

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

ANDERSON GUSTAVO SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM O EXTRATO DE *Passiflora*
alata NO MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR
6-HIDROXIDOPAMINA.**

PONTA GROSSA

2018

ANDERSON GUSTAVO SANTOS

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM O EXTRATO DE *Passiflora alata* NO MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi

Co-Orientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso

PONTA GROSSA

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

S237 Santos, Anderson Gustavo

Avaliação do efeito do tratamento com o extrato de Passiflora alata no modelo animal de doença de Parkinson induzido por 6-Hidroxi dopamina/ Anderson Gustavo Santos. Ponta Grossa, 2018.

98f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Fisiologia e Fisiopatologia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi.

Coorientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso.

1.Passiflora alata. 2.Doença de Parkinson. 3.Neuroproteção. I.Miyoshi, Edmar. II. Velloso, José Carlos Rebuglio. III. Universidade Estadual de PontaGrossa. Mestrado em Ciências Biomédicas. IV. T.

CDD: 615.321



Universidade Estadual
de Ponta Grossa



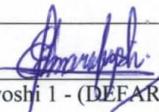
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISIOLÓGIA E FISIOPATOLOGIA, NÚMERO DA ATA 02/2018, DO MESTRANDO ANDERSON GUSTAVO SANTOS REALIZADO NO DIA 19 DE FEVEREIRO DE 2018, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos dezoito dias de fevereiro de dois mil e dezoito, às 13hs30min, na sala 115, Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência do **Professor Dr. Edmar Miyoshi** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas do mestrando **Anderson Gustavo Santos** na linha de pesquisa; Fisiopatologia do Sistema Nervoso Central, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professor Dr. Gilson Cesar Nobre Franco (UEPG/Pr)** e **Professora Dra. Lea Rosa Chioca Ferro (Faculdades Ponta Grossa/ Pr)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **“AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM O EXTRATO DE PASSIFLORA ALATA NO MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6 - HIDROXIDOPAMINA.”** Encerrado a defesa, e após reunião, a comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como APROVADO considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. O aluno deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim não

Novo título: _____



Edmar Miyoshi 1 - (DEFAR - UEPG) - Presidente



Gilson Cesar Nobre Franco 2 - (DEBIO - UEPG) – Titular



Lea Rosa Chioca Ferro 3- (Faculdades Ponta Grossa) – Titular

Ponta Grossa, 19 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho à minha mãe e avós,
os quais me permitiram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primariamente, a **Deus** pelas bênçãos, privilégios e pelas oportunidades que surgiram em minha vida.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Edmar Miyoshi**, pela sua confiança em ter me orientado. Agradeço pela sua paciência, serenidade, companheirismo, pelos conhecimentos transmitidos e por todos os esforços dedicados. Espero um dia poder ser um profissional tão competente e zeloso pela profissão farmacêutica e pela pesquisa científica assim como o senhor.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. José Carlos R. Velloso**, que me acompanha desde a iniciação científica. Você é um grande exemplo de pessoa e pesquisador para mim.

A minha mãe, **Aricléia**, e aos meus avós **Pelaguia e Dirceu**, que sempre foram os meus pilares, aqueles que tornaram tudo isto possível graças ao seu enorme coração e ao seus inúmeros esforços e abdições. Sou eternamente grato a vocês. Agradeço, também, aos meus familiares pelas palavras de incentivo e por todo o apoio.

Ao meu companheiro e melhor amigo, **Erick**. Obrigado por tornar a minha vida mais feliz e por sempre me incentivar a ser cada vez melhor.

Aos membros da banca, **Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco** e **Prof^a. Lea Rosa Chioca Ferro**, pelo aceite em participar da avaliação do meu trabalho.

Agradeço ao **Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro** pelos conhecimentos compartilhados, pelo convívio, companheirismo e amizade.

Agradeço a **Prof^a. Dra. Jane Manfron Budel**, que permitiu que este trabalho se consolidasse sem medir esforços. Obrigado por nos ajudar na coleta da planta e por ser sempre muito solícita.

Agradeço a **Prof^a Dra. Romaiiana Picada Pereira** e a **Ana Carolina M. Hacke**, à **Luciane Monteiro**, a **Daniela G. Folquitto**, ao **Prof. Dr. Leandro Lipinski**, à **Prof^a Mackelly Simionatto** e ao **Bruno R. Minozzo** pelo auxílio na execução de experimentos.

As minhas amigas de laboratório: **Lillian, Susi, Ana Paula, Camila e Ana Carolina** por todo companheirismo. O temido mestrado se tornou muito mais leve com a sua amizade. Agradeço de modo especial a Lillian, que se tornou uma grande amiga. Agradeço pelas risadas e momentos engraçados, pelos fiascos e pelas viagens compartilhadas.

Aos alunos de iniciação científica: **Alana, Amanda, Gabriela, Gustavo, Juliane, Lucas, Luciana, Thaynara**, por toda a ajuda e amizade. Sem vocês este trabalho não seria possível.

Aos meus demais amigos pelo companheirismo, incentivo e carinho. Em especial à **Ana Flávia Tostes e Alícia Krüger**, por estarem sempre presentes em minha vida.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas**.

A **Universidade Estadual de Ponta Grossa** por me oferecer suporte desde a graduação até o mestrado.

A **CAPES** pelo auxílio financeiro.

E a todos que colaboraram, de alguma maneira, com este trabalho e esta conquista.

“Quando a gente anda sempre em frente, não se pode ir muito longe”.

O Pequeno Príncipe - Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença crônica e neurodegenerativa, de etiologia não totalmente elucidada. Estudos demonstram que processos oxidativos podem estar envolvidos nesta morte neuronal. Sabendo-se disso, pesquisas têm sido direcionadas na busca de plantas medicinais e substâncias que possam atuar inibindo tais processos oxidativos. A *Passiflora alata* é uma planta nativa do Brasil e que possui uma atividade antioxidante descrita na literatura. Além disto, há evidências de que espécies do gênero *Passiflora* podem atuar frente a doenças neurodegenerativas, como a DP. Através disto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com o extrato hidroalcoólico de *P. alata* (EHPA) em um modelo animal de DP, induzido pela neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA). O extrato das folhas de *P. alata* foi preparado através da extração com solução hidroalcoólica a 95%, e posteriormente foi realizado a determinação do conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides, além de ser determinada a sua atividade antioxidante frente aos ensaios DPPH* e ABTS⁺. Para avaliar o efeito *per se* do EHPA, foi realizada uma avaliação do efeito comportamental, de diferentes doses do extrato, em animais não lesionados. Para a identificação do possível efeito neuroprotetor da planta, os animais foram separados em 5 grupos experimentais: SHAM (falso-operado), 6-OHDA controle, 6-OHDA + 100mg/Kg/dia de EHPA, 6-OHDA + 200mg/Kg/dia de EHPA e 6-OHDA + 300mg/Kg/dia de EHPA. Após a divisão dos grupos, os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica para a administração bilateral da neurotoxina 6-OHDA ou de solução salina (SHAM) no feixe prosencefálico medial. No dia seguinte, iniciou-se o tratamento com os extratos, por via oral, tendo uma duração de 14 dias. Após o término do tratamento, os animais foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: Reconhecimento social, Campo aberto, Reconhecimento de objetos, Labirinto em cruz elevado e Natação forçada. Após o término dos testes, os animais foram sacrificados e foram coletados sangue e cérebro (estriado) para a determinação de GSH, catalase, parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os resultados apresentados sugerem um efeito neuroprotetor resultante do tratamento com o EHPA, indicando uma reversão do déficit cognitivo e comportamentos do tipo depressivo e ansioso, resultantes da lesão com a 6-OHDA. No entanto, não foram observadas alterações comportamentais nos ratos não lesionados. Além disto, o extrato apresentou um bom desempenho frente ao modelo de captura de radicais livres ABTS⁺, indicando a sua atividade antioxidante. Não foram observadas diferenças entre os grupos nas concentrações de GSH e na atividade da catalase, tanto no plasma como no estriado. No entanto, alterações hematológicas foram identificadas nos animais lesionados. Conclui-se, portanto, que o tratamento com o EHPA reverteu os prejuízos cognitivos, efeito tipo ansioso e tipo depressivo causados pela infusão intracerebral de 6-OHDA, um modelo animal de DP.

Palavras Chave: *Passiflora alata*, Doença de Parkinson, Neuroproteção.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a chronic and neurodegenerative disease with an unknown etiology. Studies have shown that oxidative processes may be involved in this neuronal death. Thus, studies have been focused on medicinal plants and substances with antioxidant properties that may inhibit such oxidative processes. *Passiflora alata* is a Brazilian native plant with an antioxidant and neuroprotective activity, described on literature. In addition, there is evidences that species of the genus *Passiflora* can act against neurodegenerative diseases, such as PD. Hence, the aim of present investigation was to evaluate the neuroprotective effect of ethanolic extract of *Passiflora alata* (EEPA) in an animal model of PD, induced by the neurotoxin 6-Hydroxidopamine (6-OHDA). The extract of *P. alata*'s leaves was prepared by extraction with ethanolic solution (95%), and characterized by its phenolic compounds, flavonoids and the scavenger activity against DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals. To evaluate the effect *per se* of EEPA, an evaluation of the behavioral effect was carried out on non-injured animals, with different doses of the extract. For the identification of the possible neuroprotective effect of the plant, male Wistar rats were used, which were separated into 5 experimental groups: SHAM (false-operated), 6-OHDA control, 6-OHDA + 100mg/kg/day of EEPA, 6-OHDA + 200mg/kg/day of EEPA and 6-OHDA + 300mg/kg/day of EEPA. After the division of these groups, the animals were submitted to the stereotaxic surgery for bilateral administration of 6-OHDA neurotoxin or saline solution (SHAM) in the medial forebrain bundle. On following day, the treatment with the extracts started and continued for 14 days. After the treatment was finished, all the animals were submitted to the following behavioral tests: Social recognition, Open field, Object recognition, Elevated plus maze and Forced swimming. The non-injured animals, the same treatment protocol and tests were followed. Subsequently, the animals were sacrificed and blood and brain (*striatum*) were collected for the determination of GSH, catalase, hematological and biochemical parameters. The present results demonstrate a neuroprotective effect resulting from treatment with the EEPA on rats with 6-OHDA injury, indicating a reversal of cognitive deficit and depressive and anxious behaviors. However, no behavioral effects were observed in the non-injured rats. In addition, the extract exhibited a good scavenger activity against the ABTS^{•+} radical, indicating its antioxidant activity. No differences were observed between groups on GSH concentrations and catalase activity, on blood and striatal tissue. However, hematological changes were identified in the injured animals. In conclusion, the treatment with EEPA reversed the cognitive, anxious and depressive impairments caused by the intracerebral infusion of 6-OHDA, an animal model of PD.

Keywords: *Passiflora alata*, Parkinson's Disease, Neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Sintomas motores da Doença de Parkinson	18
FIGURA 2	Sintomas não motores que podem estar presentes no paciente com Doença de Parkinson	19
FIGURA 3	Comparação entre aspectos fisiopatológicos entre um paciente normal e um com a Doença de Parkinson	21
FIGURA 4	Relação estrutural entre dopamina e 6-hidroxidopamina	25
FIGURA 5	<i>Passiflora alata</i> Curtis	27
FIGURA 6	Estrutura química da vitexina, um flavonóide considerado como o composto majoritário das folhas da <i>Passiflora alata</i>	28
FIGURA 7	Exsicata da planta <i>Passiflora alata</i> Curtis	32
FIGURA 8	Ordem cronológica dos testes comportamentais realizados	38
FIGURA 9	Representação do teste de reconhecimento social	39
FIGURA 10	Teste de reconhecimento de objetos	40
FIGURA 11	Teste do campo aberto	41
FIGURA 12	Teste do labirinto em cruz elevado	42
FIGURA 13	Teste de natação forçada	44
FIGURA 14	Ordem cronológica dos testes comportamentais realizados após a realização da cirurgia estereotáxica	47
FIGURA 15	Gráfico contendo a porcentagem de inibição radicalar do DPPH [•] em função das concentrações dos extratos	52
FIGURA 16	Gráfico contendo a porcentagem de inibição radicalar do ABTS ^{•+} em função das concentrações dos extratos	53
FIGURA 17	Gráfico contendo a relação entre as investigações (RID) no teste de reconhecimento social, para os grupos tratados com o extrato	54
FIGURA 18	Escore de discriminação, do teste de reconhecimento de objetos, para os grupos tratados com o extrato	55
FIGURA 19	Gráfico contendo o tempo de escalada para os animais tratados com o extrato	58
FIGURA 20	Relação entre as investigações (RID) para os grupos submetidos a cirurgia estereotáxica	59
FIGURA 21	Escores de discriminação para os grupos submetidos a cirurgia estereotáxica	60
FIGURA 22	Gráfico contendo os parâmetros de tempo no centro e tempo na periferia para o teste do campo aberto realizado com os animais submetidos a cirurgia estereotáxica	62
FIGURA 23	Gráficos contendo os parâmetros de natação, imobilidade e escalada para os animais submetidos a cirurgia estereotáxica	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Grupos experimentais utilizados para avaliação do efeito <i>per se</i> de diferentes doses do extrato sobre modelos comportamentais 37
TABELA 2	Relação dos grupos experimentais para a avaliação do efeito dos extratos sobre um modelo animal de doença de Parkinson 45
TABELA 3	Resultados para o teste de campo aberto 56
TABELA 4	Resultados para o teste de labirinto em cruz elevado 57
TABELA 5	Resultados para o teste de natação forçada 58
TABELA 6	Resultados do teste de campo aberto, para os animais submetidos a cirurgia estereotáxica 61
TABELA 7	Resultados do teste de labirinto em cruz elevado, para os animais submetidos a cirurgia estereotáxica 63
TABELA 8	Resultados do teste de natação forçada, para os animais submetidos a cirurgia estereotáxica 64
TABELA 9	Conteúdo de GSH no estriado 66
TABELA 10	Conteúdo de GSH no plasma 67
TABELA 11	Atividade da catalase do estriado 67
TABELA 12	Atividade da catalase nos eritrócitos 68
TABELA 13	Número total de hemácias (milhões/ μ L) e hematócrito (%) dos animais submetidos a cirurgia estereotáxica 69

LISTA DE ABREVIATURAS

DP	Doença de Parkinson
EHPA	Extrato hidroalcoólico de <i>Passiflora alata</i>
SNpc	Substância Negra parte compacta
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
NOS	Espécies reativas de nitrogênio
SOD	Superóxido dismutase
GSH	Glutathiona reduzida
CAT	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
MAO	Enzima Monoamino-oxidase
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
COMT	Enzima Catecol-O-metiltransferase
GABA	Ácido gama-aminobutírico
SNC	Sistema Nervoso Central
GABAr	Receptor para o ácido gama-aminobutírico
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
DPPH [•]	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ABTS ^{•+}	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
FPM	Feixe prósecefálico medial
RID	Relação entre as investigações (Ratio of Investigation Duration)
ED	Escore de discriminação
SHAM	Falso-operado
Eq	Equivalente
IRM	Inibição radicalar máxima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Doença de Parkinson.....	16
2.1.1 Histórico	16
2.1.2 Epidemiologia.....	16
2.1.3 Fisiopatologia da Doença.....	17
2.1.4 Etiologia	21
2.1.5 Tratamento.....	25
2.2 <i>Passiflora alata</i>	26
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Material botânico	32
4.2 Preparo dos extratos	32
4.3 Caracterização do perfil químico e da atividade antioxidante do extrato	33
4.3.1 Determinação da concentração de compostos fenólicos	33
4.3.2 Determinação da concentração de flavonoides	34
4.3.3 Avaliação da atividade de sequestro de radicais livres pelo extrato	34
4.4 Animais.....	36
4.5 Avaliação do efeito comportamental resultante do tratamento com o extrato hidroalcoólico de <i>Passiflora alata</i>	37
4.5.1 Testes comportamentais	38
4.5.2 Avaliação de memória.....	38
4.5.3 Avaliação da atividade locomotora.....	41
4.5.4 Avaliação do comportamento do tipo ansioso	42
4.5.5 Avaliação do comportamento do tipo depressivo	43
4.6 Avaliação do efeito do extrato em um modelo animal de doença de Parkinson.	44
4.6.1 Cirurgia estereotáxica	45
4.6.2 Testes Comportamentais	47
4.7 Quantificação de GSH no estriado	47
4.9 Quantificação de GSH no plasma.....	48
4.10 Determinação da atividade da catalase no estriado	48
4.11 Determinação da atividade da catalase nos eritrócitos.....	49
4.12 Exames Hematológicos e Bioquímicos.....	49

4.13 Análise Estatística	50
5. RESULTADOS.....	51
5.1 Caracterização do perfil químico e da atividade antioxidante do extrato	51
5.1.1 Determinação da concentração de compostos fenólicos e flavonoides	51
5.1.2 Avaliação da atividade scavenger do extrato pelo método DPPH*	51
5.1.3 Avaliação da atividade scavenger do extrato pelo método ABTS ⁺⁺	52
5.2 Avaliação dos efeitos comportamentais resultantes do tratamento com os extratos	53
5.2.1 Avaliação da Memória.....	53
5.2.2 Avaliação da atividade motora	55
5.2.3 Avaliação do comportamento do tipo Ansioso	56
5.2.4 Avaliação do comportamento do tipo Depressivo	57
5.3 Avaliação do efeito do extrato no modelo animal de Doença de Parkinson, induzido por 6-OHDA.....	59
5.3.1 Avaliação sobre a Memória (Modelo 6-OHDA)	59
5.3.2 Avaliação da atividade motora (Modelo 6-OHDA).....	61
5.3.3 Avaliação do comportamento do tipo Ansioso (Modelo 6-OHDA).....	62
5.3.4 Avaliação do comportamento do tipo Depressivo (Modelo 6-OHDA).....	63
5.4 Concentração de GSH no estriado	66
5.5 Concentração de GSH no plasma	66
5.6 Atividade da catalase no estriado	67
5.7 Atividade da catalase nos eritrócitos	68
5.8 Exames Bioquímicos e Hematológicos.....	68
5.9 Resumo dos resultados obtidos.....	70
6. DISCUSSÃO	72
6.1 Perfil químico e Caracterização da atividade antioxidante.....	72
6.2 Avaliação dos efeitos comportamentais resultantes do tratamento com o extrato	73
6.3 Avaliação do efeito do extrato no modelo animal de Doença de Parkinson, induzida por 6-OHDA.....	76
7. CONCLUSÕES	84
8. REFERÊNCIAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a nível mundial, existe um aumento considerável da população idosa e projeções futuras indicam uma elevação ainda maior na porcentagem desta população. Este fato é preocupante, visto que, o envelhecimento está correlacionado com uma maior incidência de doenças neurodegenerativas, entre elas, a Doença de Parkinson (DP).

A DP é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal, sendo este o mecanismo responsável pelo aparecimento dos sintomas característicos da doença, como o tremor em repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural, que estão associados a alterações motoras. Além dos sintomas motores há a presença de sintomas não-motores como a depressão, ansiedade, alterações cognitivas e autonômicas. Estes fatores levam a uma redução da sobrevida e da qualidade de vida do paciente.

Apesar dos inúmeros avanços para elucidar a etiopatogenia da doença, ainda não se sabe claramente como ela se desenvolve. Porém, diversos fatores têm sido relacionados a ela, como a exposição a toxinas ambientais e alterações genéticas, que levam a formação de processos neuroinflamatórios e oxidativos. O estresse oxidativo, gerado pelo desbalanço entre o sistema antioxidante endógeno e a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio), é um dos principais fatores que levam a morte neuronal, uma vez que, ele promove alterações em moléculas essenciais como proteínas, lipídeos de membrana e até mesmo no DNA.

Atualmente, os tratamentos existentes têm uma finalidade paliativa, não havendo alternativas terapêuticas direcionadas a prevenção do aparecimento ou progressão da doença, além disto, os efeitos colaterais decorrentes dos fármacos utilizados prejudicam a qualidade de vida do paciente. No entanto, esforços têm sido direcionados na busca de substâncias que possam reverter os processos oxidativos e de morte celular, resultando num efeito de neuroproteção.

As plantas medicinais são importantes alvos na identificação de compostos antioxidantes. A *Passiflora alata* é uma planta nativa da América do Sul e que apresenta em sua composição diversos compostos com estas propriedades. Além da atividade antioxidante, a *P. alata* apresenta diversas outras aplicações terapêuticas atuando como antidepressiva, ansiolítica e sedativa. Além disto, evidências na literatura mostram o papel neuroprotetor de plantas do gênero *Passiflora*, atuando na

inibição de processos deletérios associados a doenças neurodegenerativas, como na DP. No entanto, não existem estudos que mostrem um efeito neuroprotetor associado ao tratamento com *P. alata* no modelo animal de DP induzida pela 6-Hidroxidopamina (6-OHDA).

A partir disto, o presente estudo buscou avaliar o efeito do extrato de *P. alata*, visando identificar uma possível alternativa terapêutica no tratamento da DP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇA DE PARKINSON

2.1.1 Histórico

A Doença de Parkinson (DP), que é uma desordem neurológica de caráter crônico e progressivo, está em segundo lugar em prevalência entre as doenças neurodegenerativas, ficando atrás somente da Doença de Alzheimer (LENKA; PADMAKUMAR; PAL, 2017)

A DP foi descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson, um médico inglês, que publicou uma monografia denominada “An Essay on the Shaking Palsy”. Nesta monografia ele descreveu seis indivíduos, os quais tinham características clínicas muito semelhantes. A partir disto, estas manifestações foram chamadas, por ele, de *shaking palsy*, que pode ser traduzida ao português como “paralisia agitante” (FAHN, 2003; PARKINSON, 2002).

Jean Martin Charcot, o pai de neurologia, 70 anos depois, aprimorou a descrição desta doença, denominando-a em homenagem a James Parkinson. Suas contribuições resultaram na caracterização dos principais sinais cardinais da doença (tremor em repouso, instabilidade postural, rigidez muscular), além da introdução do uso da atropina (beladona) para o tratamento paliativo da doença (GOETZ, 1986, 2016).

2.1.2 Epidemiologia

Atualmente vivemos em um período de envelhecimento populacional a nível mundial. Em comparação com 50 anos atrás a população vive, hoje em dia, em média de 20 anos a mais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Em 2011, a população idosa, que apresenta 60 anos ou mais, representou 10,8% da população total brasileira, o que corresponde a cerca de 20,5 milhões de idosos (MASSANO, 2011). Para o ano de 2020, projeções indicam que a população idosa brasileira atinja 14% da população total (30,9 milhões de habitantes). Este aumento populacional altera a estrutura social, não somente em aspectos econômicos, como também em aspectos relacionados a saúde, uma vez que, o aumento populacional leva a um aumento da

incidência de doenças relacionadas a idade, como as doenças neurodegenerativas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Estudos demonstram que a prevalência e a incidência da DP estão intimamente relacionadas com a idade, porém, há a influência de outros fatores como sexo e localização geográfica. Pringsheim *et al.* (2014) em seu estudo de meta-análise, demonstrou uma maior prevalência da DP em indivíduos acima de 60 anos (428 por 100.000 habitantes) do que em idades menos avançadas. A prevalência em idosos acima de 80 anos foi ainda maior, 1903 por 100.000 habitantes, demonstrando a correlação da idade e desenvolvimento da doença. Observou-se, além disto, a maior prevalência da doença em indivíduos homens, e também, em residentes em países Europeus e nos Estados Unidos quando comparado com países Asiáticos. Estudos de incidência da DP também mostram uma correlação entre o aumento da idade e o número de casos novos da doença (HIRSCH *et al.*, 2016).

2.1.3 Fisiopatologia da Doença

A fisiopatologia da Doença de Parkinson está relacionada com a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc) e da via nigroestriatal, levando a uma redução de dopamina (KALIA; LANG; SHULMAN, 2015). Esta redução de dopamina, tanto na SNpc como nos núcleos da base, que são regiões responsáveis pelo controle motor (JANKOVIC, 2008), está associada com o desenvolvimento dos sintomas motores característicos da doença (DEMAAGD; PHILIP, 2015), os quais estão descritos na Figura 1.

SINTOMAS MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON
Tríade Clássica (Sintomas cardinais da doença)
<p>1) Tremor em repouso</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sintoma inicial e característico da doença • Acomete principalmente os membros distais, mas também ocorre em membros inferiores e regiões da cabeça (lábios, mandíbula, língua etc). <p>2) Bradicinesia</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lentidão e diminuição da amplitude do movimento • Ocorre em 80% a 90% dos pacientes <p>3) Rigidez</p> <ul style="list-style-type: none"> • Resistência ao movimento muitas vezes acompanhadas do efeito da “roda denteadada” (movimentos “enferrujados”) • Ocorre em 80% a 90% dos pacientes
Outros sintomas motores
<ul style="list-style-type: none"> • Instabilidade postural • Disartria (Distúrbio na articulação da fala) • Dystonia (Espasmos involuntários)

FIGURA 1. Sintomas motores da Doença de Parkinson
 Fonte: Adaptado de DeMaagd; Philip (2015).

Os sinais cardinais e motores da doença surgem quando mais de 70% dos neurônios dopaminérgicos são destruídos (CHENG; ULANE; BURKE, 2010; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003a; ROSS *et al.*, 2004; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017).

Além do acometimento dos neurônios dopaminérgicos, diversos estudos demonstraram que outros subtipos neuronais também podem ser afetados durante o desenvolvimento da DP, como os neurônios glutamatérgicos (LITIM; MORISSETTE; DI PAOLO, 2017; STARR, 1995), GABAérgicos (BŁASZCZYK, 2016), colinérgicos (BENSAID *et al.*, 2016), serotoninérgicos (KISH *et al.*, 2008; YE *et al.*, 2017) e noradrenérgicos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003b; ROMMELFANGER; WEINSHENKER, 2007).

A depleção destes diversos sistemas neuronais, a degeneração de neurônios dopaminérgicos em fases iniciais da DP, bem como o acometimento de diversas regiões encefálicas estão associados aos sintomas não-motores da doença. Apesar de a DP estar normalmente associada com os sintomas motores, antes do seu

aparecimento há a presença dos sintomas não motores da doença. (BARONE, 2010; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017).

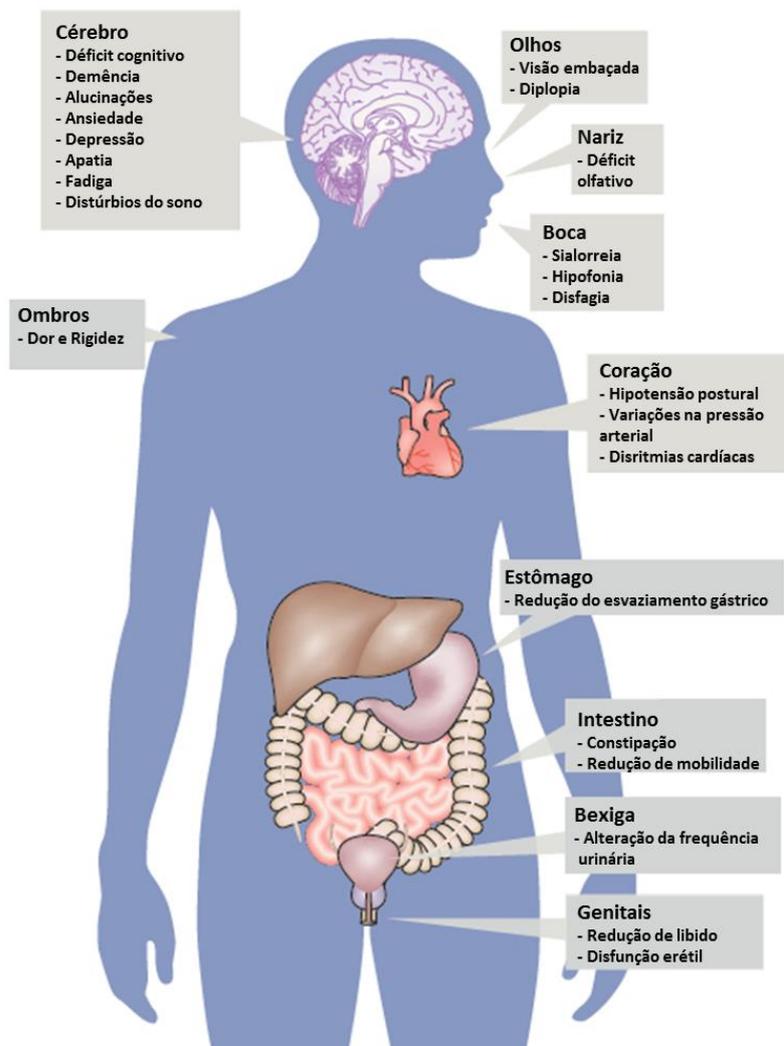


FIGURA 2. Sintomas não motores que podem estar presentes no paciente com Doença de Parkinson. Fonte: Adaptado de Schapira; Chaudhuri; Jenner, (2017)

Grande parte dos sintomas descritos na imagem acima estão relacionados com o comprometimento de neurônios dopaminérgicos e colinérgicos (sistema nervoso autônomo). Além disto, algumas regiões cerebrais estão envolvidas, como o bulbo olfatório e amígdala (Hiposmia), córtex occipital (alucinações), gânglios da base (ansiedade), áreas corticais e límbicas (depressão), córtex frontal (disfunção cognitiva), hipotálamo e formação reticular (distúrbios do sono), *locus coeruleus*, núcleos da rafe, amígdala e tálamo (dor) (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017).

Braak *et al.* (2003) propuseram mecanismos para o desenvolvimento da DP. Em seu estudo, foi proposto que o estímulo inicial para o desenvolvimento da doença

seria o contato/estímulo de patógenos ou toxinas ambientais sobre os neurônios entéricos e olfatórios, atuando como um gatilho para a agregação de α -sinucleína, que é uma proteína neuronal associada a DP (STOLZENBERG *et al.*, 2017). Após a formação da α -sinucleína há a sua disseminação para o sistema nervoso central, através do nervo vago e do bulbo olfatório, podendo chegar até a SNpc, contribuindo para a degeneração neuronal, através de diversos mecanismos, como o estresse oxidativo (BRAAK *et al.*, 2003).

A α -sinucleína está relacionada com a formação dos corpúsculos de Lewy, que são agregados proteicos, considerados como uma das principais características patológicas encontradas em pacientes com DP (*post mortem*) (STOLZENBERG *et al.*, 2017).

Outra marcante característica patológica da doença é a redução da pigmentação da SNpc. A degeneração dos neurônios leva a esta redução, uma vez que, tais neurônios produzem neuromelanina, que é responsável por esta coloração. A neuromelanina é produzida através da oxidação de catecolaminas, como a dopamina. A produção e acumulação de neuromelanina se inicia em fases iniciais da vida humana, e em situações fisiológicas não há a sua excreção (ZUCCA *et al.*, 2014).

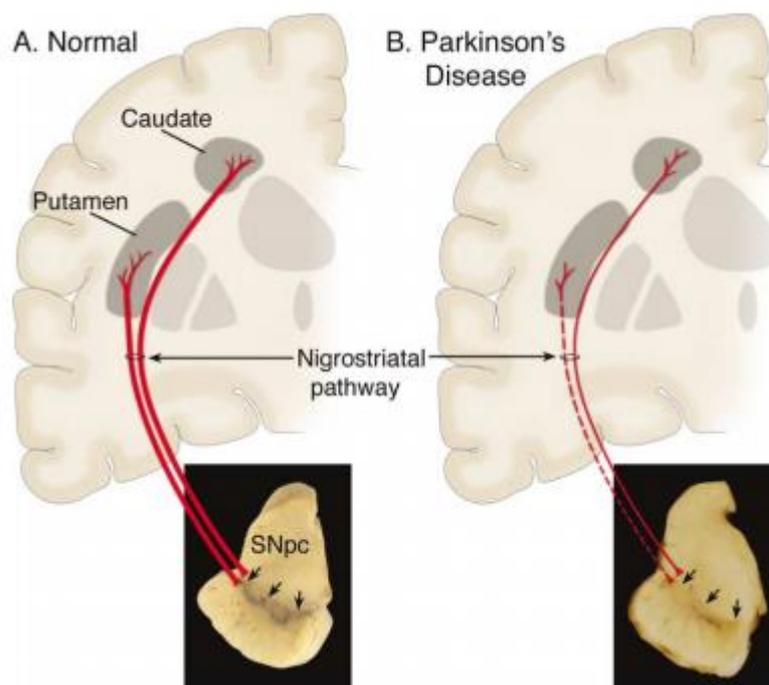


FIGURA 3. Comparação entre aspectos fisiopatológicos entre um paciente (A) normal e um com a (B) Doença de Parkinson. Nos pacientes acometidos com a doença há a redução de neurônios da via nigroestriatal, além da redução da pigmentação (neuromelanina) da substância negra parte compacta. Fonte: Dauer; Przedborski, (2003b)

Apesar dos inúmeros esforços para tentar elucidar os aspectos que levam a este quadro fisiopatológico, ainda não se sabe exatamente o que leva ao desenvolvimento da doença (DOVERO; GROSS; BEZARD, 2016).

2.1.4 Etiologia

A DP é uma doença neurodegenerativa que não possui uma etiologia muito bem estabelecida (HOANG, 2014). Apesar de não se saber, de maneira bem elucidada, como e o que leva ao desencadeamento da doença, acredita-se que fatores genéticos e ambientais possam estar envolvidos, podendo atuar até mesmo de maneira concomitante (SCHAPIRA; JENNER, 2011).

Entre os fatores genéticos, o primeiro a ser descoberto, há 20 anos atrás, foi uma mutação no gene *SNCA*, que codifica a proteína α -sinucleína (POLYMERPOULOS *et al.*, 1997). Desde então, diversos genes tem sido associados a doença, principalmente com a forma familiar (KOROS; SIMITSI; STEFANIS, 2017). A mutação mais frequente dos pacientes com DP ocorre no gene da *LRRK2* (*leucine-rich repeat kinase 2*), uma mutação autossômica-dominante (LILL, 2016), que codifica uma proteína que parece estar associada ao transporte

vesicular intracelular (ROOSEN; COOKSON, 2016). Dentre as mutações autossômicas recessivas, as principais são: *Parkin* (KITADA *et al.*, 1998), *PINK1* e *DJ-1* (BONIFATI *et al.*, 2005), sendo que todas estão associadas ao parkinsonismo juvenil (KOROS; SIMITSI; STEFANIS, 2017).

Outro importante fator associado com a doença é a exposição a pesticidas agrícolas e toxinas ambientais (TIMPKA, 2017). O papel destes fatores ambientais na doença surgiu a partir da descoberta da neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) a partir dos estudos de Langston *et al.* (1984), que demonstraram uma alta seletividade deste composto para a região da substância negra, localizada no mesencéfalo, de primatas e não-primatas. Anteriormente a este estudo, Davis *et al.* (1979) já haviam descrito o caso de um paciente com quadro de parkinsonismo, o qual se desenvolveu após a utilização de drogas análogas a meperidina (analgésico opiáceo), sintetizadas por ele mesmo. Neste processo de síntese do análogo de meperidina houve a formação do MPTP, que é um composto secundário desta síntese (LANGSTON; LANGSTON; IRWIN, 1984).

A partir disto, novos estudos tentaram elucidar o papel de toxinas sobre a etiopatogenia da doença onde foram descobertos o papel da rotenona (BETARBET *et al.*, 2000) e do paraquat (KUTER *et al.*, 2007), os quais atualmente são utilizados como modelo para a indução de DP (UVERSKY, 2004).

Como já citado anteriormente, Braak *et al.* (2003) introduziram uma hipótese sobre a influência destes fatores ambientais sobre a doença, sugerindo que estas toxinas promoveriam estímulos celulares que resultariam na formação de α -sinucleína, a qual se disseminaria entre os neurônios, semelhantemente a proteínas infecciosas denominadas como príons (BRUNDIN; MELKI, 2017), desencadeando um processo de neuroinflamação e estresse oxidativo (DEAS *et al.*, 2016).

A neuroinflamação crônica é um importante fator fisiopatológico que está intimamente relacionado com a degeneração neuronal na DP. Análises em modelos animais da doença e em pacientes com DP *post-mortem* indicaram a presença de neuroinflamação através do aumento de citocinas pró-inflamatórias e ativação das células da glia. Acredita-se, portanto, que o aumento destes fatores resulta no aumento da degeneração neuronal (WANG; LIU; ZHOU, 2015). O aumento do número de células da micróglia foi descrito em diversas regiões cerebrais, como na substância negra, estriado e hipocampo (MANOCHA *et al.*, 2017). Além da microgliose, foi verificado a hipereatividade de astrócitos, que são responsáveis pelo metabolismo e

fluxo sanguíneo cerebral (TJALKENS; STREIFEL; MORENO, 2017), e aumento de fatores inflamatórios oriundos do sistema imunológico periférico, como: aumento de IL-2 (interleucina-2), IL-6 (interleucina-6), IL-1 β (interleucina 1 beta) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) (HIRSCH; HUNOT, 2009).

Associado ao processo de neuroinflamação, o estresse oxidativo é outro fator importante no processo de degeneração neuronal (TAYLOR; MAIN; CRACK, 2013). O estresse oxidativo é causado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e NOS), que são moléculas altamente reativas, e que podem causar diversos efeitos deletérios no organismo (MOTHERWELL; ZUO, 2013). Além do aumento destas espécies reativas, o estresse oxidativo é também caracterizado pela depleção dos sistemas antioxidantes, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona reduzida (GSH), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) (FRANCO *et al.*, 2017; NIRANJAN, 2014).

O aumento de espécies reativas promove diversos efeitos deletérios sobre a célula, incluindo a modificação de proteínas, lipídeos e até mesmo sobre o DNA (ácido desoxirribonucleico) (MOTHERWELL; ZUO, 2013). Tais efeitos danosos resultam em diversas alterações que podem levar a apoptose, como alteração de mecanismos de transporte, morfologia celular (dano sobre a membrana celular), alterações no metabolismo, sinalização e ciclo celular, assim como a formação de mutações genéticas e ativação de respostas inflamatórias (RANI *et al.*, 2016).

A neuroinflamação, disfunção mitocondrial e o metabolismo da dopamina são as principais fontes de ROS e NOS na DP (SARRAFCHI *et al.*, 2016; YAN; WANG; ZHU, 2013).

A disfunção mitocondrial ocorre em resultado de diversos defeitos bioenergéticos e de mutações no DNA mitocondrial, assim como, mutações relacionadas a mitocôndria no DNA nuclear. Estes efeitos promovem diversas alterações, como modificações na morfologia mitocondrial e alterações no transporte de moléculas (BOSE; BEAL, 2016). Estas modificações mitocondriais levam ao aumento da concentração de radicais livres dentro da célula, gerando efeitos nocivos em importantes componentes celulares, como a membrana lipídica (através de reações de peroxidação lipídica), proteínas celulares e no DNA (MOTHERWELL; ZUO, 2013).

O primeiro estudo que demonstrou o efeito da disfunção mitocondrial sobre a etiopatogenia da DP foi, novamente, o estudo de Langston *et al.* (1984) que

demonstraram que o efeito deletério induzido pelo MPTP teve um efeito inibitório sobre o complexo mitocondrial I, que é um dos componentes da cadeia transportadora de elétrons. Outras toxinas como o paraquat e rotenona também estão associados a disfunção mitocondrial (HEINZ *et al.*, 2017; RECZEK *et al.*, 2017).

Além do papel das toxinas, também foi demonstrada a participação de mutações na indução do estresse oxidativo (BOSE; BEAL, 2016). Um exemplo é a mutação do gene que codifica a proteína DJ-1, que atua como uma peroxirredoxina mitocondrial (ANDRES-MATEOS *et al.*, 2007), neutralizando ROS. Assim como outras mutações, como a *SNCA*, *Parkin*, *PINK1*, *LRRK2* e *VPS35*, que também parecem estar associadas ao desenvolvimento da disfunção mitocondrial (BOSE; BEAL, 2016).

Assim como a disfunção mitocondrial, o metabolismo da dopamina também está associado ao aumento de ROS. A dopamina pode ser metabolizada por uma via enzimática e uma não-enzimática e ambas resultam na formação de ROS (FOLLMER; NETTO, 2013; SARRAFCHI *et al.*, 2016).

Durante o processo enzimático de oxidação da dopamina pela enzima MAO (monoamina oxidase) ocorre a formação de peróxido de hidrogênio, que é o substrato para a formação de radicais superóxido. Esta oxidação promove a formação de DOPAL (3,4-Diidroxifenilacetaldeído), que quando metabolizado também gera a formação de radicais superóxido (FOLLMER; NETTO, 2013).

Enquanto isso, na via não-enzimática, a dopamina é auto-oxidada formando o radical dopamina semi-quinona e dopamina quinona, que são substrato para a formação de neuromelanina, mas que também promovem efeitos deletérios sobre o neurônio (BURBULLA *et al.*, 2017; FOLLMER; NETTO, 2013).

2.1.4.1 Modelo animal da 6-hidroxidopamina (6-OHDA)

A 6-OHDA é uma neurotoxina derivada da dopamina que quando acumulada no citosol induz a citotoxicidade de neurônios catecolaminérgicos (RODRIGUEZ-PALLARES *et al.*, 2007). Esse acúmulo se dá através do sistema de transporte de catecolaminas e, por isto, esta neurotoxina possui uma característica seletiva para estes neurônios (BLUM *et al.*, 2001).

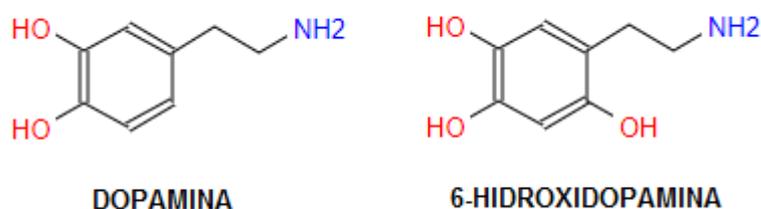


FIGURA 4. Relação estrutural entre dopamina e 6-hidroxi-dopamina
 Fonte: O Autor.

Atualmente, a 6-OHDA representa uma das toxinas mais utilizadas como modelo de indução de DP. Por conta de não apresentar características lipossolúveis, a 6-OHDA não consegue atravessar a barreira hematoencefálica, devendo, portanto, ser administrada diretamente na estrutura cerebral que se deseja lesionar (BLUM *et al.*, 2001).

O mecanismo de ação da lesão provocada pela 6-OHDA está associado a promoção de estresse oxidativo, através da inibição do complexo I da cadeia mitocondrial, levando a um aumento de ROS (GLINKA; YODIM, 1995; KUPSCH *et al.*, 2014). Outros mecanismos deletérios estão associados a 6-OHDA, como a formação de radical superóxido decorrente da oxidação da 6-OHDA (MAZZIO; REAMS; SOLIMAN, 2004), depleção de sistemas antioxidantes como a SOD, GSH e catalase (KUNIKOWSKA; JENNER, 2001; SHIMIZU *et al.*, 2002), e ativação de processos inflamatórios (SANTIAGO *et al.*, 2015).

A partir disto, o modelo da 6-OHDA garante características importantes para a avaliação do tratamento proposto neste estudo.

2.1.5 Tratamento

Atualmente não existem tratamentos que impeçam a progressão da doença e, portanto, os tratamentos que existem são paliativos e sintomáticos. A monoterapia com a levodopa é considerada como “padrão ouro” para a DP, uma vez que ela é uma substância precursora da dopamina e, portanto, causa uma melhoria significativa dos sintomas motores da doença (CONNOLLY; LANG, 2014; TITOVA; JENNER; CHAUDHURI, 2017). Outras estratégias farmacológicas são: levodopa + carbidopa (inibidor da conversão da levodopa em dopamina na periferia), inibidores da MAO e da COMT (catecol-O-metiltransferase) que participam da metabolização da dopamina,

fármacos anticolinérgicos (geram a redução de acetilcolina e melhora dos sintomas motores) e amantadina (mecanismo desconhecido) (LAURENCIN *et al.*, 2016).

Novos alvos terapêuticos têm sido buscados para o tratamento da doença, visando impedir a morte neuronal e as vias que levam a este processo (REGLODI *et al.*, 2017).

As substâncias antioxidantes presentes em extratos vegetais tem se demonstrado uma possível estratégia farmacológica para o tratamento da DP (SARRAFCHI *et al.*, 2016). Apresentando tais características, os compostos fenólicos ou polifenóis tem demonstrado importantes efeitos antioxidantes e antiinflamatórios (REGLODI *et al.*, 2017), atuando até mesmo na prevenção da disfunção mitocondrial (KARUPPAGOUNDER *et al.*, 2013) e da fibrilogênese de proteínas como a α -sinucleína e β -amilóide (Doença de Alzheimer) (BIESCHKE *et al.*, 2010).

Em função de tais evidências, este estudo propõe a avaliação do efeito neuroprotetor de um extrato vegetal que apresenta uma atividade antioxidante bem estabelecida na literatura.

2.2 *Passiflora alata*

O gênero *Passiflora* é o mais amplo gênero da família Passifloraceae, correspondendo a cerca de 600 espécies (ULMER; MACDOUGAL, 2004). A espécie mais estudada e que está presente em diversas farmacopeias internacionais, como na farmacopeia americana, é a *Passiflora incarnata* (AMERICAN HERBAL PHARMACOPOEIA, 2011). A farmacopeia brasileira apresenta as espécies *Passiflora alata* e a *Passiflora edulis*, uma vez que a *P. incarnata* não é nativa do Brasil e, portanto, não se adapta ao clima tropical (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; WOSCH *et al.*, 2015). As plantas do gênero *Passiflora* estão amplamente distribuídas nas regiões tropicais e temperadas da América, além de outras regiões tropicais do planeta, como no sul da Ásia e na Austrália (XU *et al.*, 2016).

O nome *Passiflora* advém dos exploradores espanhóis, que documentaram no século XVI a existência da planta (*P. incarnata*). Para eles, a flor da planta simbolizava a paixão (*passion*) de Cristo (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004).

A *Passiflora alata* teve sua primeira documentação em 1788, é uma planta conhecida popularmente como o maracujazeiro-doce, sendo nativa da América do Sul, especialmente do Brasil (NORIEGA *et al.*, 2011). É caracterizada botanicamente

por ser uma planta trepadeira (contendo a presença de gavinhas), com folhas no formato oval-oblonga, de diâmetro entre 7-20 cm de comprimento e 4-15 cm de largura, além disto, possui frutos amarelados de sabor adocicado e aromático e flores exuberantes, tal como mostrado na figura abaixo. (NORIEGA *et al.*, 2011; WOSCH *et al.*, 2015).



FIGURA 5. *Passiflora alata* Curtis.
Fonte: O Autor.

Dentre os componentes químicos presentes na *P. alata*, os mais importantes são os pertencentes a classe dos flavonoides (PEREIRA *et al.*, 2004), dentre eles: vitexina (composto majoritário das folhas) (MADOGGIO, 2011), isovitexina, orientina, isoorientina (DE-PARIS *et al.*, 2002; WOSCH *et al.*, 2017), rutina (MORAES; VILEGAS; LANÇAS, 1997), apigenina e hiperosídeo (MÜLLER, 2006) , além de diversos outros compostos (NORIEGA *et al.*, 2011). Além dos flavonoides, outras classes de metabólitos estão presentes na planta, como saponinas (quadrangulosídeo) (BIRK *et al.*, 2005; REGINATTO *et al.*, 2004) e alcaloides (harmalol, harmol) (MÜLLER, 2006).

A vitexina e a isovitexina possuem diversos estudos farmacocinéticos descritos na literatura (HE *et al.*, 2016). A sua absorção intestinal é baixa (WANG *et al.*, 2015), devido a interações com alimentos e com a flora intestinal. Essa interação pode promover a sua conversão em apigenina (BRAUNE; BLAUT, 2012; HE *et al.*, 2016), que também é um flavonóide. Xue *et al.* (2014) demonstraram que as concentrações plasmáticas de vitexina são baixas, e que isto pode ocorrer em função do extensivo

efeito de primeira passagem intestinal, além de influências hepáticas e gástricas. No estudo de Wang *et al.* (2015), mostrou-se que a vitexina pode promover um efeito de indução ou inibição enzimática, dependente de concentração, sobre as enzimas do CYP2C11 e também sobre o CYP3A1, porém, não tendo efeitos sobre o CYP1A2. Além disso, a vitexina possui alta ligação as proteínas plasmáticas (TONG; WU, 2012) e é amplamente distribuída em diversos tecidos (tendo menor afinidade por tecidos lipofílicos)(TONG; LIU, 2007).

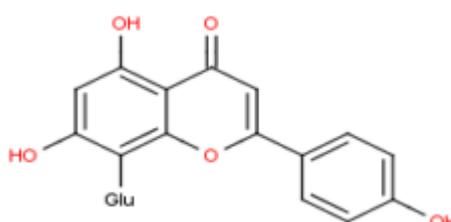


FIGURA 6. Estrutura química da vitexina, um flavonóide considerado como o composto majoritário das folhas da *Passiflora alata*.
Fonte: Noriega *et al.*, (2011).

Os flavonoides são compostos oriundos do metabolismo secundário de plantas (sendo um dos principais compostos responsáveis pela coloração de flores) e fazem parte da classe dos compostos fenólicos (polifenóis) (KUMAR; PANDEY, 2013). Estes compostos possuem diversas atividades farmacológicas, porém a mais encontrada na literatura é a atividade antioxidante (KUMAR; PANDEY, 2013). Além disso, também são identificadas atividades sobre o SNC (DOVICH; LAJOLO, 2011).

Apesar da existência da barreira hematoencefálica e da característica hidrofílica dos compostos fenólicos e flavonoides, estudos tem apontado que a captação destas substâncias para o SNC pode ocorrer em função de um possível envolvimento de transportadores, como os da família ABC (como o BCPR) e também a Pg-p (Glicoproteína p) (YOU DIM; SHUKITT-HALE; JOSEPH, 2004)(YOU DIM; SHUKITT-HALE; JOSEPH, 2004).

As plantas do gênero *Passiflora* possuem inúmeras aplicações terapêuticas, estando principalmente relacionadas a atividades sobre o SNC (sistema nervoso central), como as atividades antidepressiva, ansiolítica, sedativa, anticonvulsivante, além de propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante e antitumoral (TIWARI *et al.*, 2016).

Dentre as propriedades farmacológicas da *Passiflora alata* demonstradas na literatura, pode-se citar: atividade ansiolítica e sedativa (BARBOSA *et al.*, 2008; KLEIN *et al.*, 2014; OTOBONE *et al.*, 2005), anticonvulsivante (OGA *et al.*, 1984), anti-inflamatória (FIGUEIREDO *et al.*, 2016a; VARGAS *et al.*, 2007), antidiabética (COLOMEU *et al.*, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2016a), gastroprotetiva (inibição da formação de úlceras) (WASICKY *et al.*, 2015), anorexigênica (BOEIRA *et al.*, 2010; BRAGA *et al.*, 2013), aumento de colesterol HDL (High-density Lipoprotein) (DOYAMA *et al.*, 2005), hepato e cardioproteção (RUDNICKI, 2005; RUDNICKI *et al.*, 2007), além da atividade antioxidante (LUGATO *et al.*, 2014a; RAMAIYA; BUJANG; ZAKARIA, 2014; RUDNICKI *et al.*, 2007a, 2007b). Em relação a sua toxicidade, no estudo de Boeira *et al.* (2010) não foram observadas mortes, em camundongos, para as doses de até 4800mg/Kg (24 horas após o tratamento), além de não serem identificadas alterações bioquímicas, hematológicas, urinárias e histopatológicas (fígado, coração, rins e pulmões) para as doses de 300mg/Kg (tratamento de 14 dias) em ratos Wistar. Por outro lado, uma possível genotoxicidade foi identificada na mesma dose (BOEIRA *et al.*, 2010).

As plantas do gênero *Passiflora* são importantes alvos na busca de propriedades farmacológicas sobre o SNC. Além das atividades antidepressiva-ansiolítica e sedativa, já bem estabelecidas na literatura, há a presença de outros estudos mostrando sua ação sobre sistemas GABAérgicos (PROVENSI *et al.*, 2008), promovendo a modulação deste sistema através da inibição da recaptação em sinaptossomas e interação com o receptor GABA_B (APPEL *et al.*, 2011) e GABA_A (JAWNA-ZBOIŃSKA *et al.*, 2016). Além disto, foram identificados efeitos anticonvulsivantes, possivelmente ligados ao sistema GABAérgico em associação com sistema opióide, onde foi observada a supressão da atividade anticonvulsivante com a utilização de um antagonista do receptor de GABA (Flumazenil) e antagonista de receptor opióide (Naloxona) (ABBASI *et al.*, 2012; NASSIRI-ASL; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2007). E também, há a presença de estudos mostrando um efeito nootrópico resultante do tratamento com *P. incarnata* (JAWNA-ZBOIŃSKA *et al.*, 2016), além de neuroproteção frente a isquemia cerebral (WATTANATHORN *et al.*, 2012).

Há também evidências de que as *Passifloras* possam atuar frente a doenças neurodegenerativas. Dentre elas, há a presença de alguns estudos que demonstraram o efeito neuroprotetor destas plantas frente a excitotoxicidade induzida por glutamato,

tanto *in vivo* (SANTOS *et al.*, 2016; TAL *et al.*, 2016) como *in vitro* (TAL *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2016), mecanismo o qual também está associado ao desenvolvimento de estresse oxidativo na DP (AMBROSI; CERRI; BLANDINI, 2014). Além disso há a presença de estudos que mostram que a crisina (flavonoide presente nas flores de Passifloras), pode atuar prevenindo os efeitos deletérios em um modelo animal de Doença de Alzheimer (VEDAGIRI; THANGARAJAN, 2016). Outro estudo relacionado a doença de Alzheimer mostra o papel neuroprotetor da vitexina e isovitexina no modelo de indução de toxicidade em células PC12 por A β ₂₅₋₃₅ (25-35-amino acid residue amyloid β -peptide) (GUIMARÃES *et al.*, 2015). Em relação a DP, os achados também são positivos, uma vez que, alguns estudos têm demonstrado o papel neuroprotetor das plantas do gênero Passiflora, assim como alguns de seus constituintes, os quais atuam benéficamente sobre modelos de DP, prevenindo a morte neuronal (BRANDÃO *et al.*, 2017) e também sobre o aparecimento de sintomas da doença (INGALE; KASTURE, 2014).

Porém, na literatura revisada (PubMed, Scielo, Google Scholar, ScienceDirect, no período de outubro/2017 a fevereiro/2018) não existem evidências de um efeito neuroprotetor destas plantas frente ao modelo animal de DP induzido pela 6-OHDA, mostrando a necessidade de maiores estudos relacionados.

Através de tal embasamento teórico, observa-se um grande interesse na busca de novos tratamentos para a DP, principalmente naqueles direcionados a prevenção do aparecimento dos sintomas ou da progressão da doença. Sabendo-se dos aspectos etiopatológicos, os quais estão ligados ao estresse oxidativo, esforços têm sido direcionados na busca de substâncias e extratos naturais que possuam atividade antioxidante e que possam atuar prevenindo estes processos neurodegenerativos. Portanto, através das evidências demonstradas, a *Passiflora alata* torna-se uma possível alternativa terapêutica para o tratamento destas doenças.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora alata* em um modelo animal de doença de Parkinson, a fim de identificar possíveis efeitos neuroprotetores.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos de diferentes doses do extrato hidroalcoólico de *Passiflora alata* nas alterações comportamentais induzidas pelo modelo animal de Doença de Parkinson da 6-OHDA.
- Avaliação do efeito comportamental resultante do tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Passiflora alata*, em ratos não lesionados
- Caracterizar a capacidade antioxidante do extrato, através de metodologias de captura de radicais livres.
- Determinar a concentração de compostos fenólicos e flavonoides.
- Quantificar a concentração de glutathiona reduzida (GSH) e de catalase no sangue e no estriado dos animais submetidos a cirurgia estereotáxica.
- Avaliar o perfil hematológico e bioquímico a fim de investigar possíveis alterações decorrentes do tratamento realizado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

A coleta da planta (*Passiflora alata* Curtis) foi realizada em Curitiba - PR, Brasil, no período de Abril a Junho de 2016.

Uma amostra da planta de aproximadamente 45 cm de comprimento, contendo a flor e fruto, foi coletada e levada ao Herbário da UEPG para a realização de uma exsicata a fim de realizar a confirmação da espécie e registro, sob número tombo 21552.

Após a coleta, o material foi levado para a Universidade Estadual de Ponta Grossa, onde foram separadas as folhas e pecíolos, os quais foram submetidos a secagem em estufa a 45°C. Após a secagem, o material foi triturado e armazenado, em ambiente protegido da luz e frasco âmbar, para posterior utilização.



FIGURA 7. Exsicata da planta *Passiflora alata* Curtis.
Fonte: O Autor.

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS

A extração, com a finalidade de se obter um extrato bruto, foi realizada sob refluxo, até a exaustão, com o auxílio de aparelho de Soxhlet, utilizando como solvente uma solução hidroetanólica a 95% (v/v). Foram utilizados tais

parâmetros de extração em função do intuito de se obter um maior rendimento, e também, da característica hidrofílica dos compostos com característica antioxidante.

Após a extração, o solvente foi evaporado, em banho maria, resultando em um “extrato seco”, com rendimento de aproximadamente 35g de extrato / 100g de folhas. Estes “extratos secos” foram armazenados em ambiente refrigerado (4°C) e protegido da luz.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO

O extrato de *P. alata* contém diversos compostos antioxidantes em sua composição, representados principalmente pelos flavonoides e fenólicos, porém, devido a diferenças climáticas, sazonalidade, composição química do solo e índice pluviométrico, a concentração destes compostos e a atividade antioxidante pode ser alterada (GOBBO-NETO & LOPES, 2007; SOZO, 2014; WOSCH *et al.*, 2017). Portanto, foi necessário avaliar a concentração destes compostos do extrato em estudo, além de determinar a sua atividade *scavenger* (neutralização de radicais livres) frente a ensaios de captura de radicais livres.

4.3.1 Determinação da concentração de compostos fenólicos

A concentração dos compostos fenólicos presentes no EHPA foi determinada através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). O reagente de Folin-Ciocalteu é constituído por uma mistura de ácidos fosfomolibdico e fosfotungstico que possuem coloração amarela. Na presença de compostos fenólicos, há a formação do complexo molibdênio-tungstênio que possui coloração azul, a qual é detectada pelo espectrofotômetro (HACKE, 2017; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Previamente a realização do experimento com o extrato, foi realizada uma curva de calibração de ácido gálico (A.G.), utilizando como solvente o metanol. O experimento foi realizado em placa de 96 poços, onde foram adicionadas as seguintes soluções: 5 µL do extrato (10mg/mL solubilizado em etanol absoluto), 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e 100 µL de solução aquosa de carbonato de

sódio (Na_2CO_3) 7,5% (m/v). Após este procedimento, a placa foi incubada em estufa a 45°C durante 15 minutos, e então foi feita a leitura em espectrofotômetro UV/Vis (Biotek® Synergy H1) no comprimento de onda de 765 nm.

O teor de compostos fenólicos se deu a partir da curva de calibração de ácido gálico e o resultado foi expresso mg Eq ácido gálico/1g de extrato. As análises foram realizadas em 3 períodos diferentes e em triplicata.

4.3.2 Determinação da concentração de flavonoides

A concentração de flavonoides foi determinada tal como descrito por (KOSALEC *et al.*, 2004). Este método se baseia na complexação do íon alumínio Al(III) com os grupamentos cetônicos e hidroxilas das moléculas dos flavonoides. Esta reação resulta na formação de um complexo estável de coloração amarela, que é detectada por espectrofotometria (HACKE, 2017; PEIXOTO SOBRINHO *et al.* 2012).

Previamente a realização do experimento com o extrato, foi realizada uma curva de calibração com a quercetina (QER). O experimento foi realizado em placa de 96 poços, onde foram adicionadas as seguintes soluções: metanol (em diferentes volumes), 4µL de uma solução aquosa de acetato de potássio (CH_3COOK) a 0,1 mol L^{-1} , 4 µL de uma solução aquosa de cloreto de alumínio (AlCl_3) 10% (m/v), 112 µL de água deionizada e 5µL de extrato (10mg/mL solubilizado em etanol absoluto). Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV/Vis (Biotek® Synergy H1) no comprimento de onda de 420nm.

O teor de flavonoides totais foi calculado a partir da curva padrão de quercetina e expresso como mg Eq quercetina/1g de extrato. As análises foram realizadas em 3 períodos diferentes e em triplicata.

4.3.3 Avaliação da atividade de sequestro de radicais livres pelo extrato

Para esta avaliação foram realizados os ensaios DPPH• e ABTS^{•+}. A determinação da atividade antioxidante frente a diferentes modelos é importante para se determinar o possível mecanismo de inibição dos radicais exercido por este extrato, uma vez que no ensaio do DPPH• o radical utilizado é aniônico e no ABTS^{•+} é catiônico.

Em ambas as metodologias foram avaliadas 7 concentrações de extrato: 125 µg/mL, 100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 2,5 µg/mL, determinadas através de um estudo semelhante (LUGATO *et al.*, 2014b). Para a obtenção dessas concentrações de extrato foram preparadas duas soluções “mãe” nas concentrações de 1 mg/mL e 0,1mg/mL, as quais foram obtidas através da solubilização, com o auxílio de aparelho de sonicação, do extrato seco em etanol absoluto.

4.3.3.1 Avaliação da atividade scavenger do extrato pelo método DPPH*

O método DPPH* (2,2 Difenil-1-picrilhidrazil) é um dos métodos mais populares na determinação da atividade antioxidante de extratos e substâncias naturais. Isto ocorre devido a sua facilidade e baixo custo de execução (MISHRA; OHJA; CHAUDHURY, 2012; OLSZOWY; DAWIDOWICZ, 2017). O radical DPPH* em solução alcoólica (etanol) possui coloração púrpura e absorção na faixa de 515-531nm (CONTRERAS-GUZMAN; STRONG, 1982). Na presença de substâncias antioxidantes, ocorre a redução deste radical através da doação de elétrons ou de hidrogênio. Com a neutralização do radical é verificado um decréscimo na coloração e absorção (SANTOS, 2015; SUCUPIRA *et al.*, 2012).

O experimento foi realizado segundo Soares *et al.* (1997), onde foram pipetados em microtubos: etanol absoluto, 250 µL de uma solução de DPPH a 60 µM (Sigma-Aldrich®) e o extrato nas diferentes concentrações, já citadas anteriormente. Após as amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços e incubadas durante 15 minutos. Em seguida, foi feita a leitura das amostras em espectrofotômetro UV/Vis (Biotek® Synergy H1) no comprimento de onda de 531 nm. Todas as etapas descritas foram realizadas sobre a proteção da luz. Os resultados foram expressos em inibição radicalar (porcentagem de inibição dos radicais em solução).

Com o objetivo de comparação, também foi determinada a atividade *scavenger* do ácido ascórbico, que é uma substância pura com atividade antioxidante bem estabelecida, nas mesmas concentrações que o extrato.

4.3.3.2 Avaliação da atividade scavenger do extrato pelo método ABTS^{•+}

O método ABTS^{•+} assim como o DPPH[•], é um método popular na determinação da atividade antioxidante, além de possuir uma boa estabilidade, facilidade e baixo custo de execução (OLSZOWY; DAWIDOWICZ, 2017). O cátion ABTS^{•+} é formado a partir de uma reação de complexação do ABTS (não ionizado) com o persulfato de potássio (K₂S₂O₈). O cátion formado é um cromóforo de coloração azul-verde, e que pode ser detectado através de espectrofotometria nos comprimentos de onda de 645 nm, 734 nm and 815 nm (RE *et al.*, 1999). Na presença de substâncias antioxidantes, há a neutralização deste radical (através da doação de um próton ou recebimento de elétrons) e com isto ocorre a diminuição da coloração e absorbância (RE *et al.*, 1999; SANTOS, 2015).

O experimento foi realizado segundo Pellegrini (1999), onde foram pipetados em microtubos: Tampão fosfato de sódio 10 Mm e pH 7,4; 150 µL da solução de ABTS^{•+} 30µM (Sigma-Aldrich®) e o extrato nas diferentes concentrações. Após isto, as amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços e incubadas durante 10 minutos. Em seguida, foi feita a leitura das amostras em espectrofotômetro UV/Vis (Biotek® Synergy H1) no comprimento de onda de 734 nm. Todas as etapas descritas foram realizadas sobre a proteção da luz.

Com o objetivo de comparação, também foi determinada a atividade *scavenger* do ácido ascórbico, que é uma substância pura com atividade antioxidante bem estabelecida, nas mesmas concentrações que o extrato.

Os resultados foram expressos em inibição radicalar (porcentagem de inibição dos radicais em solução) e IC₅₀ (concentração inibitória para 50% dos radicais em solução).

4.4 ANIMAIS

O estudo foi realizado utilizando ratos machos da linhagem Wistar, com 3 meses de idade e peso de aproximadamente 300g, procedentes do biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa, mantidos em biotério climatizado (22°C ± 2°C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, com comida e água *ad libitum*. O projeto foi previamente aprovado pelo comitê de ética da UEPG (Protocolo 046/2016), para a realização dos experimentos.

Além disto, foram utilizados ratos jovens com aproximadamente um mês de idade, cedidos temporariamente pelo biotério da UEPG, para a realização do teste de reconhecimento social.

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO COMPORTAMENTAL RESULTANTE DO TRATAMENTO COM O EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Passiflora alata*.

Esta avaliação teve como objetivo verificar possíveis alterações comportamentais resultantes do tratamento com o extrato de *Passiflora alata*. Para isto, foram utilizados 44 animais que foram divididos em 4 grupos experimentais quanto ao tratamento, descritos na tabela abaixo:

TRATAMENTOS
Grupo Controle (n=10)
<i>Passiflora alata</i> 100 mg/kg/dia de EHPA (n=11)
<i>Passiflora alata</i> 200 mg/kg/dia de EHPA (n=11)
<i>Passiflora alata</i> 300 mg/kg/dia de EHPA (n=12)

TABELA 1. Grupos experimentais utilizados para avaliação do efeito *per se* de diferentes doses do extrato sobre modelos comportamentais.

Fonte: O Autor

Os extratos administrados foram preparados a partir do EHPA seco, o qual foi pesado e suspenso em água. O tratamento foi realizado diariamente durante 14 dias. Para isto, foram preparadas 3 soluções com as concentrações de 30mg/mL, 60mg/mL e 90mg/mL (correspondente aos grupos: 100mg/kg/dia, 200mg/kg/dia e 300mg/kg/dia respectivamente) e cada animal recebeu 1 mL de extrato ou de veículo (água), por via oral, através da gavagem.

Para a definição das doses (citadas acima) a serem utilizadas neste trabalho, foi realizado um experimento piloto (n=30), baseado em Klein *et al.* (2014), em que os animais receberam, por via oral, 1 mL do extrato de *P. alata* nas doses de 300 mg/kg (n=10) e 600 mg/kg (n=10), além do grupo controle (n=10). Após 30 minutos da administração foram realizados o teste de labirinto em cruz elevado e o teste de natação forçada. Em ambos os testes, as doses utilizadas resultaram em um efeito

sedativo (dados não mostrados), porém, como este efeito deveria ser descartado das análises realizadas, uma vez que seriam avaliados comportamentos do tipo depressivo, novas doses foram definidas, sendo elas: 100 mg/kg/dia, 200 mg/kg/dia e 300 mg/kg/dia.

4.5.1 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram iniciados após 14 dias de tratamento, seguindo a ordem descrita na linha do tempo, abaixo.

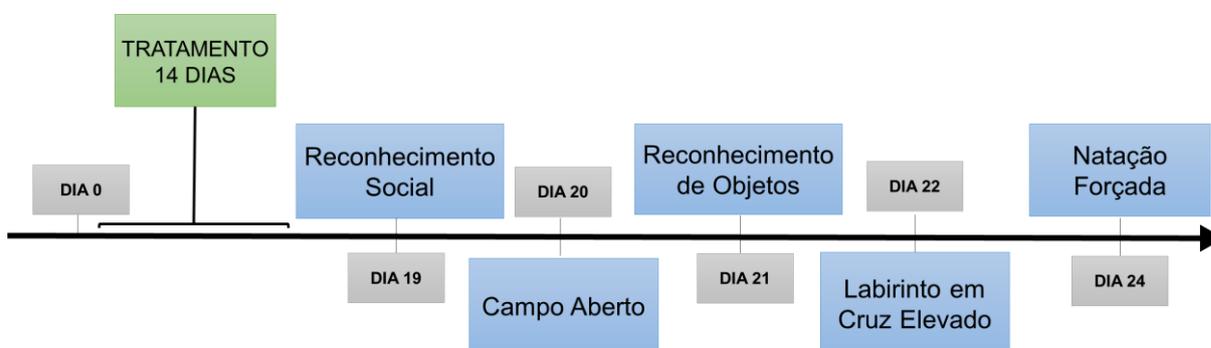


FIGURA 8. Ordem cronológica dos testes comportamentais realizados.
Fonte: O autor.

Todos os testes foram realizados no período da tarde. Além disto, os testes foram gravados para posteriores análises.

4.5.2 Avaliação de memória

4.5.2.1 Teste de Reconhecimento Social

O teste de reconhecimento social foi inicialmente descrito por Dantzer *et al.* (1987) e posteriormente padronizado por Prediger e colaboradores (PREDIGER *et al.*, 2006; PREDIGER; TAKAHASHI, 2003). Este teste é baseado no fato de que os roedores gastam um tempo maior investigando novos indivíduos do que indivíduos já familiarizados, e este reconhecimento normalmente se dá por sinais olfatórios (DANTZER *et al.*, 1987).

O teste de reconhecimento social foi realizado no 19º dia, após o início do tratamento. Este teste necessita que haja um isolamento prévio dos animais (o qual

foi realizado durante os 4 dias anteriores a realização do teste) para que o animal esteja ambientado em sua caixa moradia e assim evitando vieses. Além disto, foram utilizados ratos jovens, os quais foram cedidos, temporariamente para uso apenas neste experimento, pelas funcionárias do biotério da UEPG.

O teste consiste em duas apresentações de um rato jovem ao rato adulto, em sua caixa moradia (este é um fator importante, como já dito anteriormente, uma vez que diferentes odores podem alterar o tempo de investigação do animal). Estas apresentações tiveram duração de 5 minutos cada e um intervalo de aproximadamente 30 minutos entre elas. A primeira apresentação tem como objetivo “apresentar” o rato jovem para o rato adulto, enquanto que a segunda tem como objetivo avaliar se o animal lembra do rato jovem. Durante as apresentações foram avaliados os tempos de investigação do rato adulto sobre o rato jovem. Após cada investigação o rato jovem foi retirado da caixa do rato adulto, ficando isolado em outra caixa.

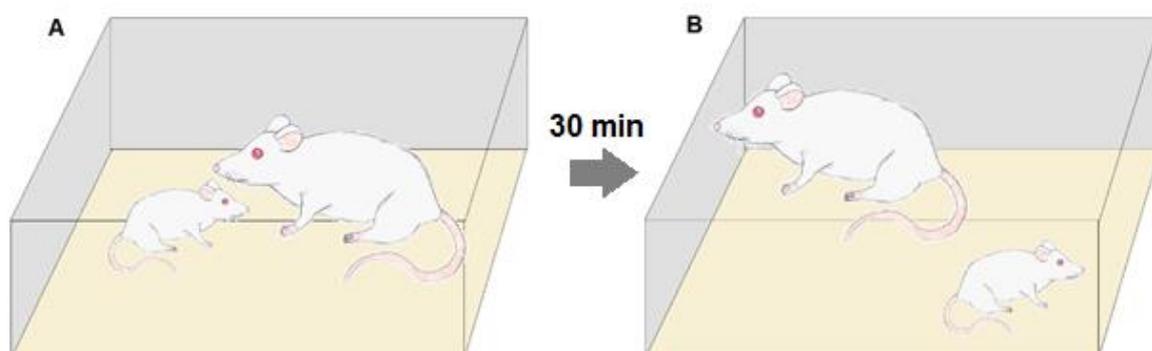


FIGURA 9. Representação do teste de reconhecimento social. **(A)** Primeira exposição – Nesta primeira fase o animal adulto interage com o rato jovem, através de atos de aproximação, cheirar e lambe. **(B)** Segunda exposição – Ratos adultos controle interagem menos com o rato jovem na segunda exposição, uma vez que eles recordam daquele indivíduo.

Fonte: O Autor

Este teste tem como objetivo a análise de memória de curta duração (MOURA, 2008). Diversos autores demonstraram que um intervalo maior que 60 minutos resulta numa perda desta memória (DANTZER *et al.*, 1987; PREDIGER *et al.*, 2006; THOR; HOLLOWAY, 1982), uma vez que o tempo de interação na segunda exposição se torna igual ao da primeira.

A partir destas análises foi possível determinar a taxa de duração de investigação ou RID (*Ratio of Investigation Duration*), que corresponde a razão entre a segunda exposição sobre a primeira exposição (PREDIGER; TAKAHASHI, 2003). Quanto maior o valor do RID, menor é a capacidade de reconhecimento do animal.

4.5.2.2 Teste de Reconhecimento de Objetos

O teste de reconhecimento de objetos é um teste de memória que avalia a memória declarativa episódica de roedores (ENNACEUR, 2010). Este teste foi baseado no comportamento exploratório destes animais (RAJAGOPAL *et al.*, 2014), e foi inicialmente descrito por Ennaceur e Delacour (1988), e posteriormente adaptado por Prickaerts *et al.* (2002).

Previamente, 24 horas antes da realização do teste, o animal é posicionado em uma caixa de madeira (campo aberto) permanecendo durante 5 minutos, a fim de que haja uma adaptação ao local. O método, que foi realizado no 21º dia, consiste em duas apresentações a objetos em um intervalo de 30 minutos. Na primeira apresentação o animal é colocado no centro da caixa de madeira onde estão 2 objetos idênticos, posicionados a 10 cm da parede das caixas, permanecendo durante 3 minutos.

Entre cada exposição, os objetos e a caixa foram higienizados com uma solução aquosa de álcool 5% para evitar possíveis vieses no teste. Após 30 minutos, na segunda exposição, o animal é posicionado na mesma caixa contendo um objeto antigo (que já lhe foi apresentado) e um objeto novo (com formato e coloração diferentes), permanecendo, também, durante 3 minutos.

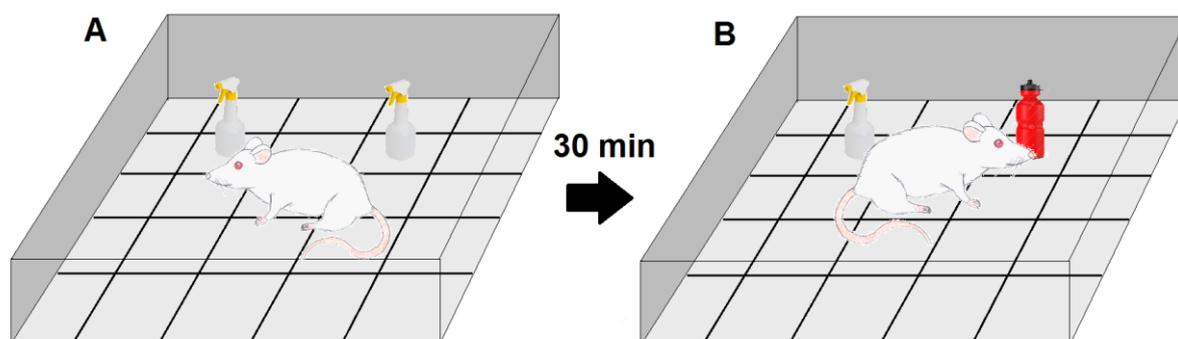


FIGURA 10. Teste de reconhecimento de objetos. (A) Primeira exposição e (B) Segunda exposição. Fonte: O Autor.

Através destes dados é possível calcular o escore de discriminação (ED), que representa o quanto o animal consegue diferenciar tais objetos apresentados. O ED é calculado a partir da seguinte equação:

$$ED = \frac{\text{Tempo de exploração do objeto antigo} - \text{Tempo de exploração do Objeto novo}}{\text{Tempo total nas duas explorações}}$$

4.5.3 Avaliação da atividade locomotora

4.5.3.1 Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto é um modelo clássico para avaliação da atividade locomotora, além de ser utilizado para determinar o comportamento do tipo ansioso (LAETITIA; CATHERINE, 2003; ZIMCIKOVA *et al.*, 2017).

Este teste foi realizado no dia seguinte ao teste de reconhecimento social (20º dia). Para a sua realização foi utilizado uma caixa de madeira, medindo 100 x 100 cm e 40 cm de altura, piso de cor branca dividido em 25 quadrados (20 x 20 cm cada). O animal foi posicionado no centro desta caixa e foram permitidos 5 minutos de exploração. Os parâmetros analisados foram a ambulação (determinada através do número de linhas cruzadas pelas patas traseiras), número de *rearings* (levantadas) e o tempo de permanência no centro e na periferia.

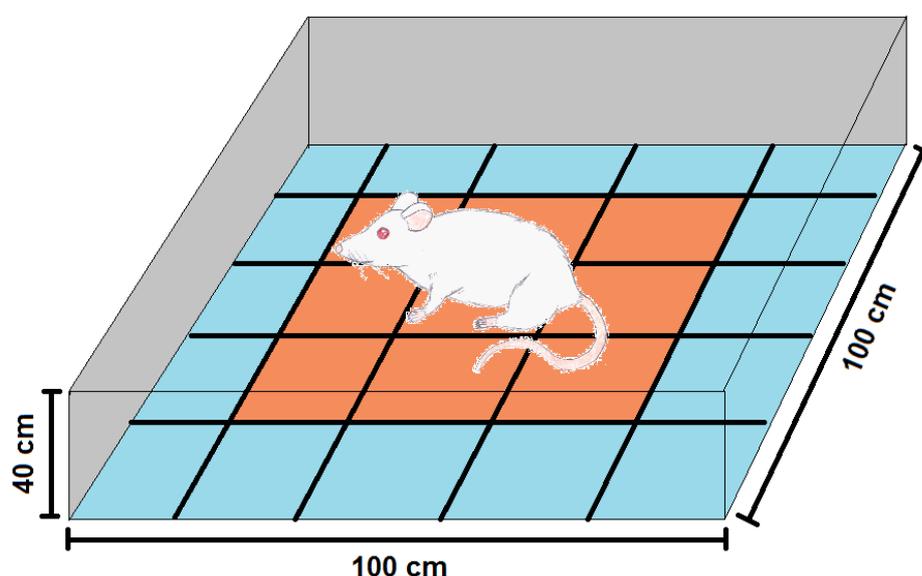


FIGURA 11. Teste do campo aberto. O animal é posicionado no quadrado central. Os quadrados azuis são a periferia, que é uma zona de maior segurança ao animal, devido a menor exposição e ao contato das suas vibrissas com a parede da caixa. Por outro lado, os quadrados vermelhos representam o centro, que é considerado como um ambiente “mais perigoso”, devido a maior exposição.

Fonte: O Autor.

4.5.4 Avaliação do comportamento do tipo ansioso

4.5.4.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O estudo que deu base ao teste do labirinto em cruz elevado foi o de Montgomery (1958), que propôs que após um novo estímulo o rato apresenta um comportamento do tipo aproximação/esquiva, que é evocado por reações de curiosidade e medo. Posteriormente, Pellow *et al.* (1985) padronizaram e validaram farmacologicamente o teste do labirinto em cruz para ratos.

O aparato para a realização do teste consiste em dois braços abertos (50cm x 10cm) e de 2 braços fechados (50cm x 10cm x 40cm), dispostos de maneira oposta, tal como demonstrado na figura 12, abaixo.

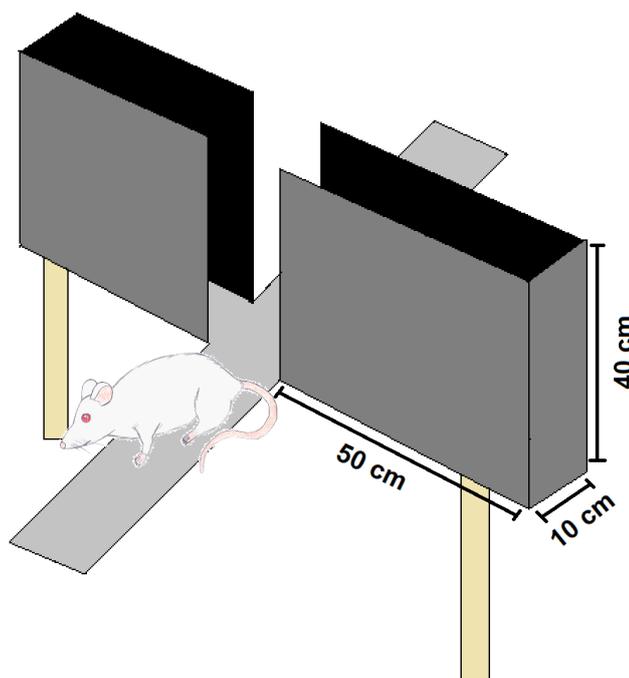


FIGURA 12. Teste do Labirinto em Cruz Elevado.
Fonte: O Autor.

O teste foi realizado no dia seguinte da realização do teste de reconhecimento de objetos, no 22º dia. Ele consiste em posicionar o animal no centro do aparato, possibilitando a sua exploração durante 5 minutos. Os parâmetros analisados são o tempo em que o animal permanece nos braços fechados, abertos e centro, além de, determinar a frequência de entradas em cada braço.

4.5.5 Avaliação do comportamento do tipo depressivo

4.5.5.1 Teste de Natação Forçada

O teste de natação forçada é o teste mais utilizado na identificação de substâncias antidepressivas (PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005). O modelo foi proposto por Porsolt *et al.* (1978) que propõe a observação do tempo de imobilidade do animal durante o teste, uma vez que, um tempo de imobilidade maior está associado a uma desistência de fuga daquele ambiente, estando associado a um sintoma depressivo.

Para a realização do teste foi utilizado um cilindro de plástico opaco, com diâmetro de 20 cm e altura de 50 cm. Este cilindro é preenchido com água (± 22 a 25° C) até a altura de 30 cm do cilindro. O teste de natação forçada consistiu em duas sessões, sendo a primeira uma sessão de treino (pré-teste), que foi realizada no dia seguinte da realização do labirinto em cruz (23^o dia), e uma segunda sessão, que é o teste em si, realizado 24 horas após a sessão de treino (24^o dia). Na sessão treino, o animal é colocado dentro do cilindro, permanecendo durante 15 minutos, tendo como objetivo a ambientação do animal as condições do teste.

Durante a sessão de teste, o animal é novamente colocado dentro do cilindro, permanecendo durante 5 minutos, e são avaliados os seguintes parâmetros: tempo de imobilidade (realização de movimentos mínimos para a flutuação), tempo de natação (movimentos circulares) e tempo de escalada (movimentos verticais associados a tentativa de fuga do cilindro), tal como esquematizado na figura 13, abaixo.

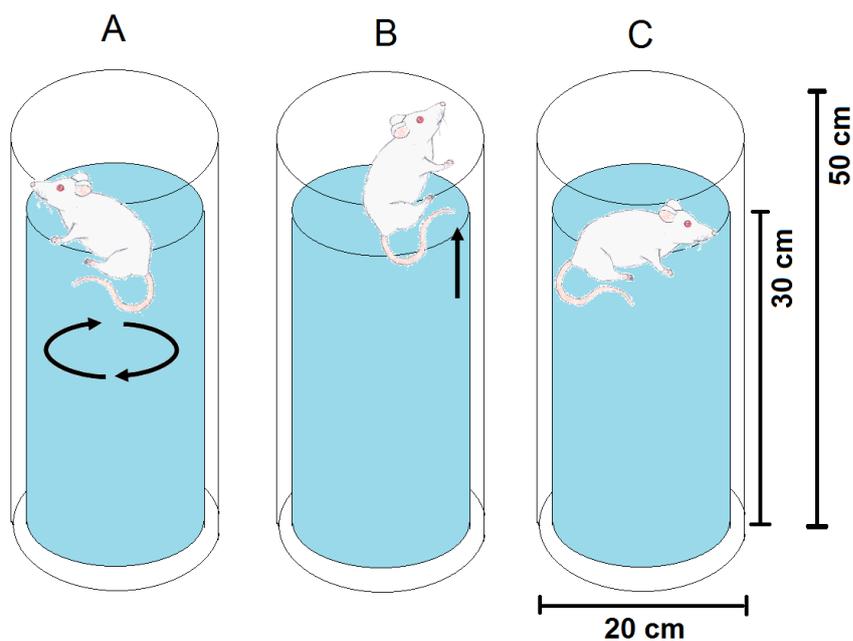


FIGURA 13. Teste de natação forçada, representando os movimentos de (A) natação, de (B) escalada e de (C) imobilidade.
Fonte: O Autor.

Após cada sessão, os animais foram secados e colocados novamente em suas caixas. É importante ressaltar também que após cada troca de animal é realizada a troca da água do cilindro, a fim de evitar alterações na temperatura e na presença de odores.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO EM UM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON.

Para a avaliação do efeito do extrato em um modelo animal de doença de Parkinson foram utilizados 57 animais, dispostos nos seguintes grupos experimentais:

GRUPOS EXPERIMENTAIS
SHAM + Controle (Veículo) (n=11)
6-OHDA + Controle (Veículo) (n=12)
6-OHDA + 100 mg/kg/dia de EHPA (n=11)
6-OHDA + 200 mg/kg/dia de EHPA (n=12)
6-OHDA + 300 mg/kg/dia de EHPA (n=11)

TABELA 2. Relação dos grupos experimentais para a avaliação do efeito dos extratos sobre um modelo animal de doença de Parkinson.

Fonte: O Autor

Os animais foram divididos em 5 grupos, onde o grupo SHAM + Controle corresponde aos animais falso-operados, com a administração de veículo (água) durante o tratamento. Os grupos 6-OHDA correspondem aos animais em que foi realizada a administração de 6-hidroxidopamina, para a indução do modelo de doença de Parkinson. Antes da realização dos tratamentos, os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica, que tem como objetivo a administração de 6-OHDA, descrita no tópico 4.6.1, a seguir.

Os extratos administrados foram preparados a partir do extrato seco, o qual foi pesado e suspenso em água (veículo). O tratamento iniciou-se no dia seguinte a cirurgia estereotáxica e tendo uma duração de 14 dias. Cada animal recebeu 1 mL de extrato ou de veículo, por via oral, através da gavagem, tal como descrito no item 4.5.

4.6.1 Cirurgia estereotáxica

A cirurgia estereotáxica tem como objetivo a administração de substâncias em áreas específicas do encéfalo (PAXINOS *et al.*, 1985). A utilização deste procedimento resulta na reprodutibilidade das infusões realizadas e da lesão gerada (POCHAPSKI, 2016).

Para a lesão na via nigroestriatal, o procedimento foi realizado de mesma maneira como descrito por Schamne *et al.* (2014) e Vecchia *et al.* (2015), sendo que os animais foram previamente anestesiados com tiopental (Thiopentax® – Cristália) na concentração de 50 mg/Kg. Após a constatação da sedação, o animal

foi tricotomizado na região do crânio.

Aos 15 minutos antes do procedimento cirúrgico foi realizada a administração de nortriptilina (Medley) na concentração de 10 mg/Kg por via intraperitoneal, tendo como objetivo evitar lesões nos neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos decorrentes da administração da toxina 6-OHDA. Posteriormente foi administrado 0,2 mL de penicilina (Aricilina®) 5.000.000 UI por via intramuscular, a fim de evitar possíveis infecções decorrentes do procedimento cirúrgico.

Após estas administrações, o animal foi posicionado no aparelho estereotáxico (Insight Laboratories). Em seguida foi realizada a antissepsia do local com iodopovidona e uma administração de anestésico local Xylestesin® (Lidocaína 2% + vasoconstritor [hemitartarato de epinefrina]) por via subcutânea.

Aos 5 minutos após a administração de anestésico local, foi realizada uma incisão com bisturi na pele e tecido muscular acima do crânio do animal. Posteriormente estes tecidos foram afastados com o auxílio do bisturi de pinças hemostáticas para que o crânio ficasse evidente. Assim, foi possível localizar o bregma e então foram ajustadas as coordenadas para a região do feixe prósencefálico medial (FPM): - 1,9 mm no sentido anteroposterior a partir do bregma, \pm 1,9 mm no sentido médio-lateral a partir do bregma e - 7,9 mm no sentido dorsoventral a partir do crânio, as quais estão descritas no atlas de Paxinos e Watson (2005).

Com uma broca de baixa rotação (Beltec LB2000®) foi feita a perfuração do crânio permitindo o acesso da agulha para a infusão. A infusão foi realizada com o auxílio de bomba infusora (Harvard Apparatus Ltda.), onde foram administrados 1 μ L da solução de 6-OHDA na concentração de 4 μ g/ μ L (solubilizada em salina 0,9%, suplementada com 0,2% de ácido ascórbico), ou 1 μ L da solução salina 0,9% (grupos SHAM) no FPM, na taxa de 0,25 μ L/min. As infusões foram realizadas bilateralmente.

Após o término das infusões, foi realizada a sutura do corte e o animal permaneceu sob observação em ambiente aquecido, a fim de evitar a hipotermia decorrente do anestésico.

4.6.2 Testes Comportamentais

Após o término dos tratamentos foram realizados os seguintes testes comportamentais (já descritos anteriormente, nos itens 4.5.2 ao 4.5.5) ilustrados na linha do tempo abaixo.

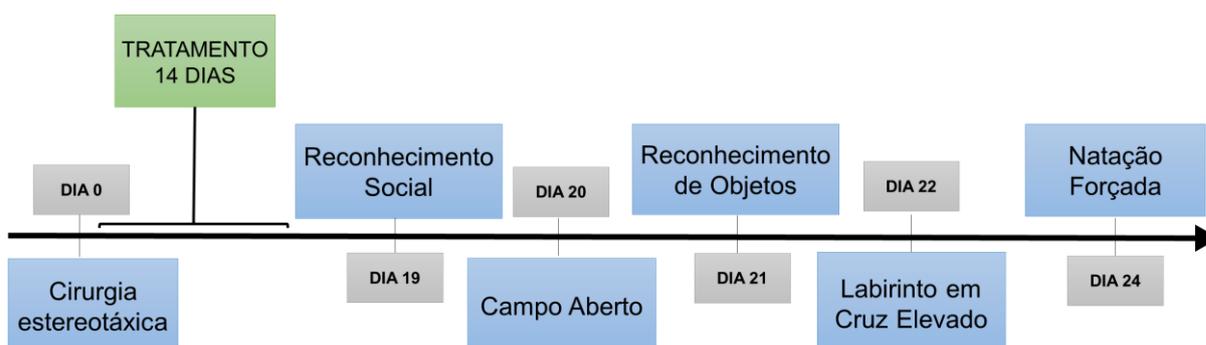


FIGURA 14. Ordem cronológica dos testes comportamentais realizados após a realização da cirurgia estereotáxica.
Fonte: O Autor.

Todos os testes foram realizados no período da tarde e foram gravados para posteriores análises.

Após a realização dos testes comportamentais os animais foram sacrificados e foram coletados: porção do estriado e o sangue. Os animais foram sacrificados por punção cardíaca (animais previamente anestesiados com Isoflurano) seguida de decapitação por guilhotina.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DE GSH NO ESTRIADO

A concentração de GSH no estriado foi realizada segundo Sedlak; Lindsay (1968) e estimada através da concentração de grupamentos sulfidrílicos não-proteicos (SH-NP) presentes no tecido. Para isto, foi realizado um homogenato do estriado (previamente congelado e mantido em freezer a -80°C) numa proporção de 10 mg de tecido para 100 μL de EDTA 0,02 M. Após, foi realizada uma diluição 1:2 deste homogenato, adicionando uma alíquota de 400 μL de homogenato em 400 μL de água destilada. A partir desta solução, uma alíquota de 400 μL foi adicionada a 320 μL de água destilada e 80 μL de ácido tricloroacético 50% (precipitação de proteínas). Posteriormente a esta etapa, os tubos foram centrifugados durante 15 minutos, a 3000

RPM e temperatura de 4° C (Hermle® Z 326K). Em seguida, uma alíquota de 400 µL do sobrenadante foi adicionada a 800 µL de tampão Tris/HCl 0,4 M (pH 8,9) e 20 µL de DTNB (*5,5''-dithiobis[2-nitrobenzoic acid]*) 0,01 M. Após esta etapa, as soluções (cada amostra em triplicata) foram lidas em espectrofotômetro UV-Vis (Biotek® Synergy H1) no comprimento de onda de 412 nm.

Para a quantificação, foi necessária a realização de uma curva de calibração com o padrão de GSH 1 mM (glutathiona reduzida, Sigma-Aldrich®). Os resultados foram expressos em microgramas de GSH por grama de tecido (µg GSH. g⁻¹ tecido). Foram utilizadas 4 amostras por grupo.

4.9 QUANTIFICAÇÃO DE GSH NO PLASMA

A concentração de GSH (estimada pela concentração de grupamentos sulfidrílicos totais SH-T) no soro foi realizada de acordo com Ellman (1959). Para a realização do experimento foram adicionados 25 µL de soro a 625 µL de tampão Tris/HCl 0,1 M (pH 8,2), 75 µL de água destilada e 25 µL de DTNB 0,124 mM. As soluções foram então homogeneizadas e incubadas durante 15 minutos em ambiente protegido da luz. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV\Vis (Biotek® Synergy H1) no comprimento de onda de 412nm. Os resultados foram dados em micromol de GSH por mililitro de soro (µmol GSH. mL soro⁻¹). Foram utilizadas 4 amostras por grupo.

4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE NO ESTRIADO

A determinação da atividade da catalase no estriado foi realizada segundo a metodologia de Aebi (1984) e descrita por Minozzo (2015). Para isto, os tecidos foram previamente retirados do freezer -80° C e pesados. Após a determinação do peso, foram realizados homogenatos na proporção de 10mg de tecido para 100µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, KCl 150 mM e EDTA 200 mM em pH 7,4, com o auxílio de um homogeneizador de tecidos. Após esta etapa, os homogenatos foram centrifugados a 15000 RPM, durante 30 minutos a 4° C. Após a centrifugação, foi feita uma diluição onde foram pipetados 100µL do sobrenadante em 100µL de tampão fosfato 50mM, pH 7,4. Em uma cubeta de quartzo foram adicionados 955 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, 10 µL de amostra diluída e 35 µL de H₂O₂

(10,5 mM), os quais foram rapidamente homogeneizados e submetidos a leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 240$ nm, a cada 15 segundos, durante 2 minutos.

Para este experimento foram utilizadas 4 amostras por grupo. Os resultados foram expressos como μmol de H_2O_2 consumido / minuto / miligrama de tecido.

4.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE NOS ERITRÓCITOS

A determinação da atividade da catalase nos eritrócitos seguiu a metodologia descrita por Aebi (1984), onde inicialmente foi realizado uma diluição dos eritrócitos em água destilada na proporção de 1:100 v/v. Após este procedimento, foram pipetados em uma cubeta: 955 μL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4; 10 μL da diluição da amostra e 35 μL de H_2O_2 (10,5 mM), os quais foram rapidamente homogeneizados e submetidos a leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 240$ nm, a cada 15 segundos, durante 2 minutos.

Para este experimento foram utilizadas 5 amostras por grupo. Os resultados foram expressos como μmol de H_2O_2 consumido / minuto / mililitro de eritrócitos.

4.12 EXAMES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Para a realização dos exames bioquímicos e hematológicos foi necessário a coleta do sangue do animal através de punção cardíaca (animal previamente anestesiado com isoflurano). Após a coleta, o sangue foi transferido para 2 tipos de tubos: um contendo EDTA 4% (ácido etilenodiamino tetra-acético), que atua como anticoagulante, para as análises hematológicas, e o outro sendo um tubo seco com gel separador, para as análises bioquímicas. Em seguida, os tubos secos foram centrifugados, durante 10 minutos a 3000 RPM, para a separação dos hemocomponentes do plasma. Após a centrifugação ambos os tubos foram levados ao Laboratório Universitário de Análises Clínicas da UEPG (LUAC-UEPG) para a realização das análises.

Os parâmetros hematológicos analisados foram: número total de hemácias, hematócrito, hemoglobina, VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), RDW (índice de variação de tamanho de hemácias), leucócitos totais e parciais presentes no sangue. Os parâmetros bioquímicos foram: glicemia, lipidograma

(Triglicerídeos, colesterol: total, HDL e LDL), enzimas hepáticas (TGO [transaminase glutâmico-oxalacética] e TGP [transaminase glutâmico-pirúvica]), creatinina e PCR (proteína C reativa) ultrasensível.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média e erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando o software estatístico GraphPad Prism® 5.01. Primeiramente, foi verificado a normalidade dos dados com o teste de Shapiro-Wilk. Os dados não paramétricos foram avaliados através do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* de Dunn, enquanto que, os dados paramétricos foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Para a comparação entre dois grupos, foi realizado a análise pelo teste t de Student. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO

5.1.1 Determinação da concentração de compostos fenólicos e flavonoides

O conteúdo de compostos fenólicos determinado no extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Passiflora alata* foi de 16,455 ($\pm 1,3$) mg Eq ácido gálico/1g de extrato, enquanto que a concentração de flavonoides, que é uma classe de compostos pertencente aos compostos fenólicos, foi de 6,55 ($\pm 0,72$) mg Eq quercetina/1g de extrato.

5.1.2 Avaliação da atividade scavenger do extrato pelo método DPPH^{*}

A atividade *scavenger* do extrato frente ao radical DPPH^{*} apresentou, na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$, a porcentagem de inibição radicalar máxima (IRM) de 18,44% ($\pm 2,3\%$). O valor de IC₅₀ para este ensaio não foi possível de ser calculado, uma vez que as concentrações de extrato utilizadas não resultaram em inibição de 50% ou mais dos radicais. A figura 15, abaixo, ilustra esta baixa atividade, comparando a IRM do extrato com a do ácido ascórbico, o qual apresentou 96,31% ($\pm 0,17\%$).

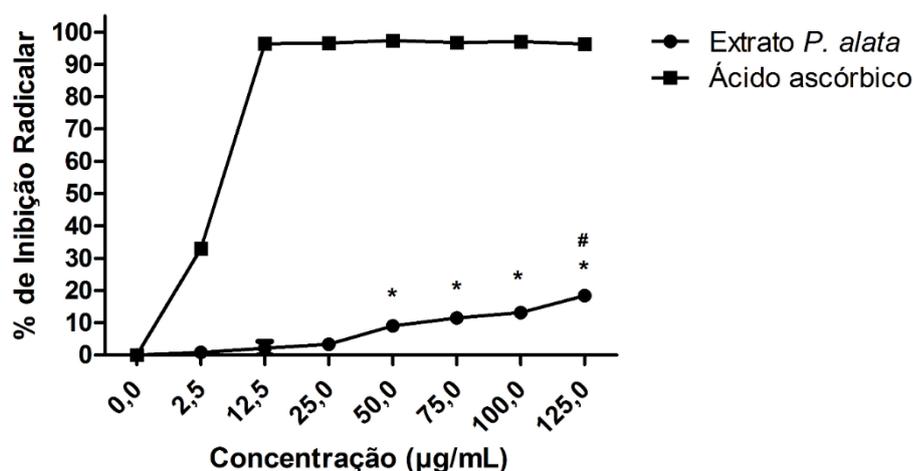


FIGURA 15. Gráfico contendo a porcentagem de inibição radicalar do DPPH* em função das concentrações dos extratos. * $p \leq 0,05$ em comparação com o controle, onde os dados foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Dunnett. # $p \leq 0,0001$ em comparação com a IRM do ácido ascórbico, onde os dados foram analisados através do teste T de Student. Fonte: O Autor.

Através deste gráfico, é possível observar que as concentrações de 125 µg/mL, 100 µg/mL, 75 µg/mL e 50 µg/mL apresentaram diferença significativa em comparação com o controle, mostrando que o extrato, nessas concentrações, promoveu uma redução significativa dos radicais em solução. Quando comparado a IRM do extrato com o ácido ascórbico, um antioxidante “padrão”, é possível observar que a IRM do extrato é significativamente menor neste ensaio experimental.

5.1.3 Avaliação da atividade scavenger do extrato pelo método ABTS^{•+}

A atividade *scavenger* do extrato no ensaio experimental do radical ABTS^{•+} demonstrou uma atividade antioxidante mais pronunciada do que na metodologia do radical DPPH*. A IRM apresentada neste teste foi de 91,32% ($\pm 4,5\%$) na maior concentração, de 125 µg/mL, enquanto isto, a IRM do padrão de ácido ascórbico foi de 99,83% ($\pm 0,1\%$), nesta mesma concentração.

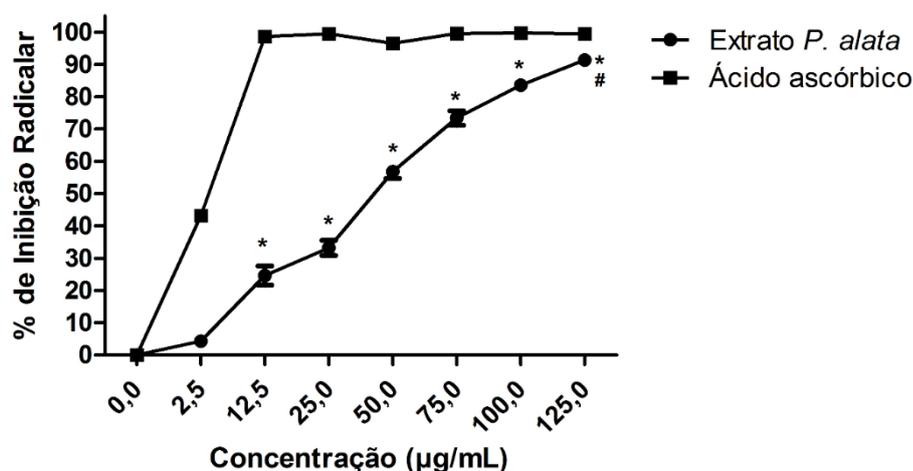


FIGURA 16. Gráfico contendo a porcentagem de inibição radicalar do ABTS⁺⁺ em função das concentrações dos extratos. * $p \leq 0,05$ em comparação com o controle, onde os dados foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Dunnett. # $p \leq 0,0001$ em comparação com a IRM do ácido ascórbico, onde os dados foram analisados através do teste T de Student.

Fonte: O Autor.

A partir dos dados obtidos e do gráfico acima foi possível determinar a concentração que inibiu 50% dos radicais ou IC₅₀, equivalente a 47,8 µg/mL.

5.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS RESULTANTES DO TRATAMENTO COM OS EXTRATOS

5.2.1 Avaliação da Memória

5.2.1.1 Teste de Reconhecimento Social

No teste de reconhecimento social foram analisados os valores da relação entre as investigações (RID), os quais estão demonstrados no gráfico abaixo. As médias (\pm desvio padrão) foram: 0,79 ($\pm 0,39$); 0,75 ($\pm 0,34$); 0,86 ($\pm 0,67$) e 0,71 ($\pm 0,28$) para os grupos Controle, 100 mg/kg/dia, 200 mg/kg/dia e 300 mg/kg/dia, respectivamente. Para a identificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada a análise pela ANOVA de uma via, onde não foi possível observar uma diferença significativa entre os grupos analisados ($p = 0,86$).

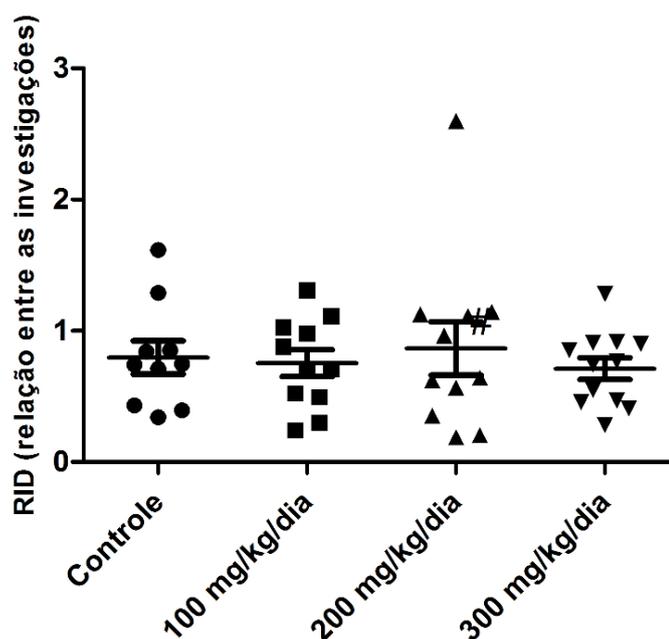


FIGURA 17. Gráfico contendo a relação entre as investigações (RID) no teste de reconhecimento social, para os grupos tratados com o extrato. Cada ponto representa um animal enquanto que as barras representam a média e o erro padrão. Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos ($p > 0,05$).
Fonte: O Autor.

5.2.1.2 Teste de Reconhecimento de Objetos

No teste de reconhecimento de objetos, a média e desvio padrão para os grupos controle, 100 mg/kg/dia, 200 mg/kg/dia e 300 mg/kg/dia foram, respectivamente: 0,34 ($\pm 0,44$); 0,22 ($\pm 0,62$); 0,11 ($\pm 0,72$) e 0,29 ($\pm 0,71$). A análise estatística dos dados foi realizada através da ANOVA de uma via, onde não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, obtendo valores de $p = 0,852$.

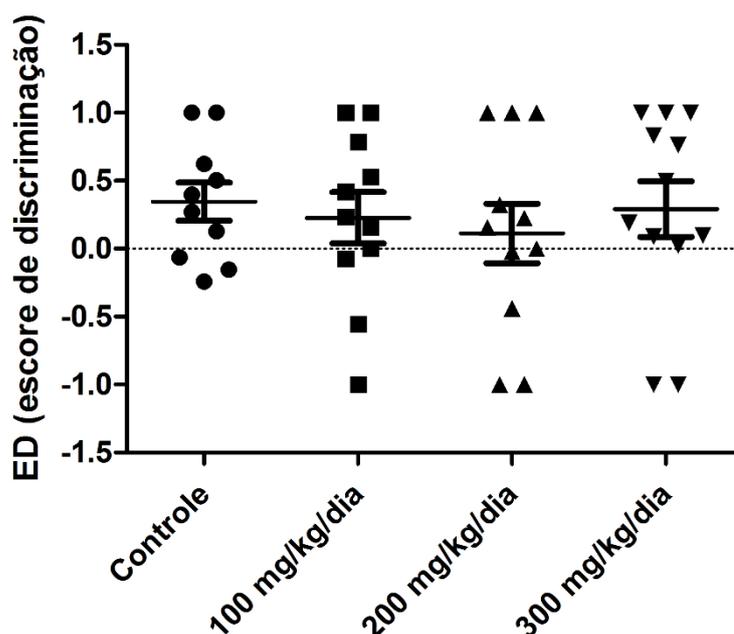


FIGURA 18. Escore de discriminação, do teste de reconhecimento de objetos, para os grupos tratados com o extrato. Cada ponto representa um animal enquanto que as barras representam a média e o erro padrão. Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados ($p > 0,05$). Fonte: O Autor.

Além dos dados demonstrados no gráfico acima, foram avaliados o tempo de investigação entre os objetos da primeira exposição, sendo que, não houve diferença significativa entre os objetos utilizados. Através da análise dos dados de investigação dos objetos, realizado pelo teste t de Student, obteve-se os seguintes valores: Controle ($p = 0,32$), 100 mg/Kg/dia ($p = 0,30$), 200 mg/Kg/dia ($p = 0,42$) e 300 mg/Kg/dia ($p = 0,27$). Estes dados mostram que não houve uma preferência do animal por um objeto em específico.

5.2.2 Avaliação da atividade motora

5.2.2.1 Teste de Campo Aberto

Os parâmetros avaliados no teste de campo aberto foram a ambulação (número total de quadrados percorridos), número de levantadas, tempo no centro e na periferia. A partir da análise dos resultados obteve-se os seguintes resultados:

TABELA 3. Resultados para o teste de campo aberto. Os valores foram dados em média \pm desvio padrão.

	Controle	100 mg/kg/dia	200 mg/kg/dia	300 mg/kg/dia	Dados Estatísticos
Ambulação	66,5 \pm 0,4	69,8 \pm 0,2	59,2 \pm 0,7	50,5 \pm 0,4	p = 0,38 ANOVA
Levantadas	17,4 \pm 6,2	19,8 \pm 7,8	16,6 \pm 8,0	13,7 \pm 8,1	p = 0,14 Kruskal-Wallis
Tempo no centro (%)	9,6 \pm 4,0	5,5 \pm 3,4	6,9 \pm 7,2	3,8 \pm 2,5	p \leq 0,05 ANOVA
Tempo na periferia (%)	90,3 \pm 4,0	94,4 \pm 3,4	93,1 \pm 7,2	96,1 \pm 2,5	p \leq 0,05 Kruskal-Wallis

Fonte: O Autor

Os dados paramétricos foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Newman-Keuls, e os dados não-paramétricos foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Dunn.

Os resultados mostram que não houve diferença nos parâmetros de ambulação e levantadas. Apesar de haver diferença estatística entre as médias do tempo no centro e na periferia, não houve diferença significativa entre os grupos. A partir disto, o tratamento com o extrato de *P. alata* não promoveu alterações na capacidade motora, além de não promover um efeito ansiolítico significativo para este teste.

5.2.3 Avaliação do comportamento do tipo Ansioso

5.2.3.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

No teste do labirinto em cruz elevado foram avaliados o tempo e o número de entradas em cada braço e no centro. Através das análises, obteve-se os dados demonstrados na tabela 4, abaixo. Os dados foram analisados através do teste de Kruskal Wallis.

TABELA 4. Resultados para o teste de labirinto em cruz elevado. Os valores foram dados em média \pm desvio padrão.

	Controle	100 mg/kg/dia	200 mg/kg/dia	300 mg/kg/dia	Dados Estatísticos
Tempo (%) no Braço Aberto	22,1 \pm 24,2	12,8 \pm 10,46	18,9 \pm 28,80	11,5 \pm 14,69	p = 0,75 Kruskal-Wallis
Tempo (%) no Braço Fechado	60,9 \pm 28,9	80,8 \pm 12,5	71,5 \pm 28,8	82,7 \pm 18,7	p = 0,17 Kruskal-Wallis
Tempo (%) no Centro	16,9 \pm 16,9	6,3 \pm 3,3	9,5 \pm 6,8	5,6 \pm 5,1	p = 0,059 Kruskal-Wallis
Entradas no Braço Aberto	2,6 \pm 2,4	2,54 \pm 1,4	3,1 \pm 3,1	2,5 \pm 2,7	p = 0,92 ANOVA
Entradas no Braço Fechado	3,5 \pm 2,2	4,0 \pm 3,1	4,54 \pm 3,5	4,0 \pm 3,9	p = 0,40 Kruskal-Wallis
Entradas no Centro	5,54 \pm 3,7	5,45 \pm 4,1	6,72 \pm 5,8	5,50 \pm 6,1	p = 0,68 Kruskal-Wallis
Total de Entradas	12,9 \pm 6,7	12,0 \pm 8,1	14,4 \pm 12,1	12,0 \pm 12,4	p = 0,93 ANOVA

Fonte: O Autor.

Os dados obtidos demonstraram que o extrato de *P. alata* não teve efeito significativo sobre os parâmetros do teste de labirinto em cruz elevado, indicando que o tratamento não foi capaz de causar um efeito ansiolítico.

5.2.4 Avaliação do comportamento do tipo Depressivo

5.2.4.1 Teste de Natação Forçada

Neste teste foram avaliados o tempo de natação, escalada e de imobilidade do animal submetido ao teste, onde foram obtidos os seguintes resultados:

TABELA 5. Resultados para o teste de natação forçada. Os valores foram dados em média \pm desvio padrão.

	Controle	100 mg/kg/dia	200 mg/kg/dia	300 mg/kg/dia	Dados Estatísticos
Tempo de Natação (s)	224,2 \pm 15,4	226,2 \pm 9,4	223,7 \pm 20,9	220,1 \pm 21,4	$p = 0,86$ ANOVA
Tempo de Imobilidade (s)	43,3 \pm 15,3	25,4 \pm 13,0	28,0 \pm 24,7	34,0 \pm 13,0	$p = 0,09$ ANOVA
Tempo de Escalada (s)	32,4 \pm 8,4	48,3 \pm 15,4	48,3 \pm 13,5	45,8 \pm 13,0	$p \leq 0,05$ ANOVA

Fonte: O Autor

Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls, utilizando um $p \leq 0,05$. Através dos resultados obtidos não foi possível observar um efeito antidepressivo resultante do tratamento de 14 dias com o extrato, apesar de os valores de média serem diferentes, não houve diferença estatística entre os grupos. Por outro lado, foi demonstrado que o extrato promoveu um aumento no tempo de escalada, em todas as doses, quando comparados ao grupo controle ($p \leq 0,05$).

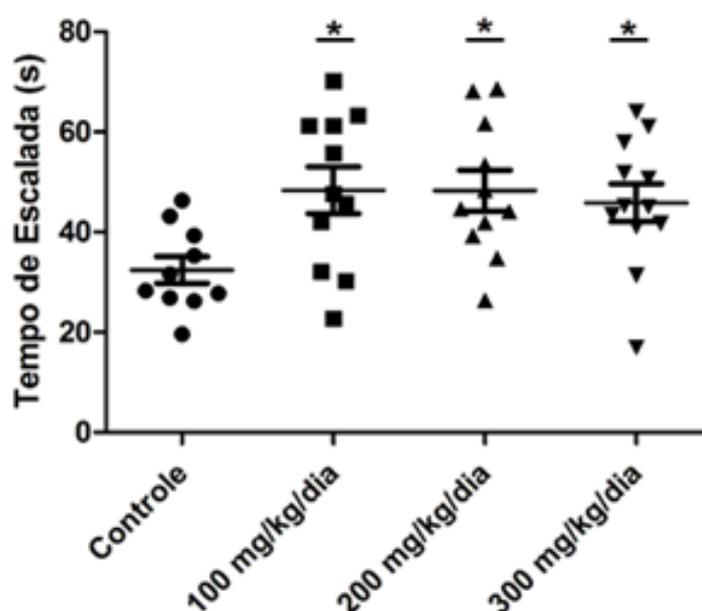


FIGURA 19. Gráfico contendo o tempo de escalada para os animais tratados com o extrato. Cada ponto representa um animal enquanto que as barras representam a média e o erro padrão. Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls. * $p \leq 0,05$ comparando com o grupo controle. Fonte: O Autor.

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO NO MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON, INDUZIDO POR 6-OHDA.

5.3.1 Avaliação sobre a Memória (Modelo 6-OHDA)

5.3.1.1 Teste de Reconhecimento Social

Assim como para a avaliação do efeito *per se* do extrato sobre os animais o parâmetro avaliado foi o RID (relação entre as investigações). Os resultados, expressos em média \pm desvio padrão foram: Grupo controle (0,8271 \pm 0,3931), 6-OHDA controle (1,23 \pm 0,41), 6-OHDA 100 (0,54 \pm 0,22), 6-OHDA 200 (0,65 \pm 0,2) e 6-OHDA 300 (0,73 \pm 0,68), dados estatísticos ($p \leq 0,01$). Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls, utilizando um $p \leq 0,05$.

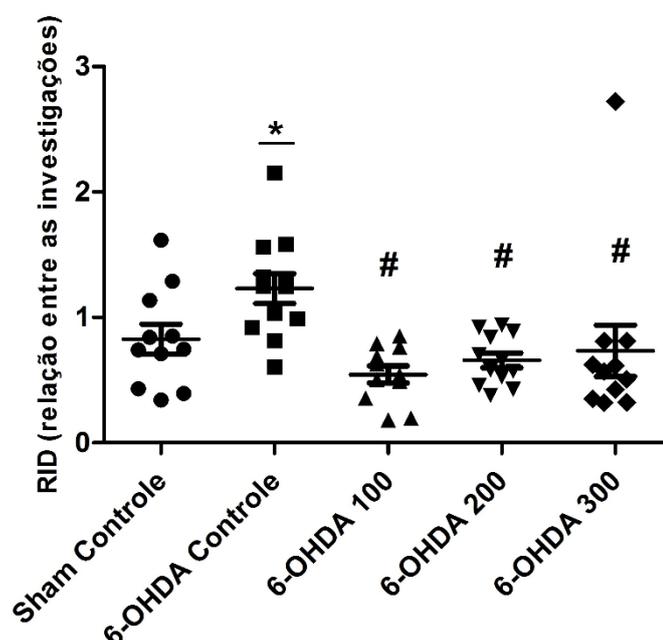


FIGURA 20. Relação entre as investigações (RID) para os grupos submetidos a cirurgia estereotáxica. Cada ponto representa um animal enquanto que as barras representam a média e o erro padrão. * $p \leq 0,05$ comparando com o grupo SHAM controle e # $p \leq 0,05$ comparando com o grupo 6-OHDA controle. Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls.
Fonte: O Autor.

Através destes dados foi possível observar que os animais tratados com o extrato apresentaram valores de RID diferentes, estatisticamente, dos apresentados pelo grupo 6-OHDA, indicando que o tratamento preveniu a perda de memória para

os animais submetidos a cirurgia. Além disto, o grupo 6-OHDA controle obteve valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo SHAM controle ($p \leq 0,05$).

5.3.1.2 Teste de Reconhecimento de Objetos

No teste de reconhecimento de objetos, os resultados dos escores de discriminação (média \pm desvio padrão) foram: SHAM Controle ($0,3152 \pm 0,4342$), 6-OHDA Controle ($-0,52 \pm 0,4$), 6-OHDA 100 ($0,21 \pm 0,5$), 6-OHDA 200 ($-0,037 \pm 0,4$) e 6-OHDA 300 ($0,07 \pm 0,5$), dados estatísticos ($p \leq 0,001$). Os resultados mostraram um efeito positivo do extrato sobre os grupos tratados, prevenindo-os da perda de memória resultante da lesão pela toxina 6-OHDA. Este resultado foi demonstrado através da diferença estatística entre os grupos tratados com o extrato e o grupo 6-OHDA controle ($p \leq 0,05$). Este efeito, porém, não mostrou correlação de dose-dependência.

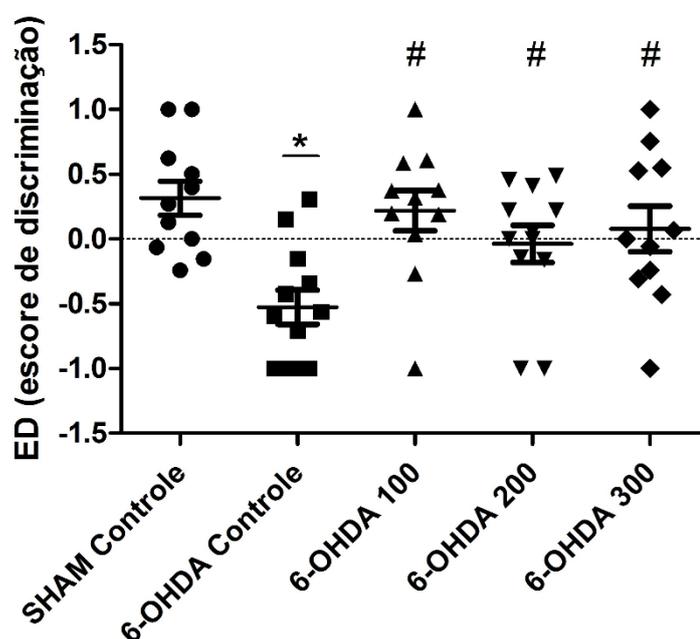


FIGURA 21. Escores de discriminação para os grupos submetidos a cirurgia estereotóxica. Cada ponto representa um animal enquanto que as barras representam a média e o erro padrão. * $p \leq 0,05$ comparando com o grupo SHAM controle e # $p \leq 0,05$ comparando com o grupo 6-OHDA controle. Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls. Fonte: O Autor.

5.3.2 Avaliação da atividade motora (Modelo 6-OHDA)

5.3.2.1 Teste de Campo Aberto

No teste do campo aberto o tratamento não foi capaz de alterar os parâmetros de ambulação e número de levantadas. Os dados obtidos estão representados na tabela 6, abaixo.

TABELA 6. Resultados do teste de campo aberto, para os animais submetidos a cirurgia estereotáxica. Os valores foram dados em média \pm desvio padrão.

	SHAM Controle	6-OHDA Controle	6-OHDA 100	6-OHDA 200	6-OHDA 300	Dados Estatísticos
Ambulação	61,7 \pm 9,7	50,8 \pm 23,1	50,5 \pm 30,2	58,0 \pm 31,0	54,7 \pm 39,3	p = 0,89 ANOVA
Levantadas	16,7 \pm 6,3	10,1 \pm 4,1	14,5 \pm 9,4	15,1 \pm 6,9	17,2 \pm 10,5	p = 0,20 ANOVA
Tempo no centro (%)	16,9 \pm 24,3	2,8 \pm 2,2	6,4 \pm 6,1	4,82 \pm 2,5	5,8 \pm 3,7	p \leq 0,05 Kruskal-Wallis
Tempo na periferia (%)	83,1 \pm 24,3	97,1 \pm 2,3	93,8 \pm 6,2	95,1 \pm 2,5	94,1 \pm 3,7	p \leq 0,05 ANOVA

Fonte: O Autor

Os dados paramétricos foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste post hoc Newman-Keuls, enquanto que os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis. Através da análise estatística, foi possível observar que houveram diferenças significativas nos parâmetros de tempo no centro e na periferia entre os grupos SHAM controle e 6-OHDA controle. Porém, não houve diferença quando estes grupos foram comparados com os grupos tratados, indicando uma possível reversão do comportamento do tipo ansioso nestes animais.

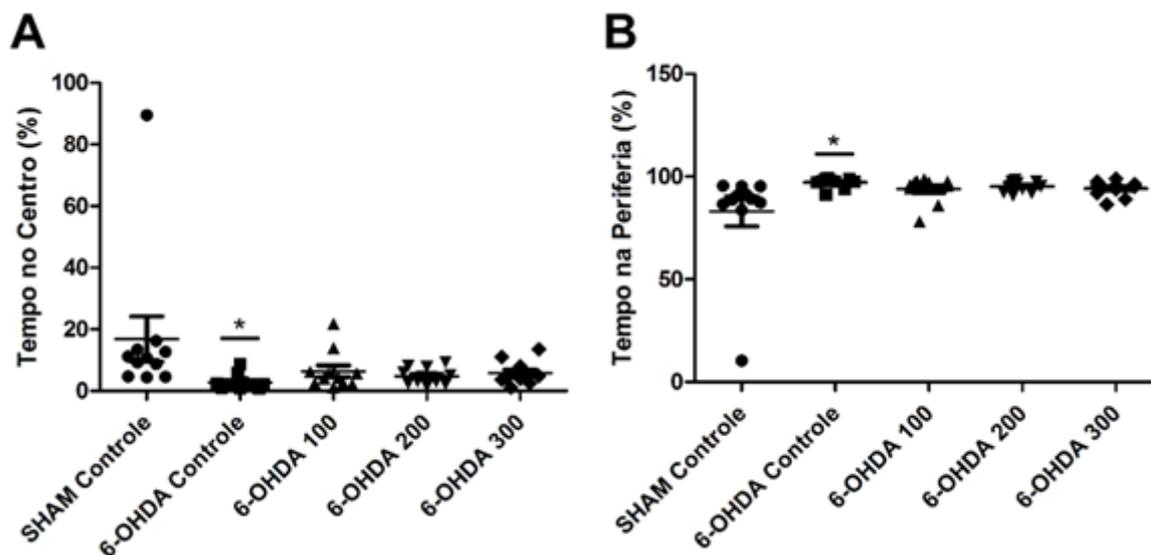


FIGURA 22. Gráfico contendo os parâmetros de (A) Tempo no centro (%) e (B) Tempo na periferia (%), para o teste do campo aberto realizado com os animais submetidos a cirurgia estereotáxica. Cada ponto representa um animal enquanto que as barras representam a média e o erro padrão. * $p \leq 0,05$ comparando com o grupo controle. Os dados paramétricos foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os dados não paramétricos foram avaliados através do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn. Fonte: O Autor.

5.3.3 Avaliação do comportamento do tipo Ansioso (Modelo 6-OHDA)

5.3.3.1 Teste de Labirinto em Cruz Elevado

Os parâmetros avaliados neste teste foram o tempo nos braços aberto, fechado e centro, além do número de entradas em cada braço e no centro, além do número total de entradas, os dados obtidos estão representados na tabela 7, abaixo. Os dados foram analisados através do teste de Kruskal Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn.

TABELA 7. Resultados do teste de labirinto em cruz elevado, para os animais submetidos a cirurgia estereotáxica. Os valores foram dados em média \pm desvio padrão.

	SHAM	6-OHDA	6-OHDA	6-OHDA	6-OHDA	Dados
	Controle	Controle	100	200	300	Estatísticos
Tempo (%) no Braço Aberto	27,3 \pm 28,9	10,2 \pm 12,4	17,6 \pm 24,5	22,4 \pm 23,4	7,3 \pm 7,1	p = 0,17 Kruskal- Wallis
Tempo (%) no Braço Fechado	56,4 \pm 31,1	83,4 \pm 15,6	74,9 \pm 28,9	70,7 \pm 25,9	84,4 \pm 9,7	p = 0,1356 Kruskal- Wallis
Tempo (%) no Centro	16,1 \pm 16,2	6,4 \pm 5,9	7,4 \pm 6,6	6,7 \pm 5,3	8,1 \pm 4,4	p = 0,15 Kruskal- Wallis
Entradas no Braço Aberto	3,2 \pm 1,8	1,4 \pm 1,1	2,7 \pm 2,6	3,7 \pm 3,5	2,7 \pm 2,6	p = 0,17 Kruskal- Wallis
Entradas no Braço Fechado	3,7 \pm 1,9	2,7 \pm 2,0	3,5 \pm 2,5	3,8 \pm 3,6	4,5 \pm 3,6	p = 0,69 Kruskal- Wallis
Entradas no Centro	5,9 \pm 3,3	3,1 \pm 2,5	5,4 \pm 4,7	6,7 \pm 6,8	6,4 \pm 5,8	p = 0,47 Kruskal- Wallis
Total de Entradas	12,5 \pm 6,5	7,5 \pm 5,2	11,7 \pm 9,4	14,3 \pm 13,5	13,7 \pm 11,8	p = 0,57 Kruskal- Wallis

Fonte: O Autor.

Não houveram diferenças significativas ($p > 0,05$) para os parâmetros analisados, indicando que o extrato não promoveu uma redução do comportamento tipo ansioso nos animais lesados com 6-OHDA, no teste do labirinto em cruz elevado.

5.3.4 Avaliação do comportamento do tipo Depressivo (Modelo 6-OHDA)

5.3.4.1 Teste de Natação Forçada

Os dados obtidos no teste de natação forçada estão mostrados na tabela 8, abaixo. Os dados foram avaliados através da ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls, utilizando um $p \leq 0,05$.

TABELA 8. Resultados do teste de natação forçada, para os animais submetidos a cirurgia estereotáxica. Os valores foram dados em média \pm desvio padrão.

	SHAM Controle	6-OHDA Controle	6-OHDA 100	6-OHDA 200	6-OHDA 300	Dados Estatísticos
Tempo de Natação (s)	228,4 \pm 20,2	177,1 \pm 14,	217,0 \pm 22,48	216,9 \pm 23,	222,7 \pm 21,6	$p \leq 0,0001$ ANOVA
Tempo de Imobilidade (s)	40,05 \pm 18,1	91,3 \pm 21,9	41,3 \pm 25,3	39,2 \pm 23,1	24,1 \pm 21,7	$p \leq 0,0001$ ANOVA
Tempo de Escalada (s)	31,5 \pm 8,5	31,5 \pm 12,6	41,6 \pm 12,8	43,8 \pm 11,0	53,2 \pm 13,3	$p \leq 0,001$ ANOVA

Fonte: O Autor.

No parâmetro de imobilidade, os resultados demonstraram que os grupos tratados com o extrato obtiveram menores valores do tempo de imobilidade quando comparado com o grupo 6-OHDA controle ($p \leq 0,05$), porém não houve diferença quando comparados com o grupo SHAM controle ($p > 0,05$). De mesma maneira, o tempo de natação foi de encontro com estes resultados, já que, os grupos tratados tiveram maiores valores em comparação com o grupo 6-OHDA Controle ($p \leq 0,05$), além de não apresentarem diferença quando comparados ao grupo SHAM Controle ($p > 0,05$).

A fim de avaliar se a diminuição no tempo de natação e o aumento no tempo de imobilidade nos animais do grupo 6-OHDA estava relacionada a um efeito motor, foi feita uma análise de correlação entre os parâmetros de tempo de natação/imobilidade e ambulação (campo aberto). Através desta análise, obteve-se um valor de $p = 0,049$ e $p = -0,57$, para a correlação entre a natação e ambulação, indicando uma correlação negativa moderada. Este dado mostrou que não houve influência de aspectos motores nos resultados apresentados para a natação forçada, já que a correlação se apresentou negativa. Além disto, entre o tempo de imobilidade e ambulação, a correlação foi de: $p = 0,27$ e $p = 0,34$, afirmando novamente que os resultados identificados neste teste não estão associados a alterações motoras.

A partir disto, foi confirmado a redução do comportamento tipo depressivo, no teste de natação forçada, para os animais tratados com *P. alata*. Porém, sem relação do tipo dose-dependente.

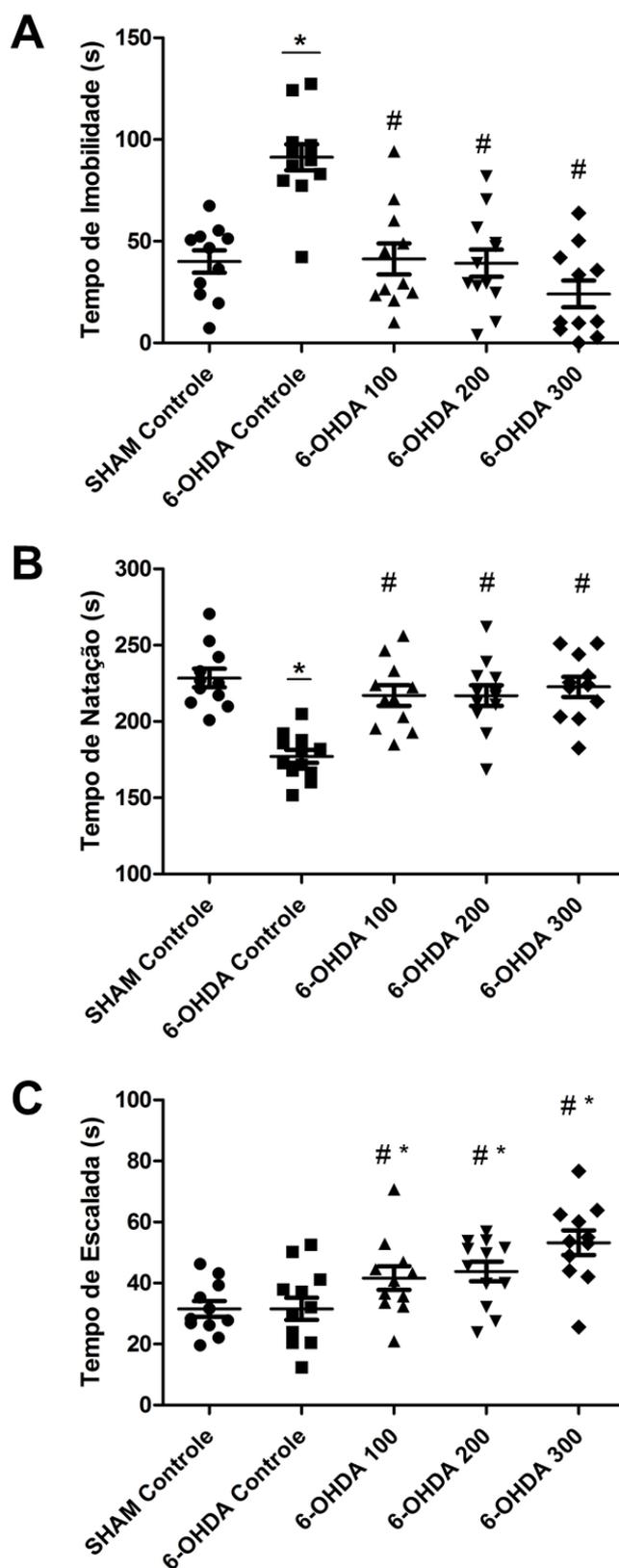


FIGURA 23. Gráficos contendo os parâmetros de (A) natação, (B) imobilidade e (C) escalada para os animais submetidos a cirurgia estereotáxica. Cada ponto representa um animal enquanto que as barras representam a média e o erro padrão. * $p \leq 0,05$ comparando com o grupo SHAM Controle e # $p \leq 0,05$ comparando com o grupo 6-OHDA Controle. Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via seguido do teste post hoc de Newman-Keuls. Fonte: O Autor.

De mesma maneira como os resultados observados nos ratos sem a realização da cirurgia estereotáxica, houve um aumento do tempo de escalada para os grupos tratados com as diferentes doses do extrato de *P. alata*.

5.4 CONCENTRAÇÃO DE GSH NO ESTRIADO

O conteúdo de GSH no estriado foi determinado para os animais (n=4) submetidos a cirurgia estereotáxica. Os resultados estão representados na tabela abaixo.

TABELA 9. Conteúdo de GSH no estriado. Os resultados foram dados em μg GSH/ grama de tecido e expressos em média \pm desvio padrão.

GRUPO	μg GSH/ grama de tecido
SHAM Controle	127,9 \pm 89,76
6-OHDA Controle	59,03 \pm 38,24
6-OHDA 100	108,7 \pm 37,31
6-OHDA 200	108,6 \pm 40,05
6-OHDA 300	73,47 \pm 19,78

Fonte: O Autor.

Os dados foram analisados através do teste de Kruskal Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn ($p = 0,33$). Não foram observadas diferenças significativas na concentração de GSH por grama de tecido entre os grupos avaliados.

5.5 CONCENTRAÇÃO DE GSH NO PLASMA

O conteúdo de GSH no plasma foi determinado para os animais (n=4) submetidos a cirurgia estereotáxica. Os resultados estão mostrados na tabela 10, abaixo.

TABELA 10. Conteúdo de GSH no plasma. Os resultados foram dados em μg GSH / mililitro de plasma e expressos em média \pm desvio padrão.

GRUPO	μg GSH / mL de plasma
SHAM Controle	0,379 \pm 0,12
6-OHDA Controle	0,251 \pm 0,04
6-OHDA 100	0,279 \pm 0,01
6-OHDA 200	0,464 \pm 0,14
6-OHDA 300	0,460 \pm 0,10

Fonte: O Autor.

Os dados foram analisados através do teste de Kruskal Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn. Esta análise demonstrou que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias, porém, não houve diferença significativa entre os grupos.

5.6 ATIVIDADE DA CATALASE NO ESTRIADO

A atividade da catalase no estriado foi determinada para os animais ($n=4$) submetidos a cirurgia estereotáxica. Os resultados foram dados em μmol de H_2O_2 consumido / minuto / miligrama de tecido e estão demonstrados na tabela abaixo.

TABELA 11. Atividade da catalase do estriado. Os resultados foram dados em μmol de H_2O_2 consumido / minuto / miligrama de tecido e estão expressos em média \pm desvio padrão.

GRUPO	μmol de H_2O_2 consumido/min/mg
SHAM Controle	5,221 \pm 5,8
6-OHDA Controle	2,932 \pm 2,9
6-OHDA 100	2,302 \pm 1,6
6-OHDA 200	3,772 \pm 2,2
6-OHDA 300	2,781 \pm 2,3

Fonte: O Autor.

Os dados foram analisados através do teste de Kruskal Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn. A estatística demonstrou que houve não diferença significativa ($p=0,924$) entre os grupos.

5.7 ATIVIDADE DA CATALASE NOS ERITRÓCITOS

A atividade da catalase nos eritrócitos foi determinada para os animais (n=5) submetidos a cirurgia estereotáxica. Os resultados foram determinados em μmol de H_2O_2 consumido / minuto / mililitro de eritrócitos e estão expressos na tabela abaixo.

TABELA 12. Atividade da catalase nos eritrócitos. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

GRUPO	μmol de H_2O_2 consumido/min/mL
SHAM Controle	8,981 \pm 1,8
6-OHDA Controle	8,393 \pm 1,1
6-OHDA 100	10,02 \pm 4,1
6-OHDA 200	11,62 \pm 3,6
6-OHDA 300	11,54 \pm 2,3

Fonte: O Autor.

Os dados foram analisados através do teste de Kruskal Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn. Esta análise demonstrou que houve não diferença significativa ($p=0,385$) entre os grupos.

5.8 EXAMES BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS

Os exames bioquímicos e hematológicos tiveram como objetivo identificar possíveis alterações tanto nos ratos submetidos a cirurgia estereotáxica (n= 4-5) como nos ratos saudáveis tratados com o extrato. Os resultados bioquímicos (dados não mostrados), em todos os parâmetros analisados (glicemia, colesterol: total, HDL e LDL; triglicerídeos, enzimas hepáticas [TGO e TGP], creatinina e PCR ultrasensível), não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$).

Por outro lado, algumas alterações hematológicas foram observadas nos grupos onde foi realizada a lesão pela toxina 6-OHDA através da cirurgia estereotáxica. Quando comparados ao grupo SHAM Controle, os grupos lesionados

(6-OHDA) apresentaram diferença significativa nos parâmetros de número total de hemácias e hematócrito.

TABELA 13. Número total de hemácias (milhões/ μ L) e hematócrito (%) dos animais submetidos a cirurgia estereotáxica. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

	SHAM Controle	6-OHDA Controle	6-OHDA 100	6-OHDA 200	6-OHDA 300
Hemácias (milhões/ μ L)	8,192 \pm 0,25	7,230 \pm 0,46	7,128 \pm 0,56	7,103 \pm 0,49	7,053 \pm 0,10
		#	#	#	#
Hematócrito (%)	49,20 \pm 2,3	44,06 \pm 3,3	42,63 \pm 3,2	42,73 \pm 2,4	42,75 \pm 1,5
		#	#	#	#

$p \leq 0,05$ comparando com o grupo SHAM Controle. Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls.

Fonte: O Autor.

Estes resultados mostram que o extrato não promoveu alterações bioquímicas relacionadas ao tratamento com o EHPA nas concentrações testadas. Por outro lado, a administração de 6-OHDA no FPM promoveu alterações hematológicas, reduzindo a concentração de hemácias no sangue.

5.9 RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

Caracterização do extrato

Perfil químico	- Concentração de fenólicos: 16,455 (\pm 1,3) mg Eq ácido gálico/1g de extrato - Concentração de flavonoides: 6,55 (\pm 0,72) mg Eq quercetina/1g de extrato
Atividade antioxidante	- IRM no DPPH: 18,44 % (\pm 2,3) - 125 μ g/mL - IRM no ABTS: 91,32% (\pm 4,5) - 125 μ g/mL - IC ₅₀ ABTS: 47,8 μ g/mL

Efeitos comportamentais resultantes do tratamento com o extrato.

Reconhecimento social	- Não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros analisados ($p > 0,05$)
Reconhecimento de objetos	- Não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros analisados ($p > 0,05$)
Labirinto em Cruz Elevado	- Não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros analisados ($p > 0,05$)
Campo Aberto	- Não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros analisados ($p > 0,05$)
Natação Forçada	- O tratamento com o extrato promoveu um aumento no tempo de escalada, comparado ao grupo controle.

Efeitos do extrato sob o modelo animal de Doença de Parkinson

Reconhecimento social	- O valor do RID dos grupos tratados e grupo SHAM controle apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo 6-OHDA controle ($p \leq 0,05$), indicando uma prevenção da perda de memória nos animais tratados.
Reconhecimento de objetos	- O ED dos grupos tratados e grupo SHAM controle apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo 6-OHDA controle ($p \leq 0,05$), indicando uma prevenção da perda de memória nos animais submetidos ao tratamento.
Labirinto em Cruz Elevado	- Não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros analisados ($p > 0,05$)

Campo Aberto	- Não houveram diferenças nos parâmetros de ambulação e levantadas. Porém, houve diferença entre os grupos SHAM controle e 6-OHDA controle no tempo de permanência no centro e na periferia, indicando um efeito ansiogênico induzido pela neurotoxina. O tratamento reverteu tal efeito.
Natação Forçada	- Os grupos tratados apresentaram um efeito antidepressivo neste teste, promovendo uma redução do tempo de imobilidade e aumento do tempo de natação quando comparados ao grupo 6-OHDA controle. Além disto, o tratamento promoveu um aumento do tempo de escalada comparando aos grupos não tratados.
Correlação: tempo de natação e ambulação	- Através da análise de correlação de Pearson, os resultados indicaram que não houve influência de aspectos motores nos resultados apresentados para a natação forçada. Por outro lado, não houve correlação entre o tempo de imobilidade e ambulação.

Testes *ex vivo*

Concentração de GSH	<p>Estriado: Não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros analisados ($p > 0,05$).</p> <p>Sangue: O teste estatístico mostrou uma diferença significativa, mas o pós-teste não indicou diferenças entre os grupos.</p>
Atividade da catalase	<p>Estriado: Não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros analisados ($p > 0,05$).</p> <p>Sangue: Não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros analisados ($p > 0,05$).</p>
Exames Hematológicos	- Os animais submetidos ao modelo de DP, induzido pela neurotoxina 6-OHDA mostraram uma redução da concentração de hemácias, quando comparados ao grupo SHAM controle. Não houve diferença nos demais parâmetros.
Exames Bioquímicos	- Não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros analisados ($p > 0,05$), indicando que não houve toxicidade decorrente do tratamento realizado.

6. DISCUSSÃO

6.1 PERFIL QUÍMICO E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados apresentados mostraram que o extrato em estudo possui uma concentração maior de compostos fenólicos (16,4 mg) do que em alguns estudos descritos na literatura. Madoglio (2011) obteve aproximadamente 7 mg de compostos fenólicos por grama de planta, enquanto Netto e colaboradores (2014) obtiveram 11,5 mg e Vieira (2014) obteve 15 mg. Esta variação pode ser decorrente de inúmeros fatores, entre eles a variação de características climáticas e ambientais (NETTO *et al.*, 2014), bem como da metodologia utilizada para a extração, sendo que, os estudos citados acima realizaram uma extração por decocção com solvente hidro-metanólico 50% (v/v), hidroetanólico 40% (v/v) e hidro-metanólico 70% (v/v), respectivamente, o que pode justificar tais variações na concentração destes compostos.

Quanto ao teor de flavonoides (6,5 mg), era esperado que este fosse menor do que o determinado para os compostos fenólicos, visto que, os flavonoides são uma classe química pertencente a estes compostos (BEER *et al.*, 2017). Os dados em relação ao teor de flavonoides na literatura é bem variado, sendo que Fenner (2006) teve uma dosagem correspondente a 26 mg por grama de planta, enquanto que, Petry e colaboradores (1998) tiveram uma dosagem correspondente a 5,5 mg por grama de planta. Wosch e colaboradores (2017) também identificaram uma grande variação da concentração de compostos fenólicos na *P. alata*, sendo que, tal fato está relacionado a diferentes características genéticas e geográficas, podendo resultar em características farmacológicas diferentes. Sendo assim há uma necessidade de padronização dos extratos.

Os testes para a avaliação da atividade de neutralização de radicais livres dos extratos apresentaram resultados discrepantes entre as metodologias utilizadas. No modelo do radical DPPH[•] não houve uma atividade *scavenger* muito pronunciada. Embora tenham feito a extração da planta por diferentes metodologias, Wasicky *et al.* (2015) determinaram um IC₅₀ de 1061,2 (± 8,5) µg/mL e Vasić *et al.* (2012) 808,6 (± 2,64) µg/mL, se assemelhando, de certa maneira, com os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que utilizaram concentrações bem maiores para determinar o IC₅₀. Esta baixa atividade pode estar associada a cinética de inibição do radical, através da doação de elétrons. Xie; Schaich (2014) demonstraram que diferentes compostos

fenólicos apresentam diferentes padrões de reação com o radical DPPH[•], sendo que, este fato pode ser resultado da dificuldade de acesso dos compostos fenólicos ao sítio do radical DPPH[•]. Outros fatores também podem ter influenciado este resultado, como a influência da luz e a presença de compostos não antioxidantes (OLIVEIRA, 2015).

Enquanto isto, no método do radical ABTS^{•+} os resultados se mostraram promissores, uma vez que, na concentração de 125 µg/mL houve uma IRM acima de 90%, assim como para o ácido ascórbico. Na literatura há a presença de bons resultados relacionando as plantas do gênero *Passiflora* e a sua atividade *scavenger* frente ao radical ABTS^{•+}. Wong *et al.* (2014) demonstraram em seu estudo um IC₅₀ maior que 500 µg/mL para a casca da fruta da *Passiflora edulis*, Masteikova *et al.* (2008) obtiveram 32% de inibição do ABTS^{•+} para as folhas de *Passiflora incarnata* (sendo que a amostra foi uma alíquota de 100µL de um extrato hidroalcoólico 70%, realizado por maceração) e Masteikova *et al.*, (2008) demonstraram aproximadamente 60% de inibição do radical ABTS^{•+} para 0,1 µL de extrato hidroalcoólico bruto 70% (v/v). Os demais resultados encontrados na literatura estão expressos em micromolar de trolox (padrão) por grama de extrato, não podendo ser comparados aos resultados deste trabalho (COLOMEU *et al.*, 2014; SARAVANAN; ARUNACHALAM; PARIMELAZHAGAN, 2014).

Através destes resultados é possível observar que o EHPA apresenta uma atividade antioxidante significativa sobre o ensaio do ABTS^{•+}. Apesar disto, há a necessidade de maiores investigações, inclusive sobre outros ensaios para avaliar a atividade antioxidante, utilizando radicais presentes fisiologicamente como o HOCl, para que possamos associar o possível efeito neuroprotetor a estes resultados positivos da atividade antioxidante.

6.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS RESULTANTES DO TRATAMENTO COM O EXTRATO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que o tratamento, durante 14 dias, com o extrato hidroalcoólico de *Passiflora alata* não promoveu alterações comportamentais significativas nos testes comportamentais realizados.

Nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado, os resultados mostraram que o extrato não resultou em um efeito ansiolítico, quando comparados ao grupo controle. Em contrapartida, diversos estudos presentes na literatura afirmam

que a *P. alata* possui atividade ansiolítica. Provensi *et al.* (2008) demonstraram em seu estudo um aumento no tempo no braço aberto assim como um menor tempo no braço fechado para os animais (camundongos), submetidos ao tratamento por via oral, 60 minutos antes do teste, com 300 mg/Kg de extrato hidroalcoólico de *P. alata*. Neste mesmo estudo, não houve a identificação de alterações no teste de campo aberto. De maneira semelhante, Romanini *et al.* (2006) demonstraram uma diminuição no tempo no braço fechado após 30 minutos da administração aguda de 300mg/Kg do extrato aquoso de *P. alata*. E, também, Barbosa *et al.* (2008) demonstraram um efeito ansiolítico através do aumento no tempo no braço aberto e redução no braço fechado em ratos submetidos a administração aguda, via intraperitoneal, de 100 e 150mg/Kg de um extrato aquoso da planta.

Na literatura revisada (PubMed, Scielo, Google Scholar, ScienceDirect, no período de outubro/dezembro de 2017) foi encontrado apenas um estudo que demonstrou o efeito ansiolítico após a realização de um tratamento prolongado com a planta. Este estudo foi realizado por Otobone *et al.* (2005b), que demonstraram tal efeito após a administração, durante 15 dias, de 20mg/Kg de um extrato hidroalcoólico de *P. alata* associado a *Valeriana officinalis*, o qual promoveu um aumento no tempo nos braços abertos.

Por outro lado, existem também evidências do efeito ansiogênico de *Passifloras*. Realizando um tratamento durante 14 dias, com 300 mg/Kg de extrato aquoso de *P. alata*, Fenner (2006) mostrou um possível efeito ansiogênico em ratos submetidos ao teste de labirinto em cruz, os quais permaneceram um tempo menor no braço aberto quando comparados ao grupo controle. Este resultado também foi observado durante o tratamento agudo, utilizando a mesma dose. Porém, na dose de 600 mg/Kg houve uma reversão deste efeito. Além deste estudo, Elsas *et al.* (2010) também demonstraram um efeito ansiogênico em camundongos tratados, por uma semana, com um extrato de *P. incarnata* solubilizado na água do bebedouro, resultando em uma diminuição significativa do tempo nos braços abertos em comparação ao controle.

Apesar de tais evidências, acerca dos efeitos ansiolítico e antidepressivo, estes estudos apresentam fatores que não se correlacionam com as metodologias propostas em nossa pesquisa. Um destes fatores é a preparação do extrato, o qual foi preparado com solvente diferente dos demais, além de outros fatores como a dose utilizada, composição química do extrato (concentração de flavonoides e saponinas),

espécie utilizada para o ensaio, assim como aspectos fisiológicos e metabólicos (ELSAS *et al.*, 2010), duração de tratamento (agudo ou crônico), e as condições de execução do teste, como ritmo circadiano do animal, exposição a luz e sons (WALF; FRYE, 2007).

Além disto, em nosso estudo o teste de labirinto em cruz elevado foi realizado 8 dias após o término do tratamento de 14 dias com o extrato, o que pode ter gerado alterações no efeito observado, uma vez que houve uma interrupção do tratamento para a realização dos demais testes comportamentais. Este foi um dos principais fatores limitantes deste estudo para que não pudessem ser identificadas alterações comportamentais, não somente na avaliação do efeito ansiolítico como também nos demais efeitos analisados. Apesar de não se conhecer os seus parâmetros farmacocinéticos, acredita-se que este hiato entre o término das administrações e a realização dos testes possa ter alterado fatores como a concentração plasmática dos componentes do extrato, e assim, a não identificação dos efeitos terapêuticos já estabelecidos na literatura.

Semelhantemente a alguns estudos citados acima, este estudo demonstrou ausência de alterações motoras, no teste de campo aberto, após o tratamento prolongado com o extrato.

Além disto, não foi observado um efeito antidepressivo após o tratamento prolongado com o extrato hidroalcoólico de *P. alata*, no teste de natação forçada. Assim como para o efeito ansiolítico, a literatura apresenta diversos estudos demonstrando o papel antidepressivo de plantas do gênero *Passiflora*, como a *P. alata*. Santosh *et al.* (2011) mostraram em seu estudo uma redução do tempo de imobilidade nos testes de suspensão pela cauda e natação forçada, em camundongos submetidos a uma dose aguda (100, 200 e 300mg/Kg) de um extrato metanólico das folhas de *P. foetida*. De mesma maneira, (JAFARPOOR *et al.*, 2014; SINGH; SINGH; GOEL, 2012) também demonstraram tal efeito antidepressivo para o extrato hidroalcoólico de *P. incarnata*.

Apesar disto, o efeito antidepressivo não foi pronunciado neste trabalho, e este fato pode ser resultado dos diversos fatores já mencionados, como as características do extrato (solvente utilizado, composição química, aspectos climáticos), assim como características do animal (espécie, peso, taxa de metabolismo, nível de estresse [presença de ruídos, odores e movimentação aversiva] e demais características

inerentes ao animal [genéticas]), assim como aspectos metodológicos (tamanho dos aparatos, temperatura da água e variação interpessoal de avaliação).

Por outro lado, neste mesmo modelo da natação forçada, foi identificado um aumento no tempo de escalada para os animais tratados, o que indica um possível envolvimento do sistema noradrenérgico no mecanismo de ação do extrato (CONSONI; VITAL; ANDREATINI, 2006; DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995). Este envolvimento noradrenérgico também já foi demonstrado por estudos que utilizaram extrato de *P. edulis* (AYRES *et al.*, 2017) e vitexina (flavonoide presente na *P. alata*) (CAN; DEMIR ÖZKAY; ÜÇEL, 2013). Tais estudos demonstraram uma inibição do efeito antidepressivo após a administração de AMPT (alfa metil-p-tirosina), um inibidor da síntese de catecolaminas (noradrenalina).

Em relação a avaliação de possíveis efeitos nootrópicos induzidos pelo extrato de *P. alata*, foi observado que não houve modificação na memorização dos animais (memória semântica de curta duração), tanto no teste de reconhecimento social como no teste de reconhecimento de objetos. Barbosa *et al.* (2008b) também apresentou tais resultados, não identificando alterações na memória dos animais, tratados com diferentes concentrações (100 e 150 mg/Kg) de extratos aquosos de *P. alata* e *P. edulis*, submetidos ao teste de esquiva inibitória, assim como Slomp *et al.* (2010) que realizaram um tratamento com 150 mg/Kg de *P. alata* associado a *Valeriana officinalis*. Por outro lado, no estudo de Jawna-zboińska *et al.* (2016) foi observado um efeito nootrópico, em ratos Wistar, após um tratamento, de 9 semanas, com 300 mg/Kg de um extrato hidroalcoólico de *P. incarnata*.

Sendo assim, as poucas evidências existentes se mostram contraditórias, mostrando a necessidade de maiores esforços para a elucidação dos efeitos resultantes do tratamento prolongado sobre a memória.

6.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO NO MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON, INDUZIDA POR 6-OHDA.

Neste estudo, pode-se observar que o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. alata* produziu um efeito benéfico sobre o modelo animal de DP, induzido pela 6-OHDA. Nos testes de reconhecimento social e reconhecimento de objetos, o extrato preveniu a perda de memória induzida pela neurotoxina 6-OHDA, promovendo o um aumento dos scores de RID e de discriminação (ED), os quais foram diferentes

estatisticamente dos resultados observados no grupo 6-OHDA controle, indicando assim, um efeito positivo do extrato neste modelo.

Quando avaliado o efeito *per se* do tratamento com o EHPA sobre a memória, observamos que este não alterou os scores discriminatórios, mostrando que ele por si só não gerou um efeito nootrópico. Porém, no modelo animal da 6-OHDA, o tratamento com a *P. alata* levou a este efeito. Este resultado pode indicar que o efeito de reversão de déficit cognitivo, no modelo da 6-OHDA, pode estar associado a um possível efeito neuroprotetor resultante do tratamento com o EHPA. Na literatura revisada não existem evidências deste efeito relacionados a plantas do gênero *Passiflora*, e, portanto, há a necessidade de maiores investigações.

Enquanto isto, no teste de campo aberto o EHPA não promoveu alterações significativas. Este dado é importante, uma vez que alterações na ambulação poderiam estar associadas a um comprometimento motor. Este comprometimento poderia levar a alterações em outros testes comportamentais. Outro viés descartado, em relação ao comprometimento motor, foi através da não existência de correlação entre o aumento do tempo de imobilidade, no teste de natação forçada, com a diminuição da ambulação no campo aberto. Mostrando novamente que os resultados apresentados são decorrentes de alterações comportamentais e não de alterações motoras.

Para a avaliação do efeito neuroprotetor frente a alterações motoras causadas pela 6-OHDA, a metodologia realizada para a lesão na via nigroestriatal é diferente, sendo necessário uma administração unilateral da neurotoxina. Após esta administração, é realizado a avaliação do comportamento rotatório induzido por apomorfina, sendo que, quanto maior o número de rotações contralaterais, maior a lesão causada e, uma redução nestas rotações indicam um efeito neuroprotetor (VECCHIA *et al.*, 2015). Este teste não foi realizado neste trabalho em função da quantidade de animais necessários ao estudo. Para a realização deste teste seriam necessários o dobro da quantidade de animais utilizados, tornando-se inviável em função da estrutura de biotério e tempo para execução dos testes.

Quando avaliadas em diferentes modelos de DP, as *Passifloras* desencadearam efeitos neuroprotetores importantes sobre as alterações motoras. No modelo de DP induzido por reserpina, o extrato hidroalcoólico de *P. cincinnata* preveniu o aparecimento de alterações motoras (BRANDÃO *et al.*, 2017). E, também, Ingale e Kasture (2014) mostraram que o tratamento do extrato butanólico de *P.*

incarnata reduziu a catalepsia (imobilidade e rigidez de membros) induzida por Haloperidol (antagonista do receptor D2 de dopamina), além de reduzir os movimentos mandibulares induzidos por tacrina (inibidor da acetilcolinesterase).

Foram observadas diferenças no tempo no centro e periferia entre os grupos SHAM e 6-OHDA controle. Esse efeito mostra que os ratos lesionados apresentaram um maior comportamento do tipo ansioso quando comparados ao grupo SHAM. Este efeito se dá pelo fato de que animais com comportamento do tipo ansioso tendem a ficar numa zona de segurança, sendo esta zona a região periférica da caixa, onde há menor exposição dos animais e também pelo fato de que eles podem se sentir seguros ao encostar as vibrissas na parede.

Enquanto isso, apesar de o tratamento não apresentar diferença significativa comparando ao grupo 6-OHDA controle, estes grupos também não apresentaram diferença com o grupo SHAM, podendo indicar um possível efeito de reversão do comportamento do tipo ansioso.

Por outro lado, no teste de labirinto em cruz elevado, que também avalia o comportamento do tipo ansioso, não houve diferença significativa entre os parâmetros analisados, nem mesmo entre os grupos SHAM e 6-OHDA controle. Outros estudos já demonstraram tal resultado, indicando que a lesão com 6-OHDA também não resultou em alterações no comportamento do tipo ansioso no teste de labirinto em cruz elevado. Nestes estudos, foram realizadas administrações bilaterais de 8 µg de 6-OHDA no estriado dorsal de camundongos (BRANCHI *et al.*, 2010) e 12 µg de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial de ratos Wistar (BRANCHI *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2013), mostrando que mesmo com maiores doses da neurotoxina, o efeito ansiogênico também não foi observado.

A ansiedade é uma condição que está presente em grande parcela dos pacientes com DP. O desenvolvimento desta condição nos humanos, com DP, se dá por um processo crônico de neurodegeneração e que acomete diversos tipos neuronais (WALSH; BENNETT, 2001), ao contrário do que ocorre nos modelos animais, em que há uma lesão aguda e específica para um tipo de neurônio. A lesão realizada neste estudo foi específica para neurônios dopaminérgicos, o que pode ter gerado uma redução do efeito ansiogênico induzido pela toxina (BRANCHI *et al.*, 2010, 2008; CARVALHO *et al.*, 2013). Além disto, ainda não se sabe se a ansiedade, presente em pacientes com DP, é resultado de aspectos fisiopatológicos da doença

ou se ocorrem em função de efeitos colaterais dos medicamentos utilizados para o tratamento dos sintomas (WALSH; BENNETT, 2001).

Por outro lado, Tadaiesky *et al.* (2008) observaram um efeito contrário do que o demonstrado por Branchi *et al.* (2008,2010), indicando que a lesão bilateral com 12 µg de 6-OHDA promoveu alterações no comportamento do tipo ansioso, no teste de labirinto em cruz elevado, indicando que a lesão promoveu um aumento deste tipo de comportamento. Este efeito do tipo ansioso, resultante da lesão com 6-OHDA, encaixa-se melhor com a hipótese de desenvolvimento de manifestações não-motoras da DP, segundo Prediger *et al.* (2012). Apesar disto, não foram observadas alterações neste comportamento em decorrência do tratamento com o extrato de *P. alata*. Brandão (2015) demonstrou em seu estudo que o tratamento, tanto agudo como “crônico”, de *P. cincinnata* também não promoveu alterações no teste de labirinto em cruz elevado.

O comportamento do tipo depressivo também é promovido pela lesão bilateral com 6-OHDA (SANTIAGO *et al.*, 2010). Neste estudo, o teste realizado para avaliar uma possível reversão deste efeito foi o teste de natação forçada. Neste teste, o animal é colocado em um cilindro com água e pode realizar três tipos de movimento: natação, escalada e imobilidade, sendo que, quanto maior o tempo de imobilidade, maior é o comportamento do tipo depressivo, visto que, o animal desistiu de escapar do cilindro. Quando comparados os grupos SHAM e 6-OHDA controle, pode-se observar que houve diferença estatística entre estes grupos nos parâmetros de natação e imobilidade. Este fato indica que a lesão gerada resultou em um comportamento do tipo depressivo.

Neste teste, o tratamento com o EHPA promoveu um efeito antidepressivo, uma vez que, os animais tratados permaneceram um maior tempo realizando o movimento de natação e um menor tempo de imobilidade quando comparados ao grupo 6-OHDA controle. Este efeito de redução do tempo de imobilidade (no modelo da 6-OHDA) em função do tratamento com a *P. alata* e outras espécies do gênero, ainda não é descrito na literatura. Porém, plantas como o *Hibiscus asper* (FOYET *et al.*, 2011) e o *Hypericum perforatum* (VECCHIA, 2013), que apresentam alguns metabólitos semelhantes as Passifloras, como a rutina e hiperosídeo (GREESON; SANFORD; MONTI, 2001), também apresentaram resultados semelhantes aos deste presente estudo.

Neste mesmo modelo, o tratamento resultou em um aumento no tempo de escalada. Como já mencionado anteriormente, o aumento do tempo de escalada, no teste de natação forçada, está associado a uma ativação do sistema noradrenérgico (CONSONI; VITAL; ANDREATINI, 2006), indicando um possível mecanismo de ação para o efeito antidepressivo.

Através destes resultados, pode-se observar que o extrato de *P. alata* preveniu o aparecimento de comportamentos do tipo depressivo e do déficit cognitivo induzidos pela lesão bilateral de 6-OHDA. Estudos com espécies relacionadas e compostos presentes na planta também demonstram tais efeitos. Tal *et al.* (2016) evidenciaram um efeito neuroprotetor dos frutos de *P. edulis*, através de um tratamento prévio de 14 dias, reduzindo em 60% a morte de neurônios dopaminérgicos (SNpc e estriado) após a administração de MPTP. Outros achados importantes estão relacionados ao efeito neuroprotetor da crisina, onde ela mostrou a redução da morte celular, em células PC12 (feocromocitoma), após a lesão por 6-OHDA (ZHAO *et al.*, 2009), e também preveniu a morte de neurônios dopaminérgicos mesoencefálicos em cultura, após a lesão com MPTP (MERCER *et al.*, 2005). E no estudo de Goes *et al.* (2017), sob o modelo da 6-OHDA, a crisina promoveu redução de movimentos rotatórios, além de promover a restauração dos níveis de fatores inflamatórios (redução de IL-6, IL-2 e IL-1 β e TNF- α), oxidativos e de dano neuronal (demonstrado através de dados imunohistoquímicos) neste mesmo modelo.

Apesar de não existirem muitos dados correlacionando o efeito neuroprotetor da *P. alata* e espécies correlacionadas sobre a DP, acredita-se que estas plantas tenham grande potencial terapêutico sobre esta doença, atuando principalmente sobre os processos oxidativos envolvidos na DP. Para a confirmação desta hipótese, novas análises devem ser feitas, como a imunohistoquímica da SNpc para tirosina hidroxilase (TH) ou até mesmo através da técnica de Western-blot, a fim de identificar e quantificar a morte de neurônios dopaminérgicos, além de outras técnicas, como TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), para a determinação de peroxidação lipídica, indicando o possível mecanismo sobre o estresse oxidativo.

Além das avaliações comportamentais, este estudo objetivou quantificar a concentração de glutathiona reduzida (GSH) e de catalase (CAT) no estriado dos animais estudados, a fim de identificar alterações nestes sistemas antioxidantes endógenos, os quais poderiam estar associados a um possível efeito decorrente do tratamento com o EHPA.

A GSH, um tripeptídeo, é um importante constituinte do sistema antioxidante endógeno, e está presente em concentrações milimolares em grande parte das células do organismo. A GSH pode agir sozinha ou com auxílio de outras enzimas na redução de ROS como o ânion superóxido, radicais peroxilas e peroxinitritos (SMEYNE *et al.*, 2013). A literatura mostra que na DP há uma depleção da concentração GSH (CHINTA *et al.*, 2007; HAUSER; HASTINGS, 2013; JENNER, 1993; WÜLLNER *et al.*, 1996). Um estudo *post mortem* revelou um decréscimo de aproximadamente 40% da concentração de GSH, na substância negra, em pacientes com DP quando comparados a pacientes sem a doença (SIAN *et al.*, 1994). Além disto, sabe-se também que a GSH promove uma atenuação da morte neuronal induzida pela 6-OHDA (SHIMIZU *et al.*, 2002).

Apesar de tais evidências, este estudo não identificou alterações na concentração de GSH no estriado quando comparados os grupos SHAM e 6-OHDA controle, embora sejam observadas diferenças nas médias entre os grupos, quando comparadas ao grupo 6-OHDA Controle, porém, estatisticamente não houve diferenças entre os grupos devido ao elevado desvio padrão.

Este resultado pode significar ou que o mecanismo de ação do extrato não foi por regulação positiva deste sistema antioxidante endógeno, ou então, o experimento realizado não foi capaz de detectar estas alterações. Algumas limitações podem existir durante a realização da metodologia, como a temperatura de armazenamento e pH da amostra, que podem gerar a oxidação e degradação da GSH (TIPPLE; ROGERS, 2012), como também o número de amostras analisadas, que neste estudo foram de apenas 4 por grupo. Além disto, sabe-se que a concentração de GSH, tanto no tecido cerebral, como no plasma são bem baixas quando comparadas a outros tecidos, sendo esta uma limitação relacionada a sensibilidade desta metodologia (SMEYNE *et al.*, 2013; TIPPLE; ROGERS, 2012), podendo este fator ser o responsável pela não identificação das alterações esperadas.

Além a determinação da GSH no estriado também foi realizada a determinação no plasma. Esta determinação teve como objetivo avaliar se o tratamento realizado com *P. alata*, ou a lesão pela 6-OHDA, poderiam levar a alterações nos níveis de GSH no sangue periférico. Porém, nenhum dos fatores pareceu ter influência. Novamente, acredita-se que ou houve uma limitação na execução do teste ou em relação, resultante sensibilidade a determinação da GSH no plasma, e também devido ao

baixo número experimental (n=4), ou então, que a *P. alata* não teve um papel sobre os níveis deste tripeptídeo.

A catalase, uma enzima encontrada de maneira ubíqua em tecidos como fígado, rins e eritrócitos, tem como função catalisar a reação de degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio (O_2) (MAGALINGAM; RADHAKRISHNAN; HALEAGRAHARA, 2014; SINGH et al., 2008). Além de estar presente nestes tecidos, a catalase também é expressa em outros tecidos, como no SNC (MORENO; MUGNAINI; CERÙ, 1995).

Diversos estudos mostram o envolvimento da depleção deste sistema antioxidante na DP (AMBANI; VAN WOERT; MURPHY, 1975; YAKUNIN et al., 2014), e também em modelos de DP através de lesão por 6-OHDA, tanto em modelos *in vivo* (PERUMAL et al., 1989) como *in vitro* (BLUM et al., 2000; SAITO et al., 2007). Apesar disto, não foram verificadas alterações na atividade da catalase tanto nos eritrócitos como no estriado, dos animais lesionados quando comparados aos animais do grupo SHAM controle, e também dos animais tratados quando comparados ao controle.

Estes resultados podem ter sido decorrentes do processo de armazenamento dos tecidos utilizados, já que o congelamento e descongelamento das amostras podem levar a uma alteração na sua atividade (CAO et al., 2003; SHIKAMA; YAMAZAKI, 1961). Outro fator que também pode ter influenciado este resultado é o elevado desvio padrão associado ao baixo número amostral, sendo necessárias uma quantidade maior de amostras para se obter melhores conclusões. Vale lembrar, também, que este teste avalia a capacidade de neutralização do H_2O_2 pela catalase tecidual/eritrócitos e que, portanto, ele não avalia a expressão ou concentração desta enzima.

Outro parâmetro avaliado com o intuito de identificar possíveis alterações fisiológicas induzidas pelo tratamento com o EHPA (podendo indicar uma possível toxicidade do extrato) ou pela 6-OHDA foi a avaliação dos indicadores hematológicos e bioquímicos. Nesta avaliação, não houve influência do tratamento ou do modelo utilizado na maior parte dos parâmetros. Os únicos fatores em que foi observada uma diferença estatística dos grupos lesionados (6-OHDA controle, 100, 200 e 300) quando comparados ao controle foram o número total de hemácias e hematócrito (que tem relação ao número total de hemácias).

Esta redução da hematopoiese decorrente da administração de 6-OHDA já foi documentada na literatura. Hritcu (2008) também mostrou em seu estudo que após a

administração bilateral de 6-OHDA na SNpc, houve uma redução da hematopoiese e leucopoiese nestes animais. Alguns autores acreditam que a regulação da hematopoiese esteja relacionada não somente com as células do estroma medular e citocinas hematopoiéticas, mas também com o sistema nervoso central, através de fatores neuroendócrinos e catecolaminas (BAZAN, 1991; HRITCU, 2008). No estudo de Penn e colaboradores (2010), ratos lesionados com 6-OHDA apresentaram inibição de colônias eritróides progenitoras, retiradas do fêmur. Este efeito foi inibido através da administração exógena de noradrenalina.

Apesar disto, há a necessidade de maiores evidências para determinar a influência da 6-OHDA neste processo e, sobretudo, sobre a correlação entre as catecolaminas e a modulação da hematopoiese.

7. CONCLUSÕES

No presente estudo podemos observar que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora alata* reverteu os prejuízos cognitivos, efeito tipo ansioso e tipo depressivo causados pela infusão intracerebral de 6-OHDA, um modelo animal de doença de Parkinson, sugerindo que o EHPA tenha um efeito neuroprotetor.

8. REFERÊNCIAS

- ABBASI, E. et al. Neuroprotective Effects of Vitexin, a Flavonoid, on Pentylentetrazole-Induced Seizure in Rats. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 80, n. 2, p. 274–278, 1 ago. 2012.
- AMBANI, L. M.; VAN WOERT, M. H.; MURPHY, S. Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. **Archives of neurology**, v. 32, n. 2, p. 114–8, fev. 1975.
- AMBROSI, G.; CERRI, S.; BLANDINI, F. A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 121, n. 8, p. 849–859, 1 ago. 2014.
- ANDRES-MATEOS, E. et al. DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 37, p. 14807–14812, 11 set. 2007.
- APPEL, K. et al. Modulation of the γ -aminobutyric acid (GABA) system by *Passiflora incarnata* L. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 6, p. 838–843, jun. 2011.
- AYRES, A. S. F. S. J. et al. Monoaminergic neurotransmission is mediating the antidepressant-like effects of *Passiflora edulis* Sims fo. *edulis*. **Neuroscience Letters**, v. 660, p. 79–85, nov. 2017.
- BARBOSA, P. R. et al. The Aqueous Extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* Reduce Anxiety-Related Behaviors Without Affecting Memory Process in Rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 2, p. 282–288, 2008a.
- BARBOSA, P. R. et al. The Aqueous Extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* Reduce Anxiety-Related Behaviors Without Affecting Memory Process in Rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 2, p. 282–288, jun. 2008b.
- BARONE, P. Neurotransmission in Parkinson's disease: beyond dopamine. **European Journal of Neurology**, v. 17, n. 3, p. 364–376, mar. 2010.
- BAZAN, J. F. Neurotrophic cytokines in the hematopoietic fold. **Neuron**, v. 7, n. 2, p. 197–208, ago. 1991.
- BEER, D. DE et al. **South African journal of enology and viticulture**. [s.l.] SASEV, 2017. v. 23
- BENSAID, M. et al. Role of pedunculopontine cholinergic neurons in the vulnerability of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 275, p. 209–219, 2016.
- BETARBET, R. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1301–1306, 2000.
- BIESCHKE, J. et al. EGCG remodels mature α -synuclein and amyloid- β fibrils and reduces cellular toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 17, p. 7710–7715, 27 abr. 2010.
- BIRK, C. D. et al. TLC Fingerprint of Flavonoids and Saponins from *Passiflora* Species. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 14, p. 2285–2291, 6 ago. 2005.
- BŁASZCZYK, J. W. Parkinson's Disease and Neurodegeneration: GABA-Collapse Hypothesis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. 269, p. 1–8, 2016.

- BLUM, D. et al. Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. **Neuroscience Letters**, v. 283, n. 3, p. 193–196, abr. 2000.
- BLUM, D. et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 65, n. 2, p. 135–172, out. 2001.
- BOEIRA, J. M. et al. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 2, p. 526–532, 2010.
- BONIFATI, V. et al. Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: Frequency, genotypes, and phenotypes. **Neurology**, v. 65, n. 1, p. 87–95, 12 jul. 2005.
- BOSE, A.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 216–231, out. 2016.
- BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 197–211, mar. 2003.
- BRAGA, A. et al. Repeated administration of an aqueous spray-dried extract of the leaves of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae) inhibits body weight gain without altering mice behavior. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 59–66, 2013.
- BRANCHI, I. et al. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: Investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 9, p. 2050–2061, jul. 2008.
- BRANCHI, I. et al. Striatal 6-OHDA lesion in mice: Investigating early neurochemical changes underlying Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 1, p. 137–143, mar. 2010.
- BRANDÃO, L. E. M. et al. *Passiflora cincinnata* Extract Delays the Development of Motor Signs and Prevents Dopaminergic Loss in a Mice Model of Parkinson's Disease. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–11, 2017.
- BRAUNE, A.; BLAUT, M. Intestinal bacterium *Eubacterium cellulosolvens* deglycosylates flavonoid C- and O-glucosides. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 22, p. 8151–3, 15 nov. 2012.
- BRUNDIN, P.; MELKI, R. Prying into the Prion Hypothesis for Parkinson's Disease. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 37, n. 41, p. 9808–9818, 11 out. 2017.
- BURBULLA, L. F. et al. Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. **Science**, v. 357, n. 6357, p. 1255–1261, 2017.
- CAN, Ö. D.; DEMİR ÖZKAY, Ü.; ÜÇEL, U. İ. Anti-depressant-like effect of vitexin in BALB/c mice and evidence for the involvement of monoaminergic mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, n. 1–3, p. 250–257, jan. 2013.
- CAO, E. et al. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 6, p. 684–690, 20 jun. 2003.
- CARVALHO, M. M. et al. Behavioral characterization of the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. **Molecular Neurodegeneration**, v. 8, n. 4, p. 1–11, 2013.
- CHENG, H.-C.; ULANE, C. M.; BURKE, R. E. Clinical Progression in Parkinson's

Disease and the Neurobiology of Axons. **Annals of Neurology**, v. 67, n. 6, p. 715–725, 2010.

CHINTA, S. J. et al. Inducible Alterations of Glutathione Levels in Adult Dopaminergic Midbrain Neurons Result in Nigrostriatal Degeneration. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 51, p. 13997–14006, 19 dez. 2007.

COLOMEU, T. C. et al. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). **International Immunopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 106–115, 2014.

CONNOLLY, B. S.; LANG, A. E. Pharmacological Treatment of Parkinson Disease. **JAMA**, v. 311, n. 16, p. 1670, 23 abr. 2014.

CONSONI, F. T.; VITAL, M. A. B. F.; ANDREATINI, R. Dual monoamine modulation for the antidepressant-like effect of lamotrigine in the modified forced swimming test. **European Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 6, p. 451–458, 2006.

CONTRERAS-GUZMAN, E.; STRONG, F. C. Determination of total tocopherols in grains, grain products, and commercial oils, with only slight saponification, and by a new reaction with cupric ion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 1109–1112, nov. 1982.

DANTZER, R. et al. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology**, v. 91, n. 3, p. 363–8, 1987.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889–909, 2003a.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron**, v. 39, p. 889–909, 2003b.

DAVIS, G. C. et al. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. **Psychiatry Research**, v. 1, n. 3, p. 249–254, dez. 1979.

DE-PARIS, F. et al. Pharmacochemical Study of Aqueous Extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 5–8, 2002.

DEAS, E. et al. Alpha-Synuclein Oligomers Interact with Metal Ions to Induce Oxidative Stress and Neuronal Death in Parkinson's Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 24, n. 7, p. 376–391, mar. 2016.

DEMAAGD, G.; PHILIP, A. Parkinson's Disease and Its Management. **P&T Pharmacy and Therapeutics Journal**, v. 40, n. 8, p. 504–511, 2015.

DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 66–72, set. 1995.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: A review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1–23, 2004.

DOVERO, S.; GROSS, C.; BEZARD, E. Unexpected toxicity of very low dose MPTP in mice: A clue to the etiology of Parkinson's disease? **Synapse**, v. 70, n. 2, p. 49–51, 1 fev. 2016.

DOVICH, S. S.; LAJOLO, M. Flavonoids and their relationship to diseases of the Central Nervous System. **J. Brazilian Soc. Food Nutr**, v. 36, n. 2, p. 123–135, 2011.

DOYAMA, J. T. et al. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 371–374, 15 jan. 2005.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1 maio 1959.

ELSAS, S. M. et al. *Passiflora incarnata* L. (Passionflower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons in vitro, and show anxiogenic and anticonvulsant effects in vivo, varying with extraction method. **Phytomedicine**, v. 17, n. 12, p. 940–949, 2010.

ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. **Behavioural Brain Research**, v. 215, n. 2, p. 244–254, dez. 2010.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, nov. 1988.

FAHN, S. Description of Parkinson ' s Disease as a Clinical Syndrome. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 14, n. 991, p. 1–14, 2003.

FARMACOPÉIA, A. N. D. V. S. **Farmacopeia Brasileira**. [s.l.: s.n.]. v. 1

FENNER, R. **Avaliação do efeito hipnótico/sedativo e ansiolítico de um extrato seco nebulizado de passiflora alata curtis (passifloraceae)**. Porto Alegre: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/8569>>. Acesso em: 30 out. 2017.

FIGUEIREDO, D. et al. Aqueous leaf extract of *Passiflora alata* Curtis promotes antioxidant and anti-inflammatory effects and consequently preservation of NOD mice beta cells (non-obese diabetic). **International Immunopharmacology**, v. 35, p. 127–136, 2016a.

FIGUEIREDO, D. A. F. et al. Effects of bark flour of *Passiflora edulis* on food intake, body weight and behavioral response of rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 595–600, 2016b.

FOLLMER, C.; NETTO, H. J. C. B. Fármacos multifuncionais: Monoamina oxidase e a-sinucleína como alvos terapêuticos na doença de Parkinson. **Quim. Nova**, v. 36, n. 2, p. 306–313, 2013.

FOYET, H. S. et al. Methanolic extract of *Hibiscus asper* leaves improves spatial memory deficits in the 6-hydroxydopamine-lesion rodent model of Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 773–779, jan. 2011.

FRANCO, R. et al. **Oxidative stress and redox signalling in Parkinson's disease**. 1. ed. London: Royal Society of Chemistry (Great Britain), 2017.

GLINKA, Y. Y.; YOUDIM, M. B. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. **European journal of pharmacology**, v. 292, n. 3–4, p. 329–32, 16 mar. 1995.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, abr. 2007.

GOES, A. T. R. et al. Protective role of chrysin on 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration a mouse model of Parkinson's disease: Involvement of

neuroinflammation and neurotrophins. **Chemico-Biological Interactions**, 2017.

GOETZ, C. G. Charcot on Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 1, n. 1, p. 27–32, 1986.

GOETZ, C. G. Charcot, hysteria, and simulated disorders. In: **Handbook of Clinical Neurology**. 3rd. ed. Chicago IL: [s.n.]. p. 11–23.

GREESON, J. M.; SANFORD, B.; MONTI, D. A. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. **Psychopharmacology**, v. 153, n. 4, p. 402–14, fev. 2001.

GUIMARÃES, C. C. et al. The glycosylated flavonoids vitexin, isovitexin, and quercetrin isolated from *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae) leaves protect PC12 cells against amyloid- β 25-35 peptide-induced toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 86, p. 88–94, dez. 2015.

HACKE, A. C. M. **Determinação da atividade antioxidante e composição química dos extratos de *Cymbopogon citratus***. Ponta Grossa: [s.n.].

HANEY, M. J. et al. Specific Transfection of Inflamed Brain by Macrophages: A New Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

HAUSER, D. N.; HASTINGS, T. G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. **Neurobiology of Disease**, v. 51, p. 35–42, mar. 2013.

HE, M. et al. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**, v. 115, p. 74–85, dez. 2016.

HEINZ, S. et al. Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. **Nature Publishing Group**, 2017.

HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 4, p. 382–397, abr. 2009.

HIRSCH, E. C.; JENNER, P.; PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 28, n. 1, p. 24–30, jan. 2013.

HIRSCH, L. et al. The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Neuroepidemiology**, v. 46, n. 4, p. 292–300, 2016.

HOANG, Q. Q. Pathway for Parkinson disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 7, p. 2402–3, 2014.

HRITCU, L. Hematological disorders in 6-hydroxydopamine induced rat model of Parkinson's disease. **Turkish Journal of Hematology**, v. 25, p. 140–144, 2008.

INGALE, S. P.; KASTURE, S. B. Antioxidant and antiparkinsonian activity of *Passiflora incarnata* leaves. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 14, n. 3, p. 231–236, 2014.

JAFARPOOR, N. et al. Evaluation of antidepressant-like effect of hydroalcoholic extract of *Passiflora incarnata* in animal models of depression in male mice. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 41–45, 2014.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 79, p. 368–376, 2008.

JAWNA-ZBOIŃSKA, K. et al. *Passiflora incarnata* L. Improves Spatial Memory, Reduces Stress, and Affects Neurotransmission in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 5, p. 781–789, 1 maio 2016.

JENNER, P. Altered mitochondrial function, iron metabolism and glutathione levels in Parkinson's disease. **Acta neurologica Scandinavica. Supplementum**, v. 146, p. 6–13, 1993.

KALIA, L. V.; LANG, A. E.; SHULMAN, G. Parkinson ' s disease. **The Lancet**, v. 6736, n. 14, p. 1–17, 2015.

KARUPPAGOUNDER, S. S. et al. Quercetin up-regulates mitochondrial complex-I activity to protect against programmed cell death in rotenone model of Parkinson's disease in rats. **Neuroscience**, v. 236, p. 136–148, abr. 2013.

KISH, S. J. et al. Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. **Brain**, v. 131, p. 120–131, 2008.

KITADA, T. et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**, v. 392, n. 6676, p. 605–608, 9 abr. 1998.

KLEIN, N. et al. Assessment of sedative effects of passiflora edulis f. flavicarpa and passiflora alata extracts in mice, measured by telemetry. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 5, p. 706–713, 2014.

KOROS, C.; SIMITSIS, A.; STEFANIS, L. Genetics of Parkinson's Disease. **International Review of Neurobiology**, p. 197–231, 2017.

KOSALEC, I. et al. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. **Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)**, v. 54, n. 1, p. 65–72, mar. 2004.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–16, 2013.

KUNIKOWSKA, G.; JENNER, P. 6-Hydroxydopamine-lesioning of the nigrostriatal pathway in rats alters basal ganglia mRNA for copper, zinc- and manganese-superoxide dismutase, but not glutathione peroxidase. **Brain Research**, v. 922, n. 1, p. 51–64, 13 dez. 2001.

KUPSCH, A. et al. 6-Hydroxydopamine impairs mitochondrial function in the rat model of Parkinson's disease: respirometric, histological, and behavioral analyses. **Journal of Neural Transmission**, v. 121, n. 10, p. 1245–1257, 14 out. 2014.

KUTER, K. et al. Toxic influence of subchronic paraquat administration on dopaminergic neurons in rats. **Brain Research**, v. 1155, p. 196–207, jun. 2007.

LAETITIA, P.; CATHERINE, B. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 28 fev. 2003.

LANGSTON, J. W.; LANGSTON, E. B.; IRWIN, I. MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. **Acta neurologica Scandinavica. Supplementum**, v. 100, p. 49–54, 1984.

LAURENCIN, C. et al. Initial treatment of Parkinson's disease in 2016: The 2000 consensus conference revisited. **Revue Neurologique**, v. 172, n. 8–9, p. 512–523, ago. 2016.

LENKA, A.; PADMAKUMAR, C.; PAL, P. K. Treatment of Older Parkinson's Disease.

In: [s.l: s.n.].

LILL, C. M. Genetics of Parkinson's disease. **Molecular and Cellular Probes**, v. 30, n. 6, p. 386–396, dez. 2016.

LITIM, N.; MORISSETTE, M.; DI PAOLO, T. Metabotropic glutamate receptors as therapeutic targets in Parkinson's disease: An update from the last 5 years of research. **Neuropharmacology**, v. 115, p. 166–179, mar. 2017.

LUGATO, D. et al. Determination of antioxidant activity and phenolic content of extracts from in vivo plants and in vitro materials of *Passiflora alata* Curtis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 2, p. 339–346, 2014a.

LUGATO, D. et al. Determination of antioxidant activity and phenolic content of extracts from in vivo plants and in vitro materials of *Passiflora alata* Curtis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 2, p. 339–346, 2014b.

MADOGGIO, F. A. **Investigação fitoquímica das partes aéreas de *Passiflora alata* Curtis**. Florianópolis: [s.n.]. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/95525/294798.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 28 out. 2017.

MAGALINGAM, K. B.; RADHAKRISHNAN, A.; HALEAGRAHARA, N. Protective effects of flavonol isoquercitrin, against 6-hydroxy dopamine (6-OHDA) -induced toxicity in PC12 cells. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 49, p. 1–8, 2014.

MANOCHA, G. D. et al. Defining the contribution of neuroinflammation to Parkinson's disease in humanized immune system mice. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, n. 1, p. 17, 14 dez. 2017.

MASSANO, J. Parkinson's disease: a clinical update. **Acta médica portuguesa**, v. 24 Suppl 4, p. 827–34, 2011.

MASTEIKOVA, R. et al. Antiradical activities of the extract of *Passiflora incarnata*. **Acta Polonae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 65, n. 5, p. 577–583, 2008.

MAZZIO, E. A.; REAMS, R. R.; SOLIMAN, K. F. A. The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic effects of 6-hydroxydopamine in vitro. **Brain Research**, v. 1004, n. 1–2, p. 29–44, 9 abr. 2004.

MERCER, L. D. et al. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 2, p. 339–345, jan. 2005.

MISHRA, K.; OHJA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036–1043, 15 fev. 2012.

MORAES, M. DE L. L.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Supercritical fluid extraction of glycosylated flavonoids from *Passiflora* leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 5, p. 257–260, 1 set. 1997.

MORENO, S.; MUGNAINI, E.; CERÙ, M. P. Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 43, n. 12, p. 1253–67, 4 dez. 1995.

MOTHERWELL, M. S.; ZUO, L. The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. **Gene**, v. 532, n. 1, p. 18–23, dez.

2013.

MÜLLER, S. D. **Determinação de Alcalóides e de Flavonóides através de CLAE e UV de extratos de Passiflora alata Curtis, Passifloraceae - Maracujá-Doce.** Itajaí: [s.n.]. Disponível em: <[https://siaiap39.univali.br/repositorio/bitstream/repositorio/1471/1/Simony Davet Muller.pdf](https://siaiap39.univali.br/repositorio/bitstream/repositorio/1471/1/Simony%20Davet%20Muller.pdf)>. Acesso em: 14 nov. 2017.

NASSIRI-ASL, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTANI, F. Anticonvulsant effects of aerial parts of *Passiflora incarnata* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 1, p. 26, 8 dez. 2007.

NATÁLIA ROCHA SUCUPIRA, C. J. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–9, 2012.

NETTO, R. et al. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares na bioprodução de fenóis totais e no crescimento de *Passiflora alata* Curtis. **Rev. Bras. Pl. Med. Campinas**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2014.

NIRANJAN, R. The Role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of parkinson's disease: Focus on astrocytes. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n. 1, p. 28–38, 2014.

NORIEGA, P. et al. *Passiflora alata* Curtis: a Brazilian medicinal plant. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 10, n. 5, p. 398–413, 2011.

OGA, S. et al. Pharmacological Trials of Crude Extract of *Passiflora alata*. **Planta Medica**, v. 50, n. 4, p. 303–306, 26 ago. 1984.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph•: Estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.

OLSZOWY, M.; DAWIDOWICZ, A. L. Is it possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compounds? **Chemical Papers**, p. 1–8, 2017.

OTOBONE, F. J. et al. Anxiolytic and sedative effects of a combined extract of *Passiflora alata* Dryander and *Valeriana officinalis* L. in rats. **Acta Scientiarum - Health Sciences**, v. 27, n. 2, p. 145–150, 2005a.

OTOBONE, F. J. et al. Anxiolytic and sedative effects of a combined extract of *Passiflora alata* Dryander and *Valeriana officinalis* L. in rats. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 27, n. 2, 2005b.

PARKINSON, J. An Essay on the Shaking Palsy. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 14, n. 2, p. 223–236, 2002.

PAXINOS, G. et al. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 13, n. 2, p. 139–143, 1985.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 14, n. 4, p. 586–591, 2012.

PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as

a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, ago. 1985.

PENN, A. et al. Dose-Response Relationship between Norepinephrine and Erythropoiesis: Evidence for a Critical Threshold. **Journal of Surgical Research**, v. 163, n. 2, p. e85–e90, out. 2010.

PEREIRA, C. A. M. et al. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 4, p. 241–248, jul. 2004.

PERUMAL, A. S. et al. Regional effects of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on free radical scavengers in rat brain. **Brain Research**, v. 504, n. 1, p. 139–141, dez. 1989.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v. 177, n. 3, p. 245–255, 18 jan. 2005.

PETRY, R. D.; SOUZA, K. C. B.; ORTEGA, G. G. Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcoólicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, n. 1/2, p. 7–10, 1998.

PHARMACOPOEIA, A. H. *Passiflora incarnata* L. In: UPTON, R. (Ed.). **American Herbal Pharmacopoeia**. [s.l.] CRC Press, 2011. p. 513–517.

POCHAPSKI, J. A. **Avaliação do efeito comportamental e neuroprotetor do ômega-3 administrado durante o período pré-natal em um modelo animal da doença de Parkinson**. Ponta Grossa: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=411990&search=parrana%7Cponta-grossa>>.

POLYMEROPOULOS, M. H. et al. Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. **Science**, v. 276, n. 5321, p. 2045–2047, 27 jun. 1997.

PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379–391, fev. 1978.

PREDIGER, R. et al. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 202, n. 2, p. 391–403, dez. 2006.

PREDIGER, R. D. ; TAKAHASHI, R. N. Ethanol improves short-term social memory in rats. Involvement of opioid and muscarinic receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 462, n. 1–3, p. 115–123, fev. 2003.

PREDIGER, R. D. S. et al. Anxiety in Parkinson's disease: A critical review of experimental and clinical studies. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 115–124, jan. 2012.

PRICKAERTS, J. et al. Effects of two selective phosphodiesterase type 5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, on object recognition memory and hippocampal cyclic GMP levels in the rat. **Neuroscience**, v. 113, n. 2, p. 351–361, ago. 2002.

PRINGSHEIM, T. et al. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**, v. 29, n. 13, p. 1583–1590, 2014.

PROVENSI, G. et al. Participation of GABA-benzodiazepine Receptor Complex in the

Anxiolytic Effect of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Latin American Journal of Pharmacy Am. J. Pharm**, v. 27, n. 6, p. 845–51, 2008.

RAJAGOPAL, L. et al. The Novel Object Recognition Test in Rodents in Relation to Cognitive Impairment in Schizophrenia. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, p. 5104–5114, 2014.

RAMAIYA, S. D.; BUJANG, J. S.; ZAKARIA, M. H. Assessment of total phenolic, antioxidant, and antibacterial activities of passiflora species. **TheScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 167309, 2014.

RANI, V. et al. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sciences**, v. 148, p. 183–193, 1 mar. 2016.

RE, R. et al. Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231–1237, 1999.

RECZEK, C. R. et al. A CRISPR screen identifies a pathway required for paraquat-induced cell death. **Nature Chemical Biology**, 23 out. 2017.

REGINATTO, F. H. et al. Assay of quadranguloside, the major saponin of leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 3, p. 195–197, maio 2004.

REGLODI, D. et al. Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease: Role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. **Progress in Neurobiology**, v. 155, p. 120–148, ago. 2017.

RODRIGUEZ-PALLARES, J. et al. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 0, n. 0, p. 070615193023005–???, 15 jun. 2007.

ROMANINI, C. V. et al. Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato fluido e fração aquosa de folhas de *Passiflora alata* Curtis em camundongos. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 28, n. 2, 2006.

ROMMELFANGER, K. S.; WEINSHENKER, D. Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 2, p. 177–190, jul. 2007.

ROOSEN, D. A.; COOKSON, M. R. LRRK2 at the interface of autophagosomes, endosomes and lysosomes. **Molecular Neurodegeneration**, v. 11, n. 1, p. 73, 7 dez. 2016.

ROSS, G. W. et al. Parkinsonian signs and substantia nigra neuron density in decedents elders without PD. **Annals of Neurology**, v. 56, n. 4, p. 532–539, out. 2004.

RUDNICKI, M. et al. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 719–724, jan. 2007a.

RUDNICKI, M. et al. Protective effects of *Passiflora alata* extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 4, p. 656–661, abr. 2007b.

SAITO, Y. et al. Molecular mechanisms of 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in PC12 cells: Involvement of hydrogen peroxide-dependent and -independent action.

Free Radical Biology and Medicine, v. 42, n. 5, p. 675–685, 1 mar. 2007.

SANTIAGO, R. M. et al. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 1104–1114, 16 ago. 2010.

SANTIAGO, R. M. et al. The nonsteroidal antiinflammatory drug piroxicam reverses the onset of depressive-like behavior in 6-OHDA animal model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 300, p. 246–253, ago. 2015.

SANTOS, A. G. **Perfil de ação do cetoprofeno, associado ao flavonóide rutina, frente ao estresse oxidativo**. Ponta Grossa: [s.n.].

SANTOS, K. C. et al. Passiflora actinia hydroalcoholic extract and its major constituent, isovitexin, are neuroprotective against glutamate-induced cell damage in mice hippocampal slices. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 2, p. 282–291, 2016.

SANTOSH, P. et al. Antidepressant activity of methanolic extract of *Passiflora foetida* leaves in mice. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 112–115, 2011.

SARAVANAN, S.; ARUNACHALAM, K.; PARIMELAZHAGAN, T. Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from *Passiflora subpeltata* leaves – A promising species of *Passiflora*. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 272–280, 1 mar. 2014.

SARRAFCHI, A. et al. Oxidative Stress and Parkinson's Disease: New Hopes in Treatment with Herbal Antioxidants. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 2, p. 238–246, 2016.

SCHAMNE, M. G. et al. Efeito da sinvastatina no teste do comportamento rotatório após desafio com apomorfina em um modelo animal da doença de parkinson. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v. 9, n. 3, p. 62–68, 2014.

SCHAPIRA, A. H.; JENNER, P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 26, n. 6, p. 1049–1055, 2011.

SCHAPIRA, A. H. V.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 435–450, 8 jun. 2017.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192–205, 1968.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757–781, out. 2015.

SHIKAMA, K.; YAMAZAKI, T. Denaturation of Catalase by Freezing and Thawing. **Nature**, v. 190, n. 4770, p. 83–84, 1 abr. 1961.

SHIMIZU, E. et al. Roles of endogenous glutathione levels on 6-hydroxydopamine-induced apoptotic neuronal cell death in human neuroblastoma SK-N-SH cells. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 3, p. 434–443, set. 2002.

SIAN, J. et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. **Annals of Neurology**, v. 36, n.

3, p. 348–355, set. 1994.

SINGH, B.; SINGH, D.; GOEL, R. K. Dual protective effect of *Passiflora incarnata* in epilepsy and associated post-ictal depression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 273–279, 6 jan. 2012.

SINGH, R. et al. Comparative study of catalase-peroxidases (KatGs). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 471, n. 2, p. 207–214, 15 mar. 2008.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1 jan. 1999.

SLOMP JUNIOR, H. et al. The Combination of *Passiflora alata* and *Valeriana officinalis* on Memory Tasks in Mice: Comparison with Diazepam. **Arch. Biol. Technol.** v, v. 5353, n. 6, p. 1343–50, 2010.

SMEYNE, M. et al. Glutathione Metabolism and Parkinson's Disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, n. 13–25, p. 1–32, 2013.

STARR, M. S. Glutamate/dopamine D1/D2 balance in the basal ganglia and its relevance to Parkinson' disease. **Synapse**, v. 19, n. 4, p. 264–293, abr. 1995.

STOLZENBERG, E. et al. A Role for Neuronal Alpha-Synuclein in Gastrointestinal Immunity Neuronal α S in Gastrointestinal Immunity. **J Innate Immun**, v. 99, 2017.

TADAIESKY, M. T. et al. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 830–840, out. 2008.

TAL, Y. et al. The neuroprotective properties of a novel variety of passion fruit. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 359–369, 2016.

TAYLOR, J. M.; MAIN, B. S.; CRACK, P. J. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 5, p. 803–819, abr. 2013.

THOR, D. H.; HOLLOWAY, W. R. Social memory of the male laboratory rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 96, n. 6, p. 1000–1006, 1982.

TIMPKA, J. Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Movement Disorders Curricula**, p. 95–101, 2017.

TIPPLE, T. E.; ROGERS, L. K. Methods for the Determination of Plasma or Tissue Glutathione Levels. **Methods Mol Biol**, v. 889, p. 315–324, 2012.

TITOVA, N.; JENNER, P.; CHAUDHURI, K. R. The Future of Parkinson's Treatment – Personalised and Precision Medicine. **European Neurological Review**, v. 12, n. 1, p. 15–16, 2017.

TIWARI, S. et al. A pharmacological review: *Passiflora* species. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 3, n. 1, p. 10–18, 2016.

TJALKENS, R. B.; STREIFEL, K. M.; MORENO, J. A. Neuroinflammation and Oxidative Stress in Models of Parkinson's Disease and Protein-Misfolding Disorders. In: **Oxidative Stress and Redox Signalling in Parkinson's Disease**. [s.l: s.n.]. p. 184–209.

TONG, C. L.; LIU, X. D. Pharmacokinetics of vitexin in rats. **Journal of China Pharmaceutical University**, v. 38, n. 1, p. 65–68, 2007.

- TONG, C.; WU, X. Determination of plasma protein binding rate of vitexin. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 15 jul. 2012.
- UVERSKY, V. N. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. **Cell and Tissue Research**, v. 318, n. 1, p. 225–241, 16 out. 2004.
- VARGAS, A. J. et al. Passiflora alata and Passiflora edulis spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, n. 2, p. 112–119, fev. 2007.
- VASIĆ, S. M. et al. Biological Activities of extracts from cultivated Granadilla Passiflora alata. **EXCLI Journal**, v. 11, p. 208–218, 2012.
- VECCHIA, D. D. et al. Effects of Hypericum perforatum on turning behavior in an animal model of Parkinson's disease. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 111–115, mar. 2015.
- VEDAGIRI, A.; THANGARAJAN, S. Mitigating effect of chrysin loaded solid lipid nanoparticles against Amyloid β 25–35 induced oxidative stress in rat hippocampal region: An efficient formulation approach for Alzheimer's disease. **Neuropeptides**, v. 58, p. 111–125, 2016.
- WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 332–328, 2007.
- WALSH, K.; BENNETT, G. Parkinson's disease and anxiety. **Postgrad Med J**, v. 77, p. 89–93, 2001.
- WANG, Q.; LIU, Y.; ZHOU, J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. **Translational Neurodegeneration**, v. 4, n. 1, p. 19, 12 dez. 2015.
- WANG, X. et al. Effects of Vitexin on the Pharmacokinetics and mRNA Expression of CYP Isozymes in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 3, p. 366–372, mar. 2015.
- WASICKY, A. et al. Evaluation of gastroprotective activity of Passiflora alata. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 407–412, 1 jul. 2015.
- WATTANATHORN, J. et al. Neuroprotective Effect against Cerebral Ischemia of Passiflora foetida. **American Journal of Applied Sciences**, v. 9, n. 4, p. 600–604, 2012.
- WONG, Y. et al. Influence of Extraction Conditions on Antioxidant properties of Passion Fruit (Passiflora edulis) peel. **Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.**, v. 13, n. 3, p. 257–265, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World report on ageing and health**. 2015. ed. Luxembourg: World Health Organization, 2015.
- WOSCH, L. et al. Comparative study of Passiflora taxa leaves: I. A morpho-anatomic profile. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 4, p. 328–343, 2015.
- WOSCH, L. et al. Comparative study of Passiflora taxa leaves: li. A chromatographic profile. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 1, p. 40–49, 2017.
- WÜLLNER, U. et al. Glutathione depletion potentiates MPTP and MPP+ toxicity in nigral dopaminergic neurones. **Neuroreport**, v. 7, n. 4, p. 921–3, 22 mar. 1996.
- XIE, J.; SCHAICH, K. M. Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free

Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 4251–4260, 14 maio 2014.

XU, F. Q. et al. Protective effects of cycloartane triterpenoides from *Passiflora edulis* Sims against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cell. **Fitoterapia**, v. 115, p. 1, 2016.

XUE, H.-F. et al. Hepatic, gastric, and intestinal first-pass effects of vitexin in rats. 2014.

YAKUNIN, E. et al. The regulation of catalase activity by PPAR γ is affected by α -synuclein. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 1, n. 3, p. 145–159, 2014.

YAN, M. H.; WANG, X.; ZHU, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 90–101, set. 2013.

YE, Z. et al. Selective serotonin reuptake inhibition modulates response inhibition in Parkinson's disease. 2017.

YOUDIM, K. A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Flavonoids and the brain: interactions at the blood–brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 11, p. 1683–1693, 1 dez. 2004.

ZHAO, H. et al. Long-term ginsenoside consumption prevents memory loss in aged SAMP8 mice by decreasing oxidative stress and up-regulating the plasticity-related proteins in hippocampus. **Brain Research**, v. 1256, p. 111–122, fev. 2009.

ZIMCIKOVA, E. et al. Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: Are the effects on mood and behavior detectable in open-field test? **Seizure**, v. 52, p. 35–40, nov. 2017.

ZUCCA, F. A. et al. Neuromelanin of the human substantia nigra: An update. **Neurotoxicity Research**, v. 25, n. 1, p. 13–23, 2014.

ZUO, L.; MOTHERWELL, M. S. The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. **Gene**, v. 532, n. 1, p. 18–23, dez. 2013.