



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

EFEITO DE *Plathymenia reticulata* SOBRE A TOXICIDADE INDUZIDA POR
METILMERCÚRIO EM RATOS

JULIANA GAMA DE ALMEIDA

Santarém – Pará
Novembro - 2015

JULIANA GAMA DE ALMEIDA

EFEITO DE *Plathymenia reticulata* SOBRE A TOXICIDADE INDUZIDA POR
METILMERCÚRIO, EM RATOS

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira

Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Oeste do Pará – UFOPA como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Biociências junto ao
Programa de Pós-graduação *Scritu Sensu*
Biociências

Santarém – Pará
Novembro – 2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFOPA

A447e Almeida, Juliana Gama de
Efeito de *Plathymenia reticulada* sobre a toxicidade induzida por metilmercúrio, em ratos / Juliana Gama de Almeida. – Santarém, 2015.
78 f. : il.

Orientador Ricardo Bezerra de Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós-Graduação em Biociências. Santarém, 2015.

1. Mercúrio - Toxicologia. 2. Ratos – Efeitos de metais pesados. I. Oliveira, Ricardo Bezerra, *orient.* II. Título.

CDD: 23.ed. 615.92

DEDICATÓRIA

Inteiramente dedicado à minha família. Meus pais Ana e Washington e minha irmã Luciana.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. **Ricardo Bezerra**, pelo conhecimento repassado e infindável paciência durante a execução e correção do trabalho

À **Sandra Sarrazin** pelo apoio, atenção e preocupação com a qualidade e execução dos experimentos e escrita do trabalho.

À minha mãe **Ana**, meu pai **Whashington** e minha irmã **Luciana** pelo apoio integral em minha casa.

À Minha tia-madrinha **Selma Almeida**, meu tio **Francisco Martins** e minha tia **Sheyla Gama** por sempre acreditarem em minha capacidade

Às minhas avós **Flor Almeida e Ruth Gama** pela sabedoria e tranquilidade repassadas.

Às minhas amigas-irmãs **May Iwama e Fabrícia Alves** que, mesmo distantes, se fizeram presentes em demonstrar amor, carinho e amizade.

Ao meus amigos **Átila Barros, Athos Barros e Catarina Magalhães** por me acolherem como segunda família e sempre torcerem e incentivarem a minha caminhada

A todas da unidade experimental do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental-LabBBEx: **Poliane Lopes, Adriele Serra, Amanda Azevedo, Meive Freire** pelo companheirismo e alegria do convívio no Biotério e à toda a **Família LabBBex**.

À dupla de experimento e amiga inseparável **Thuanny Castro** por ter dividido tarefas, funções e preocupações no andamento da pesquisa, experimentos e escrita do trabalho, sempre prestativa e companheira. Obrigada!

À **Wânia Cristina** pelas palavras de conforto e de incentivo, e **Ana Paula Assunção** sempre contribuindo muito como veteranas, a experiência nos experimentos e na pesquisa.

Às colegas e amigos da turma de 2013 do Programa de Pós Graduação em Biociências da UFOPA: **Beatriz Viana, Bárbara Iansan, Amanda Azevedo, Helen Soares, Daliane Marinho, Andrea Nunes, Giovana Gilbert, Brena Vinholte, Suelen Ricarte, Mônica, José Júnior, Juliana Machado e Lúcio Tadeu** por dividirem os momentos de aprendizado nas disciplinas, compartilharem conhecimento cada um em suas áreas e sobretudo superarmos juntos as dificuldades de ser uma primeira turma de mestrado em Biociências.

Aos meus amigos da Universidade do Estado do Pará: **Caroline Figueira, Arthur Silva, Camilla Daniella, Vanessa Farias, Igo Feitosa e Sofia Dosares** por dividirem momentos de alegria e tornarem a caminhada mais agradável.

Aos meus amigos inspiradores do Centro Mei-Mei, em especial **Cid Tenório, Giane Naim, Daniel Calçado e Dona Luiza**, por serem responsáveis pelas ondas de calma quando foi necessário além das inúmeras lições de sabedoria que aprendi observando suas falas.

Aos meus professores de graduação da Universidade do Estado do Pará: **André Cabral, Rodrigo Ferreira, Silvânia Takanashi, Alexandre Oliveira, Luís Fernando Gouveia**,

Moacir Boreli e **Kalysta Borges**, por servirem de inspiração para ingressar na pós-graduação e serem exemplos de dedicação aos estudos e à pesquisa.

À Universidade Federal do Oeste do Pará pelos recursos investidos na formação de novos mestres.

À **FAPESPA** pela concessão da bolsa de estudos, à Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica da - **Proppit UFOPA** pelo apoio financeiro e possibilidade de realização desse trabalho.

À CAPES- PVE – PROCESSO 88881.030.467243-61

A todos já citados e todos que contribuíram de maneira direta ou indireta em dois anos de mestrado,

Gratidão!

ALMEIDA, J. G. **Efeito de *Plathymenia reticulata* sobre a toxicidade induzida por metilmercúrio em ratos.** 2015. 78p. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Biociências. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA. Santarém, 2015.

RESUMO

O mercúrio (Hg) é um metal reconhecidamente de alta toxicidade já descrita ao longo dos anos. O metilmercúrio (MeHg) é uma das formas orgânicas deste metal que apresenta maior toxicidade por ter mais facilidade de penetrar as membranas celulares dos órgãos e das barreiras hematoencefálica e placentária causando inúmeras consequências sistêmicas no organismo contaminado. Um dos mecanismos em que se baseia a toxicidade do MeHg é a geração em excesso de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) causando estresse oxidativo. *P. reticulata* é uma espécie vegetal comumente conhecida como vinhático cujo uso na medicina popular é bastante difundido principalmente no norte e centro-oeste brasileiros. O extrato da casca de *P. reticulata* possui em sua composição taninos, flavonóides e outros grupos de compostos de estrutura fenólica, responsáveis em grande parte pelo efeito antioxidante da planta. O objetivo geral deste estudo foi verificar o efeito do extrato aquoso de *P. reticulata* mediante a contaminação por MeHg durante 21 dias em ratos através dos testes comportamentais e dosagens de Hg em fígado, rins, cérebro e cerebelo. Foi realizado ainda teste *in vitro* para avaliar atividade antioxidante do extrato aquoso através do teste do radical superóxido. Foram selecionados para os experimentos 48 ratos Wistar machos de pesagem entre 150 e 200g provenientes do Biotério do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental (LabBex) da Universidade Federal do Oeste do Pará. Os animais foram separados nos seguintes grupos (G) com n=6 em cada: G1- Água, G2 - *P. reticulata* 60mg/kg, G3 - *P. reticulata* 120mg/kg, G4 - *P. reticulata* 240mg/Kg, G5 – MeHg 4mg/kg, G6 - *P. reticulata* 60mg/kg+ MeHg, G7 - *P. reticulata* 120mg/kg+ MeHg, G8 - *P. reticulata* 240mg/kg+ MeHg. Após 21 dias de administração diária os animais foram submetidos aos testes comportamentais (Labirinto em Y, Caixa Claro-escuro e Rota-rod), posteriormente eutanasiados e por fim feita a coleta de cérebro, fígado e rins para análises. Os resultados dos testes comportamentais mostraram que os grupos que receberam MeHg tiveram memória de curta e longa duração além de função motora afetadas. No labirinto em Y, a % de alternância dos grupos G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 e G8 foram em média de 65; 62; 71; 62; 33; 75; 41; 20% respectivamente. No teste da barra giratória foi observado que os animais de G5, G6 permaneceram menos tempo sobre a barra giratória, em média de 65,75 segundos. Os animais de G7 e G8 não foram capazes de permanecer na barra giratória. As dosagens de Hg mostraram maior concentração do metal respectivamente em fígado, rins, cerebelo e cérebro. A dose de *P. reticulata* de 60mg/kg mostrou-se de maneira geral mais eficaz na proteção dos danos causados pelo metal aos órgãos e na memória e aprendizado avaliados nos testes de comportamento. A avaliação *in vitro* do extrato comprovou atividade antioxidante através da inibição dos radicais superóxidos (respectivos % de inibição: 25,6%, 50,92%, 68% 93% para as concentrações 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL e 50 µg/mL.)

ALMEIDA, JG *Plathymenia reticulata* protective effects on the toxicity induced by methylmercury in rats. 2015. 78p. Dissertation. Programa de Pós-graduação em Biociências. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA. Santarém, 2015.

ABSTRACT

Mercury (Hg) is a known metal high toxicity been described over the years. Methylmercury (MeHg) is one of organic forms of this metal that has a higher toxicity find it easier to penetrate the cell membranes of organs and blood-brain and placental barriers causing numerous systemic consequences in the contaminated organism. One of the mechanisms underlying the toxicity of MeHg is to generate in excess of reactive oxygen species (ROS) causing oxidative stress. *P. reticulata* is a species commonly known as mahogany whose use in folk medicine is widespread mainly in northern and central-western Brazil. The *P. reticulata* bark extract has in its composition tannins, flavonoids and other phenolic groups of compounds of structure responsible in large part by the antioxidant effect of the plant. The aim of this study was to investigate the effect of aqueous extract of *P. reticulata* by contamination MeHg for 21 days in mice through behavioral tests and Hg dosages in liver, kidney, brain and cerebellum. In vitro testing was also carried out to evaluate antioxidant activity of the aqueous extract through the superoxide radical test. They were selected for the 64 mice experiments Wistar weighing males between 150 and 200g from the Vivarium of Bioprospecting Laboratory and Experimental Biology (LabBex) of the Federal University of Western Pará. The animals were separated into the following groups (G) with n = 6 in each: G1 Water, G2 - *P. reticulata* 60 mg / kg, G3 - *P. reticulata* 120mg / kg, G4 - *P. reticulata* 240mg / kg, G5 - MeHg 4 mg / kg, G6 - *P. reticulata* 60mg / kg + MeHg , G7 - *P. reticulata* 120mg / kg + MeHg, G8 - *P. reticulata* 240 mg / kg + MeHg. After 21 days of daily administration animals were subjected to behavioral testing (Y maze, Box Light-dark and Rota-Rod) subsequently euthanized and finally collecting made brain, liver and kidneys for analysis. The results of the behavioral tests showed that the groups that had received MeHg short and long term memory plus motor function affected. In the Y maze, the switching% of G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 and G8 were on average 65; 62; 71; 62; 33; 75; 41; 20% respectively. In the rotating rod test it was observed that the animals G5, G6 spent less time on the swivel bar, averaging 65.75. G7 and G8 animals were not able to remain on the swivel bar. Hg dosages showed higher concentration of metal respectively in liver, kidney, brain and cerebellum. The dose of *P. reticulata* 60 mg / kg proved to be more effective overall in protecting the damage caused by metal to organs and memory and learning assessed in behavioral tests. The in vitro evaluation of the extract demonstrated antioxidant activity through inhibition of superoxide radicals (its% inhibition: 25.6%, 50.92% 68% 93% for 5 mg / mL concentrations, 10 mg / mL, 20 ug / ml and 50 ug / ml).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição de ocorrência natural de *P. reticulata* no Brasil

Figura 2 – Árvore de *P. reticulata*.

Figura 3 – Dispositivo usado para o Teste do Labirinto em Y

Figura 4 – Teste da Caixa Claro-escuro

Figura 5 – Teste da Barra giratória (Rota-rod)

Figura 6 – Equipamento utilizado para dosagens de Hg

Figura 7 – Aspecto do animal durante o Teste do Labirinto em Y. O animal permaneceu por mais tempo parado e com os pêlos eriçados. Foi notado maior número de bolos fecais durante todos os testes comportamentais dos grupos que receberam MeHg.

Figura 8 - *Hind leg crossed* – patas traseiras cruzadas. Característica da intoxicação crônica por MeHg. Neste estudo, os animais apresentaram este sinal após a terceira semana de intoxicação nos grupos que receberam apenas MeHg (dose: 4mg/kg) e nos grupos de tratamento com *P. reticulata*+MeHg (nas doses de 120 e 240mg/Kg)

Figura 9 – Variação de peso dos animais submetidos ao tratamento com MeHg e extrato aquoso de *P. reticulata* durante 21 dias. Os valores representam a média ± erro padrão.

Figura 10 – Efeitos do tratamento no desempenho dos animais submetidos ao teste do Labirinto em Y

Figura 11 – Efeitos do tratamento no desempenho dos animais submetidos ao Teste da Caixa Claro-escuro

Figura 12 – Efeitos do tratamento no desempenho dos animais submetidos ao Teste da Barra giratória

Figura 13 – Efeitos do tratamento no desempenho dos animais na dosagem de Hg nos órgãos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT – Catalase

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FSH - Hormônio folículo estimulante

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

Hg – Mercúrio

LH - Hormônio Luteinizante

MeHg – Metilmercúrio

NBT – Nitroblue tetrazolium

PMS – Metassulfato de fenazina

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido dismutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 MERCÚRIO	18
2.1.1 Características físico-químicas	18
2.1.2 Histórico da exposição humana à contaminação mercurial	19
2.1.3 MeHg: absorção, metabolismo e excreção	21
2.1.4 Exposição ao MeHg	22
2.1.5 Toxicidade do MeHg	24
<i>2.1.5.1 Efeitos celulares</i>	<i>25</i>
<i>2.1.5.2 Efeitos cardiovasculares, hematológicos e pulmonares</i>	<i>26</i>
<i>2.1.5.3 Efeitos no sistema digestivo e renal</i>	<i>26</i>
<i>2.1.5.4 Efeitos no sistema imune</i>	<i>27</i>
<i>2.1.5.5 Efeitos nos Sistemas Reprodutivos</i>	<i>27</i>
<i>2.1.5.6 Efeitos no sistema endócrino</i>	<i>27</i>
<i>2.1.5.7 Efeitos na gravidez, lactação e fetotoxicidade</i>	<i>28</i>
<i>2.1.5.8 Efeitos no Sistema Nervoso</i>	<i>28</i>
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO	30
2.2.1 Sistema de defesa antioxidante	32
<i>2.2.1.1 Enzimático</i>	<i>32</i>
<i>2.2.1.2 Químico ou não-enzimático</i>	<i>34</i>
2.3.1 Testes antioxidantes in vitro	34
<i>2.3.1.1 Sequestro de radical superóxido - xantina oxidase</i>	<i>35</i>
2.3.2 O MeHg como causador de estresse oxidativo	35
2.4 MEMÓRIA E APRENDIZADO	36
2.4.1 Avaliação da memória e comportamento em ratos	38
2.5 PLATHYMENIA RETICULATA	39
2.5.1 Características gerais	39
2.5.2 Composição química de <i>P. reticulata</i>	42
<i>2.2.2.1 Flavonóides</i>	<i>42</i>
<i>2.2.2.2 Taninos</i>	<i>42</i>
<i>2.2.2.3 Antocianinas</i>	<i>43</i>

2.2.2.4 Saponinas	44
3 OBJETIVOS	45
3.3 Objetivo Geral:	45
3.4 Objetivos específicos:	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.3 Animais	46
4.4 Preparo da solução de MeHg	46
4.5 Extrato aquoso de <i>P. reticulata</i>	47
4.6 Grupos experimentais e administração de MeHg e <i>P. reticulata</i>	47
4.7 Análise da variação de massa corporal	47
4.8 Testes comportamentais	48
4.8.1 Teste do Labirinto em Y	48
4.8.2 Teste da Caixa Claro-Escuro	49
4.8.3 Teste da barra giratória	50
4.9 Procedimentos de eutanásia e coleta de material biológico	51
4.9.1 Coleta dos órgãos	51
4.9.2 Determinação do Hg total	52
4.9.3 <i>Teste de sequestro do radical superóxido</i>	52
4.10 Análise estatística	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.3 Avaliação do ganho de peso	56
5.4 Testes comportamentais	58
5.4.1 Labirinto em Y	58
5.4.2 Caixa claro-escuro	59
5.4.3 Barra giratória (Rota-rod)	60
5.5 Análise do Hg total	61
5.4 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante	63
6 CONCLUSÃO	66
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

O mercúrio (Hg) é reconhecidamente um dos metais pesados de grande impacto sobre a saúde humana e o meio ambiente. Exposições ao Hg podem afetar órgãos-alvo e/ou apresentar sintomas sistêmicos no homem (SATO, 2013; CAVE et al., 2013; PASSOS e MERGLER, 2015).

Os seres humanos estão expostos à contaminação mercurial por diversas fontes as quais incluem: consumo de pescado e frutos do mar contaminados, exposição ocupacional, uso de amálgamas dentários e mais recentemente ao contato com baterias e componentes de eletroeletrônicos cujo descarte é em maioria indiscriminado (PASSOS e MERGLER, 2015; UNEP, 2013).

Dentre as formas químicas de Hg, o metilmercúrio (MeHg) é a mais preocupante devido à capacidade de atravessar as barreiras placentária e hematoencefálica, causando estresse oxidativo em muitos tecidos corporais (ROVER, 2001; STOHS e BAGACHI, 1995), a exemplo da neurotoxicidade bastante estudada desde a época dos incidentes em Minamata no Japão (SATO, 2013; SAKAMOTO et al., 2013; MEACHAM et al., 2005).

Sendo a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) uma das ações do MeHg em organismos vivos, a utilização de compostos com atividade antioxidante, pode reduzir os efeitos do MeHg no organismo (ASLANTURKA et al., 2014; AL-SALEH et al., 2014; PAL e GHOSH et al., 2012; GÖKSEL et al., 2006) Nesse contexto, plantas medicinais com atividade antioxidante poderiam também ser utilizadas como potenciais compostos para reduzir a ação das EROs.

Muitas plantas medicinais já são utilizadas para diversas sintomatologias pelo saber popular. Algumas já são reconhecidas e aceitas como tratamento fitoterápico autorizado pelo Ministério da Saúde do Brasil. Outras estão em fase de descrição e estudo de componentes fitoquímicos bem como suas atividades farmacológica e possível toxicidade (TOLEDO et al., 2011; SIMÕES, 2007; LORENZI e MATOS, 2002).

Os princípios ativos de plantas medicinais já bastante descritos na literatura mostram-se determinantes em auxiliar em situações prejudiciais ao organismo. As atividades anti-inflamatória, anti-edematogênica, antifúngica e antioxidante estão presentes nas evidências encontradas ao longo dos anos e dos estudos nessa área. Este último efeito em especial deve-se a grupos de compostos denominados taninos,

flavonóides dentre outros de estrutura fenólica principalmente (SIMÕES, 2007). Esses componentes são presentes, por exemplo, no extrato da casca de *P. reticulata* (MORIM, 2014; FARRAPO, 2011; FERNANDES et al., 2005; LEWIS e WARWIRC, 2003), composto estudado neste trabalho em sua ação protetora mediante intoxicação por MeHg.

Possíveis mecanismos envolvidos na mitigação dos efeitos do MeHg por fitoquímicos podem incluir a redução das EROs, a ativação dos sistemas antioxidantes enzimáticos, a restauração do potencial da membrana mitocondrial e a modulação de vias de sinalização celular (CAMPOS e SPARZA; SANCHEZ-GOMEZ; MATUTE, 2009). Fitoquímicos também podem afetar a biodisponibilidade e farmacocinética do MeHg (LAIRD et al., 2009; PASSOS et al., 2007).

Neste sentido, esforços para procurar proteção contra os efeitos do MeHg na população são de grande importância e a correlação com a alimentação local e o uso de plantas medicinais mostra-se uma alternativa válida, visto que a cultura local expressada pelo consumo de produtos regionais de origem natural possui forte influência e aceitação da população e pode ser utilizada em favor de amenizar as consequências do metal. Deste modo, o desenvolvimento de estudos experimentais têm sido fundamental para conhecer os efeitos tóxicos do MeHg, e também para as investigações de prováveis alvos moleculares que possam minimizar os efeitos deste metal pesado.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MERCÚRIO

2.1.1 Características físico-químicas

O Hg é um metal pesado, pertencente ao grupo II B da Tabela Periódica, tem característica volátil e se apresenta no estado líquido à temperatura ambiente e a 0°C. Não apresenta funções biológicas, e é considerado um agente potencialmente tóxico ao oferecer grande risco de contaminação (AZEVEDO, 2003). A forma líquida e a capacidade de evaporar-se facilmente é decorrente de seu baixo calor latente de evaporação de 295KJ/Kg. O Hg sob forma de vapor (Hg^0) oferece maior risco que a forma líquida. Este metal pode também ligar-se a outros elementos como enxofre ou oxigênio para formar o Hg inorgânico pela formação de íons: Hg^{1+} (mercúrico) ou Hg^{2+} (mercuroso).

O Hg^0 presente na atmosfera é derivado da gaseificação natural da crosta terrestre e através de erupções vulcânicas, bem como da evaporação dos oceanos e solos. As fontes antropogênicas tornaram-se um contributo significativo para o Hg atmosférico. Essas emissões são provenientes da mineração e fundição de metal, incineradores e despejo de resíduos industriais (CASARRETT e DOULL'S, 2008).

O despejo de Hg em águas e solos, a liberação na atmosfera e consumo pelo homem através da alimentação, causa prejuízos à saúde (SATO et al., 2013; RICE et al., 2014), principalmente ao sistema nervoso central (GONZÁLEZ-ESTECHA et al., 2014; ASCHNER et al., 2007; WHO, 2007).

As fontes de exposição humana às formas do Hg incluem: amálgama dentário, termômetros, esfigmomanômetros, barômetros, emissões de combustíveis fósseis, lâmpadas incandescentes, pilhas e incinerações de resíduos hospitalares (RICE et al., 2014), fábricas de lâmpadas fluorescentes, mineração do ouro e da prata (MERGLER et al., 2007).

Este metal pode ainda formar um número de compostos organometálicos estáveis ligando-se a um ou dois átomos de carbono. O MeHg é a forma orgânica toxicológica mais importante (CASARRETT e DOULL'S, 2008; SATO et al., 2013; RICE et al., 2014).

A Tabela 1 mostra as características físico-químicas do Hg, bem como a utilização de cada forma do metal:

Tabela 1: Formas de Hg, propriedades e aplicações

Forma Química	Propriedades e características	Aplicações
Metálico	Líquido à temperatura ambiente, expansão volumétrica uniforme em ampla faixa de temperatura, alta tensão superficial, não aderência a superfícies vítreas Baixa resistência elétrica e alta condutividade térmica Alto potencial de oxidação em relação ao hidrogênio Facilidade de formação de amálgamas com outros metais	Aparelhos de medição de pressão e temperatura: termômetros, barômetros e manômetros Materiais elétricos e eletrônicos, agente resfriante Operações eletroquímicas: indústrias de cloro e soda Metalurgia, odontologia, processos extrativos (garimpo).
Vapor (Hg⁰)	Volatilidade maior	Queima do metal, incineradores industriais
Compostos orgânicos (MeHg principal)	Poder de assepsia por oxidação de matéria orgânica	Inseticidas, bactericidas, fungicidas
Compostos inorgânicos (Hg¹⁺, Hg²⁺)	Alta estereoespecificidade	Catálise na indústria de polímeros sintéticos

Fonte: Adaptado de Micaroni et al., 2000 QUÍMICA NOVA, 23(4)

2.1.2 Histórico da exposição humana à contaminação mercurial

O Hg por ter sido utilizado em larga escala ao longo dos anos de desenvolvimento industrial e agrícola, foi causa de muitos casos de contaminação. Um dos casos mais conhecidos foi o acidente na Baía de Minamata no Japão na década de 1950, onde uma companhia de produtos químicos despejava os detritos, um deles o MeHg, da produção

de acetaldeído na baía de Minamata. Como consequência, o consumo de peixes contaminados afetou diretamente o sistema nervoso de seus moradores (GONZÁLEZ-ESTECHA et al., 2014; ASCHNER et al., 2007).

A “Doença de Minamata” foi oficialmente descoberta em 1956, quando uma criança foi hospitalizada com mãos e pés paralisados. A partir daí, vários casos similares foram encontrados, atingindo níveis epidêmicos. Desde 1953, fatos até então inexplicáveis estavam sendo observados próximo à Baía de Minamata: um grande número de pessoas com entorpecimento de dedos, lábios e língua, morte de peixes e mariscos e morte de pássaros e gatos por violentas desordens nervosas. Por volta de 1960, no mínimo 111 pacientes já haviam sido identificados com esta doença. A mortalidade foi de cerca de 20% e os sobreviventes ficaram permanentemente incapacitados (ASCHNER et al., 2007).

Outro caso histórico relevante ocorreu em 1971 no Iraque, onde foi importada grande quantidade de sementes de trigo e cevada tratados com fungicida à base de MeHg. Apesar das advertências oficiais, a safra foi utilizada na confecção de pães para o consumo da população. Cerca de 500 pessoas morreram e aproximadamente 6500 foram hospitalizadas com sequelas graves (GONZÁLEZ-ESTECHA et al., 2014).

Na Amazônia, além dos registros da mineração industrial e artesanal de ouro desde a década de 80 há possivelmente outras fontes naturais e antropogênicas de contaminação atuais e isso tem aumentado a concentração de Hg na Bacia do Tapajós (NEVADO et al., 2010). Sedimentos e biota desta região encontram-se contaminados pelo metal, o que resulta em bioacumulação em peixes consumidos por comunidades ribeirinhas (MARINHO et al., 2013; HACON et al., 2008).

A exposição ocupacional ao Hg mostrou-se, na Amazônia dos anos 80, a principal fonte contaminante para as pessoas desta região. No entanto, há evidências de que a formação rochosa do local através de acumulação na escala de tempo geológico também pode ser significativa na concentração de Hg (NEVADO et al., 2010; WASSERMAN et al., 2007). A concentração de Hg medida em cabelos da população mostrou que crianças de comunidades ribeirinhas são mais vulneráveis à exposição crônica pelo consumo de MeHg em peixes (MARINHO et al., 2013).

A complexidade do sistema amazônico e o conhecimento limitado do ciclo biogeoquímico deste metal em florestas tropicais explicam as dificuldades enfrentadas pela comunidade científica na avaliação dos impactos da contaminação por Hg na Amazônia, o que gera problemas para a população local, constantemente exposta ao

metal e às consequências negativas causadas à sua saúde (HACON et al., 2008; WASSERMAN et al., 2007).

2.1.3 MeHg: absorção, metabolismo e excreção

Metais metilados exibem uma maior mobilidade, levando assim a um transporte mais eficiente de metal dentro do corpo e, em particular, abrindo chances para penetração das barreiras de membrana (barreira hemato-encefálica, barreira transplacentária) (CAVE et al., 2013).

A contaminação por MeHg representa um desafio especial para a saúde pública, visto que é um metal tóxico presente em peixes e frutos do mar, fontes alimentares vitais e de relevância cultural de muitas comunidades em todo o mundo (GONZÁLEZ-ESTECHA et al., 2014; MERGLER et al., 2007).

O MeHg na carne do peixe está ligado a proteínas e aminoácidos livres, componentes dos tecidos musculares que não são removidos nos processos de cozimento e limpeza da carne. Cerca de 95% do MeHg ingerido pelo homem é oriundo da ingestão do pescado (GOLDMAN; SHANNON, 2001). No entanto, o consumo de outras fontes alimentares também pode prover contaminação, como carne de animais terrestres (aves e porcos), bem como de determinadas plantações provenientes de solo contaminado. (MERGLER et al., 2007).

A absorção do MeHg ocorre no trato gastro-intestinal (TGI) e a distribuição em todos os tecidos acontece em torno de 30h, sendo 10% absorvido pelo cérebro e 5% permanecendo no plasma. Nos eritrócitos, a concentração chega a ser até 20 vezes maior do que no plasma (GOLDMAN; SHANNON, 2001; CASARRETT e DOULL'S, 2008).

O MeHg liga-se a moléculas contendo grupos tiol, como a cisteína e conseguem atravessar a barreira hemato-encefálica através de transportadores de aminoácidos. Pode também acumular-se avidamente no cabelo em concentrações proporcionais às do sangue, podendo ser utilizado como indicador de exposição (CASARRETT e DOULL'S, 2008).

Quanto à permanência deste metal no organismo humano, o MeHg apresenta meia-vida de 50 a 70 dias (SKERFVING & COPPLESTONE, 1976). O Hg⁰ inalado sob a forma de vapor apresenta uma meia-vida de 35 a 90 dias enquanto os sais inorgânicos

de Hg possuem meia-vida no organismo de 37 dias e nas hemácias de 16 dias (GOYER, 1986).

A respeito do MeHg maior fração ingerida é excretada na urina (10%) e fezes (90%) como um complexo glutathiona-MeHg e 16% é excretado no leite materno (COUNTER E BUCHANAN, 2004). Uma parte deste MeHg presente na bile pode sofrer recirculação hepato-biliar, prolongando a meia-vida biológica (alcançando 2 meses) desse composto no organismo, o que é dependente da dose de contaminação, do tipo de animal e do sexo (COUNTER E BUCHANAN, 2004; DUTCZAK et al., 1991).

A eliminação do MeHg do organismo ocorre pelos rins, fígado (via bile), mucosa intestinal, glândulas sudoríparas e salivares, pele e leite materno, sendo as vias urinária e fecal as mais importantes. Embora a maior parte do MeHg absorvido seja eliminada em cerca de 60 a 70 dias, traços deste metal podem ser detectados no organismo por meses ou anos pois deposita-se nos tecidos, demonstrando que o contato humano com este metal constitui uma ameaça à saúde (SWIFT, 1997).

2.1.4 Exposição ao MeHg

A maioria do MeHg é incorporado na base da cadeia alimentar e assim apresenta sério risco ambiental. Acumula-se na cadeia alimentar por um fenômeno denominado bioamplificação, ou seja, a concentração do metal aumenta à medida em que ele alcança os níveis tróficos sendo portanto, capaz de se manter por longos períodos nos tecidos do organismo (BOERING, 2000).

Desta forma, o MeHg pode ser encontrado em peixes predadores do topo da cadeia alimentar em concentrações elevadas (0,546 µgHg por grama de peixe) e culminar na dieta humana (MALM, 1998; PINHEIRO et al., 2003).

No que concerne ao estabelecimento de níveis seguros de exposição ao Hg, o Comitê de Especialistas em Alimentos e Aditivos da Organização para Alimentosa Agricultura da Organização Mundial da Saúde (*Joint Food and Agriculture Organization – F.A.O./W.H.O. – W.H.O. Expert Committee on Food Additives*) propôs que substâncias consideradas contaminantes alimentares, foram avaliados através do estabelecimento do denominado “Consumo Semanal Tolerável Provisório (CSTP)” (*Provisional Tolerable Weekly Intake*). Para o Hg, o CSTP foi fixado em 0,3 mg/semana de Hg total desde que não mais de 0,2 mg estejam sob a forma de MeHg, o que

corresponderia às concentrações de 5 µg Hg total/kg peso corpóreo e 3,3 µg MeHg/kg de peso corpóreo. Esta estimativa é baseada em uma alta entrada de Hg total pela dieta, especificamente pelo consumo de peixe e seus produtos contendo altos níveis de MeHg. Porém, quando a alta entrada de Hg total ocorrer por outros motivos, a estimativa poderá não se aplicar, necessitando de uma análise específica da situação. Quando a ingestão de Hg total na dieta exceder 0,3 mg por semana, é aconselhável realizar análises para MeHg (WHO, 2008).

Em uma pesquisa sobre nutrição e saúde, o *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), nos Estados Unidos, avaliou os níveis de Hg no sangue na população desde 1999, para determinar os níveis de Hg total no sangue de mulheres em idade fértil e de crianças com idade entre 1 e 5 anos. Os resultados mostraram que o nível médio de Hg no sangue de crianças foi de 0,3µg/L (CDC, 2009).

No Brasil, o estudo de Santos et al., (2007), cujo objetivo foi correlacionar a concentração de Hg no sangue de 1.510 mães do Município de Itaituba, no Estado do Pará (Brasil) com a concentração de Hg no sangue do cordão umbilical dos seus 1.510 recém-nascidos, encontrou que a concentração no sangue das mães foi 11,53µg/L (0,38 - 117,62µg/L) e nos recém-nascidos foi de 16,68µg/L (0,350 - 126,87µg/L).

A legislação brasileira, por meio das Normas Regulamentadoras (NRs), do Ministério do Trabalho e da Organização Mundial de Saúde e, através da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT/NBR 10.004), estabelece como limite de tolerância biológica para o ser humano a taxa de 33mg/g de Hg por grama de creatinina urinária e 0,04mg/m³ de ar no ambiente de trabalho. O Hg ocupa lugar de destaque entre as substâncias mais perigosas relacionadas nessas normas (UNEP, 2013).

Em algumas áreas da região amazônica, estimou-se uma ingestão diária na ordem de 100µg de MeHg/dia, uma quantidade muito maior que o limite máximo recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2007). Apesar deste intenso processo de ingestão, nenhum caso claro de sintomas semelhantes aos observados nos indivíduos de Minamata foi descrito na região amazônica, contudo, Lebel et al., (1998), demonstraram alterações neurológicas em indivíduos que foram intoxicados com MeHg nesta região, sendo estas alterações proporcionais às concentrações de MeHg presentes no cabelo dos indivíduos (maior que 50µg/Kg).

A grande assimilação de Hg pelo homem ocorre por ingestão principalmente de pescado. A OMS (WHO, 2007) estabeleceu que o valor máximo de consumo humano

admissível é de 0,5µg de Hg por grama de peixe e para exposições a vapores o limite é de 0,05mg de Hg/m³. Queiroz e colaboradores (1995) analisou amostras de peixes da região do garimpo de Grajaú, no município de Vizeu, no Pará, e os teores encontrados variaram de < 0,014 a 0,279 µg/g para o MeHg e de < 0,011 a 0,29 µg/g para o Hg total, todos inferiores ao limite estabelecido para consumo humano no Brasil. Amostras de sete espécies de peixes piscívoros, onívoros e herbívoros, de 12 localidades do rio Madeira, Brasil, foram analisadas e os valores encontrados variaram de 0,41 a 6,66 nmol/g dependendo da espécie considerada (DOREA et al., 1998).

Pesquisa conduzida por Maurice-Bourgoin et al., (2000), em peixes da bacia do rio Madeira, em área de mineração, mostrou que os peixes piscívoros da região do rio Beni apresentaram concentração de 0,33 a 2,30 µg/g, enquanto nos onívoros e naqueles que se alimentam de lama os teores variaram de 0,02 a 0,19 µg/g. O mercúrio acumulado pelos peixes carnívoros encontrava-se principalmente na forma de MeHg e representou 73 a 98% do total analisado.

Em estudos de Lacerda et al., (1994), observou-se que as concentrações Hg total em músculo de 12 espécies de peixes coletadas na região mineira de Carajás, no sul do Pará, estavam relacionadas com o tipo de peixe. Os carnívoros apresentavam concentrações de Hg maiores que os herbívoros e onívoros. Os peixes carnívoros maiores apresentavam maior concentração que os menores. O MeHg correspondeu à cerca de 91,7% do mercúrio total nos peixes analisados, enquanto nos invertebrados bentônicos esse valor caiu para 50%. Estudos feitos para se conhecer a relação entre Hg total e MeHg em músculo de peixes de lagos com acidez acentuada mostraram que 99% do Hg encontravam-se na forma de MeHg.

Estudos na Bacia do Tapajós, onde o consumo de peixe é a principal fonte de alimento diária, os níveis de exposição medidos em raiz do cabelo chegam a atingir um valor até de 150µg de Hg por grama, quando feitas medições em cabelos humanos. Os níveis em que os primeiros sinais de contaminação mercurial, como alterações do sistema visual e motor ocorrem em exposições acima de 50µg/g (MALM, 1998; PINHEIRO et al., 2003; PASSOS e MERGLER, 2008).

2.1.5 Toxicidade do MeHg

Os compostos de Hg tanto orgânicos e inorgânicos possuem diferentes perfis de toxicidade causada que sofre influência tanto do tempo de exposição como da fase da

vida em que ocorre, refletindo em diferentes efeitos na saúde. A intoxicação por MeHg pode ser de forma aguda ou crônica, por baixas ou altas doses do metal circulante no organismo (SATO, 2013; RICE et al 2014).

A intoxicação crônica por MeHg resulta frequentemente da exposição permanente e por períodos prolongados a pequenas quantidades das formas do metal. Entre os possíveis mecanismos de toxicidade encontram-se inativação de enzimas, proteínas estruturais e processos de transporte ou alteração da permeabilidade da membrana celular, estresse oxidativo nas células causando acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) (STOHS & BAGCHI, 1995).

A elevada toxicidade do MeHg parece estar relacionada ao fato de possuir afinidade aos grupos tiol das diversas enzimas celulares nos microssomas e na mitocôndria, ligando-se covalentemente a eles e promovendo a interrupção do metabolismo e da função celular (STOHS & BAGCHI, 1995). O metal também pode se ligar a outros grupos químicos, embora com uma menor afinidade, como o fosforil (PH), carboxil (COOH), amina (R-NH, amina primária) e amida (R-CO)NH₃ (CUNHA, 2008).

A exposição ao MeHg pode ser associada com a indução de mais de 250 sintomas, o que acaba complicando um diagnóstico preciso. O diagnóstico diferencial começa a ser definido através da história de exposição do indivíduo ao metal. Os testes laboratoriais incluem basicamente: análise de sangue, exame de urina, urinálise de 24h, análise de cabelo, e se possível a biópsia de tecido (RICE et al., 2014).

Embora o Sistema Nervoso Central (SNC) seja o sistema mais gravemente afetado pelo MeHg, a distribuição sistêmica transitória deste metal tem potencial para causar sintomas em diferentes sistemas (SATO, 2013; RICE et al., 2014) descritos a seguir.

2.1.5.1 Efeitos celulares

A nível celular, os danos da exposição mercurial estão associados com alterações da permeabilidade da membrana, alterações estruturais de macromoléculas devido sua afinidade com grupos sulfidríla e grupos tiol além de danos ao DNA. O MeHg também induz o estresse oxidativo e disfunções mitocondriais que resultam em alterações da homeostase de cálcio e peroxidação lipídica (RICE et al., 2014). O MeHg também pode

umentar os níveis de EROs devido à sua capacidade de atuar como catalisador para reações do tipo fenton (PERAZA et al., 1998).

Os eventos que desencadeiam na toxicidade celular do MeHg são dependentes em grande parte das propriedades eletrofílicas do composto, que permitem a sua interação com grupos nucleofílicos principalmente os tióis e os selenóis. O MeHg pode interromper a função mitocondrial, visando a estrutura de proteínas contendo grupo tiol específicas, incluindo complexos da cadeia respiratória. O dano a esses complexos pode contribuir para a despolarização da membrana mitocondrial, geração de EROs exacerbando a toxicidade do MeHg nos centros nucleofílicos e em outros compartimentos subcelulares mitocôndriais, que conduz em um ciclo de morte celular (DALLA CORTE, et al., 2013).

2.1.5.2 Efeitos cardiovasculares, hematológicos e pulmonares

O acúmulo de MeHg no coração pode contribuir para cardiomiopatia, dor no peito ou angina, especialmente em indivíduos de meia idade (HAFFNER et al., 1991). Há também evidências correlacionando a contaminação por MeHg com distintos tipos de anemia, através do mecanismo de competição com o ferro no grupo heme (PYSEL et al., 2005).

Os efeitos no sistema respiratório são pouco relacionados com a forma metilada sendo mais decorrentes da contaminação sob a forma de vapor, cuja inalação pode causar tremores, distúrbios do sono e prejuízos nas habilidades cognitivas (KINJO et al., 1996).

2.1.5.3 Efeitos no sistema digestivo e renal

O MeHg é absorvido através das células epiteliais da mucosa intestinal quando ingerido e pode causar vários distúrbios digestivos, uma vez que pode inibir a produção de tripsina, quimiotripsina e pepsinogênio (SUMMERS et al., 1993). Os efeitos podem refletir em dor abdominal, indigestão, doença inflamatória intestinal, diarreia, além da destruição da flora intestinal (SUMMERS et al., 1998). Pode ainda causar danos nos rins ocasionando diversas disfunções como síndrome nefrótica aguda, disfunção tubular, glomeruloesclerose e proteinúria (MILLER et al., 2013).

2.1.5.4 Efeitos no sistema imune

O MeHg age através da supressão de adrenocorticoides e impede a produção normal de células polimorfonucleadas (neutrófilos) afetando também sua capacidade de reconhecer substâncias estranhas. Este metal produz uma resposta imune no sistema nervoso central com possível produção de interferon gama e interleucina 2. Como consequência há uma suscetibilidade crônica a infecções sucessivas (SHENKER et al., 1992).

2.1.5.5 Efeitos nos Sistemas Reprodutivos

O MeHg pode precipitar alterações fisiopatológicas ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e gonadal que pode afetar a função reprodutiva, alterando os níveis circulantes do hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Pode ainda alterar os níveis de estrogênio e progesterona (ROWLAND et al., 1994).

Foi observada a redução da fertilidade em indivíduos que tiveram exposição ocupacional ao MeHg e em estudo feito em Hong Kong foi demonstrada associação entre exposição ao metal com infertilidade tanto em homens quanto em mulheres. Em indivíduos do sexo masculino, o MeHg pode afetar a espermatogênese, diminuindo o peso testicular e ainda pode estar relacionado com disfunção erétil (SCHARAG et al., 1985).

Em mulheres expostas ao MeHg, a alteração dos níveis de FSH e LH na hipófise anterior causam alterações na produção de estrogênio e progesterona levando às disfunções ovarianas, ciclos menstruais irregulares e/ou dolorosos, menopausa precoce e sangramentos anormais (DAVIS et al., 2001).

2.1.5.6 Efeitos no sistema endócrino

Os níveis de exposição ao MeHg, ainda que baixos, podem afetar o sistema endócrino por perturbações das funções da tireóide, da hipófise, glândulas supra-renais e pâncreas. O mecanismo de toxicidade baseia-se na capacidade do metal em reduzir a

ligação hormônio-receptor ou através da inibição de uma ou mais enzimas-chave durante os processos de biossíntese hormonal (MINOIA et al., 2009).

Os hormônios cuja síntese parece ser mais afetada pelo MeHg são: insulina, estrogênio, testosterona e adrenalina. Também pode afetar a degradação de catecolaminas através da inativação de S-adenosil-metionina que pode causar o acúmulo de adrenalina além de hiperidrose, hipersalivação, taquicardia e hipertensão (CLIFTON, 2007) No córtex da supra-renal, a exposição ao Hg pode ser associada a níveis plasmáticos reduzidos de corticoesterona (IAVICOLI et al., 2009).

2.1.5.7 Efeitos na gravidez, lactação e fetotoxicidade

Além da toxicidade nas funções reprodutivas, o MeHg também está relacionado com a toxicidade fetal, podendo causar abortamentos espontâneos, natimortos, prematuridade e recém nascidos com baixo peso ao nascer. Além disso, o metal é conhecido por causar defeitos no fechamento do tubo neural, malformações craniofaciais, retardo do crescimento – tanto uterino quanto pós natal - dentre outras manifestações no crescimento e desenvolvimento infantis (YOSHIDA, 2002).

O MeHg atravessa a barreira placentária chegando ao feto e inibindo seu crescimento cerebral causando futuro retardo psicomotor e paralisia no último trimestre da gestação (CASTOLDI et al., 2001). O metal inibe o transporte transmembrana de nutrientes incluindo o selênio. Em estudo feito com animais também foi demonstrado que existe uma acumulação no tecido cerebral maior no feto do que no tecido cerebral materno (MEACHAM et al., 2005).

2.1.5.8 Efeitos no Sistema Nervoso

As consequências da intoxicação no SNC são as mais agressivas. A contaminação na vida adulta traz prejuízos à saúde tais como: ataxia, constrição concêntrica do campo visual, deficiência auditiva e sintomas do trato extrapiramidal (SATOH et al., 2013; WHO, 2007). Já na vida fetal os sintomas aparentemente são mais graves, visto que comprometem o desenvolvimento do sistema nervoso. As mais comuns são descritas na Doença de Minamata: retardo mental, ataxia cerebelar, reflexo primitivo, disartria, apreensão e sinais piramidais, danos os quais podem permanecer por toda a vida. Após vários anos depois do acidente de Minamata no Japão, ainda é possível observar a

deteriorização psicomotora e deficiências neurológicas entre idosos ex-trabalhadores (SATO et al., 2013; WHO, 2007).

Os efeitos do MeHg no SNC evidenciados pela Doença de Minamata mostram que os cérebros em desenvolvimento são mais afetados do que os adultos, devido a prejuízos nos processos de formação de microtúbulos, migração neuronal e divisões celulares. Quanto mais precoce a exposição do organismo ao MeHg, maior será a magnitude dos danos nos processos de neurogênese e organogênese (SAKAMOTO, et al., 2013; SATO et al., 2013; ASCHNER et al., 2007). Em estudo sobre a contaminação na gestação, foi evidenciado que a concentração de MeHg é maior no cordão umbilical do que na placenta, indicando maior toxicidade para a criança (SAKAMOTO, et al., 2013).

A apresentação clínica da intoxicação mercurial em crianças nascidas após contaminação em vida fetal assemelha-se ao quadro de paralisia cerebral grave, com atrasos significativos de desenvolvimento, cegueira, surdez, permanência de reflexos profundos e alterações de tônus muscular (WHO, 2007). As áreas cerebrais mais afetadas são aquelas responsáveis por: linguagem, atenção e memória, noção visual-espacial e motora. Além desses comprometimentos, foi observado também em crianças iraquianas: doença mental, atrasos no desenvolvimento neuropsicomotor e alterações nas funções sensoriais (GONZÁLEZ-ESTECHA et al., 2014).

O efeito mais devastador do MeHg acumulado nos tecidos nervosos é a interferência na produção de energia que pode prejudicar os processos de descontaminação celular causando morte ou disfunção celular crônica. O MeHg causa problemas neuronais através do bloqueio do processo enzimático da célula causando estresse oxidativo que aumenta o dano aos tecidos nervosos. A nível estrutural, podem haver prejuízos à síntese de tubulina e actina, proteínas constituintes importantes na estrutura celular e nos processos neuronais de desintoxicação (KAZANTZIS et al., 2002).

A neuropatia sensorial primária é uma forte característica da intoxicação por MeHg. A nível de SNC é capaz de adentrar através de dano na barreira hematoencefálica e os efeitos incluem: depressão, paranoia, irritabilidade extrema, alucinações, dificuldade de concentração, perda de memória, tremores das mãos, da cabeça, de lábios, língua, mandíbula e pálpebras, perda de peso, baixa temperatura corporal, sonolência, dores de cabeça, insônia e fadiga (WU et al., 1985).

Outros efeitos sensoriais também já foram descritos incluindo: cegueira, retinopatia, neuropatia ótica, perda da audição e redução da capacidade olfativa e gustativa (WU, et al., 1985). Há a hipótese de que a contaminação por MeHg possa causar prejuízos comportamentais em relacionamentos sociais, funções de linguagem e comunicação, sugestivos do quadro clínico das síndromes do espectro do autismo (BHARDWAI et al., 2009; SOLT et al., 2010).

Muitos são os efeitos já descritos do MeHg, o mecanismo molecular envolvido nessa toxicidade bem como de outros metais pesados, está também relacionado com a produção de estresse oxidativo, seja através da redução de defesas antioxidantes e/ou da geração de EROs, (WANG et al, 2004) ocasionando danos em lipídeos, proteínas e DNA (GOERING et al, 2002).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

A geração de radicais livres trata-se de um processo contínuo e fisiológico, importante para a homeostase. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons; ativação de genes; e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. Porém, a produção excessiva pode causar danos por estresse oxidativo (SHAMI e MOREIRA, 2004; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (SHAMI e MOREIRA, 2004; BIANCHI e ANTUNES, 1999).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

A cronicidade do processo em questão tem relevantes implicações sobre o processo etiológico de numerosas enfermidades crônicas não transmissíveis, entre elas a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (GREEN et al., 2004).

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Tais mecanismos podem, especialmente, ser favorecidos pelos íons ferro e cobre (KOURY e DONANGELO, 2003). A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres (GREEN et al, 2004).

Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio (O_2) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Os restantes 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, ainda, por reações químicas de oxidação direta (SCHEINDER e OLIVEIRA, 2004).

Na mitocôndria, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase. Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, a referida enzima oxida quatro moléculas de citocromo C removendo um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são adicionados ao O_2 para formar água. A ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres (SCHEIDER e OLIVEIRA, 2004; KOURY e DONANGELO, 2003; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Em face da redução univalente do O_2 são gerados os radicais superóxido (O_2^\bullet), hidroxila (OH^\bullet) e, ainda, peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esse processo se dá mediante reações específicas, catalisadas por enzimas e com a participação dos íons ferro e de cobre. O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo. Por participar da reação de geração de OH^\bullet tem ação deletéria potencial, uma vez que esse se constitui no mais reativo dos radicais livres, pois pode alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima. Diferente dos radicais livres, o H_2O_2 tem vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxico para as células. Esta toxicidade pode ser aumentada em dez mil vezes pela

presença de ferro (SCHEIDER e OLIVEIRA, 2004; FERREIRA e MATSUBARA, 1997)

Além da capacidade do $O_2\bullet$ em participar de reações de geração de $OH\bullet$, pode ainda, por meio da reação com o radical livre óxido nítrico ($NO\bullet$), gerar a espécie reativa de nitrogênio, peroxinitrito ($ONOO$), também potencialmente reativa (GREEN et al., 2004).

Os íons ferro e cobre são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os capacitam como potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres. A participação desses metais se dá, especialmente, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss. A primeira diz respeito à geração de radical $OH\bullet$, por meio da reação do H_2O_2 com os íons em questão, ao passo que, na segunda, estes íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o radical $O_2\bullet$, a fim de gerar, da mesma forma, o radical $OH\bullet$ (SCHEIDER e OLIVEIRA, 2004; KOURY e DONAGELO, 2003).

2.2.1 Sistema de defesa antioxidante

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicaais (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (KOURY e OLIVEIRA, 2004).

Didaticamente, esse sistema é dividido em enzimático e não-enzimático. No último caso, é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética. Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não-radicaais, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

2.2.1.1 Enzimático

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicaais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (SCHEIDER e OLIVEIRA, 2004; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

As enzimas CAT e GPx agem com o mesmo propósito, ou seja, o de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical OH•, contra o qual não há sistema enzimático de defesa (SCHEIDER e OLIVEIRA, 2004; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O referido radical (OH•) vem sendo indicado como o de maior potencial reativo e com extrema instabilidade (vida média de 10⁻⁹ segundos). Essas características os capacitam como o radical livre mais propício na produção de danos oxidativos. Além de ser o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, tendo como consequência a alteração da função biológica das membranas celulares, esse radical é capaz de agir sobre as proteínas, alterando-as em relação à sua estrutura e/ou função biológica. Seu ataque ao DNA possibilita a ocorrência de mutações e possíveis alterações importantes no ciclo celular (WELCH et al, 2002).

Considerando a potencialidade do radical OH• e o fato da não existência de defesa enzimática especializada, é de extrema importância a manutenção do perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes, com o propósito de promover a manutenção da integralidade celular. Assim, a GPx merece atenção especial, uma vez que sua ação depende da manutenção do ciclo redox da glutathione, por meio do controle da relação entre glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (SCHEIDER e OLIVEIRA, 2004; ROVER et al., 2001; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A atividade das enzimas em questão muitas vezes depende da participação de cofatores enzimáticos, especialmente antioxidantes de origem dietética. Tais cofatores podem diferir de acordo com os compartimentos celulares de ação das enzimas. A SOD pode ser encontrada sob duas formas: no citoplasma, é dependente de cobre e zinco (SOD-Cu/Zn), enquanto na mitocôndria, necessita do manganês como cofator (SOD-

Mn). A GPx também existe sob duas formas: dependente e independente de selênio e pode apresentar-se no citoplasma ou na mitocôndria (GREEN et al., 2004).

2.2.1.2 Químico ou não-enzimático

O sistema de defesa não-enzimático inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol e β -caroteno, precursores das vitaminas E e A, respectivamente, são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes. Outros carotenóides sem atividade de vitamina A, como licopeno, luteína e zeaxantina, também o são. Entre os minerais destacam-se o zinco, cobre, selênio e magnésio (PRASAD et al., 2007).

A instalação do estresse oxidativo se dá por meio de um desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos primeiros. O sistema de defesa antioxidante tem o objetivo primordial de manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo que os danos oxidativos se amplifiquem, culminados em danos sistêmicos irreparáveis. Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, sobretudo, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma (PRASAD et al., 2007; SCHEIDER e OLIVEIRA, 2004).

2.3.1 Testes antioxidantes *in vitro*

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (RAMALHO, 2006)

Estes testes têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos, auxiliando os pesquisadores na avaliação da atividade de substâncias isoladas de produtos naturais, bem como obtidas de fontes sintéticas. Além disso, estes métodos podem auxiliar na escolha das espécies de planta para estudos químicos e farmacológicos, bem como grau de maturação, condições ambientais e comprovar a presença de substâncias antioxidantes em alimentos como frutas, legumes e bebidas, ressaltando a importância de uma dieta rica em vegetais (ALVES et al., 2010). Segundo Halliwell et al., (1992)

um composto que exibe atividade antioxidante *in vitro* provavelmente exibirá atividade *in vivo*.

Para este estudo foi escolhido o método de avaliação *in vitro* do teste do radical superóxido ou xantina oxidase.

2.3.1.1 Sequestro de radical superóxido - xantina oxidase

A produção do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), uma espécie reativa de oxigênio, é essencial para a defesa de organismos vivos e atua na transferência de sinais entre células vivas. Entretanto, a superprodução de $O_2^{\bullet-}$ causa estresse oxidativo e está envolvida em diversas patologias como Doença de Parkinson e degeneração macular (BORDINEAUD et al., 2007; KAMO et al., 2004)

Xantina oxidase (XO) é a enzima responsável pela transformação tanto da hipoxantina em xantina, quanto desta em ácido úrico, tendo como consequência a produção de peróxido de hidrogênio e radical superóxido, por isso é considerada uma das principais fontes biológicas de espécies reativas de oxigênio. Assim, é possível que a inibição deste processo enzimático por compostos que exibem propriedades antioxidante ou inibitória da xantina oxidase possam ter uso terapêutico (DEW et al., 2005; RAO et al., 2003).

A atividade de um grande número de substâncias pode ser medida em termos da atividade sequestradora do radical superóxido ou através da inibição da ação da xantina oxidase. O $O_2^{\bullet-}$ pode ser gerado por distintos sistemas enzimáticos, entre eles a reação catalisada pela enzima xantina oxidase, ou pelo sistema não enzimático através da reação de metassulfato de fenazina (PMS) com NADH e oxigênio molecular (ALVES et al., 2010; RAO et al., 2003).

2.3.2 O MeHg como causador de estresse oxidativo

A toxicidade do MeHg parece estar associada também aos seus efeitos pró-oxidantes e, conseqüentemente, a sua capacidade de contribuir para a geração de EROs, como o radical hidroxil (OH^{\bullet}), o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BRANDÃO et al., 2008).

Além de promover o aumento da produção de EROs, a exposição ao MeHg também pode ocasionar alterações no sistema de defesa do organismo ao reduzir os níveis enzimáticos das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona redutase (GR) e glutathiona peroxidase (GPx), como também da glutathiona (GSH), contribuindo para o estresse oxidativo em variados tipos celulares de diferentes tecidos (RIBAROV & BENOVA, 1981).

Os vários mecanismos de toxicidade do MeHg no SNC dentre os quais a formação de radicais livres, a peroxidação lipídica, alterações do cálcio e homeostase dos radicais sulfidrilo causam prejuízos às funções cerebrais, como por exemplo os mecanismos envolvidos na memória e aprendizado, e função motora (NASCIMENTO, et al., 2008). As alterações causados por MeHg no SNC podem ocasionar problemas relacionados ao comportamento animal. Regiões cerebrais, como por exemplo o hipocampo podem ser afetadas. Dessa forma aprendizado e retenção de memória de curta e longa duração podem ser afetados pela exposição ao MeHg.

2.4 MEMÓRIA E APRENDIZADO

Aprendizagem é o processo através do qual nós adquirimos conhecimento sobre o mundo. Já a memória é o processo pelo qual o conhecimento é codificado, retido e posteriormente, recuperado. A aprendizagem molda o comportamento, sendo esta uma função encefálica, onde qualquer disfunção dá origem a distúrbios característicos do comportamento (LENT, 2002; KANDEL, 2000).

Memória é a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações (IZQUIERDO et al., 2002), esta não é estática, isolada ou única função do cérebro; ela pode ser mais bem descrita como uma complexa rede com diferentes funções inter-relacionadas que trabalham juntas para gerenciar informações. Sendo definida como a capacidade de um organismo alterar seu comportamento em decorrência de experiências prévias. Do ponto de vista fisiológico, essa capacidade é resultado de modificações na circuitaria neural em função da interação do indivíduo com o ambiente (LENT, 2002; KANDEL, 2000).

A memória pode ser de Curta Duração (operacional), baseada na atividade elétrica dos neurônios e, assim, suscetível a interferências; ou de Longa Duração, representada

por alterações estruturais dos neurônios, particularmente nas sinapses com outros neurônios, podendo ser subdividida em explícita e implícita. A informação de como realizar determinada tarefa se denominou memória implícita (também chamada de não-declarativa), esta é recordada inconscientemente, a qual requer treinamento de habilidades reflexas motoras ou perceptuais. Possui formas elementares de aprendizagem: habituação, sensibilização e condicionamento clássico. Já o conhecimento factual de pessoas, lugares e coisas, e o que esses fatos significam, é chamado de memória explícita (ou declarativa). Esta é recordada por um esforço consciente, deliberado. O psicólogo Endel Tulving idealizou que ela se dividiria em dois ramos: a episódica, a qual seria usada em casos de eventos e experiências pessoais; e a semântica, uma memória para fatos. A memória explícita, tanto a semântica quanto a episódica, é resultado de no mínimo quatro processos distintos, porém, relacionados entre si: codificação, consolidação, retenção e acesso (IZQUIERDO et al., 2002).

A aplicabilidade dessa diferença entre memórias pode ser ressaltada analisando um caso de uma pessoa com uma doença neurológica. Quando esta pretende adquirir uma nova habilidade, como por exemplo, andar de bicicleta, a aquisição envolveria o treinamento repetitivo e atingiria regiões nervosas intactas. Assim, embora que a pessoa adquira essa habilidade, ela não é capaz de se recordar “que” já a praticou. Ou seja, a natureza da informação “saber que” é diferente da natureza da informação sobre “saber como” (HELENE e XAVIER, 2007). As memórias “saber como” são atualmente denominadas memórias implícitas (o que faz bastante sentido, pois é muito difícil declarar como se anda de bicicleta), e “saber que” são denominadas memórias explícitas (LENT, 2002).

Há vários tipos de retenção de memória, e certas regiões do encéfalo são muito mais importantes para alguns tipos de retenção que outros. O hipocampo (e outras estruturas do lobo temporal medial) é fundamental para a reverberação da atividade neural, que leva ao arquivamento de informações sobre experiências vividas. Essa reverberação seria essencial para o arquivamento das informações sobre “o que” ocorreu, mas não sobre “como” desempenhar uma tarefa percepto-motora (LENT, 2002).

Dados obtidos através de estudos de imagem funcional (GOLBY et al., 2002) apontam a participação do hipocampo no processamento de informações novas. Ao comparar a intensidade de ativação hipocampal entre estímulos novos e estímulos repetidos observa que à medida que o estímulo se torna familiar, a ativação do

hipocampo diminui o que aponta a participação deste no processo de aprendizado. Os estudos com animais demonstram a grande importância do sistema hipocampal na memória espacial de roedores (EICHENBAUM, 2002).

2.4.1 Avaliação da memória e comportamento em ratos

Em virtude da complexidade funcional do sistema nervoso, dos eventos neurotóxicos de natureza múltipla, da variabilidade e inacessibilidade dos sítios celulares e ainda dos efeitos tardios das substâncias tóxicas, os recursos para a avaliação de efeitos neurotóxicos são limitados, nesse sentido o parâmetro neurocomportamental é considerado importante. Muitos testes comportamentais são aplicados para avaliação de alterações de funções cognitivas, como, por exemplo, aprendizagem e memória (MANZO, 1995; AMORIM, 2003).

Os testes de comportamento animal destinam-se à avaliação da neurotoxicidade de compostos em laboratório. Há um grande número de métodos disponíveis para o rastreamento de comportamento e caracterização dos efeitos neurotóxicos, sendo a avaliação da atividade motora apropriada para a triagem inicial de neurotoxicidade. Embora os métodos de avaliação da atividade motora constituam uma abordagem racional de rastreamento primeiro nível, há uma série de importantes funções, como a memória, a aprendizagem, a atenção, o comportamento social e a resposta sensorial que também são importantes nas metodologias de análises comportamentais (KULIG, 1996).

O efeito inibitório do MeHg na locomoção tem sido extensivamente reportado. De acordo com diversos estudos experimentais, a exposição ao MeHg está relacionada a déficits na locomoção e coordenação motora (GIMENEZ-LLORT et al., 2001). Em estudos prévios do nosso laboratório, camundongos adultos apresentaram danos motores após exposição oral ao MeHg (DIETRICH et al., 2005). Um estudo realizado por Franco e colaboradores (2006) mostrou que camundongos expostos ao MeHg no período lactacional apresentaram significativo prejuízo motor (Teste do rotarod) e uma redução da atividade locomotora (Teste do campo aberto)

Diversos estudos apontam para o MeHg como um poderoso agente neurotóxico, que afeta principalmente as células do cerebelo (MURAKAMI, 1972; CHANG et al., 1981), região do cérebro responsável por diversas atividades relacionadas ao equilíbrio, coordenação motora, manutenção da postura e reações de endireitamento (GOWEN e MIALL, 2007). Alguns estudos em roedores mostram danos ou desenvolvimento

anormal do cerebelo após tratamento com MeHg (CHANG et al., 1977; CHOI et al., 1981).

Alguns trabalhos já descreveram a importância de se utilizar extratos de plantas como alternativa para tratamento de disfunções causadas pela toxicidade do MeHg (LUCENA et al., 2007; FARINA et al., 2005; KUMAR et al., 2012; NWOKOCHA et al., 2011; ABDALLA et al., 2011; MOHAMED et al., 2014; EUDES FILHO, 2014;). Este trabalho buscou investigar os efeitos de *Plathymenia reticulata* enquanto extrato aquoso mediante contaminação por MeHg através dos testes comportamentais Labirinto em Y, Caixa Claro-escuro e Rota-rod e ainda pela dosagem de Hg nos órgãos dos animais.

2.5 PLATHYMENIA RETICULATA

2.5.1 Características gerais

O gênero *Plathymenia* foi descrito pela primeira vez por Betham em 1842, com duas espécies observadas: *Plathymenia reticulata* Benth e *Plathymenia foliosa* Benth. (FERNANDES, 2002). No entanto, segundo descrição realizada por Lewis e Warwirc, (2003) essas duas espécies foram consideradas sinônimas, sendo que na catalogação, apenas a denominação *Plathymenia reticulada* tornou-se reconhecida.

Plathymenia reticulata é uma espécie decídua, heliófita e seletiva xerófita, característica de formações abertas de cerrado e de sua transição para as florestas. (LORENZI, 1998). Conhecida popularmente como acende-candeia, pau-candeia, vinhático do campo, pau-amarelo entre outras (FERNANDES et al., 2005; ALMEIDA et al., 1998). *P. reticulata* é classificada como uma das espécies vegetais mais importantes do Cerrado devido sua madeira de alta qualidade e potencial de utilização para recuperação de áreas degradadas (FERNANDES et al., 2002; BRAGA et al., 2007).

Essa espécie arbórea é da família leguminosae e da sub-família mimosoideae, tribo mimosae. O gênero *Plathymenia* é exclusivo da América do Sul, sendo característica do cerradão e cerrado. A planta se adapta a terrenos pobres, em campo apresenta um crescimento satisfatório de 4,4 metros de altura (ALMEIDA et al., 1998).

A árvore de *P. reticulata* floresce entre os meses de dezembro a janeiro e seus frutos ficam maduros entre julho e agosto. É uma árvore que chega até 12 metros de altura com tronco de 30-50cm de diâmetro, retilíneo e amarelado. As folhas são compostas, bipinadas. A madeira é leve, fácil de trabalhar e com alta resistência aos organismos xilófagos. Apresenta dispersão irregular e descontínua, ocorrendo em densidades moderadas em determinadas áreas e ausente em outras. Ocorre preferencialmente em terras altas e com drenagem (LORENZI, 1998).

É também uma árvore ornamental, empregada em paisagismo e marcenaria e empregada na construção civil na confecção de lambris, rodapés, batentes de portas, esquadrias dentre outras peças (LORENZI, 1998). A casca do tronco fornece tinta amarela para ser usada em tinturaria, suas flores e frutos compõem arranjos denominados "flores do planalto" (ALMEIDA et al., 1998) (Figura 1).

Segundo o Instituto Brasileiro de Pesquisas Agropecuárias – EMBRAPA, *P. reticulata* possui distribuição heterogênea tanto nacionalmente, em quinze estados (Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato-Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo), quanto internacionalmente, representada nos países: Argentina, Bolívia e norte do Paraguai (Figura 2).

P. reticulata é uma espécie de crescente interesse medicinal que apresenta uso popular, principalmente no tratamento de doenças inflamatórias, infecções e hemorragias. (SILVA, 2014). Estudos anteriores abordam as atribuições do extrato obtido da casca da planta nas atividades antibotrópica (SILVA, 2014; MOURA et al, 2013; FARRAPO et al, 2011; DELLA TORRE et al., 2011) e antimicrobiana *in vitro* (FERNANDES et al., 2005; TOLEDO et al., 2011).

No município de Santarém, *P. reticulata* foi a espécie mais citada por moradores de comunidades do município como recurso no tratamento de inflamações, infecções e na preparação de banhos de asseio (ASSUNÇÃO, 2011).



Figura 1: Árvore de *Plathymenia reticulata*. Fonte: Anzai et al, 2014



Figura 2: Distribuição da ocorrência natural de *P. reticulata* no Brasil.
Fonte: Embrapa Florestas

2.5.2 Composição química de *P. reticulata*

A composição química da espécie (casca e madeira) indica que seu conteúdo químico origina-se do mecanismo geral de todos os metabólitos dos vegetais. A constituição inclui: flavonoides (FERNANDES et al., 2005), terpenos (LEAL et al., 2003) taninos e ácidos fenólicos (FARRAPO et al., 2011; MOURA et al., 2013), antocianinas e saponinas (ASSUNÇÃO, 2013).

2.2.2.1 Flavonóides

Os flavonóides são substâncias distribuídas na natureza importantes pelo efeitos biológicos de atividade antimicrobiana e efeito benéfico no sistema cardiovascular (MARTINI et al., 2004; FERNANDES et al., 2005).

Os flavonóides são compostos fenólicos, cuja síntese não ocorre em seres humanos. A maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos (FERNANDES et al., 2005; SIMÕES et al., 2007). Nas plantas apresentam-se, frequentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares, com ampla variação em sua estrutura. Nos vegetais, esses compostos aromáticos desempenham o papel de bloqueadores da radiação ultra-violeta, além de atuar na pigmentação das espécies (SIMÕES et al., 2007).

Em humanos e animais, os flavonóides apresentam efeitos potenciais como antioxidantes, anti-inflamatórios, protetores cardíacos, analgésicos, antialérgicos, antitumorais, antidiabéticos, cicatrizantes, entre outros (FERNANDES et al., 2005; SIMÕES et al., 2007).

2.2.2.2 Taninos

Os taninos são considerados uns dos produtos naturais mais importantes das plantas. Possuem peso molecular entre 500 e 3000 daltons, são solúveis em água e consistem em polifenóis caracterizados pela capacidade de formarem complexos com

macromoléculas, como proteínas e alcaloides (SHAHAT & MARZOUK, 2013). A capacidade de precipitação de proteínas caracteriza o sabor adstringente dos taninos, sendo essa propriedade relevante para a proteção dos vegetais frente aos ataques de patógenos e herbívoros (MADHAN et al., 2005).

Os taninos são substâncias fenólicas e hidrossolúveis, capazes de inibir o desenvolvimento de insetos, fungos e bactérias (FERNANDES et al., 2002). São compostos facilmente oxidáveis, tanto por meio de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções (MONTEIRO et al., 2005).

Além de serem substâncias diretamente envolvidas na adequação da planta em seu meio, os taninos também apresentam atividades biológicas, tais como: atividades antioxidantes, gastroprotetora, anti-inflamatórias, antialérgicas, anti-hipertensiva e antimicrobiana (ROMANI et al., 2006).

Na medicina popular, plantas ricas em taninos são empregadas no tratamento de diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais e processos inflamatórios (ASSUNÇÃO, 2013). Os taninos podem ainda apresentar atividade anticarcinogênica (CHUNG et al., 1998) e atuar como inibidores de transcriptase reversa em HIV e como captadores de radicais livres, demonstrando importância no potencial antioxidante (MONTEIRO et al., 2005).

Simões et al., (2007) atribuiu as atividades farmacológicas dos taninos a três ações: complexação com macromoléculas, complexação com íons metálicos e atividade antioxidante.

2.2.2.3 Antocianinas

As antocianinas consistem em pigmentos naturais dos vegetais pertencentes ao grupo dos flavonóides e têm função de atrair polinizadores e dispersores de sementes e proteger os tecidos vegetais (EIBOND et al., 2004). Há um crescente interesse no uso de antocianinas em diversos segmentos, tais como a indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, sendo apresentados muitos benefícios na medicina tradicional em virtude de suas atividades biológicas, que incluem a atividade antioxidante, anti-inflamatória, inibição do LDL, diminuição dos riscos vasculares e câncer (CHANG et al., 2006;

CHEN et al., 2006; TOUFEKTSIAN et al., 2008; GARCIA-ALONSO et al., 2009; XIA et al., 2009).

2.2.2.4 Saponinas

As saponinas consistem em glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos que apresentam parte de sua estrutura com caráter lipofílico (triterpeno ou esteróide) e outra hidrofílica (açúcares), sendo essa característica estrutural responsável pela propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes e emulsificantes (SCHENKEL et al., 2001).

As ações biológicas variadas das saponinas estão relacionadas com o comportamento anfifílico e a capacidade de formar com complexos esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membranas que podem levar a mudanças na permeabilidade ou até mesmo levar a destruição celular, sendo as atividades hemolíticas, ictiotóxica e molusquicida estão relacionadas com esta ação sobre as membranas (SCHENKEL et al., 2001). Esses compostos são importantes para a ação de drogas vegetais, destacando-se o uso tradicional como expectorantes e diuréticas (SIEDENTOPP, 2008).

Considerando a importante participação de EROs na toxicidade induzida por Hg e a conhecida capacidade antioxidante de compostos de plantas, inclusive os flavonóides, o objetivo deste estudo foi investigar os possíveis efeitos protetores do extrato aquoso da planta *P. reticulata* contra a toxicidade induzida por MeHg em ratos. Estudos que busquem elucidar mecanismos de proteção à intoxicação por este metal são de grande importância, especialmente para a região amazônica onde a população é frequentemente exposta ao MeHg através da dieta rica no consumo de peixes. A exposição de níveis abaixo dos permissíveis porém de forma contínua ainda não possui evidências bem elucidadas na literatura, porém, é conhecido que a exposição crônica traz consequências a diversos sistemas já descritos acima. Neste sentido, a ingestão do extrato aquoso de *P. reticulata* pode contribuir para a redução de possíveis efeitos deletérios da contaminação pelo MeHg.

3 OBJETIVOS

3.3 Objetivo Geral:

- ✓ Avaliar o efeito do extrato aquoso de *P. reticulata* na toxicidade induzida por MeHg em ratos.

3.4 Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar o efeito do extrato aquoso de *P. reticulata* sobre a memória e aprendizagem em ratos contaminados com MeHg;
- ✓ Avaliar a concentração de Hg total acumulada em fígado, rins, cérebro e cerebelo pré e pós tratamento com *P. reticulata*;
- ✓ Avaliar *in vitro* a capacidade antioxidante do extrato aquoso de *P. reticulata*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.3 Animais

Neste trabalho foram utilizados um total de 48 animais, subdivididos em 8 grupos experimentais de 6 animais cada. Foram selecionados ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, fornecidos pelo Biotério do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental da Universidade Federal do Oeste do Pará - Labbex.

Foram utilizados ratos cujo peso variou entre 150 e 250g ao serem administrados com MeHg. Os animais foram colocados em gaiolas de polipropileno e mantidos em condições de laboratório a $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, com ciclo de 12h claro/ 12h escuro, tendo livre acesso a água e ração. Foram realizados experimentos, como a administração do MeHg e do extrato aquoso da *P. reticulata* e, posteriormente a este período, foram executados testes experimentais, eutanásia e coleta de material biológico para análises.

Todos os procedimentos obedeceram aos princípios éticos da manipulação animal, de acordo com as normas e princípios do uso de animais de experimentação em pesquisa da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (COBEA) e com aprovação fornecida pelo Comitê de Ética para utilização de animais de experimentação da Universidade Federal do Oeste do Pará conforme o protocolo nº 03002/2015.

4.4 Preparo da solução de MeHg

A solução de MeHg foi preparada no Laboratório de Biologia Experimental e Bioprospecção da Universidade Federal do Oeste do Pará. Foi feita uma solução de cloreto de MeHg (SIGMA) preparada na concentração de 4mg/ml em água destilada. Para facilitar a diluição do MeHg em água a solução foi agitada em vortex até dissolução total do MeHg.

4.5 Extrato aquoso de *P. reticulata*

Cascas de *P. reticulata* foram coletadas em março de 2012 nas proximidades da comunidade Cucurunã, Santarém Pará, Brasil (02°26' 53,9" S e 54°47'05" O). Exsiccatas da espécie encontram-se depositadas no Herbário da Embrapa Amazônia Oriental/Belém, sob o código IAN: 185215.

As cascas foram desidratadas a 40 °C (Licit LC–E80, Revest Arc) e pulverizadas em moinho de facas. O extrato aquoso foi preparado a partir de 50 g do pó das cascas de *P. reticulata* com 250 mL de água destilada por 2 horas sob agitação constante de 1.250 rpm a 70°C ± 5. O extrato obtido foi filtrado em papel filtro qualitativo (14 µm), liofilizado (Liotop L 101, Liobras) e determinado como extrato aquoso de *P. reticulata* (EAPr).

4.6 Grupos experimentais e administração de MeHg e *P. reticulata*

A administração do extrato aquoso, da solução de MeHg e da água ocorreu por gavagem conforme os grupos (n=6) abaixo.

- ✓ Grupo 1: Água
- ✓ Grupo 2: *P. reticulata* 60mg/Kg
- ✓ Grupo 3: *P. reticulata* 120mg/Kg
- ✓ Grupo 4: *P. reticulata* 240mg/Kg
- ✓ Grupo 5: *P. reticulata* 60mg/Kg + Metilmercúrio 4mg/Kg
- ✓ Grupo 6: *P. reticulata* 120mg/Kg + Metilmercúrio 4mg/Kg
- ✓ Grupo 7: *P. reticulata* 240mg/Kg + Metilmercúrio 4mg/Kg
- ✓ Grupo 8: Metilmercúrio 4mg/Kg.

Os animais receberam primeiramente a dose do extrato e após 1h receberam MeHg.

4.7 Análise da variação de massa corporal

Para análise da variação de massa corporal, os animais foram pesados diariamente, durante os 21 dias de tratamento. O ganho de peso dos animais foi

calculado semanalmente (nos dias 1, 7, 14 e 21). Os resultados foram expressos em percentual de ganho. O dia 0 foi considerado como parâmetro do peso inicial.

4.8 Testes comportamentais

Após período de administração do extrato aquoso de *P. reticulata* e MeHg conforme os grupos experimentais citados, foram aplicados os seguintes testes comportamentais: Rota-Rod (Barra Giratória), Caixa Claro-Escuro (Esquiva Passiva) e Labirinto em Y. Para todos os testes foram mantidas condições adequadas de luz, temperatura e ausência de ruído na sala de experimentos.

4.8.1 Teste do Labirinto em Y

Para a avaliação da memória de curta duração em ratos, utilizou-se o teste do labirinto Y, proposto por Montgomery (1958). O labirinto consiste em uma estrutura de madeira, em formato de Y, com um braço com 34 cm de comprimento (A) e os outros dois braços iguais medindo 43 cm de comprimento (B e C), tendo todos os três braços 10 cm de largura e paredes com 34 cm de altura (Figura 3). Para realização do teste, tomou-se o braço mais longo como ponto de partida dos animais, que foram deixados livres para caminhar pelo labirinto durante 8min, registrando-se a sequência de entradas nos braços.

As informações foram analisadas para determinar o número de entradas sem repetições a cada tríade que representava as entradas dos animais nos três braços. O sucesso do teste foi indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço eles entraram por último. O resultado será obtido através da seguinte fórmula matemática (percentual de alternância = n° de acertos/total de entradas -2). Entre cada sessão, o labirinto será higienizado com uma solução de álcool a 20% e secado com toalhas de papel.



Figura 3 – Dispositivo usado para o Teste do Labirinto em Y. Foto: Juliana.

4.8.2 Teste da Caixa Claro-Escuro

O Teste da Caixa Claro-Escuro é um modelo experimental de esquiva passiva utilizado para a avaliação da memória aversiva. A realização deste teste tem o objetivo de avaliar a memória aversiva dos animais, baseado na aversão natural dos roedores a áreas iluminadas e no comportamento exploratório habitual (DENOBLE *et al.* 1986).

A caixa é composta por uma arena em acrílico (46 x 27 x 30cm de altura) dividida em dois compartimentos: o maior (31 x 27 x 30 cm) branco e iluminado diretamente por uma lâmpada fluorescente (fria) de 20 W e o menor (15 x 27 x 30 cm) preto e dotado de tampa. Os dois compartimentos são separados por uma placa de acrílico preta de 27 x 30cm (base x altura) com uma abertura de 7,5 x 7,5cm localizada no centro, possuindo um fundo formado por barras, ligadas a um dispositivo eletrônico para liberação de choque.

No primeiro dia de testes foi realizado um treinamento, onde cada animal foi colocado individualmente no centro do compartimento claro. No momento em que ocorreu a transição do compartimento claro para o escuro, definida como a passagem das quatro patas do animal pela divisória, o animal recebeu um choque de 2 mA, durante 2 s, para demonstrar que o ambiente escuro não era seguro.

A retenção do aprendizado foi testada após 24h, quando os animais foram colocados no compartimento claro por um período máximo de 5 minutos e o tempo de latência para a entrada no escuro foi registrado (os animais nesta fase não levarão choque), sendo avaliada desta forma a memória tardia dos animais.



Figura 4 – Teste da Caixa Claro-escuro. Animal localizado no compartimento claro do dispositivo. Foto: Ana Paula.

4.8.3 Teste da barra giratória

O teste da barra giratória (Rota-Rod) foi proposto por Dunham e Miya (1957), sendo apropriado para detectar a ação de agentes farmacológicos sobre a coordenação motora dos animais. O aparelho de Rota-rod é constituído de uma barra giratória, não escorregadia, com 45 cm de altura, 54 de largura e 35 de comprimento; dividida em quatro compartimentos iguais, sendo um aparelho motorizado, possuindo uma velocidade regulável em rotações por minuto (r.p.m.) (Figura 5).

Nesse teste utilizou-se o equipamento RotaRod (EFF 411 Insight ®) para avaliar a coordenação motora dos animais. Para que ocorresse a habituação e aprendizado, inicialmente foi realizado um treino com grupos que foi dividido em três séries de dois minutos com velocidade de 10r.p.m.. Após 24h, na mesma velocidade de rotação, o teste foi realizado registrando-se o tempo de permanência de cada animal sobre o aparelho, por no máximo 2 minutos.



Figura 5 – Teste da Barra Giratória (Rota-Rod). Foto: Juliana.

4.9 Procedimentos de eutanásia e coleta de material biológico

Após o período de administração do MeHg, dos extratos aquosos de *P. reticulata* e de realização de todos os testes comportamentais, os animais foram anestesiados para realização de coleta de sangue (segundo as normas de experimentação cirúrgica em animais da COBEA) e posterior retirada de fígado, rins e encéfalo. As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas para separação do soro e os órgãos foram devidamente tratados e lavados com solução fisiológica a 0,9%, sendo então armazenados para posterior análise.

4.9.1 Coleta dos órgãos

Para determinação da concentração de Hg total, os animais foram eutanasiados e, após a coleta de sangue, realizou-se a lavagem dos órgãos com solução salina. O cérebro, o fígado e os rins foram retirados, acondicionados em frascos e mantidos sob refrigeração à -2°C para conservação e posterior análise.

4.9.2 Determinação do Hg total

Para análise de Hg total nos órgãos e no sangue dos animais, foi utilizado um Espectrofotômetro de Absorção Atômica disponível comercialmente como Direct Mercury Analyzer DMA-80 (Milestone Srl – Sorisole (BG), Italy).



Figura 6 – Equipamento utilizado para medidas de Hg. Foto: Juliana.

4.9.3 Teste de sequestro do radical superóxido

Neste trabalho, foi também realizada avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato de *P. reticulata* através do Teste de Sequestro do radical superóxido conforme o protocolo em Anexo I.

O teste inclui radicais superóxido na presença de um indicador, o Nitroblue tetrazolium (NBT), que fica azul quando é reduzido pelo radical superóxido. A geração de radicais superóxido *in vitro* envolve oxidação do cofator NADH pelo cátion metossulfato de fenazina (PMS), reduzindo o NBT oxidado até se obter o NBT de coloração azul.

Quando os antioxidantes são adicionados ao meio de reação, eles competem com NBT em reagir com o radical superóxido e assim exercer uma inibição competitiva pela redução do NBT. Uma vez que os compostos de polifenóis podem neutralizar o radical superóxido, a extensão da redução do NBT será diminuída; por conseguinte, a porcentagem de inibição da redução do NBT é uma medida eficaz de compostos de potencial antioxidante testados.

Este teste foi realizado em três etapas: preparo das soluções-tampão, preparo das soluções reagentes e leitura das amostras.

As soluções-tampão foram preparadas adicionando-se fosfato de sódio monobásico na proporção de 1mol/L para 100mL, em seguida foi diluída em 10 vezes para que a concentração da solução se estabelecesse em 0,1 M. O mesmo foi feito para se fazer uma solução de fosfato de sódio dibásico. Em seguida, as duas soluções foram misturadas na proporção cada uma de 10mL para 90mL de água destilada e a solução foi colocada no aparelho medidor de pH mPA210 MS Tecnopon Instrumentação® para que se atingisse um pH de 7,4 e por fim armazenada em tubo falcon de 50mL.

As quatro soluções reagentes foram preparadas nas seguintes proporções e concentrações: 1- 30,7mg de NBT e 10mL do tampão de fosfato de sódio a 7,4 de pH; 2 - solução de NADH adicionada de 10mL do tampão de fosfato de sódio a 7,4 de pH; 3 – 9,2mg de PMS em 40mL de tampão de fosfato de sódio a 7,4 de pH (esta solução foi protegida da luz, devido a Fenazina ser fotorreagente) e 4 – 0,01g de extrato de *P. reticulata* diluído em 1mL do tampão de fosfato de sódio a 7,4 de pH.

De cada solução foi transferido 1mL para tubos de eppendorf para serem usados nos testes e mantidos em recipiente com gelo.

Foi feita a diluição da solução estoque do extrato de *P. reticulata* de 1mg/mL para as concentrações utilizadas no trabalho (5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL e 50 µg/mL) e cada uma foi testada por vez.

As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 560nm. Foi realizada uma primeira leitura sem o extrato para medir a produção do radical superóxido. A reação do NBT com o radical superóxido produz coloração azul, medido no espectrofotômetro. Em seguida, às soluções foram adicionados 10µL de PMS e a partir de então foram cronometrados e anotadas as absorbâncias a cada 30 segundos por 5 minutos.

Ao final foram calculados os percentuais de inibição de cada concentração do extrato de *P. reticulata* utilizados através da fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = (\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{controle}} \times 100$$

A curva de calibração das concentrações foi obtida por plotagem das concentrações padrões do extrato aquoso de *P. reticulata* (x) e valores de absorbância (y), obtendo a seguinte equação:

$$y = 1,3127x + 31,484$$

4.10 Análise estatística

A avaliação dos resultados foi realizada por meio das médias e desvio padrão das médias. O teste de Tukey e a Análise de Variância (ANOVA) foram aplicados para avaliar as diferenças entre as médias. Foram considerados como significativos valores de $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando-se o GraphPad Prism 6®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final da administração de MeHg e *P. reticulata* conforme os grupos e doses, os animais exibiram características gerais de intoxicação por MeHg. Em torno da terceira semana de administração (entre dias 14 e 21) os animais começaram a apresentar comportamento correspondente com ansiedade notado em pêlos eriçados (Figura 7), aumento do número de bolos fecais e agressividade ao manuseio nos grupos que receberam MeHg e *P. reticulata*+MeHg nas doses de 120 e 240mg/Kg. Essas características também foram observadas durante a aplicação dos testes comportamentais. Verificou-se ainda nestes grupos, além da perda de peso, uma diminuição da ingesta alimentar notada pelo número de paletas de ração encontradas intactas nas gaiolas durante as reposições diárias de comida, comparadas aos outros grupos.

A partir da terceira semana de administração, os animais dos grupos de MeHg e de *P. reticulata* +MeHg de 120 e 240mg/Kg apresentaram um sinal denominado “*hind leg crossed*” (patas trazeiras cruzadas: Figura 8) característico da intoxicação crônica por MeHg e descrito por outros autores (SAKAMOTO et al., 2004; SHIJEMATSU et al., 2000; CHAKRABARTI e BAI, 2000).

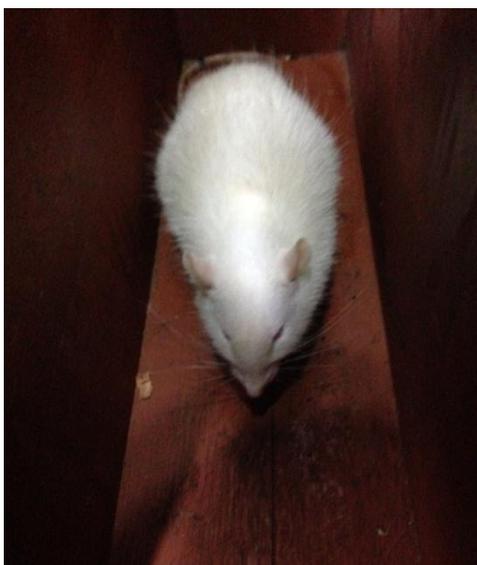


Figura 7: Aspecto do animal durante teste comportamental. O animal permaneceu por mais tempo parado e com os pêlos eriçados. Foi notado maior número de bolos fecais durante todos os testes comportamentais dos grupos que receberam MeHg.(dose de 4mg/kg) e MeHg+*P. reticulata* (doses: 120 e 240mg/kg)



Figura 8: *Hind leg crossed* – patas traseiras cruzadas. Característica da intoxicação crônica por MeHg. Neste estudo, os animais apresentaram este sinal após a terceira semana de intoxicação nos grupos que receberam apenas MeHg (dose: 4mg/kg) e nos grupos de tratamento com *P. reticulata*+MeHg (nas doses de 120 e 240mg/Kg)

5.3 Avaliação do ganho de peso

Durante a administração ao longo dos 21 dias, notou-se perda de peso nos animais tanto no grupo que recebeu apenas MeHg, quanto naqueles que o receberam associado ao extrato aquoso de *P. reticulata* nas três doses utilizadas. Os animais do grupo de *P. reticulata* 60mg+MeHg, no entanto, tiveram uma perda menor de peso a partir do 14º dia comparados com os outros grupos das doses de *P. reticulata* de 120 e 240mg+MeH (Figura 9).

As médias e desvios padrão do percentual de ganho de peso ao início (dia 1) e ao final (dia 21) do tratamento dos grupos foram, respectivamente: *P. reticulata* 60mg: $3,27 \pm 3,4$ e $48,52 \pm 17,1$; *P. reticulata* 120mg: $10,86 \pm 3,74$ e $6,80 \pm 17,3$; *P. reticulata* 240mg: $9,73 \pm 2,8$ e $57,58 \pm 30,1$; *P. reticulata* 60mg/kg+MeHg: $-3,08 \pm 3,7$ e $12,75 \pm 8,0$; *P. reticulata* 120mg/kg+MeHg: $3,15 \pm 0,7$ e $-16,67 \pm 10,3$; *P. reticulata*

240mg/kg+MeHg: $5,57 \pm 0,6$ e $-8,46 \pm 9,0$; MeHg 4mg/kg: $8,62 \pm 3,1$ e $32,64 \pm 7,5$;
 Água: $7,41 \pm 2,2$ e $58,20 \pm 13,2$.

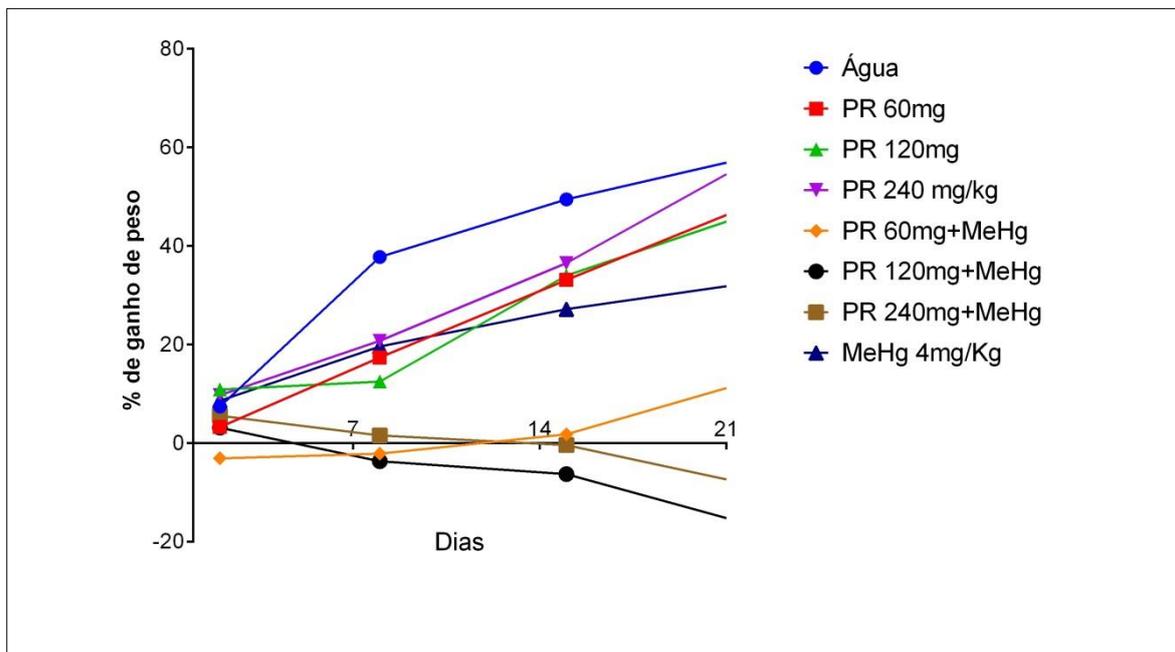


Figura 9 - Variação de peso dos animais submetidos ao tratamento com MeHg (dose 4mg/kg) e extrato aquoso de *P. reticulata* (60, 120 e 240 mg/kg) e MeHg+*P. reticulata* (doses: 60, 120 e 240mg/kg) durante 21 dias. Os valores representam a média \pm erro padrão.

Alterações de peso são importantes indicadores de efeitos adversos das drogas e de produtos químicos em animais de laboratório (AMENIA et al., 2014). Segundo Ezeja et al. (2014), o comportamento geral dos animais e a avaliação do peso corporal representam parâmetros críticos para a avaliação dos primeiros sinais de toxicidade. Neste sentido, os resultados expressam que houve maior efeito de toxicidade nos grupos do extrato aquoso de *P. reticulata* +MeHg, ainda que a dose de 60mg tenha apresentado menor efeito tóxico que as demais em relação ao ganho de peso.

A perda de peso dos animais em outras pesquisas que estudaram o efeito da administração do MeHg foi um dado comumente encontrado (FLORA et al., 2008; MAGOS e CLARKSON, 2006).

5.4 Testes comportamentais

5.4.1 Labirinto em Y

No labirinto em Y, a % de alternância dos grupos Água, MeHg, *P.reticulata* 60mg, *P.reticulata* 120mg, *P.reticulata* 240mg, *P.reticulata* 60mg+MeHg, *P.reticulata* 120mg+MeHg, *P.reticulata* 240mg+MeHg são em média de 65; 33; 62; 71; 62; 75; 41; 20% respectivamente. Não foi observada diferença estatística significativa em comparação ao grupo controle (Figura 10).

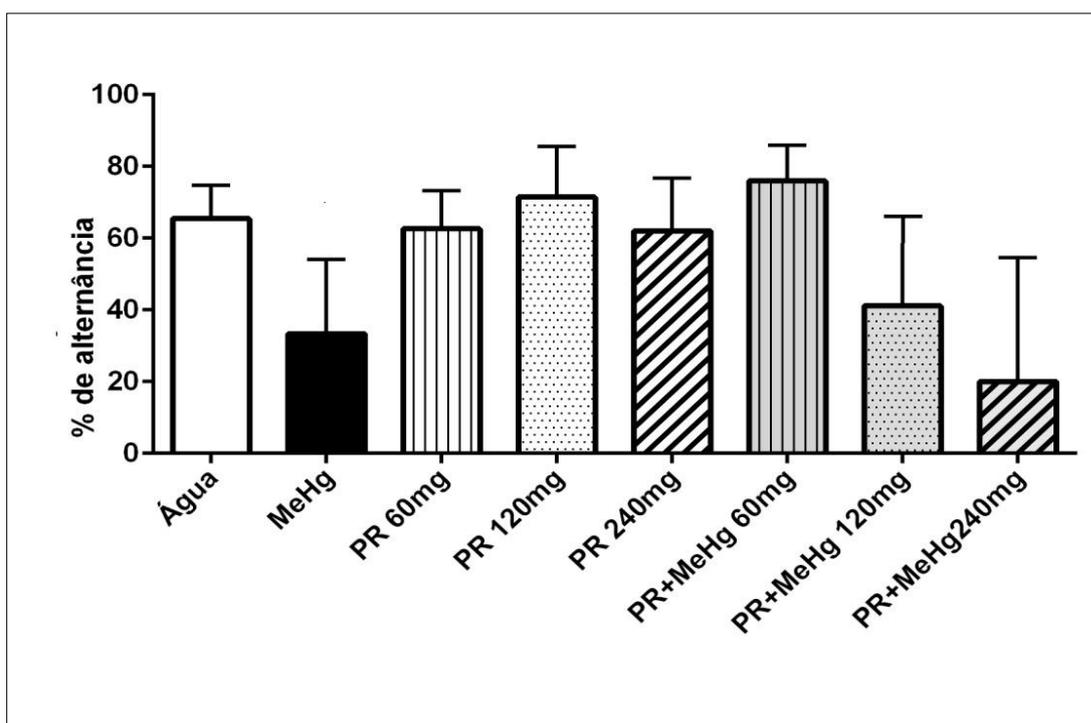


Figura 10 - Efeitos dos tratamentos no desempenho dos animais submetidos ao teste do labirinto em Y após tratamento com MeHg (dose 4mg/kg) e extrato aquoso de *P. reticulata* (60, 120 e 240 mg/kg) e MeHg+*P.reticulata* (doses: 60, 120 e 240mg/kg) durante 21 dias expresso pelas médias de % de alternância. Os valores representam a média \pm erro padrão.

O labirinto em Y tem grande valor na avaliação da memória espacial de curto prazo. Tem sido demonstrado que animais com lesões no córtex pré-frontal e no hipocampo apresentam baixos percentuais de alterações espontâneas (LALONDE, 2002). Além disso, alterações no sistema colinérgico, como as induzidas por substâncias antagonistas da acetilcolina, a exemplo da escopolamina, também causam redução

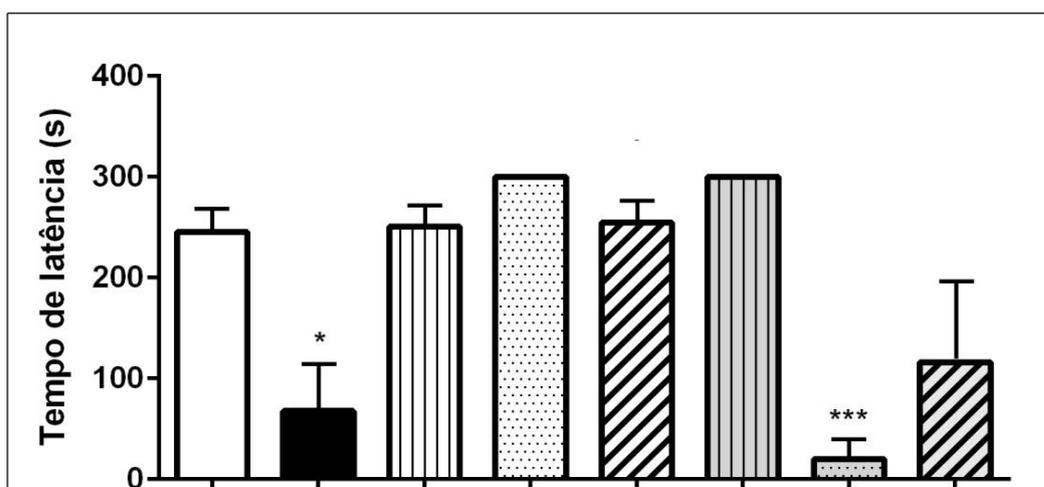
significativa no percentual de alternância dos animais submetidos ao teste do labirinto em Y (OH et al., 2013).

Percebeu-se que o grupo de *P. reticulata* de 60mg/Kg associada à administração de MeHg manteve percentual de alternância mais elevado em comparação às demais doses, assemelhando-se ao grupo da Água sugerindo melhor proteção ao sistema colinérgico.

5.4.2 Caixa claro-escuro

No teste da caixa claro-escuro, os animais dos grupos do extrato de *P. reticulata*, *P. reticulata* 60mg+MeHg e Água foram capazes de reter a informação de memória aversiva ao ambiente escuro, apresentando tempo de latência próximo a 300 segundos. Porém, o tempo de latência dos animais dos grupos MeHg e *P. reticulata*+MeHg nas doses de 120mg e 240mg sofreram queda, apresentando valores médios de 20 e 116 segundos, respectivamente. Em comparação com o grupo controle, esta diferença foi considerada estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A amígdala cerebral é uma estrutura essencial para a formação e expressão do medo condicionado, comportamento principalmente testado no Teste da Caixa claro-escuro (MAREN, 2001; KIM E JUNG, 2006). Outras estruturas encefálicas também desempenham papel importante neste tipo de memória, como o hipocampo e áreas associativas (THOMAS e EVERITT, 2001; PANG e LU, 2004).



5.4.3 Barra giratória (Rota-rod)

No teste da barra giratória, não foram observadas diferenças significativas ao comparar os demais grupos ao grupo controle. No entanto, observamos que os animais tratados com MeHg tenderam a permanecer menos tempo sobre a barra giratória, em média de 65,75 para o grupo de *P. reticulata*+MeHg. Os animais dos grupos de *P. reticulata*+MeHg das respectivas doses de 120mg e 240mg não foram capazes de permanecer na barra giratória para a realização do teste. Apenas a dose de 60mg/kg apresentou atividade protetora sobre este teste de motricidade e equilíbrio (Figura 12).

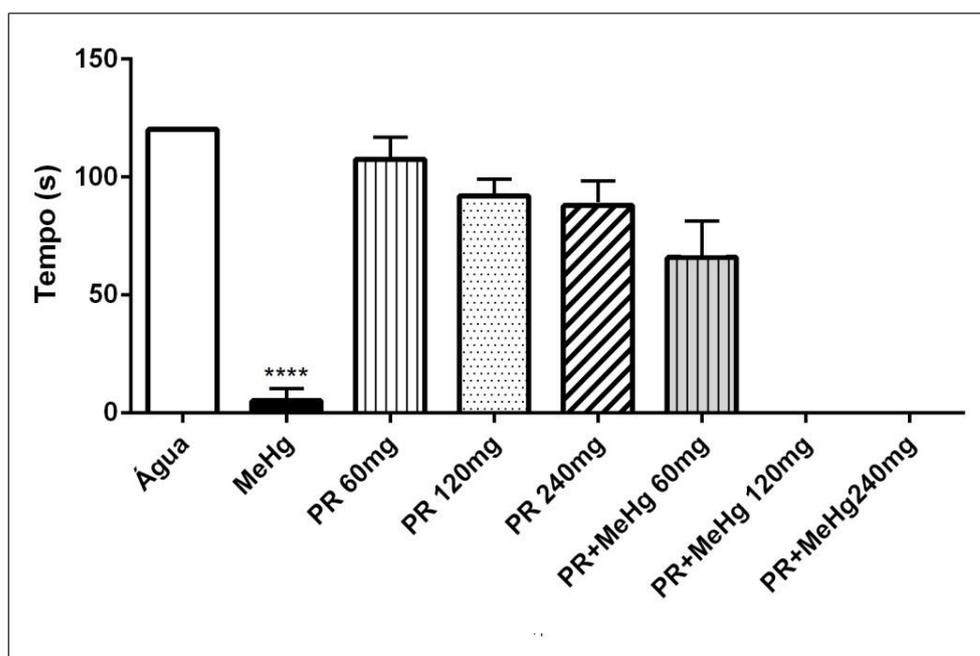


Figura 12 - Efeitos da administração dos tratamentos no desempenho dos animais

Chuu et al., 2007 conduziu um estudo de avaliação da função motora através do Rota-rod e encontrou lesões irreversíveis no grupo tratado com MeHg. Houve nos animais deste trabalho déficits motores e do equilíbrio semelhantes.

Segundo o mesmo autor Chuu et al., (2001) que já havia descrito que a intoxicação por MeHg em ratos em uma administração crônica, o desempenho dos animais está relacionado à toxicidade das células de Purkinje e do vermis cerebelares, causando anormalidades do equilíbrio.

O cerebelo é uma região do encéfalo responsável em grande parte pelo equilíbrio e coordenação motora, realizando importantes conexões com o córtex frontal e pré-frontal caracterizados como áreas motoras primárias (LENT, 2001; MACHADO, 2013). Os dados encontrados no teste do Rota-rod correspondem com lesões cerebelares, visto que os animais do grupo de MeHg apresentaram déficits importantes.

5.5 Análise do Hg total

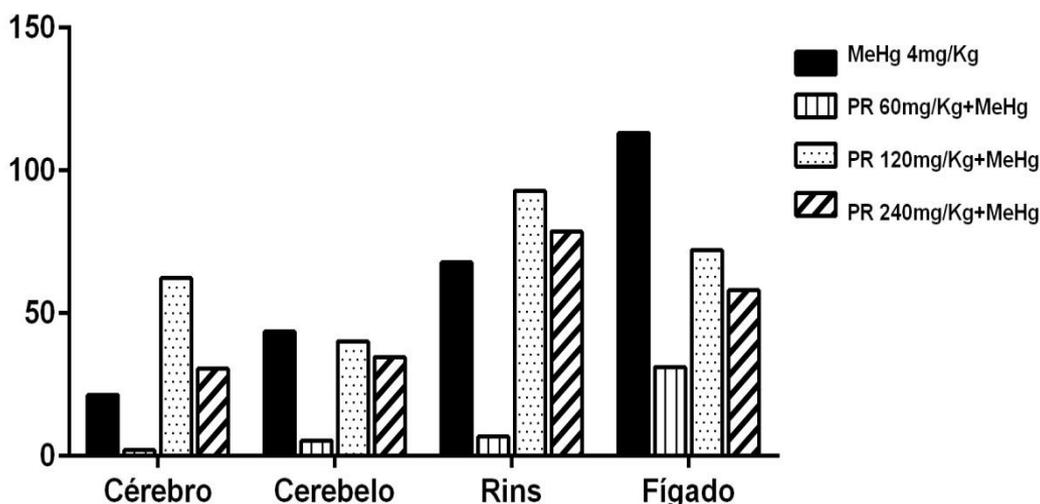


Figura 13 - Concentração de Hg total (mg/Kg) em órgãos de ratos tratados (via oral) com MeHg (dose 4mg/kg) e MeHg+ *B. reticulata* (doses: 60, 120 e 240mg/kg) durante

A Figura 13 mostra a que o Hg teve a capacidade de acumular-se nos órgãos dos animais tratados, onde a maior concentração foi observada nos rins e fígado. Em todos os órgãos, a dose de 60mg/kg de *P. reticulata* associada à administração do MeHg mostrou efeito protetor mais eficaz que as demais doses.

Análise em animais intoxicados com MeHg mostram que este composto exerce maior neurotoxicidade nos sistemas motor e visual, sendo o cerebelo e a retina alvos potenciais de ação de MeHg (MOTTET et al., 1994; GOTO et al., 2001). Os mecanismos celulares relacionados a estes fenômenos neurotóxicos ainda não estão bem esclarecidos, no entanto, vários eventos celulares e moleculares são descritos a partir de modelos experimentais de intoxicação com MeHg.

Em estudo conduzido por Agarwal et al., em 2009 foi também verificado um acúmulo maior de Hg em rins seguido do fígado. Estes autores testaram a eficácia da administração do Alfa-tocoferol (Vitamina E) associado ao MeHg em ratos, onde os dados, semelhantemente à dose de *P. reticulata* 60mg+MeHg mostrou redução do acúmulo de Hg nestes órgãos.

Na determinação de concentração de Hg nos órgãos, Chu et al., (2007) encontrou respectivamente maiores concentrações do metal em rins, fígado e cérebro, concordantes com os resultados encontrados neste trabalho. Os resultados da dosagem de cérebro e cerebelo também assemelham-se aos encontrados por Farina et al., (2005) em que a dosagem deste metal foi maior em cerebelo. O efeito neurotóxico nesta região específica do encéfalo já havia sido descrito por Sakamoto et al., desde 1993 e estudos subsequentes e mais recentes deste mesmo autor em 2005, 2013 confirmam a neurotoxicidade do MeHg.

Outros estudos também buscaram avaliar a capacidade protetora de compostos de origem vegetal na contaminação por metais pesados. Nwokocha et al., (2011) avaliou a eficácia de *Garcinia kola* sobre a hepatotoxicidade causada por MeHg, Cádmiio e Chumbo em ratos e concluiu que a administração de *Garcinia kola* foi benéfica em

diminuir o acúmulo de Hg no fígado dos ratos. Este composto vegetal é comum em regiões africanas e assim como *P. reticulata* possui taninos e estruturas moleculares fenólicas em sua composição que segundo Monteiro et al (2005), Romani et al., (2006), Simões et al., (2007) possui atividade antioxidante.

O estudo de Abdalla et al., (2011) também buscou descrever a atividade protetora desta vez com o extrato vegetal, utilizando *Syzygium cumini*, planta rica em compostos fenólicos, o qual reverteu os efeitos tóxicos do MeHg em fígados e rins, semelhante ao efeito de *P. reticulata*. Mohamed et al., (2014) também conduziu experimentos buscando descrever a capacidade protetora de berberine mediante a intoxicação mercurial em ratos e obteve resultados satisfatórios com o uso deste extrato vegetal..

Outros trabalhos, também com plantas brasileiras que contém flavonoides na composição, testaram a eficácia contra a neurotoxicidade induzida por MeHg. Tanto Farina et al., (2005) e Lucena et al., (2007) encontraram redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio em córtex cerebral e cerebelo.

5.4 Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante

As concentrações utilizadas neste teste de atividade antioxidante *in vitro* através do Teste do radical superóxido mostraram, em ordem crescente, percentual de inibição do radical superóxido, comprovando assim a capacidade antioxidante do extrato aquoso de *P. reticulata* conforme a Tabela 2:

Tabela 2 – Concentrações do extrato de *P. reticulata* e respectivos percentuais de inibição do radical superóxido

Concentração	%de Inibição
5 µg/mL	25,6%
10 µg/mL	50,92%
20 µg/mL	68%
50 µg/mL	93%

O estabelecimento do estresse oxidativo em um organismo pode ser definido como uma situação em que há o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e/ou redução das defesas antioxidantes endógenas causando um desequilíbrio entre as duas forças (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

Neste trabalho buscou-se avaliar a capacidade da *P. reticulata* como antioxidante mediante o estresse oxidativo causado pela contaminação mercurial, visto que, este extrato vegetal é rico em flavonóides e antocianinas que possuem atividade antioxidante já descrita por outros estudos. Dentre estes, muitos trabalhos têm utilizado flavonóides na estratégia coadjuvante de amenizar os efeitos induzidos pelo MeHg em ratos. (FARINA et al., 2005; LUCENA et al., 2007; FRANCO et al., 2010; BARCELOS et al., 2011).

A SOD compõe o sistema antioxidante endógeno e desempenha função determinante na dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A SOD é a mais abundante no organismo dentre as outras enzimas do sistema enzimático (PRASAD et al., 2007). Neste sentido, dentre as muitas metodologias para testes de função antioxidante, o Teste do Radical superóxido mostrou-se mais viável para este estudo.

Substâncias antioxidantes exógenas auxiliam nos processos de neutralização de EROs e no estresse oxidativo causado pela intoxicação por Hg já foram testados, como comprova o estudo de Agarhal et al., (2010) cujo resultados mostraram que o alfa-tocoferol (vitamina E) e o selênio são capazes de neutralizar essas espécies reativas.

Gaulejac et al., (1999) utilizaram este método para avaliar a atividade sequestradora do radical superóxido em vinho tinto, e concluíram que esta atividade, usualmente atribuída aos taninos procianídicos, está também relacionada às antocianinas presentes nesta bebida.

Cos et al. (1998) utilizaram esta metodologia para avaliar a atividade inibitória de flavonoides sobre os radicais superóxidos, concluindo que flavanonas, di-hidroflavonóis e flavanóis não são capazes de inibir a ação da enzima. No entanto, este autor descreve que há relação entre a disposição de ligações entre as moléculas destes grupos e que um dos fatores determinantes na ação inibitória é a planaridade destas moléculas, ou seja a sua geometria espacial. A presença de saturação de duplas ligações destruirá a conjugação e a coplanaridade da molécula e, conseqüentemente, interferirá em sua reação com os compostos do teste.

Os resultados obtidos com o teste *in vitro* de *P. reticulata* estão em acordo com os dados descritos na literatura, os quais destacam como características importantes para ação antioxidante a presença de flavonóides em todos os compostos estudados. *P. reticulata* no teste de inibição dos radicais superóxidos mostrou resultados satisfatórios expostos na Tabela 2, crescentes em porcentagem de inibição do NBT à medida em que a dose testada aumentou comprovando que há ação antioxidante no extrato da planta.

Ao compararmos esses dados, entretanto, com os resultados dos testes comportamentais e as dosagens de Hg nos órgãos, notamos que quanto maior a dose utilizada nos animais, maior foi a toxicidade. Isso se explica pelo fato de que neste trabalho foi utilizado extrato contendo compostos totais de *P. reticulata*. Assim, ao se aumentar a dose do extrato, é possível que os níveis de outros compostos, que, em concentração baixa não manifestavam toxicidade, tornaram-se tóxicos e ainda potencializados pela administração concomitante do MeHg.

6 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no trabalho permitem concluir que:

- *P. reticulata* apresentou capacidade protetora mediante a contaminação por MeHg durante 21 dias de administração
- A dose de *P. reticulata* de 60mg/kg associada à administração de MeHg apresentou efeito protetor
- É possível concluir que doses abaixo de 60mg/Kg deverão ser investigadas, e doses acima de 60mg/Kg devem ser evitadas, pois potencializam o efeito do MeHg.
- O extrato de *P. reticulata* possui capacidade antioxidante comprovada pelo teste *in vitro* de sequestro do radical superóxido.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo foram coerentes e complementares a outros dados da literatura. Este é um estudo de relevância mediante a presença de MeHg na região amazônica e os inúmeros recursos naturais provenientes dessa região com potencial terapêutico a ser melhor descrito.

Este trabalho mostrou o efeito de *P. reticulata* frente à intoxicação induzida em ratos por MeHg, podendo servir como terapia adjuvante ao tratamento de intoxicação mercurial. Contudo, é necessária a realização de mais estudos com fim de explicitar a relação entre dose menor e os efeitos protetores com seus respectivos mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, F. H.; BELLÉ, L. P.; BITENCOURT, P. E. R.; DE BONA, K. S.; ZANETTE, R. A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; PIGATTO, A. S.; MORETTO, M. B. Protective effects of *Syzygium cumini* seed extract against methylmercury-induced systemic toxicity in neonatal rats. **Biometals, London**, v. 24, p. 349–356, 2011.

AGARWAL, V.; LAL, P.; PRUTHI, V. Effect of Plant Oils on *Candida albicans*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 43, n. 5, p. 447– 451, 2010.

ALMEIDA, S. P. de; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M. & RIBEIRO, J. F.1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina-DF: **Embrapa-CPAC**, 464 p.

ALVES, Clayton Q. et al . Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010 .

AMORIM, L.C. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Rev. Bras. Epidemiol.** v.6, n.2, 2003.

ANZAI, M.C. et al. *Cryptococcus gattii* VGII in *Plathymenia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Mycoses**, 2014. 57, 414-418 Apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 1015, 2006.

ASCHNER, M. et al . Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto , v. 40, n. 3, Mar. 2007 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2007000300001&lng=en&nrm=iso>. access on 25 Jan. 2015.

ASSUNÇÃO, A.P.F. Abordagem etnobotânica, potencial anti-*Candida* e toxicidade de plantas medicinais da comunidade do Cucurunã - Santarém, Pará. Trabalho de conclusão de curso (graduação em ciências biológicas). Universidade Federal do Oeste do Pará, 2011.

AZEVEDO, F. A. Toxicologia do mercúrio. São Carlos: **RiMa**. 1ª ed., 2003.

BAZZI, C.; PETRINI, C.; RIZZA, V.; ARRIGO, G.; NAPODANO, P.; PAPARELLA, M.; D'AMICO, G. Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor outcome in primary glomerulonephritis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, p. 1890-96, 2000.

BERINGHS-BUENO, L. A. Contaminação por metais tóxicos: medicação homeopática como quelante de mercúrio. Tese apresentada ao Centro de Ensino Superior de Homeopatia IBEHE da Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo para obtenção do título de mestre em Homeopatia. São Paulo, SP, 2005.

BHARDWAJ A, KAR JP, THAKUR OP, SRIVASTAVA P, SEHGAL HK. Electrical characteristics of PbSe nanoparticle/Si heterojunctions. **J Nanosci Nanotechnol** 2009;9(10):5953-7.

BIANCHI MLP, ANTUNES LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr.** 1999; 12(12):123-30. doi: 10.1590/S1415-52731999000 200001.

- BRAGA, L.L; TOLENTINO, G.S; SANTOS, M.R.; VELOSO, M.D.M; NUNES, Y.R.F. Germinação de Sementes de *Plathymenia reticulata* Benth (Fabaceae – Mimosidae) sob influência do tempo de armazenagem. **Rev. Bras. Bioc** Porto Alegre, 2007 v5 supl 2 p258-260.
- BRANDÃO, R.; BORGES, L. P.; DE OLIVEIRA, R.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide protects against hematological and immunological alterations induced by mercury in mice. **J Biochem Mol Toxicol.** 22(5):311-9, 2008.
- CAMPOS-ESPARZA, M. R.; SANCHEZGOMEZ, M. V.; MATUTE, C. Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. **Cell Calcium, Edinburgh**, v. 45, n. 4, p. 358–368, 2009
- CARVALHO MC. (2007). Efeitos neurotóxicos da exposição perinatal ao metilmercúrio em *gallus domesticus*. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina.
- CASTOLDI AF, COCCINI T, CECCATELLI S, MANZO L. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. **Brain Res Bull** 2001;55(2): 197-203.
- CASTOLDI, A. F., BARNI, S., TURIN, I., GANDINI, C., MANZO, L. Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. **J. Neurosc.** Mar 15;59(6):775-87, 2000.
- CASTOLDI, A. F., COCCINI, T., CACCATELLI, S., MANZO, L. neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. **Brain Research Bulletin.** 55(2): 197-203, 2001.
- CAVE, M. et al. Liver Disease Cap 16 in WEISS, B. Aging and Vulnerability to Environmental Chemicals : Age-related Disorders and Their Origins in Environmental Exposures. 2013. **Royal Society of Chemistry.** Disponível em www.pubs.rsc.org/content/ebook/978-1-84973-418-9#divbookcontent
- CHANG LW & GUO GL. (1998). Fetal Minamata disease: Congenital methylmercury poisoning, in: Silkler, WS & Chang LW (Eds.). Handbook of Developmental Neurotoxicology, **Academic Press**, San Diego.
- CHANG, L. W. Neurotoxic effects of mercury. A review. **Environmental. Research**, v. 14, p. 329-373, 1977.
- CHANG, Y.C.; HUANG, K.X.; HUANG, A.C.; HO,Y.C.; WANG, C.J. Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages
- CHEN, Y.; MAO, Y.; ZHOU, D.; HU, X.; WANG, J.; MA, Y. Environmental enrichment and chronic restraint stress in ICR mice: Effects on prepulse inhibition of startle and Y-maze spatial recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 212, p. 49-55, 2010.
- CHOI BH, CHO KH, LAPHAM LW. (1981). Effects of methylmercury on human fetal neurons and astrocytes in vitro: atime-lapse cinematographic, phase and electron microscopic study. **Enviromental Research**; 24 (1): 61-74.

CLARKSON TW, MAGOS L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Crit Rev Toxicol**. 2006;36:609-62.

CLARKSON, T. W. The toxicology of mercury. **Crit Rev Clin Lab Sci**. 34(4):369-403, 1997.

CLIFTON JC 2nd. Mercury exposure and public health. **Pediatr Clin North Am** 2007;54(2):237-269.

COS, P.; YNIG, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; VAN POEL, B.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; VANDEN BERGHE, D.; **J. Nat. Prod.** 1998, 61,

CUNHA, M. E. S. Interação entre Mercúrio e Sistemas Biológicos. Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas. Portugal, 2008.

DALLA CORTE, C. L.; WAGNER, C; SUDATI, J. H; COMPARSI, B; LEITE, G. O.; BUSANELLO, A; SOARES, F. A. A; ASCHNER, M; ROCHA; J. B. T. Effects of Diphenyl Dislenide on Methylmercury toxicity in rats **BioMed Research International**. 2013.

DAVIS BJ, PRICE HC, O'CONNOR RW, FERNANDO R, ROWLAND AS, MORGAN DL. Mercury vapor and female reproductive toxicity. **Toxicol Sci** 2001;59(2):291-296.

DELLA TORRE, A.; ALBUQUERQUE, L.B.L.; FARRAPO, N.M.; OSHIMA-FRANCO, Y.; SANTOS, M.G.; TAVARES, R.V.S.; RODAS, A.C.D.; DAL BELO, C.A.; CARDOSO, C.R.P.; VARANDA, E.A.; GROppo, F.C.; LOPES, P.S. Mutagenicity induced by the hydroalcoholic extract of the medicinal plant *Plathymenia reticulata* Benth. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17 n.2. p. 190-198, 2011

DENOBLE, V.J.; REPETTI, S.J.; GELPKE, L.W.; WOOD, L.M.; KEIM, K.L. Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 24, n. 4, p. 1123-1128, 1986.

DEW, T. P.; DAY, A. J.; MORGAN, M. R. A.; J. AGRIC. Nutraceutical Potential of Tinctures from Fruits, Green Husks, and Leaves of *Juglans regia* L. **Food Chem**. 2005, 53, 6510. 48.

DOREA, J.G., BARBOSA, A.C., SILVA, G. S. Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. Vol. 142 (3-4), 2006, 275 – 83.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detection neurological deficit in rats a mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, p. 208-209, 1957.

EIBOND, L.S.; REYNERTSON, K.A.; LUO, X.D.; BASILE, M.J.; KENELLY, E.J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 23, 2004

EICHENBAUM, H. A cortical–hippocampal system for declarative memory. **Neuroscience**, v. 1, p. 41-50, 2002

EMBRAPA FLORESTAS. Agência Embrapa de Informação Tecnológica - Ocorrência natural. Acesso em 2/10/2014 Disponível em http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/CON T000fymz8q2902wx5ok0pvo4k3k3t9wck.html

FARINA M, DAHM KC, SCHWALM FD, BRUSQUE AM, FRIZZO ME, ZENI G, SOUZA DO, ROCHA JB. (2003). Methylmercury increases glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen. **Toxicological Sciences**; (1):135-40.

FARINA, M., ROCHA, J.B., ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. **Life Sci**. 89: 555-563, 2011.

FARINA, M.; FRANCO, J.L.; RIBAS, C.M.; et al. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **J. Pharm. Pharmacol**. 57(11):1503-1508, 2005. 84

FARINA, M.; FRIZZO, M.E.S.; SOARES, F.A.A.; et al. Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. **Toxicol. Lett**. 144(3):351-357, 2003.

FARRAPO NM, SILVA GAA, COSTA KN, SILVA MG, COGO JC, DALBELO CA, SANTOS MG, GROPPA FC, FRANCO YO (2011). Inhibition of *Bothrops jararacussu* venom activities by *Plathymenia reticulata* Benth extracts. **J Venom Res** 2:52

FERNANDES, A. T. Atividade farmacológica dos extratos obtidos da *P. reticulata* Benth (leguminosae) [Dissertação de Mestrado em Ciências médicas pela universidade de Campinas] 2002

FERNANDES, A. T. et al. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. **Revista de Patologia Tropical**. vol 34 (2):113-122. maio-agosto. 2005

FERNANDES, A.T. Atividade farmacológica dos extratos obtidos de *Plathymenia reticulata* Benth (Leguminosae). Dissertação (Mestrado em Clínica Médica). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **RAMB** 43(1):61-8,1997.

FRANCO JL, TEIXEIRA A, MEOTTI FC, RIBAS CM, STRINGARI J, MORO AM, BOHRER D, BARROS AV, DAFRE AL, SANTOS ARS, FARINA M. (2006). Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. **Environmental Research** ; 102: 22-28.

FRANCO, J. L., POSSER, T., DUNKLEY, P. R., DICKSON, P. W., MATTOS, J. J., MARTINS, R., BAINY, A. C., MARQUES, M. R., DAFRE, A. L.; FARINA, M. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radic Biol Med**. 47(4):449-457, 2010.

FRANCO, J.L.; BRAGA, H.C.; STRINGARI, J.; et al. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. **Chem. Res. Toxicol.** 20 (12):1919-1926, 2007.

FRANCO, J.L.; POSSER, T.; DUNKLEY, P.R.; et al. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radic. Biol. Med.** 47(4):449-457, 2009.

FRANCO, J.L.; POSSER, T.; MISSAU, F.; et al. Structure-activity relationship of flavonoids derived from medicinal plants in preventing methylmercury-induced mitochondrial dysfunction. **Environ Toxicol Pharmacol.** 30(3):272-278, 2010.

GARCIA-ALONSO, M.; MINIHAINE, A.M.; RIMBACH, G.; RIVAS-GONZALO, J.C.; TEREZA, S.P. Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 7, p.521, 2009.

GAULEJAC, N. S. DE; GLORIES, Y.; VIVAS, N.; **Food Res. Int.** 1999, 32, 327.

GIMENEZ-LLORT L, AHLBOM E, DARE E, VAHTER M. (2001). Prenatal exposure to methylmercury changes dopamine-modulated motor activity during early ontogeny: age and gender-dependent effects. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 1; 9 (3): 61-70.

GOLDMAN, L. R.; SHANNON, M. W. American academy of pediatrics: committee on environmental health technical report: mercury in environment: implications for pediatricians. **Pediatrics, New York**, v. 108, p. 197–205, 2001.

GONZÁLEZ-ESTECHA. M. Efectos sobre la salud del metilmercurio en niños y adultos; estudios nacionales e internacionales. Revision. **Nutr Hosp.** 2014. 30: 989-1007.

GOWEN E, MIALLC RC. (2007). The cerebellum and motor dysfunction in neuropsychiatric disorders. **Cerebellum**; 6(3):268-79.

GOYER, R. A. Toxic effects of metals. In: KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. O.; DOULL, J. (Eds.) Casarett and Doull's toxicology – the basic science of poisons. 3. ed. New York: Macmillan Publication. Co., 1986, p. 605-09.

GREEN K, BRAND MD, MURPHY MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes.** 2004; 53(Suppl 1): 110-8.

HAFFNER HT, ERDELKAMP J, GOLLER E, SCHWEINSBERG F, SCHMIDT V. Morphological and toxicological findings after intravenous injection of metallic mercury. **Dtsch Med Wochenschr** 1991; 116(36):1342-1346.

HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.** 2004; 142(2): 231-55.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E.; J. **Lab. Clin. Med.** 1992, 119, 598.

HARADA, M.; NAKANISHI, E.; YASODA, E. et al., "Mercury pollution in the Tapajós River basin, Amazon mercury level of head hair and health effects", **Environment International** vol.27, no. 4, pp 285-290, 2001

HERCULANO, A.M.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; LIMA, S.M.A.; PICANÇO-DINIZ, D.L.W.; DO NASCIMENTO, J.L.M. Methylmercury intoxication activates nitric oxide synthase in chick retinal cell culture. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 39: 415- 418, 2006.

IAVICOLI I, FONTANA L, BERGAMASCHI A. The effects of metals as endocrine disruptors. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev** 2009; 12(3):206-223.

IZQUIERDO, I. Memória. 1^a ed. Porto Alegre, Editora: Artmed S.A., 2002.

KAMO, T.; SATO, K.; SEM, K.; SHIBATA, H.; HIROTA, M.; Geranylgeraniol-type diterpenoids, boletinins A-J, from *Boletinus cavipes* as inhibitors of superoxide anion generation in macrophage cells. **J. Nat. Prod.** 2004, 67, 958.

KAZANTZIS G. Mercury exposure and early effects: an overview. **Med Lav** 2002;93(3):139-147.

KESSELS, R.P.C; DE HAAN, E.H.F; KAPPELLE, L.J; POSTMA, A. Varieties of human spatial memory: ameta-analysis on the effects of hippocampal lesions. **Brain Res Rev**, v. 35, p. 295–303, 2001.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, W. H.; KANG, S. S. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, p. 229-245, 2006.

KINJO Y, AKIBA S, YAMAGUCHI N, MIZUNO S, WATANABE S, WAKAMI- YA J, et al. Cancer mortality in Minamata disease patients exposed to methylmercury through fish diet. **J Epidemiol** 1996; 6(3):134-138.

KLAASSEN CD. CASARETT & DOULL'S Toxicology The Basic Science of Poisons. 7th Ed, McGraw-Hill Inc, New York, 2008.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr.** 2003.

LAIRD, B. D.; SHADE, C.; GANTNER, N.; CHAN, H. M.; SICILIANO, S. D. Bioaccessibility of mercury from traditional northern country foods measured using an in vitro gastrointestinal model is independent of mercury concentration. **Science Total Environmental, Amsterdam**, v. 407, n. 23, p. 6003–6008, 2009

LENT, Roberto. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência.** São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

- LEWIS, G.P.; WARWIRC, M.C. Revision of Plathyenia (Leguminosae Mimosoideae). **Endinburgh Journal of Botany**, v.60, n.2, p.111-119, 2003.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum**, 2002. 396 p.
- LUCENA, G. M. R. D. S., J. L. FRANCO, C. M. RIBAS, M. S. AZEVEDO, F. C. MEOTTI, V. M. GADOTTI, A. L. DAFRE, A. R. S. SANTOS AND M. FARINA (2007). "Cipura paludosa extract prevents methyl mercury-induced neurotoxicity in mice." **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology** 101(2): 127-131
- LUCENA, R. F. P. et al. Useful Plants of the Semi-Arid Northeastern Region of Brazil – A Look at their Conservation and Sustainable Use. **Environmental Monitoring and Assessment**, Orono, v. 125, n. 1-3, p. 281-290, 2007.
- MADHAN, B.; SUBRAMANIAN, V.; RAGHAVA RAO, J.; BALACHANDRAN, U. N.; RAMASAMI, T. Stabilization of collagen using plant polyphenol: Role of catechin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, p. 47-53, 2005.
- MAGOS, L; CLARKSON, T.W. Overview of the clinical toxicity of mercury. **Ann clin Biochem**. v 43, p 257-268, 2006
- MANZO, L.; CASTOLDI, A.F.; COCCINIA, T.; ROSSI, A.D.; NICOTERA, P.; COSTA, L.G. Mechanisms of neurotoxicity: applications to human biomonitoring. **Toxicology Letters**, v. 77, p. 63-72, 1995.
- MARQUES, R. C.; DÓREA, J. G.; BASTOS, W.R et al., "Maternal Mercury exposure and neuro-motor development in breastfed infants from Porto Velho (Amazon), Brazil". **International Journal of Hygiene and Environmental Health** vol.210, no.1, pp.51-60, 2007.
- MARTINI, N. D, KATERERE, D. R, ELOF, J. N. Biological activity of five antibacterial flavonoides forma Combretum erythrophyllum (combretaceae) **J Ethnopharmacol** 93: 207-212, 2004
- MEACHAM CA, FREUDENRICH TM, ANDERSON WL, SUI L, LYONS- DARDEN T, BARONE S JR, et al. Accumulation of methylmercury or polychlorinated biphenyls in in vitro models of rat neuronal tissue. **Toxicol Appl Pharmacol** 2005;205(2):177-187.
- MERGLER, D. Behavioral Neurophysiology: Quantitative Measures of Sensory Toxicity. In: CHANG, SILKER (eds.) Neurotoxicology: Approaches and Methods, p. 727-736. **Academic Press**, 1996
- MICARONI, R.C.C.M.; BUENO, M.I.M.S.; JARDIM, W.F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 487-495, 2000.

MILLER S, PALLAN S, GANGJI AS, LUKIC D, CLASE CM. Mercury-associated nephrotic syndrome: a case report and systematic review of the literature. **Am J Kidney Dis** 2013;62(1):135-138.

MINOIA C, RONCHI A, PIGATTO P, GUZZI G. Effects of mercury on the endocrine system. **Crit Rev Toxicol** 2009;39(6):538.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28 (5) p. 892-896, 2005.

MONTGOMERY, K. C. The elevated plus-maze. **Pharmac.Methodol. Ethology Psychopharmacol.**, v. 53, n.1, p. 334-342, 1958.

MORIM, M.P. Plathyemia in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB83636>>. Acesso em: 01 Mar. 2014

MOURA, V. M.; SOUSA, L.A.F.; OLIVEIRA, R. B.; SILVA, A. M. M.; CHALKIDIS, H. M.; SILVA, M. N.; PACHECO, S.; MOURÃO, R. H. V. Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 31, p. 2330-2337, 2013.

MURAKAMI U. (1972). Embryo-fetotoxic effect of some organic mercury compounds. Annual Rep. **Res. Institute Environmental Medicine of Nagoya University**; 19: 61-68.

MYERS GJ, DAVIDSON PW. Prenatal methylmercury exposure and children: neurologic, developmental, and behavioral research. **Environ Health Perspect** 1998;106 Suppl 3:841-847.

MYERS, G.J.; DAVIDSON, P.W.; STRAIN, J.J. Nutrient and methyl mercury exposure from consuming fish. **J. Nutr.** 137(12):2805-2808, 2007.

NEVADO, J. J. B; MARTÍN-DOIMEADIOS, R.; BERNARDO, F. F. G; MORENO, M. J; HERCULANO, A. M; NASCIMENTO, J. L. M; CRESPO-LÓPEZ, M. E. Mercury in the Tapajós **River basin, Brazilian Amazon**: a review. 2010

OH, S. R.; KIM, S. J.; KIM, D. H.; RYU, J. H.; AHN, E. M.; JUNG, J. W. *Angelica keiskei* Ameliorates Scopolamine-Induced Memory Impairments in Mice **Biol. Pharm. Bull.**, v. 36 n. 1, p. 82-88, 2013.

PASSOS, C. J.; MERGLER, D.; FILLION, M.; LEMIRE, M.; MERTENS, F.; GUIMARAES, J.R.; PHILIBERT, A. Epidemiologic confirmation that fruit consumption influences mercury exposure in riparian communities in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**, San Diego, v. 105, p. 183-193, 2007.

PERAZA MA, F, Ayala-Fierro Barber DS, Casarez E, Rael LT. Effects of micronutrients on metal toxicity. **Environ Health Perspect** 1998;106 Suppl 1:203-216.

PYSZEL A, WROBEL T, SZUBA A, ANDRZEJAK R. Effect of metals, benzene, pesticides and ethylene oxide on the haematopoietic system. **Med Pr** 2005;56(3):249-255.

RAO, R. J.; TIWARI, A. K.; KUMAR, U. S.; REDDY, S. V.; ALIB, A. Z.; RAOA, J. M.; Nutraceutical Potential of Tinctures from Fruits, Green Husks, and Leaves of *Juglans regia* L. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 2003, 13, 2777

RICE, D. C. The US EPA reference dose for methylmercury: sources of uncertainty. **Environ Res.** 95: 406-13, 2004.

ROMANI, A.; IERI, F.; TURCHETTI, B.; MULINACCI N.V.; INCIERI, F.F.; BUZZINI, P., Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p. 41, v. 415-420, 2006.

ROVER JR, L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím Nova** 24(1):112-9, 2001.

ROWLAND AS, BAIRD DD, WEINBERG CR, SHORE DL, SHY CM, WILCOX AJ. The effect of occupational exposure to mercury vapour on the fertility of female dental assistants. **Occup Environ Med** 1994;51(1):28-34.

SAKAMOTO, M., KAKITA, A., WAKABAYASHI, K., TAKAHASHI, H., NAKANO, A. AND AKAGI, H. (2002): Evaluation of changes in methylmercury accumulation in the developing rat brain and its effects: a study with consecutive and moderate dose exposure throughout gestation and lactation periods. **Brain Res.**, 949, 51-59.

SAKAMOTO, M., KANEOKA, T., MURATA, K., NAKAI, K., SATOH, H. AND AKAGI, H. (2007): Correlations between mercury concentrations in umbilical cord tissue and other biomarkers of fetal exposure to methylmercury in the Japanese population. **Environ. Res.**, 103, 106-111.

SAKAMOTO, M.; YASUTAKE, A.; KAKITA, A.; RYUFUKU, M.; CHAN, H.M.; YAMAMOTO, M.; OUMI, S.; KOBAYASHI, S.; WATANABE, C. Selenomethionine protects against neuronal degeneration by methylmercury in the developing rat cerebrum. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 6, p. 2862-2868, 2013.

SATOH, H. Mercury. Cap 5 in WEISS, B. Aging and Vulnerability to Environmental Chemicals : Age-related Disorders and Their Origins in Enviromental Exposures. 2013 **Royal Society of Chemistry** disponível em www.pubs.rsc.org/content/ebook/978-1-84973-418-9#divbookcontent

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. 2001. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ed. Porto Alegre: Ed. **UFRGS/Ed. UFSC**, p. 597-619, 2001.

SCHNEIDER, C. D.; DE OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte.** 10(4), 2004.

SCHRAG SD, DIXON RL. Occupational exposures associated with male reproductive dysfunction. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 1985;25:567-592.

SHAHAT, A.; MARZOUK, M.S. Tannins and Related Compounds from Medicinal Plants of Africa. Medicinal Plant Research in Africa - **Pharmacology and Chemistry**, p. 470-555, 2013

SHAMI NJIE, MOREIRA EAM. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutr.** 2004; 17(2):227-36. doi: 10.1590/S1415-52732004000200009.

SHENKER BJ, ROONEY C, VITALE L, SHAPIRO IM. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. I. Suppression of T-cell activation. **Immunopharmacol Immunotoxicol** 1992;14(3):539-553.

SIEDENTOPP, U. El regaliz, una planta medicinal eficaz para la tos y las efecções de estómago. **Revista Internacional de Acupuntura** [online], v.2, n.2, 2008. Disponível em: http://www.dr-siedentopp.de/_zeitschrift/Dietetica_elregaliz.pdf. Acesso em: 02 set.2015.

SILVA, Wania. Potencial antiofídico de taninos isolados de *Plathymenia reticulata* Benth. sobre as principais atividades enzimáticas e biológicas induzidas pela peçonha de *Bothrops atrox*. Dissertação de mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA. Santarém, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: A necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n.1, p. 35-40, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; LILIANA ULERMENTZ, L.; ROSPETROVICK, P. Farmacognosia da planta ao medicamento. Ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2010.

SKERFVING, S. B.; COPPLESTONE, J. F. Poisoning caused by the consumption of organomercury-dressed seed in Iraq. Bull. **World Health Organ.** 54:101-12, 1976.

SOLT I, BORNSTEIN J. Childhood vaccines and autism: much ado about nothing?. **Harefuah** 2010;149(4):251-255.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free **Radical Biol Med.** 18:321–36, 1995.

SUMMERS AO, Wireman J, Vimy MJ, Lorscheider FL, Marshall B, Levy SB, et al. Mercury released from dental “silver” fillings provokes an increase in mercury and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. **Antimicrob Agents Chemother** 1993;37(4):825-834.

SWIFT, J. A. Morphology and histochemistry of human hair. Exs. 78:149-75, 1997; TAYLOR, N. E.; GLOCKA, P.; LIANG, M.; COWLEY JR, A. W. NADPH oxidase in the renal medulla causes oxidative stress and contributes to salt-sensitive hypertension in Dahl S rats. **Hypertension.** 47(4):692–8, 2006.

TOLEDO C.E.M., BRITTA E.A., CEOLE L.F., SILVA E.R., MELLO J.C.P. (2011). Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology** 133:420–425.

TOUFEKTSIAN, M.C.; LOGERRIL, M.; NAGY, N.; SALEN, P.; DONATI, M.B.; GIORDANO, L.; MOCK, H.P.; PETEREK, S.; MATROS, A.; PETRONI, K.; PILU, R.; ROTILLO, D.; TONELLI, C.; DE LEIRIS, J.; BOUCHER, F.; MARTIN, C. Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia reperfusion injury. **Journal of Nutrition**, v. 138, n. 4, p. 747, 2008.

UNEP, 2013. Global Mercury Assessment 2013: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. **UNEP Chemicals Branch**, Geneva, Switzerland, 2013.

WANG, Y.; CHEN, P.; TANG, C.; WANG, Y.; LI, Y.; ZHANG, H. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 944–950, 2014.

WHO - World Health Organization. Methylmercury. Environmental Health Criteria. International Program on Chemical Safety, 101-44, 2007.

WU MF, ISON JR, WECKER JR, LAPHAM LW. Cutaneous and auditory function in rats following methyl mercury poisoning. **Toxicol Appl Pharmacol** 1985;79(3):377-388.

XIA, M.; LING, W.; ZHU, H.; MA, J.; WANG, Q.; HOU, M.; TANG, Z.; GUO, H.; LIU, C.; YE, Q. Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation. **Atherosclerosis**, v. 202, n. 1, p. 41, 2009.

YOSHIDA M. Placental to fetal transfer of mercury and fetotoxicity. **Tohoku J Exp Med** 2002;196(2):79-88.

ANEXO I



Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental – LabbBEx- UFOPA

Protocolo Teste de Atividade Anti-oxidante de *Plathymenia reticulata*

Prof Jean Paul

Preparo das soluções-tampão

- Preparar concentrado de Fosfato de sódio monobásico (ou diácido) na proporção de 1 mol/L para 100ml
- Fazer diluição dos tampões 10x
- Preparar 100mL a 0,1M
- Pipetar 10mL de fosfato de sódio dibásico e acrescentar 90mL de água destilada
- Pipetar 10mL de fosfato de sódio monobásico e acrescentar 90mL de água destilada
- Misturar os tampões de 0,1 mol
- Juntar 100mL de fosfato de sódio dibásico a 0,1mol e ajustar o pH a 7,4 com o fosfato monobásico a 0,1M (usar o aparelho)
- Armazenar em tubo falcon de 50mL

Preparo das soluções reagentes

- Pesar 30,7mg de nitroblue tetrazolium (NBT) e adicionar 10mL do tampão fosfato de sódio a 7,4 de pH
- Pesar 0,1g de NADH e adicionar 10mL de fosfato de sódio a 7,4 de pH
- Pesar 9,2mg de metassulfato de fenazina (0,0092g) em 40mL de tampão fosfato de sódio a 7,4 de pH (proteger esta solução com papel alumínio, pois a fenazina é fotorreagente)
- Pesar 0,01g de extrato (liofilizado) de *Plathymenia reticulata* e diluir em 1mL do tampão

Obs: Centrifugar o extrato em velocidade máxima por 1 minuto; preparar uma caixa com gelo para a solução de metassulfato de fenazina

- Transferir 1mL dos reagentes para tubos de eppendorf para serem usados e manter no gelo

Leitura das amostras

- Ler as amostras em espectrofotômetro a 260nm
- Fazer a diluição da solução estoque de extrato de *P. reticulata* que está a 10mg/mL para 1mg/mL
- 900µL de tampão e 100µL de extrato (diluição de 10x)
- Realizar a primeira leitura sem extrato para medir a produção do radical superóxido (reação do NBT com o radical superóxido produzindo coloração azul, o produto azul é que é medido no espectrofotômetro)

Diluições:

Para 2mL

- 1955µL do tampão
- 40µL de NBT (distribuir o volume dentro do tampão)
- 40µL de NADH (distribuir dentro do tampão – homogeneizar)

.

- Zerar NBT e NADH juntos porque são de cor amarela
- Após isso, adicionar 10µL de fenazina metasulfonato

Obs: no momento em que adicionar a fenazina, iniciar o cronômetro; a homogeneização é obrigatória

A cada 30 segundos anotar a absorbância

*Concentrações do extrato a serem testados

- 0,125µL
- 0,250µL
- 0,5µL

Diluir novamente o estoque do extrato para uma diluição final de 100x para uma concentração final de 100µL

Para 0,5 – diluir 200x (10µL)

Adicionar: 40µL de NBT, 40µL de NADH e 10µL do extrato

Para o controle o extrato é substituído por 10µL de solução de fosfato

OBS: É importante intercalar um controle para zerar a cada diluição do extrato testada.

Cálculo da % de inibição: % de inibição = $(Abs_{controle} - Abs_{amostra}) / Abs_{controle} \times 100$