedes Aegypti* (durante a mudança de estádios de L3 para L4), possuindo então, ação no controle de mosquito.

Almeida, et al (2000) demonstraram a ação farmacológica do dioclenol e da dioflorin em dois modelos experimentais de analgesia, e de Almeida, et al (2003) demonstraram uma ação analgésica utilizando extrato hidro-alcoólico das sementes em vários modelos experimentais de analgesia. Silva (2003) em seu estudo demonstrou uma atividade antibacteriana do extrato hidro-alcoólico da casca do caule da *Dioclea*

grandiflora, e ainda uma inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus*. Já o extrato hidro-alcoólico das folhas e raízes inibiram o crescimento das espécies fúngicas, tais como *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Micriporum canis*, e também, encontrou uma atividade antineoplásica contra o sarcoma 180. Foram ainda observados efeitos tóxicos no fígado e nos rins de ambos os extratos.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Avaliação do perfil psicofarmacológico e toxicológico do extrato hidro-alcoólico das raízes de *Indigofera suffruticosa* e da casca do caule da *Dioclea grandiflora* em roedores.

3.2 Específicos:

- A) Avaliar a ação anticonvulsivante de ambas as plantas através do extrato hidroalcoólico.
- B) Avaliar a possível ação ansiolítica da *Indigofera suffruticosa* e da *Dioclea grandiflora*.
- C) Avaliar sua possível ação analgésica central da *Indigofera suffruticosa*.
- D) Avaliar seus efeitos através do tratamento crônico (30 dias), sobre os sistemas bioquímicos, hematológicos e verificar a histopatologia dos órgãos mãe (coração, fígado e rim) de ambas as plantas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2 Métodos

4.2.1 Considerações Éticas

Este projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

4.2.2 Obtenção do Extrato hidroalcoólico

Na obtenção do extrato hidroalcoólico, serão utilizados 100g do material seco, previamente triturados em máquina forrageira. O material triturado será colocado em um Becker, e posteriormente será adicionada uma mistura Álcool-água (70:30) até cobrir por completo todo o material, perfazendo um volume final de 800 ml, e em seguida colocado em banho-maria a 80° C durante 1 hora. O extrato será deixado em repouso durante 24 horas a temperatura ambiente. A seguir o extrato será filtrado em filtro de papel e colocados na geladeira. O mesmo processo irá ser repetido durante 24 horas. Em seguida, o extrato será reunido e evaporado à vácuo para retirada total do solvente, antes de ser submetido à liofilização. Após processo de liofilização, os resíduos serão colocados em dessecador até peso constante. A seguir, o extrato será pesado, calculado os seus rendimentos, lacrado cuidadosamente com parafilme e depositado em freezer, até o momento dos testes.

4.2.3 Animais

Nos experimentos *in vivo* serão utilizados 324 camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), pesando em média 20 - 30g, obtidos do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais estarão sempre sob o controle da temperatura de 23 ± 1 °C, com um ciclo claro/escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara às 06:00 horas da manhã, com livre acesso à água e comida. Todos os experimentos serão realizados entre 09h00min e 16h00min horas. Os animais serão cuidadosamente monitorados e mantidos de acordo com a recomendação ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e The National Institute of Health Guide for Care and use of Laboratory Animals.

4.2.4 Grupos:

Os animais serão divididos em grupos de 6 camundongos. Em cada avaliação o extrato hidro-alcoólico será testado em 3 doses. As 3 doses utilizadas serão determinadas através de valores entre 10 e 40% da DL_{50} , calculados pelo método de Litchfield e Wilcoxon (1949). Os grupos padrão e os grupos controle (salina 0,85% v/v) também serão formados por 6 camundongos cada.

Após os experimentos os animais serão sacrificados com Tiopental e encaminhados para o Departamento de Cirurgia Experimental para incineração.

4.2.5 Testes ansiolíticos:

4.2.5.1 Pentobarbital sódico – indutor do sono:

Os grupos teste receberão sua respectiva dose de extrato (i.p.) e o grupo controle receberá salina 0,85%. Após 1 hora, os grupos teste mais o grupo controle receberão 55 mg/kg (i.p.) de pentobarbital sódico. Observar o tempo decorrido entre a perda e o retorno dos reflexos motores, tanto para o grupo controle quanto para os grupos teste (SPERONI e MINGHETTI, 1988).

4.2.5.2 Teste de esconder as esferas (Marble-burying test)

Nesse teste, verificam-se possíveis alterações comportamentais de drogas que possam promover um perfil ansiogênico ou ansiolítico. Isto é determinado pelo aumento ou diminuição do comportamento de esconder esferas de vidro que serão distribuídas, ao acaso, na superfície da caixa coberta com serragem. O aumento de esferas recobertas é apontado como indicativo de “ansiedade”, já que se supõe representar para o animal o desconhecido, ou seja, um agente estranho cuja presença pode representar ameaça. A administração da droga ansiolítica reduz esse comportamento de recobrir as esferas de vidro (TREIT, PINEL e FIBIGER, 1981; BROEKKAMP et al., 1986; NOGUEIRA, 1997).

Vinte e cinco esferas de vidro transparente (20 mm de diâmetro) serão usadas para cada teste individual. Serão utilizadas gaiolas opacas de plástico liso (30 x 36 x 13 cm), com teto de vinil contendo buracos de ar e possuindo em seu interior uma camada de serragem de 5 cm de altura. Os camundongos serão colocados individualmente nas gaiolas de plástico com serragem por 15 minutos (período de habituação) e depois

recolocados em suas gaiolas originais. Vinte e cinco esferas de vidro transparente serão colocadas na serragem das gaiolas de habituação. Os grupos teste receberão suas respectivas doses de extrato (i.p.), o grupo controle receberá salina 0,85%, e o grupo padrão receberá diazepam (2.5 mg/kg, i.p.). Os camundongos serão reintroduzidos nessas gaiolas (cada camundongo retornará exatamente para mesma gaiola a que já estava habituado). Depois de 15 minutos, o teste será terminado o animal será removido e serão contados o número de esferas de vidro que estiverem com mais de dois terços cobertos por serragem. Após cada experimentação, a serragem será substituída e os instrumentos e esferas de vidro serão lavadas com água e limpos com álcool (70%) (BROEKKAMP et al, 1986).

4.2.5.3 Teste da placa Perfurada:

É um teste geralmente usado para *screening* de drogas com caráter ansiolítico. Baseia-se na observação de que a atividade de mergulhos (*head dippings*) dos animais é inversamente proporcional ao estado de “ansiedade” dos mesmos. (BOISSER, 1976; FILE e WARDILL, 1976).

Os instrumentos utilizados consistirão numa placa de madeira, 40 cm x 40 cm, com 16 buracos (de 2 cm de diâmetro) espaçados regularmente na superfície. A placa será elevada a uma altura de 50 cm, em um quarto iluminado. Os grupos teste receberão suas respectivas doses de extrato (i.p.), o grupo controle receberá salina 0,85% e o grupo padrão receberá diazepam (2.5 mg/kg, i.p.). Os camundongos serão colocados no centro da placa e será contado o número de vezes que o animal mergulha a cabeça nos buracos e o tempo de permanência nos mesmos num intervalo de 5 minutos (BOSSIER e SIMON, 1962).

4.2.5.4 Teste do labirinto em cruz elevado (Elevado plus-maze)

Este modelo baseia-se no conhecimento de que ratos e outros roedores evitam locais abertos e elevados. Quando nele confinados, mostra sinais de medo – congelamento, defecação e micção – e aumento do nível plasmático do hormônio de estresse, cortisona (GRAEL e GUIMARÃES, 1999).

O camundongo explora ambos os braços, abertos e fechados, mas tipicamente entrará com maior frequência e permanecerá por mais tempo nos braços fechados. Uma maior intensidade de “ansiedade” equivale a menor preferência por braços abertos (MORATO e BRANDÃO, 1997).

O teste do labirinto em cruz elevado é uma modificação do instrumento validado por Lister (1987) para camundongos e consiste de dois braços abertos (30 x 5 0,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm) originando-se de um centro comum da plataforma (5 x 5 cm). Os dois pares de braços idênticos são opostos um ao outro, formando uma cruz. O aparato inteiro será elevado a uma altura de 40 cm do chão. No começo da sessão o camundongo será colocado no centro da plataforma com a cabeça olhando para o braço aberto, deixando-se que o animal explore por 5 minutos. Seguindo os parâmetros, serão marcados: o tempo gasto e o número de entradas em cada tipo de braço. O grupo padrão receberá diazepam 2,5 mg/kg (i.p.), os grupos teste receberão suas respectivas doses de extrato (i.p.) e o grupo controle receberá salina 0,85%. Todos os experimentos serão realizados entre 10:00h e 16:00 h. Após cada experimentação, o aparato será limpo com álcool (70%).

4.2.6 Testes anticonvulsivantes:

4.2.6.1 Pentilenotetrazol – indutor de convulsão:

O pentilenotetrazol é uma das principais substâncias indutoras de convulsão utilizadas na triagem pré-clínica de novos fármacos anticonvulsivantes, podemos utilizar como modelo de crises epiléptico generalizadas dos tipos ausência, mioclônicas e de crises tônico-clônicas. O pentilenotetrazol atua inibindo o canal de cloreto associado aos receptores GABA (OLIVEIRA et al., 2001).

O primeiro grupo receberá diazepam 2.5 mg/kg (i.p.) e servirá como grupo padrão. Os grupos teste receberão o extrato (i.p.) em suas respectivas doses e o grupo controle receberá salina 0,85% . Após 1h, será administrado o Pentilenotetrazol em todos os grupos. Observar o número de camundongos que apresentarem convulsão tônico-clônica e o tempo de latência até o início da primeira convulsão (GUPTA, MAZUNMDER e CHAKRABARTI S, 1999).

4.2.6.2 Picrotoxina – indutor de convulsão:

É um modelo de epilepsia focal recorrente, para crises do tipo “pequeno mal”, ou crises de ausência. A picrotoxina é um potente estimulante do SNC que atua antagonizando os receptores GABA_A (MELLO et al., 1986; ZIA et al., 1995).

Esse método foi descrito previamente por Lehmann et al. (1988). O grupo controle receberá salina 0,85 % e o grupo padrão será tratado com diazepam. Os grupos teste receberão o extrato em suas respectivas doses (i.p.). Depois de 60 minutos, será administrada a Picrotoxina na dose de 1 mg/kg (i.p.) em todos os grupos. Imediatamente após a injeção do convulsivante, os camundongos serão colocados em caixas de plástico

individuais e será observado o tempo até o início das convulsões (latência), percentual de convulsões e número de mortes. A incidência de morte será observada até 48 horas após a administração da picrotoxina.

4.2.6.3 Eletrochoque Máximo (EMC)

Este modelo baseia-se na observação de que a estimulação por meio de pulsos elétricos repetitivos usando parâmetros adequados é capaz de induzir, em diferentes estruturas neuronais, um padrão característico de atividade epilética automantida, comumente denominado pós-descarga. O ECM é um modelo bem estabelecido que mimetiza crises convulsivas do tipo generalizadas tônico-clônicas (WHITE, 1997; LÖSCHER e SCHIMIDT, 2002)

O teste de eletrochoque máximo induz convulsão caracterizada pela extensão tônica das extremidades posteriores. Nesse experimento o choque electroconvulsivo (130V, 150 pulsos/s, 0.5 s) será realizado através de eletrodos auriculares. O grupo controle receberá salina 0,85% e o grupo padrão será tratado com fenitoína (25 mg/kg; i.p.). Os grupos teste receberão o extrato em suas respectivas doses (i.p.). Após 60 minutos, todos os grupos receberão o choque eletroconvulsivo. Serão considerados protegidos os animais que apresentarem abolição da extensão das patas traseiras, ou uma redução destas, medida com um cronômetro em segundos (SWINYARD et al., 1989).

4.2.7 Testes Analgésicos

4.2.7.1 Teste da placa quente

Este teste será realizado de acordo com a técnica descrita inicialmente por Woolfe e MacDonald (1944). Os grupos teste receberão o extrato em suas respectivas doses (i.p.), o grupo controle receberá salina 0,85% e o grupo padrão receberá morfina (i.p.) 30 minutos antes da avaliação do teste. A avaliação será realizada numa superfície aquecida previamente de um aparelho de placa-quente (DA/UFPE) com a temperatura aproximada de 55 °C, com um sistema contador de tempo acionado e parado com o uso de um pedal.

A medida referente ao tempo de reação do animal ao estímulo algico será realizada aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração dos respectivos tratamentos. Nesta metodologia o tempo de reação do animal ao estímulo térmico é quantificado quando é exibido o comportamento de levantar (tentativa de pular) ou lambe uma das patas anteriores, indicativo de nocicepção. Esses dois comportamentos são interpretados como respostas integradas no córtex cerebral, ou seja, em nível supramedular; enquanto a agitação das patas posteriores (sapateado) é interpretada como sendo uma resposta apenas de integração medular. A latência de resposta é quantificada num tempo máximo de 30 segundos, para que se evite lesão tecidual, e pode ser modificada por analgésicos de ação central, como os narcóticos (OLIVEIRA e ALMEIDA *in* ALMEIDA, 2006; ALMEIDA et al., 2003; 2006).

4.2.7.2 Avaliação do efeito antinociceptivo da *Indigofera suffruticosa* no teste de imersão da cauda.

A cauda de camundongos é uma região anatômica caracterizada por possuir uma diversificada população de receptores sensoriais, incluindo termocetores e nociceptores; sendo assim, torna-se bastante apropriada para estudos experimentais quando se utiliza algum tipo de estimulação física. Devido a essa característica, o animal, ao ser submetido a um estímulo nociceptivo de natureza térmica, proporcionado pela imersão de sua cauda em um aparelho contendo água à temperatura de $50^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, produz uma reação de afastamento da cauda do estímulo nocivo. O teste foi descrito inicialmente por Jansen et al. (1963) e adaptado por Grotto & Sulman (1967). Nesse teste, é medido o tempo de reação ou latência, ou seja, período que o animal leva para retirar a cauda que está diretamente em contato com a água. Em geral, as drogas analgésicas centrais são eficazes em ampliar a latência. (OLIVEIRA e ALMEIDA *in* ALMEIDA, 2006).

Os grupos teste receberão o extrato nas suas respectivas doses por via intraperitoneal (i.p.). Enquanto que a salina (i.p.) e a morfina (i.p.) serão administradas nos subgrupos controle e padrão respectivamente.

Será montado um banho-maria sobre o qual se colocará um recipiente de alumínio de forma esférica contendo água e um termômetro submerso que registra a temperatura. Os animais ficarão num aparelho de contenção, sendo suas caudas expostas e submergidas um terço dela na água aquecida a 52° e será registrado o tempo em que os animais permanecem sem reagir ao estímulo (latência), evitando-se exposições acima de 15 segundos, para que não ocorra dano tecidual (OLIVEIRA e ALMEIDA *in* ALMEIDA, 2006).

As leituras serão realizadas imediatamente após a administração (leitura basal) e aos 30, 60, 90 e 120 minutos após as respectivas administrações, de acordo com Grotto & Sulman (1967) e Almeida et al. (2003; 2006). Essa resposta reflexa de retirada da cauda ocorre através da estimulação de componentes em nível medular.

4.2.7.3 Efeito da *Indigofera suffruticosa* avaliado através do teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

O método se baseia no fato de que a injeção via intraperitoneal da solução de ácido acético 0,85% em camundongos provoca algumas alterações de comportamento caracterizadas por contorções abdominais seguidas de extensões dos membros posteriores. O ácido acético atua indiretamente no líquido do peritônio, provocando a liberação de mediadores endógenos, como, por exemplo, aumentando os níveis de PGE2 e PGF2 α , desta forma, sensibilizando e posteriormente estimulando as terminações neuronais da região. De um modo geral, as drogas analgésicas reduzem ou mesmo inibem esse comportamento (OLIVEIRA e ALMEIDA *in* ALMEIDA, 2006).

Os grupos teste receberão o extrato nas suas respectivas doses (i.p.), no grupo controles serão administrada salina a 0.85% (i.p.) e no grupo padrão morfina 3 mg/kg (i.p.).

Após 60 minutos da administração das substâncias relatadas acima, será administrada a solução de ácido acético 0,85% (v/v) por via intraperitoneal em todos os animais. Estes serão colocados para observação no interior de uma caixa de polipropileno de 40 cm de comprimento por 15 cm de largura e 10 cm de altura (ALMEIDA et al., 1996; ALMEIDA et al, 2003; 2006; SHADAB et al., 2002).

A leitura inicial será realizada imediatamente após a administração do ácido acético 0,85% (v/v) (leitura basal), onde o número de contorções abdominais

apresentados por cada animal. O experimento será realizado durante um período de 15 minutos.

4.2.7.4 Avaliação da ação antinociceptiva da *Indigofera suffeucosa* e da morfina com e sem o pré-tratamento pela naloxona no teste da imersão de cauda.

Este teste baseia-se na verificação do possível mecanismo de ação analgésica através da utilização de um bloqueador da morfina (naloxone), sabendo que a naloxona é um antagonista dos receptores opióides. Sendo assim, o bloqueio da ação analgésica dos extratos e da morfina caracteriza uma ação analgésica central dos extratos via receptores opióides, já que a ausência da analgesia se deve ao bloqueio dos receptores opióides pelo naloxone.

Todos os animais receberão naloxona 2 mg/kg (i.p.). Após 15 minutos, os grupos teste receberão o extrato nas suas respectivas doses (i.p.). O grupo controle receberá salina 0,1mL/10 g (i.p.) e o grupo padrão receberá morfina 3mg/kg (i.p.).

Será montado um banho-maria sobre o qual se colocará um recipiente de alumínio de forma esférica contendo água e um termômetro submerso que registra a temperatura. Os animais ficarão num aparelho de contenção, sendo suas caudas expostas e submergidas um terço dela na água aquecida a 52° e será registrado o tempo em que os animais permanecem sem reagir ao estímulo (latência), evitando-se exposições acima de 15 segundos para que não ocorra dano tecidual (OLIVEIRA e ALMEIDA *in* ALMEIDA, 2006).

As leituras serão realizadas imediatamente após a administração (leitura basal) e aos 30, 60, 90 e 120 minutos após as respectivas administrações, de acordo com Grotto & Sulman (1967) e Almeida et al. (2003; 2006). Essa resposta reflexa de retirada da cauda ocorre através da estimulação de componentes em nível medular.

4.2.7.5 Avaliação hematológica e bioquímica da *Indigofera suffeucosa* e da *Dioclea grandiflora* através do tratamento crônico em ratos.

As avaliações serão realizadas no período 0, 20 e 30 do tratamento com o extrato. Para cada grupo será utilizado 6 ratos por dose do extrato teste.

4.2.8 Análise Estatística dos Resultados.

Os dados obtidos nos vários experimentos serão analisados através de teste de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's ou pelo teste t de Student's dependendo do caso. Os resultados serão considerados significantes quando $p < 0,05$. Todos os dados serão analisados pelo programa Graph Pad Prism versão 3,02.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH M, AL-BEKAIRI ARIF, H, and SHOEB QURESHI. (1990) Effect of *Allium sativum* on epididymal spermatozoa, estradiol- treated mice and general toxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, **29**: 117-125.

ALMEIDA E. R. (1993) PLANTAS MEDICINAIS:conhecimentos populares e científicos 1° ed. Editora Hemus. São Paulo – SP 342 p.

ALMEIDA E. R, ALMEIDA R. N, NAVARRO D. S, BHATTACHARYYA J, SILVA B. A, BIRNBAUM J. S. P. (2003) Central antinociceptive effect of a hydro-alcoholic extract of *Dioclea grandiflora* seeds in rodents. **Journal of Ethnopharmacology** **88**: 1 - 4.

ALMEIDA E. R, SOARES R. P. F, LUCENA F. R, OLIVEIRA J. R. G, ALBUQUERQUE J. F. C, COUTO G. B. L. (2006) Central antinociceptive effects of hydro-alcoholic extract from the leaves of *Cissus sicyoides* on mice. **Pharmaceutical Biology** **44**: 1 - 5.

ALMEIDA R. N, NAVARRO D. S, AGRA M. F, ALMEIDA E. R, MAJETICH G, BHATTACHARYYA J. (2000) Analgesic effect of dioclenol and dioflorin isolated from *Dioclea grandiflora*. **Pharmaceutical. Biology** **38**: 394 - 395.

ALMEIDA E. R., RAFAEL, K. R. O., ALBUQUERQUE, J. F.C. (2008) Anxiolytic and anticonvulsant effects of hydro-alcoholic extract from the leaves of *Cissus sicyoides* on mice. **Fitoterapia (in press)**.

ALMEIDA R. N., HIRUNO, C. A. & BARBOSA-FILHO, .M. (1996) Analgesic effect of rotundifolone in rodents. **Fitoterapia**, **67**: 334-338.

BATISTA, J. S. (1993) Estudo químico e farmacológico das cascas das raízes da *Dioclea grandiflora* Mart.ex.Benth. Dissertation the Masters presented the Federal University of Paraíba, 85 p.

BELVISI M. G., CHUNG D. M., BARNES P. J. (1998) Opioid modulation of non-cholinergic neural bronchoconstriction in guinea-pig in vivo. **British Journal of Pharmacology** **95**: 413 - 418.

BHATTACHARYYA J., MAJETICH G., SPEARING P., ALMEIDA R. N. (1997) Dioclenol, amino flavonol from roots bark of *Dioclea grandiflora*. **Phytochemistry** **46**: 385 - 387.

BHATTACHARYYA J., MAJETICH G., JENKINS T. M, ALMEIDA R N. (1998) Dioflorin, a minor flavonoid from *Dioclea grandiflora*. **Journal of Natural Products** **61**:413 - 414.

BHATTACHARYYA J., MAJETICH G., JENKINS T. M., ALMEIDA R. N. (1998) Dioflorin, a minor flavonoid from *Dioclea grandiflora*. **Journal of Natural Products** **61**:413 – 414.

BHATTACHARYYA J., BATISTA J. S., ALMEIDA R. N. (1995) Dioclein, a flavonone from the roots of *Dioclea grandiflora*. **Phytochemistry** **38**, 277 - 278.

BOISSER J. R., SIMON P., SOUBRIE P. (1976) In: Airaksinen, M (ed). Central Nervous System and Behavioural Pharmacology, Oxford: Pergamon Press. P.213-22.

Bossier J. R., Simon P. (1962) Lareaction dexploration Chez la Souris. **Therapie**; **17**: 1225–1232.

BROEKKAMP C. L., RIJIK H. W., JOLY-GELOIND., LOYD K. L. (1986) Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swiminduced grooming in the mice. **European Journal of Pharmacogy**, **126(3)**:223-9.

CASTRO, H. G & FERREIRA, F. A. (2001) A Dialética do conhecimento no uso das Plantas Mediciniais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, **3(2)**: 19 - 21.

FARNSWORTH N. R. & BINGEL, A. S. (1997) In: New natural products and plant drug with pharmacological, biological or therapeutical activity. Springer. New York; pp. 61-73.

FEHRI B., AIACHE J. M., CORBI S., MOKNI M., BEM SAID M., MEMMI A., HIZAQUI B., BOUKEF K. (1991) Effets toxiques eugendrés par une administration réitérée d' *Allium sativum* L. **Journal of Pharmacology Belgium** **46**: 363-374.

FILE S. E.; WARDILL A. G. (1976) Validity of head-dipping as a measure of exporation in a modified hole board. **Psychopharmacology**, **44**:53-9.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. Fundamentos da Psicofarmacologia. São Paulo: Atheneu, 1999. 246p.

GROTTO, M & SULMAN, F. G. (1967) Modified receptacle method for animal analgesimetry. **Archives Internationales de Pharmacodynamic et de Thérapie**, **65**: 152 – 159.

GUPTA M., MAZUNMDER U. K., CHAKRABARTI S. (1999) CNS activities of methanolic extract of *Moringa oleifera* root in mice, **Fitoterapia** **70** **244–250**.

HUXTABLE R. J. (1980) Herbal teas and toxins: novel aspects of pyrrolizidine poisoning in the United States. **Perspectives in Biology and Medicine** **24**: 1 – 13.

JENKINS T., BHATTACHARYYA J., TENG Q., AGRA M. F., ALMEIDA R. N. (1999) Flavonoids from root- bark of *Dioclea grandiflora*. **Phytochemistry** **52**: 723 - 730.

Lemos V. S., Freitas M. R., Muller B., Lino Y. D., Queiroga C.E .G., Cortes S F. (1999) Dioclein, a new nitric oxide and endothelium–dependent vasodilator flavonoid. **European journal of pharmacology** **386**: 41- 46.

LEMOS V. S., FREITAS, M. R., MULLER, B., LINO, Y. D., QUEIROGA C. E. G., CORTES S .F. (1999) Dioclein, a new nitric oxide and endothelium–depedent vasodilator flavonoid. **European journal of pharmacology** **386**: 41-46.

LISTER R. G. (1987) the use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology** **92**, 180–185

LITCHFIELD J. D., WILCOXON F. A. (1949) Simplified method of evaluation dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. **96**: 99-113.

LÖSCHER W., SCHIMIDT D. (2002) New Horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, **50**:3 – 16.

MAIA, V. **Técnica histológica** – Ateneu , 2 ed.,1972.

MASSON P. (1956) Techniques: In tumeurs humaines: histology, diagnostic at tecniques. 2 ed. Paris: Librairie Melloine, p.1061-1148.

MATTEI R, LEITE J. R, TUFIK S. (1995) A study of the pharmacological actions of *Dioclea grandiflora* Martiuns ex.bentham. **São Paulo Medical Journal/RPM**, **113**: 687 - 692.

MELLO L. E. A. M., BORTOLLOTO Z. A., CAVALHEIRO E. A. (1986) Modelos experimentais de epilepsia: uma revisão. **Neurobiology**, **49**:231-68.

MORATO S., BRANDÃO M. L. (1997) Paradoxal increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed to two kinds of aversive stimuli. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, **30**:1113-20.

NOGUEIRA T. C. M. L. (1997) II Curso de validação de plantas medicinais com atividade no sistema nervosa central. Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento/Rede Iberoamericana de Validação de Plantas Mediciniais, Florianópolis.

OLIVEIRA F. A., ALMEIDA R. N., SOUZA M. F. V., BARBOSA-FILHO J. M., DINIZ S. A., MEDEIROS I. A. (2001) Anticonvulsant properties of *N*-sali-

cyloyltryptamine in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 68:199-202.

SCHOENTAL R. (1982) Health hazards of pyrrolizidine alkaloids: a short review. **Toxicology Letters** 10: 323 – 326.

SHADAB ZAFAR, AHMAD, M. A., TARIQ A. S. (2002) Effect of roots aqueous extract of *Delphinium denudatum* on morphine-induced tolerance in mice. **Fitoterapia**, 73: 553-556.

SILVA L. L. S. Aspectos farmacológicos de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth. (Fabaceae): Atividades antimicrobiana, citotóxica e antitumoral. Ph.D. thesis, presented the Federal University of Paraíba. 2003,124 p.

SPERONI E., MINGHETTI A. (1988) Neuropharmacological activity of extract from *Passiflora incarnata* **Planta Medica** 54:488-91

TREIT D., PINEL J. P., FIBIGER H. C. (1981) Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, 15(4): 619-26.

WHITE H. S. (1997) Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. **Epilepsy**, 38:9 -17.

YEH S. Y & MITCHELL C. L. (1971) Analgesic activity and toxicity of oripavine and Δ^9 -dihydrothebaine in the mouse and rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 179: 642-651.

ZIA A., SIDDIQUI B. S., BEGUM S., SURIA A. (1995) Studies on the constituents of the leaves of *Nerium oleander* on behavior pattern in mice. **Journal of Ethnopharmacology** 49:33-9.

2010

Etapas do projeto	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
Levantamento Bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Realização dos experimentos				X	X	X	X	X	X			
Elaboração dos resultados									X	X	X	
Conclusão											X	X

Materiais

Ração Labina
Máscaras descartáveis
Ácido acético glacial
Hidrocloridrato de naloxona
Morfina
Solução de cloreto de sódio
Caixas de luva para procedimento
Tween 80
Óculos de proteção
Seringa descartável c/ agulha 1ml
Pentilenotetrazol
Diazepam
Etanol P.A.
Pentobarbital sódico
Fenitoína

Termômetro de mercúrio grande
Béqueres
Pinça clínica
Pinça dente de rato
Cabo para bisturi n° 3
Estufa
Gaiolas
Porta-agulha
Tesoura
Vidros de 20ml
Etiquetas adesivas
Toucas descartáveis
Papel toalha
Picrotoxina

ORÇAMENTO

MATERIAL PERMANENTE

QUANT.	DISCRIMINAÇÃO	PREÇO UNIT. R\$	PREÇO TOTAL R\$
01	Termômetro de mercúrio grande	45,00	45,00
10	Béqueres	6,80	68,00
05	Pinça clínica	3,00	15,00
05	Pinça dente de rato	3,00	15,00
01	Estufa	713,00	713,00
06	Gaiolas	250,00	1200,00
03	Porta-agulha	28,00	84,00
03	Tesoura	7,50	22,50
40	Vidros de 20ml	0,95	38,00
01	Balança analítica digital de 0.001 mg	10.000,00	10.000,00

Total R\$ 12.200,50

ORÇAMENTO

SERVIÇOS DE TERCEIROS

DISCRIMINAÇÃO	LOCAL	VALOR
Med-Line	IMIP	100,00
Tradução	Norma	900,00
Digitação	DigiArte	300,00
Impressão	DigiArte	900,00
Encadernação	Copiadora Caxangá	300,00
Estatística	Edmilson	300,00
Outros Serviços	Elaboração de modelos experimentais	5.000,00

Total R\$ 7.800,00

ORÇAMENTO

MATERIAL DE CONSUMO

QUANT.	DISCRIMINAÇÃO	UNID	PREÇO UNIT. R\$	PREÇO TOTAL R\$
08	Ração Labina	PCT	60,00	480,00
50	Máscaras descartáveis	UNID	0,10	5,00
01	Ácido acético glacial	LITRO	40,00	40,00
03	Solução de cloreto de sódio	LITRO	3,00	9,00
10	Caixas de luva para procedimento	CX	12,00	120,00
01	Dimetilsulfóxido	PCT	100,00	100,00
01	Óculos de proteção	UNID	17,00	17,00
03	Seringa descartável c/ agulha 1ml	CX	45,00	135,00
08	Etanol P.A.	LITRO	12,50	100,00
01	Etiquetas adesivas	PCT	3,00	3,00
01	Toucas descartáveis	CX	7,00	7,00
03	Papel toalha	PCT	2,70	8,10
D 0899	Diazepam (Sigma)	100 mg	120 mg	110,00
M 8777	Morfina (Sigma)	50 mg	110,0	110,00
D0899	Diazepam (Sigma)	100 mg	120,00	120,00
N7758	Naloxone (Sigma)	250 mg	200,00	200,00
P6500	Pentylenetetrazole (Sigma)	25 g	55,00	55,00
P3761	Pentobarbital sódico (Sigma)	25 g	140,00	140,00
F6300	Flumazil (Ro 15 -1788) (Sigma)	25 mg	150,00	150,00
P1675	Picrotoxina (Sigma)	1 g	90,00	90,00
P0343	Tween 80 (Sigma)	50 mL	70,00	70,00
V6879	(Lys) vasopressin (Sigma)	1 mg	50,00	50,00
			Total R\$ 2.219,10	

MATERIAL PERMANENTE + SERVIÇOS DE TERCEIROS + MATERIAL DE CONSUMO

TOTAL GERAL R\$ 22. 219, 60
