

**Ação neuroprotetora do ginseng brasileiro *Pfaffia glomerata* (Spreng.)  
Pedersen**

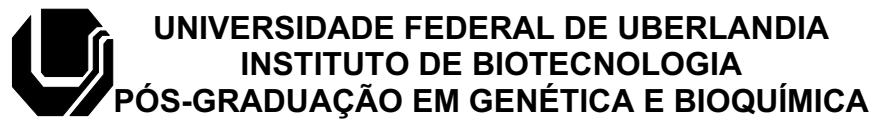
**Aluno:** Me. Rodrigo Rodrigues Franco

**Orientador:** Dr. Foued Salmen Espíndola

**Coorientador:** Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

**Coorientadora:** Dra. Cássia Regina da Silva

**UBERLÂNDIA – MG  
2021**



**Ação neuroprotetora do ginseng brasileiro *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**

**Aluno:** Me. Rodrigo Rodrigues Franco

**Orientador:** Dr. Foued Salmen Espíndola

**Coorientador:** Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

**Coorientadora:** Dra. Cássia Regina da Silva

**Tese apresentada à Universidade Federal  
de Uberlândia como parte das exigências  
para a obtenção do título de Doutor em  
Genética e Bioquímica (Área Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA – MG**

**2021**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFUcom  
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

F825 Franco, Rodrigo Rodrigues, 1991-  
2021 Ação neuroprotetora do ginseng brasileiro Pfaffia  
glomerata (Spreng.) Pedersen [recurso eletrônico] /  
Rodrigo Rodrigues Franco. - 2021.

Orientador: Foued Salmen Espindola.  
Coorientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.  
Coorientadora: Cássia Regina da Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.575>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Espindola, Foued Salmen, 1957-,  
(Orient.). II. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962-,  
(Coorient.). III. Silva, Cássia Regina da, 1984-,  
(Coorient.). IV. Universidade Federal de Uberlândia.  
Pós-graduação em Genética e Bioquímica. V. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica			
Defesa de:	Doutorado Acadêmico - nº 07/2021 - PPGGB.			
Data:	Seis de dezembro de dois mil e vinte e um	Hora de início:	13:00h	Hora de encerramento:
Matrícula do Discente:	11823GBI011			
Nome do Discente:	Rodrigo Rodrigues Franco			
Título do Trabalho:	Ação neuroprotetora do ginseng brasileiro <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen.			
Área de concentração:	Bioquímica			
Linha de pesquisa:	Bioquímica redox e estresse oxidativo, enzimologia e marcadores bioquímicos.			
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação das propriedades adaptogênicas e antioxidantes de produtos naturais em animais submetidos ao estresse induzido por imobilização e frio.			

Aos seis dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e um, às 13:00 horas, reuniu-se via web conferência pela Plataforma *MConf/RNP*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof. Dr. Filipe Silveira Duarte, Prof. Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes, Prof. Dr. Marcos Pivatto, Profª. Drª. Enyara Rezende Moraes e Prof. Dr. Foued Salmem Espindola, orientador do candidato e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Foued Salmem Espindola, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato:

APROVADO.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Foued Salmen Espíndola, Professor(a) do Magistério Superior**, em 06/12/2021, às 19:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Enyara Rezende Moraes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 06/12/2021, às 19:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Pivatto, Professor(a) do Magistério Superior**, em 06/12/2021, às 19:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Filipe Silveira Duarte, Usuário Externo**, em 06/12/2021, às 19:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos de Lucca Moreira Gomes, Usuário Externo**, em 06/12/2021, às 19:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site  
[https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3131052** e o código CRC **A0A8E2F1**.

**Dedico,**

*À Deus;*

*À minha esposa;*

*Aos meus pais e familiares.*

*Os amarei eternamente!*

**Agradeço,**

*À Deus, por toda compaixão que me doa e pela oportunidade de existir e de evoluir neste planeta/universo maravilhoso;*

*À minha esposa Rafaella, por ser minha companheira em etapas importantes da minha vida, dividindo comigo cada momento com muito amor e carinho;*

*Aos meus pais (João e Patrícia) e demais familiares que me receberam nesta existência e que contribuíram para que eu chegasse aonde estou;*

*Ao meu orientador prof. Foued, por ter aberto seu laboratório, por ter me orientado durante o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade que criamos;*

*Aos meus coorientadores prof. Luiz Ricardo (in memorian) e profa. Cássia Regina, além dos professores Wagner Otoni (UFV) e Nilson Nicolau Jr (UFU) por terem me auxiliado em etapas fundamentais durante a execução deste estudo;*

*Aos colegas que fiz na Universidade Federal de Uberlândia, Allisson, Joed, Lucas, Luiz, Victor, Letícia Takata e tantos outros, por terem compartilhado de momentos felizes, plotado muitos resultados e por terem participado em tantos projetos;*

*Ao meu país Brasil, ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo e ao Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Federal de Uberlândia, por terem me dado uma educação pública de qualidade no decorrer de toda a formação, realizando meu sonho em me tornar biólogo, mestre e doutor em genética e bioquímica;*

*Agradeço, de maneira geral, a cada pessoa que de algum modo tenha participado da minha formação como indivíduo e como cientista!*

*Um abraço!*

*Assim como a semente traça a forma e o destino da árvore, os teus próprios desejos  
é que te configuram a vida.*

*Emmanuel*

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	18
1.1 Considerações gerais.....	18
1.2 Doença de Alzheimer e suas complicações .....	20
1.3 Estresse, ansiedade e depressão .....	24
1.4 Estresse oxidativo, nitrosativo e carbonílico.....	27
1.5 Produtos naturais: <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen .....	31
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	34
2.1 Geral.....	34
2.2 Específicos .....	34
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	35
3.1 Reagentes .....	35
3.2 Obtenção do material vegetal seco .....	35
3.3 Preparação dos extratos metanólicos .....	35
3.4 Processo de fracionamento líquido-líquido dos extratos metanólicos .....	36
3.5 Atividade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) .....	36
3.6 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical peroxil (ORAC) .....	37
3.7 Capacidade de inibição da glicação proteica (método BSA/Frutose) .....	38
3.8 Inibição da enzima acetilcolinesterase .....	38
3.9 Prospecção fitoquímica .....	39
3.9.1 Avaliação da presença de polifenóis e açúcares.....	39
3.9.2 Avaliação da presença de terpenos e fitosteróis .....	39
3.9.3 Avaliação da presença de alcaloides .....	40
3.10 Sugestão da composição por espectrometria de massas .....	40
3.11 Quantificação do composto 20-hidroxiecdisona .....	41
3.12 Docking molecular e propriedades farmacocinéticas <i>in silico</i> .....	42
3.13 Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (MDMO) .....	42
3.13.1 Viabilidade celular (MTT).....	43
3.13.2 Inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS).....	43
3.13.3 Inibição da produção de óxido nítrico (NO) .....	44
3.14 Ensaio de hemólise .....	44
3.15 Parâmetros antioxidantes <i>ex vivo</i> utilizando tecido nervoso de camundongo...45	45

3.15.1 Inibição da Peroxidação lipídica (TBARS).....	46
3.15.2 Capacidade da manutenção de grupos tióis (Sulfidrilas).....	46
3.15.3 Inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS).....	47
3.15.4 Capacidade de redução de ferro (FRAP) .....	47
3.16 Animais e tratamentos em estudo <i>in vivo</i> .....	47
3.16.1 Protocolos comportamentais .....	49
3.16.1.1 Teste de campo aberto.....	49
3.16.1.2 Teste de labirinto em cruz elevado.....	50
3.16.1.3 Teste de nado forçado.....	50
3.16.1.4 Teste da roda giratória (rotarod).....	51
3.16.2 Análise dos biomarcadores do estresse oxidativo no encéfalo .....	52
3.16.2.1 Capacidade antioxidante total .....	53
3.16.2.2 Peroxidação lipídica .....	53
3.16.2.3 Conteúdo de grupos sulfidrilas .....	54
3.16.2.4 Concentração de glutationa reduzida (GSH).....	54
3.16.2.5 Atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx).....	54
3.16.2.6 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) .....	55
3.16.2.7 Atividade da enzima catalase (CAT) .....	55
3.16.2.8 Conteúdo de nitrito e nitrato (NOx).....	55
3.17 Análise estatística .....	56
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
4.1 Rendimentos obtidos para cada amostra .....	57
4.2 Atividade antioxidante e antiglicante .....	58
4.3 Inibição da enzima acetilcolinesterase .....	62
4.4 Prospecção fitoquímica .....	64
4.5 Espectrometria de massas .....	65
4.6 Quantificação de 20-hidroxiecdiona .....	67
4.7 Docking molecular e farmacocinética .....	68
4.8 Efeitos das frações PAD e RD em ensaios de hemólise, citotoxicidade, produção de EROS e de NO em cultura de células .....	72
4.9 Efeitos contra oxidações induzidas <i>ex vivo</i> .....	75
4.10 Efeito da fração RD nas alterações comportamentais relacionadas à ansiedade, estresse e depressão .....	77

4.11 Aumento das defesas antioxidantes pela RD .....	81
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
Anexos .....	105
Artigo publicado (IF:4,36 e Qualis/CAPES B1).....	117

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celcius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
Å	Ångström
AGEs	Espécies avançadas de glicação proteíca
APO B	Apoliproteína B
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAT	Catalase
CdKs	Quinases dependentes de ciclina
CI <sub>50</sub>	Metade da concentração inibitória máxima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetro
DMSO	Dimetilssulfóxido
DTNB	Reagente de Ellman (5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico))
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
eV	Elétron volt
g	Gramas
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSK-3β	Glicogênio sintase Quinase 3 beta
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
CLAE-IES-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa com ionização por eletrospray
IL-18	Interleucina 18
kV	Kilo volt
L	Litro
m/z	Massa/carga do íon molecular

mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmoL	Milimol
NFkB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nitríco
NO <sub>2</sub> <sup>-·</sup>	Óxido nítrico
NOX	NADPH oxidase
Nrf2	Fator nuclear relacionado ao eritroide 2
O <sub>2</sub> <sup>-·</sup>	Íon superóxido
OH <sup>·</sup>	Hidroxila
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PAA	Fração de acetato de etila da parte áerea
PAB	Fração de n-butanol da parte áerea
PAH <sub>2</sub> O	Fração aquosa da parte áerea
PAD	Fração de diclorometano da parte áerea
PAH	Fração de hexâno da parte áerea
PAM	Extrato metanólico da parte áerea
PBS	Tampão fosfato de sódio
Q-TOF	<i>Quadrople Time of Fligth Mass Espectrometry</i>
RA	Fração de acetato de etila das raízes
RB	Fração de n-butanol das raízes
RD	Fração de diclorometano das raízes
RH	Fração de hexâno das raízes
RH <sub>2</sub> O	Fração aquosa das raízes
RM	Extrato metanólico das raízes
RO <sup>·</sup>	Peroxila
SDE	Solução diluída em eritrócitos
SOD	Superóxido dismutase
SRE	Solução enriquecida em eritrócitos
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Sinapse no Alzheimer (A) e inibidores da enzima acetilcolinesterase (B)	23
<b>Figura 2</b> – Diferenças entre eustresse e distresse .....	25
<b>Figura 3</b> – Ansiedade e depressão.....	26
<b>Figura 4</b> – Espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERNS).....	28
<b>Figura 5</b> – Compostos glicados e seus efeitos no sistema nervoso .....	30
<b>Figura 6</b> - Parte aérea (PA) e raiz (R) da <i>Pfaffia glomerata</i> .....	32
<b>Figura 7</b> – Delineamento experimental e os grupos avaliados .....	48
<b>Figura 8</b> – Modelo de equipamento usado para teste de campo aberto.....	49
<b>Figura 9</b> – Modelo de equipamento usado para teste de labirinto em cruz elevado ..	50
<b>Figura 10</b> – Modelo de equipamento usado para teste de nado forçado.....	51
<b>Figura 11</b> – Modelo de equipamento usado para teste de nado forçado.....	52
<b>Figura 12</b> – Otenção do córtex, estriado e hipocampo .....	53
<b>Figura 13</b> - Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH.....	59
<b>Figura 14</b> - Avaliação da capacidade antioxidante pelo método ORAC e antiglicante pelo método BSA/Frutose .....	61
<b>Figura 15</b> - Ensaios de inibição da enzima acetilcolinesterase.....	63
<b>Figura 16</b> - Moléculas sugeridas nas amostras PAD e RD por espectrometria .....	67
<b>Figura 17</b> - Diagrama 2D apresentando a interação entre o composto 20-E e o controle galantamina com enzimas acetilcolinesterase humana e de peixe elétrico .....	69
<b>Figura 18</b> - Avaliação da viabilidade celular e da produção de NO por macrófagos tratados com as frações PAD e RD.....	73
<b>Figura 19</b> – Avaliação da produção de EROS por macrófagos tratados com as frações PAD e RD.....	74
<b>Figura 20</b> – Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos tratados com as frações PAD e RD .....	75
<b>Figura 21</b> – Avaliação da atividade antioxidante das frações PAD e RD em tecido nervoso em modelo <i>ex vivo</i> .....	76
<b>Figura 22</b> – Efeitos da fração RD sobre a função motora, número de Reading e número de fezes em diferentes dias de isolamento social .....	78
<b>Figura 23</b> – Efeitos protetivos da fração RD sobre o comportamento tipo depressivo e seus efeitos ansiolíticos em camundongos expostos ao isolamento social .....	79
<b>Figura 24</b> - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em regiões do encéfalo de camundongos.....	82
<b>Figura 25</b> - Atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx) e concentração de glutationa reduzida (GSH) em regiões do encéfalo de camundongos .....	83
<b>Figura 26</b> - Nível de peroxidação lipídica e concentração total de grupos sulfidrilas em regiões do encéfalo de camundongos.....	84
<b>Figura 27</b> - Capacidade antioxidante e concentração total de nitrato/nitrito (NOx) em regiões do encéfalo de camundongos.....	85

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Rendimento dos extratos de <i>P. glomerata</i> obtidos através da técnica de maceração .....	57
<b>Tabela 2</b> - Rendimento das frações de <i>P. glomerata</i> obtidas através da técnica de fracionamento líquido-líquido.....	57
<b>Tabela 3</b> - Prospecção fitoquímica de polifenóis, terpenos/esteroides e alcaloides....	64
<b>Tabela 4</b> - Compostos presentes na fração de diclorometano da parte aérea (PAD) e na fração de diclorometano das raízes (RD) da planta <i>P. glomerata</i> usando CLAE-IES-EM/EM (modo positivo e negativo em 5, 10, 15, 20, 25 e 30 eV) .....	66
<b>Tabela 5</b> - Concentração do composto 20-hidroxyecdisona nas frações PAD e RD... <td>68</td>	68
<b>Tabela 6</b> - Pontuação máxima resultante da docagem.....	68
<b>Tabela 7</b> - Avaliação da farmacocinética in sítico para o composto 20-hidroxyecdisona .....	71
<b>Tabela 8</b> - Tempo de latência para a primeira queda no teste de rotarod para camundongos tratados com solução salina, 10 mg / kg de diazepam ou 30 mg / kg da fração RD .....	80

## **RESUMO**

A planta *Pfaffia glomerata*, popularmente chamada de ginseng-brasileiro, é amplamente utilizada no Brasil para o tratamento de diversas patologias, incluindo as associadas ao Sistema Nervoso Central. A 20-hidroxiecdisona, fitoesteroide presente nesta planta, pode promover efeitos adaptógenos no organismo, conferindo maior resistência corporal a estressores exógenos e endógenos. O objetivo deste estudo foi avaliar o possível efeito neuroprotetor de extratos e frações da parte aérea e raízes de *P. glomerata*, utilizando métodos *in vitro*, além de determinar a presença e concentração de 20-hidroxiecdisona nessas amostras. Por outro lado, a fração diclorometano (RD) do extrato metanólico das raízes foi testada em modelo *in vivo*, uma vez que as raízes são as partes mais utilizadas popularmente. As frações foram obtidas pela partição dos extratos metanólicos da parte aérea e das raízes de *P. glomerata* com hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol, tendo sido obtido também o resíduo aquoso (fração água). As amostras foram inicialmente testadas em ensaios de atividade antioxidante e antiglicante e, posteriormente, aquelas frações mais promissoras foram submetidas a análises de citotoxicidade e cromatográfica. A espectrometria de massas e a análise por cromatografia líquida de alta eficiência revelaram que a 20-hidroxiecdisona foi o principal composto na fração diclorometano, tanto na parte aérea (PAD) com 45 µg/mg de fração, como nas raízes (RD), com 33,5 µg/mg de fração. Dentre as análises *in vitro*, a fração PAD apresentou resultados mais promissores do que a fração RD. No modelo *in vivo*, camundongos C57BL6 foram tratados por gavagem com três doses da fração RD (3, 10 e 30 mg/kg) e submetidos a avaliação de parâmetros de estresse, ansiedade e depressão. Os animais tratados com 30 mg/kg de RD também foram submetidos a análise de biomarcadores do estresse oxidativo no córtex, estriado e hipocampo. A dose de 30 mg/kg de RD foi capaz de reduzir o estresse, a ansiedade e a depressão, além de manter as defesas antioxidantes do córtex e estriado dos camundongos avaliados. Essas descobertas abrem novas perspectivas para a compreensão das propriedades terapêuticas de *P. glomerata* associando a atividade biológica a presença dos fitoesteróides.

**Palavras-chave:** *Pfaffia glomerata*, 20-hidroxiecidisona, estresse oxidativo, produtos naturais, sistema nervoso, efeito adaptógeno.

## **ABSTRACT**

The plant *Pfaffia glomerata*, popularly called Brazilian ginseng, is widely used in Brazil for the treatment of various pathologies, including those associated with the Central Nervous System. 20-hydroxyecdysone, a phytosteroid present in this plant, can promote adaptogenic effects in the body, providing greater body resistance to exogenous and endogenous stressors. The aim of this study was to evaluate the possible neuroprotective effect of extracts and fractions from shoots and roots of *P. glomerata*, using in vitro methods, in addition to determining the presence and concentration of 20-hydroxyecdysone in these samples. On the other hand, the dichloromethane fraction (RD) of the methanol extract of the roots was tested in an *in vivo* model, since the roots are the most popularly used parts. The fractions were obtained by partitioning methanol extracts from the aerial part and roots of *P. glomerata* with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol, and the aqueous residue (water fraction) was also obtained. The samples were initially tested in antioxidant and antiglycation activities assays and, later, those most promising fractions were submitted to cytotoxicity and chromatographic analyses. Mass spectrometry and analysis by high performance liquid chromatography revealed that 20-hydroxyecdysone was the main compound in the dichloromethane fraction, both in the aerial part (PAD) with 45 µg/mg fraction, and in the roots (RD) with 33.5 µg/mg of fraction. Among the *in vitro* analyses, the PAD fraction showed more promising results than the RD fraction. In the *in vivo* model, C57BL6 mice were treated by gavage with three doses of the RD fraction (3, 10 and 30 mg/kg) and submitted to evaluation of stress, anxiety and depression parameters. Animals treated with 30 mg/kg of RD were also submitted to analysis of oxidative stress biomarkers in the cortex, striatum and hippocampus. The dose of 30 mg/kg of RD was able to reduce stress, anxiety and depression, in addition to maintaining the antioxidant defenses of the cortex and striatum of the evaluated mice. These discoveries open new perspectives for understanding the therapeutic properties of *P. glomerata* associating the biological activity with the presence of phytosteroids.

**Keywords:** *Pfaffia glomerata*, 20-hydroxyecdysone, oxidative stress, natural products, nervous system, adaptogenic effect.

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Considerações gerais**

As doenças neurológicas demência e estresse, além dos transtornos mentais depressão e ansiedade, são caracterizados por uma combinação de alterações fisiológicas, emocionais e comportamentais entre o paciente e outras pessoas próximas em seu convívio (GBD, 2018). Essas doenças continuam a crescer ao redor do mundo, com impactos significativos na saúde e importantes consequências sociais, de direitos humanos e econômicas em todos os países do mundo (CHARLSON; VAN OMMEREN; FLAXMAN; CORNETT *et al.*, 2019).

A demência é uma síndrome crônica e/ou progressiva que leva a deterioração do sistema nervoso central e gradual perda cognitiva, sendo a doença de Alzheimer responsável por cerca de 60 – 70% dos casos (WHO, 2018). A doença acomete principalmente idosos e já é considerada a sétima causa de morte no mundo, gerando implicações sociais e econômicas significativas em termos de custos diretos de assistência médica e social (WHO, 2018). Os mecanismos bioquímicos do desenvolvimento da demência ainda não estão totalmente conhecidos, mas muitos trabalhos vêm relacionando a doença como causa e/ou consequência do estresse (JUSTICE, 2018).

Por sua vez, o estresse se tornou um grande problema de saúde mental, já que pode também ser um fator importante no desenvolvimento de ansiedade e depressão (WHO, 2017). A exposição a diferentes situações estressantes leva a manifestações psicopatológicas que provocam consideráveis alterações fisiológicas e bioquímicas, que podem incluir inflamação e estresse oxidativo (BARDEEN; FERGUS, 2016; TEIXEIRA; DE SOUZA; PEIXOTO; MACHADO *et al.*, 2017). Devido ao aumento dos casos de demência e de estresse, inúmeras pesquisas vêm sendo feitas em busca de novas intervenções terapêuticas (ALZOBAIDI; QUASIMI; EMAD; ALHALMI *et al.*, 2021).

Neste cenário, as plantas medicinais e seus compostos bioativos com propriedades adaptogênicas têm sido recomendadas como opções terapêuticas complementares para tratar demência (LUTHRA; ROY, 2021) e para controlar o estresse e seus sintomas psicopatológicos (KAUR; MAKANJUOLA; ARORA;

SINGH *et al.*, 2017; CARLINI, 2003; DOBREK, 2019; UDDIN; AL MAMUN; KABIR; JAKARIA *et al.*, 2019). Os adaptógenos incluem plantas e várias substâncias que aumentam a resistência inespecífica do corpo, protegendo-o de estressores (PANOSSIAN; WIKMAN, 2010). Dentre essas plantas, destaca-se a *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, espécie da família Amaranthaceae, nativa do Brasil e popularmente conhecida como "ginseng brasileiro", devido às suas propriedades medicinais serem comparadas ao do ginseng asiático (*Panax ginseng*) (MARQUES, 1998). Na medicina tradicional brasileira, as raízes de *P. glomerata* são utilizadas como antioxidantes e como tratamento em vários distúrbios físicos e mentais (CARLINI, 2003; CARLINI; RODRIGUES; MENDES; NEGRI *et al.*, 2007). O efeito adaptogênico de *P. glomerata* é atribuído ao fitoesteroide 20-hidroxiecdisona (20E), que atualmente já é utilizado como ingrediente em suplementos dietéticos (HUNYADI; HERKE; LENGYEL; BÁTHORI *et al.*, 2016; AMBROSIO; WIRTH; JOSEPH; MAZZARINO *et al.*, 2020). Vale salientar que o composto 20E é produzido também por artrópodes, atuando como hormônio da ecdise no organismo desses animais (DELALIO; DION; BOOTES; SMITH, 2015). A literatura aponta que a parte aérea de *P. glomerata* apresenta maiores teores de 20E do que as raízes da planta (DE MELO MARTINS; ANDRICH; MARTINS; CALAÇA *et al.*, 2020), contudo, ainda são poucos os estudos com a parte aérea.

Por outro lado, já foi sugerido que as raízes de *P. glomerata* e 20E desempenham um papel no sistema nervoso central humano e em roedores, no tratamento de doenças e transtornos mentais (DE-PARIS; NEVES; SALGUEIRO; QUEVEDO *et al.*, 2000; VIGO; NARITA; NAKAMURA; MARQUES, 2003; FENNER; ZIMMER; NEVES; KLIEMANN *et al.*, 2008) não tendo sido exibido qualquer atividade citotóxica ou mutagênica (ALMEIDA; DÜSMAN; MATTGE; TOLEDO *et al.*, 2017). Estudos em animais indicaram que 20E previne a apoptose de neurônios e astrócitos (WANG; WANG; FENG; WANG *et al.*, 2014), melhora o comprometimento cognitivo (MARQUES; GALVÃO; ESPÍNOLA; DIAS *et al.*, 2004), tem efeitos benéficos contra lesão cerebral e inibe a produção de espécies reativas de oxigênio (ERNS) (HU; LUO; CHU; SHAN *et al.*, 2012).

Xia; Zhang; Liu; Wang *et al.* (2014) mostraram que o 20E é capaz de reduzir déficits de memória em ratos submetidos ao Diabetes mellitus tipo 1, induzido pela estreptozotocina, possivelmente por aumentar a capacidade antioxidante do

cérebro. Tsujiyama; Ujihara; Ishihara e Sasa (1995) indicaram que 20E atuou no sítio modulador do receptor de ácido gama-aminobutírico GABA-A e aumentou a inibição GABAérgica em cultura de neurônios corticais, desencadeando um efeito ansiolítico. De acordo com Marques; Galvão; Espínola; Dias et al. (2004), extratos das raízes de *P. glomerata* reverteram parcialmente a memória induzida pela idade e os déficits de aprendizagem. Da mesma forma, Vigo; Narita; Nakamura e Marques (2003) mostraram que extratos hidroetanólicos desencadearam efeitos sedativos em roedores.

Outros estudos indicaram ainda que o fitoesteroide 20E foi capaz de promover a inibição da acetilcolinesterase, uma enzima cuja inibição é vista como importante no tratamento do Alzheimer (NEJMA; NGUIR; JANNET; DAÏCH et al., 2015; MAMADALIEVA; BÖHMDORFER; ZENGIN; BACHER et al., 2019; MOAWAD; ABUZAID; ARAFA; AHMED et al., 2020). Além disso, Kang; Zhang; Wang; Zhao et al. (2019) indicaram que a 20E foi capaz de estimular a produção de receptores de dopamina e de ativar a via MAPKinase. A via MAPKinase foi descrita como sendo capaz de reduzir a geração de β-amiloïdes e de aliviar deficiências cognitivas em modelos de doença de Alzheimer (DU; DU; ZHANG; HUANG et al., 2019).

## **1.2 Doença de Alzheimer e suas complicações**

A doença de Alzheimer (DA) é uma condição que pertence a categoria de patologias neurodegenerativas denominada demência, cujo principal sintoma é o declínio gradual das capacidades cognitivas do indivíduo (CALABRÒ; RINALDI; SANTORO; CRISAFULLI, 2021). A neuropatologia compreende cerca de 60 a 70% dos casos de demência ao redor do mundo, sendo uma das doenças que mais crescem entre as principais causas de morte (WHO, 2018). Atualmente, cerca de 55 milhões de pessoas vivem com demência, gerando um custo global estimado em US \$ 818 bilhões (PRINCE; WIMO; GUERCHET; ALI et al., 2017).

A DA acomete o indivíduo de maneira progressiva e geralmente afeta pessoas idosas (>65 anos), porém, casos de início precoce foram indicadas na literatura (~10% dos casos no mundo) (PERL; TRANSLATIONAL; MEDICINE, 2010). Atualmente, as intervenções terapêuticas são muito limitadas, uma vez que

o conhecimento do mecanismo molecular que causa a doença ainda é pouco compreendido (DUNN; STEIN; CAVAZZONI, 2021). Contudo, sabe-se que indivíduos com DA apresentam gradual perda sináptica, acúmulos de placas proteicas  $\beta$ -amiloides e emaranhados neurofibrilares de proteína Tau no sistema nervoso, resultando em perda cognitiva e morte dos neurônios (CALABRÒ; RINALDI; SANTORO; CRISAFULLI, 2021). A proteína precursora de amilóide (APP) é uma proteína transmembrana encontrada naturalmente nos neurônios e, ainda que pouco compreendida, sabe-se que sua função é atuar na ação sináptica, na diferenciação e plasticidade neuronal (MÜLLER; DELLER; KORTE, 2017). A APP pode ser clivada por enzimas denominadas secretases, podendo ser encontradas as isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (WILKINS; SWERDLOW, 2017). Em indivíduos normais, a APP é processada pela  $\alpha$ -secretase e depois pela  $\gamma$ -secretase, e os fragmentos obtidos atuarão em processos específicos de sinalização celular (HARTMANN, 2013).

Por outro lado, em indivíduos com DA, a proteína APP é clivada primeiramente pela  $\beta$ -secretase e depois pela  $\gamma$ -secretase, liberando um fragmento de proteína  $\beta$ -amiloide, que pode formar oligômeros que possuem atividades neurotóxicas e com potencial em se agruparem e formarem placas proteicas de  $\beta$ -amiloides (O'BRIEN; WONG, 2011). Essas placas possuem formato esférico e começam a se acumular entre as sinapses, dificultando a propagação do impulso nervoso (RODRIGUES, 2011; SINGH; SHARMA; ARORA; ATTRI *et al.*, 2020).

Outra alteração presente na DA é a formação de emaranhados de proteína Tau (GUO; NOBLE; HANGER, 2017). As proteínas Tau começam a se aglomerar após serem hiperfosforiladas anormalmente na DA, formando emaranhados neurofibrilares capazes de alterar a estrutura do neurônio, resultando em células com axônios longos e finos em comparação com o corpo celular (GUO; NOBLE; HANGER, 2017). A proteína Tau também tem importância fisiológica, pois é capaz de se ligar aos microtúbulos do citoesqueleto encontrado nos axônios e assim estabilizá-los e, após isso, a proteína é desconectada através da fosforilação normal (SPIRES-JONES; HYMAN, 2014)..

Também são visualizadas mudanças metabólicas e imunológicas no paciente com DA, com destaque para ocorrência do estresse oxidativo e inflamações, considerados atualmente como fatores que antecedem e sucedem a

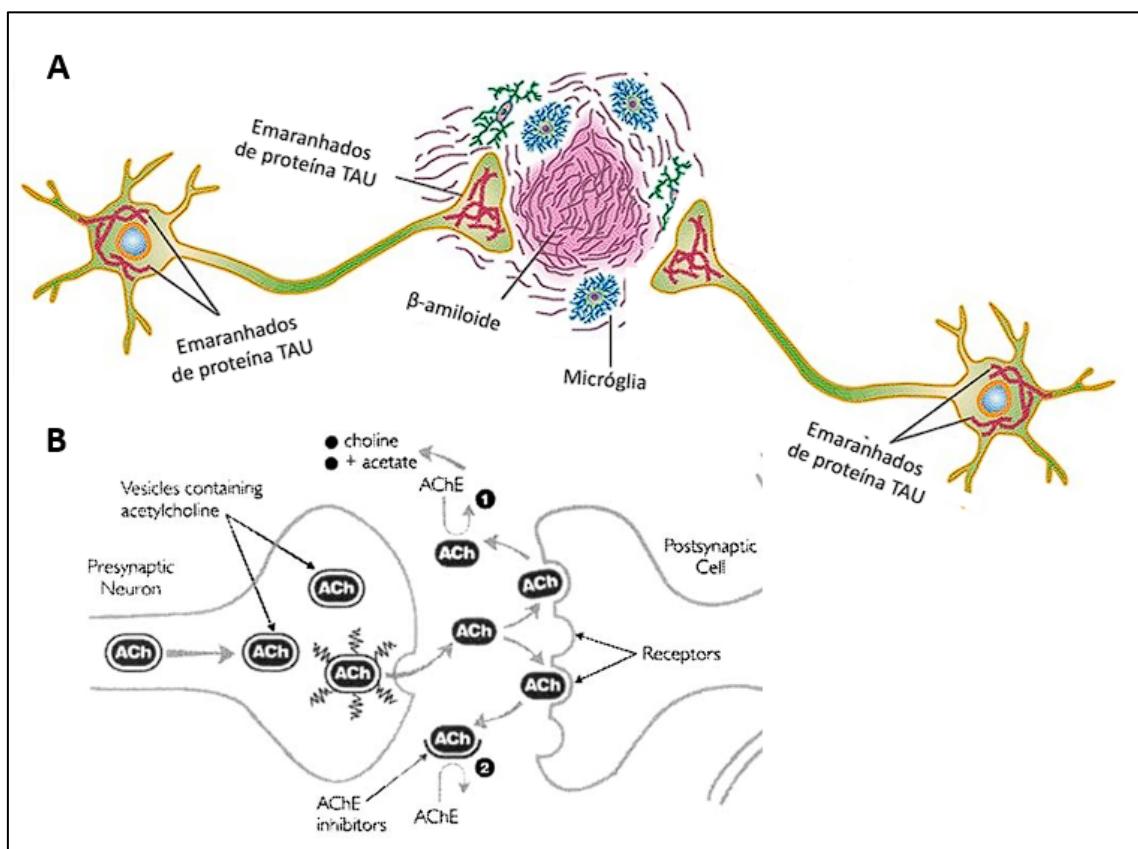
doença (CALABRÒ; RINALDI; SANTORO; CRISAFULLI, 2021). Sabe-se que os neurônios são muito sensíveis ao estresse oxidativo, pois seu conteúdo antioxidante é baixo quando comparado a outras células/tecidos, além disso, suas membranas são ricas em ácidos graxos poli-insaturados sensíveis a oxidação (MILLER; LAWRENCE; MONDAL; SEEGAL, 2009).

O processo natural de envelhecimento aumenta os radicais livres com o tempo, prejudicando fortemente os componentes sinápticos envolvidos na plasticidade neuronal, dinâmica do citoesqueleto e comunicação celular, processos estes conhecidos por serem complicações da DA (CALABRÒ; RINALDI; SANTORO; CRISAFULLI, 2021). Como dito, a literatura indica que o estresse oxidativo se inicia antes da instalação da DA, contudo, Bruce-Keller; Gupta; Knight; Beckett et al. (2011) mostraram que as proteínas  $\beta$ -amiloides, uma vez acumuladas, são capazes de estimular a produção de EROS e de ERNS (espécies oxidativas de nitrogênio) e intensificar a fosforilação da Tau.

Acredita-se que esse estímulo também esteja relacionado com a produção de mediadores inflamatórios, incluindo NOX, TGF- $\beta$ , NF- $\kappa$ B e Nrf2, capazes de desencadear outros eventos ligados ao DA, tais como disfunção mitocondrial, perda funcional de proteínas, ácidos nucleicos, organelas e membranas (BRUCE-KELLER; GUPTA; KNIGHT; BECKETT et al., 2011). Além disso, os radicais livres (EROS e ERNS) são capazes de reduzir a produção de transportadores e de receptores de acetilcolina, levando a uma redução no ciclo e disponibilidade da colina, gerando uma depressão colinérgica (RIDNOUR; DHANAPAL; HOOS; WILSON et al., 2012).

Devido a possível depressão colinérgica e ao acúmulo de placas de proteínas  $\beta$ -amiloide que afetam e encurtam a sinapse, estudos buscam inibidores da acetilcolinesterase, enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina em colina (VECCHIO; SORRENTINO; PAOLETTI; MARRA et al., 2021). Segundo Vecchio; Sorrentino; Paoletti; Marra et al. (2021), a inibição desta enzima, promove um aumento considerável da vida útil e da disponibilidade da acetilcolina na sinapse e, com isso, é possível gerar uma melhora cognitiva no paciente (Figura 1).

**Figura 1** – Sinapse no Alzheimer (A) e inibidores da enzima acetilcolinesterase (B)



Fonte (Adaptado): [https://www.researchgate.net/publication/11447114\\_Inspection\\_time\\_A\\_neuropsychophysiological\\_test\\_for\\_measuring\\_the\\_functional\\_integrity\\_of\\_the\\_cholinergic\\_system](https://www.researchgate.net/publication/11447114_Inspection_time_A_neuropsychophysiological_test_for_measuring_the_functional_integrity_of_the_cholinergic_system)

Todas essas complicações bioquímicas podem acarretar em um processo de neuroinflamação, que por sua vez intensificará os processos de neurodegeneração comumente observados na DA, tais como a hiperfosforilação da Tau, deposição de proteínas β-amiloide e a produção de citocinas pró-inflamatórias que o gerou (ZOTOVA; NICOLL; KALARIA; HOLMES *et al.*, 2010). O aumento de citocinas induzirá o estresse oxidativo e a permeabilidade da barreira hematoencefálica, além de estimular a produção de IL-18, que por sua vez aumenta os níveis de Cdk5 e GSK-3β, que estão envolvidos na hiperfosforilação de Tau (OJALA; SUTINEN; SALMINEN; PIRTTILÄ, 2008). Essas substâncias ainda prejudicam o metabolismo energético no sistema nervoso, pois promovem uma redução da produção de transportadores GLUT3 e GLUT1, transportadores de glicose encontrados nos neurônios e em células da barreira hematoencefálica, respectivamente (LIU; LIU; IQBAL; GRUNDKE-IQBAL *et al.*, 2008).

### **1.3 Estresse, ansiedade e depressão**

O processo homeostático permite que os organismos mantenham as funções adequadas de seu meio interno, indo contra aos estímulos ambientais que tendem a desestabilizá-lo; sendo a ameaça imposta ao organismo definida como estressor e as alterações geradas, de resposta ao estresse (DAVIES, 2016). Essas respostas evoluíram como processos adaptativos, contudo, se prolongados, podem levar o organismo a danos teciduais e ao desenvolvimento de doenças (NIKI; BIOPHYSICS, 2016). Os efeitos do estresse não são específicos, podendo diferentes estressores gerarem as mesmas respostas, que serão desencadeadas, a longo ou a curto prazo, pelos sistemas nervoso, endócrino, cardiovascular e imune (SOUSA; SILVA; GALVÃO-COELHO, 2015).

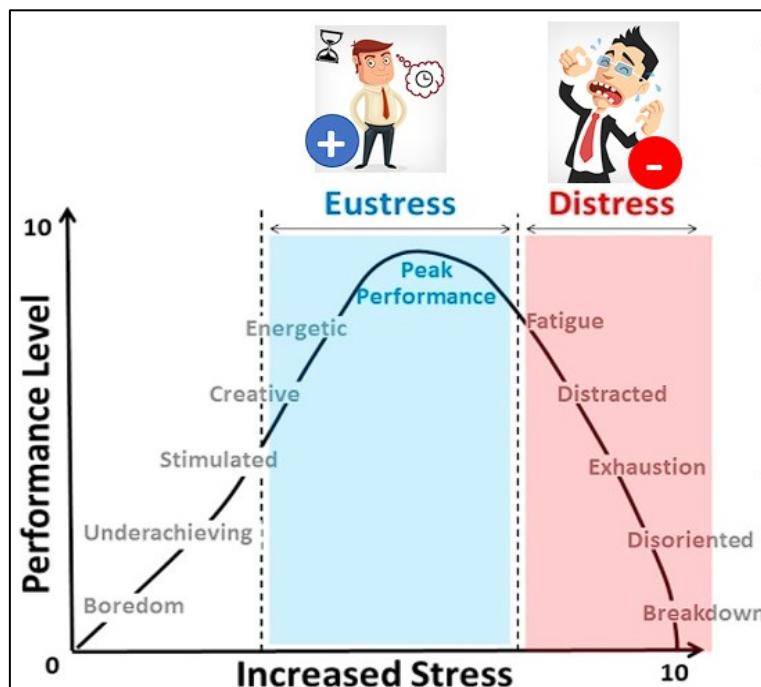
A exposição do indivíduo a um determinado estressor resulta em alterações fisiológicas e comportamentais, tais como aumento da atividade cardiorrespiratória, dilatação da pupila, ansiedade, depressão, aumento do metabolismo catabólico e da produção de catecolaminas e corticosteroides em resposta ao estímulo (KNIGHT; GIULIANO; SHANK; CLARKE *et al.*, 2020). Essas e outras alterações fisiológicas definem o estresse físico e/ou mental, que durante a evolução dos seres vivos, conferiu-lhes a capacidade de enfrentar ou fugir de situações adversas à sua sobrevivência, com o intuito de minimizar os possíveis danos ao organismo (NESSE; BHATNAGAR; ELLIS; BEHAVIOR, 2016).

A resposta imediata ao estressor se dá por ação do hipotálamo e do sistema nervoso autônomo (SNA), ocasionando aumento da glicemia, da frequência cardiorrespiratória, do fluxo sanguíneo no músculo esquelético, dilatação da pupila entre outros efeitos (KNIGHT; GIULIANO; SHANK; CLARKE *et al.*, 2020). Essa resposta vem acompanhada da produção de adrenalina e noradrenalina nas adrenais e, se a resposta ao estresse for prolongada, ocorrerá a liberação de corticoides, produzidos pela mesma glândula, que amplificam as ações do sistema nervoso simpático sobre a circulação, mantendo níveis adequados de oxigênio e de glicose em situação de emergência (JASZCZYK; JUSZCZAK; REVIEWS, 2021).

Neste momento, algumas funções fisiológicas, como reprodução, digestão e crescimento entram em latência (SOUSA; SILVA; GALVÃO-COELHO, 2015) e quando excedem o limite do organismo, podem gerar depressão, ansiedade e problemas cognitivos e, em casos crônicos, os tecidos podem sofrer diminuição

funcional devido à exposição do organismo aos radicais livres produzidos (BRULÉ; MORGAN; MANAGEMENT, 2018). Em determinadas situações, o estresse pode ser vantajoso e auxiliar o organismo a superar situações adversas, aumentando a produtividade e criatividade e, neste caso, é chamado de eustresse (BRULÉ; MORGAN; MANAGEMENT, 2018). Todavia, o estresse em excesso pode se tornar patológico, reduzindo a capacidade de comunicação, concentração, criatividade e produtividade, sendo denominado nestes casos de distresse (NIKI; BIOPHYSICS, 2016) (Figura 2).

**Figura 2 – Diferenças entre eustresse e distresse**



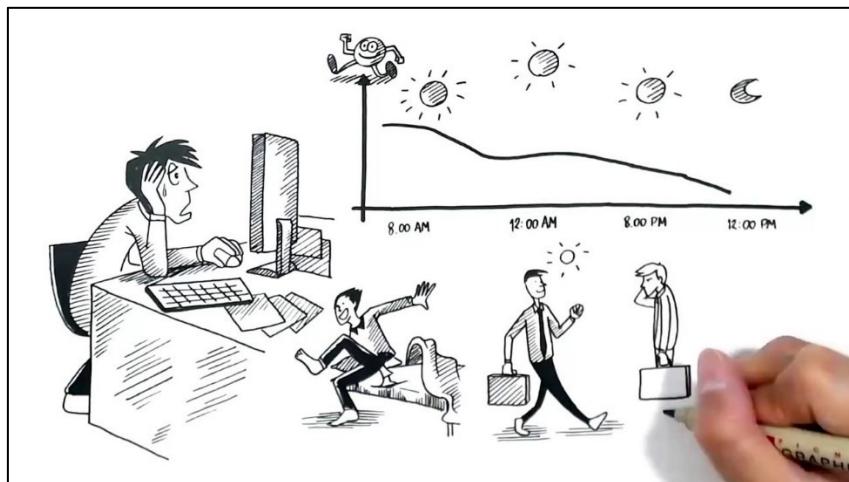
Fonte (Adaptado): <https://integralchurch.wordpress.com/2015/01/05/top-8-ways-to-disrupt-your-own-routine/>

Essas alterações também favorecem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERNS), além de outros radicais livres, acarretando em efeitos extremamente nocivos para o organismo (WANG; MUXIN; NISHIDA; SHIRAKAWA *et al.*, 2007). Ademais, temos a ansiedade, que pode ser considerada um dos efeitos do estresse patológico, afetando cerca de 264 milhões de pessoas na população mundial, sendo ainda considerada um fator de risco para o desenvolvimento de quadros depressivos (GUTMAN, 2010; SADOCK; SADOCK; RUIZ, 2016; WHO, 2017). Naturalmente, a ansiedade é considerada um processo

de alerta, sendo um importante mecanismo adaptativo para o indivíduo encontrar meios de sobrevivência em seu ambiente; porém gera sensações desagradáveis de medo, apreensão, tensão, desconforto e inquietação, podendo ser acompanhada por taquicardia, insônia, tontura e desconforto gastrointestinal (SADOCK; SADOCK; RUIZ, 2016). Contudo, a ansiedade pode se tornar patológica devido à frequência, duração ou intensidade do estímulo, muitas vezes ocorrendo sem causa definida, apenas com origem emocional/psicológica, prejudicando a homeostasia do organismo (PERROTTA, 2019).

Outro transtorno mental de grande relevância é a depressão, caracterizada por tristeza persistente e falta de interesse ou prazer em atividades anteriormente gratificantes ou agradáveis, sendo uma doença comum em todo mundo (WHO, 2017). Pesquisas demonstram que cerca de 50% dos pacientes com Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla possui depressão (CASTILLO; RECONDO; ASBAHR; MANFRO, 2000; GAVIN; REISDORFER; DA SILVA GHERARDI-DONATO; DOS REIS *et al.*, 2015).

**Figura 3 – Ansiedade e depressão**



Fonte: <https://www.youngminds.org.uk/parent/a-z-guide/anxiety/>

A literatura indica que há alta relação entre ansiedade, depressão e estresse, justificando que geralmente indivíduos estressados e/ou ansiosos possuem quadros de depressão (SADOCK; SADOCK; RUIZ, 2016). Tanto no estresse quanto na ansiedade, há alteração nos níveis de noradrenalina presentes no organismo, entretanto, no caso da depressão há a deficiência da mesma

(SADOCK; SADOCK; RUIZ, 2016). Diferentes terapias são aplicadas para o tratamento destas condições como o uso de fármacos ansiolíticos e antidepressivos, de terapias não convencionais como acupuntura, prática de yoga, entre outros (MAUST; BLOW; WIECHERS; KALES *et al.*, 2017).

#### **1.4 Estresse oxidativo, nitrosativo e carbonílico**

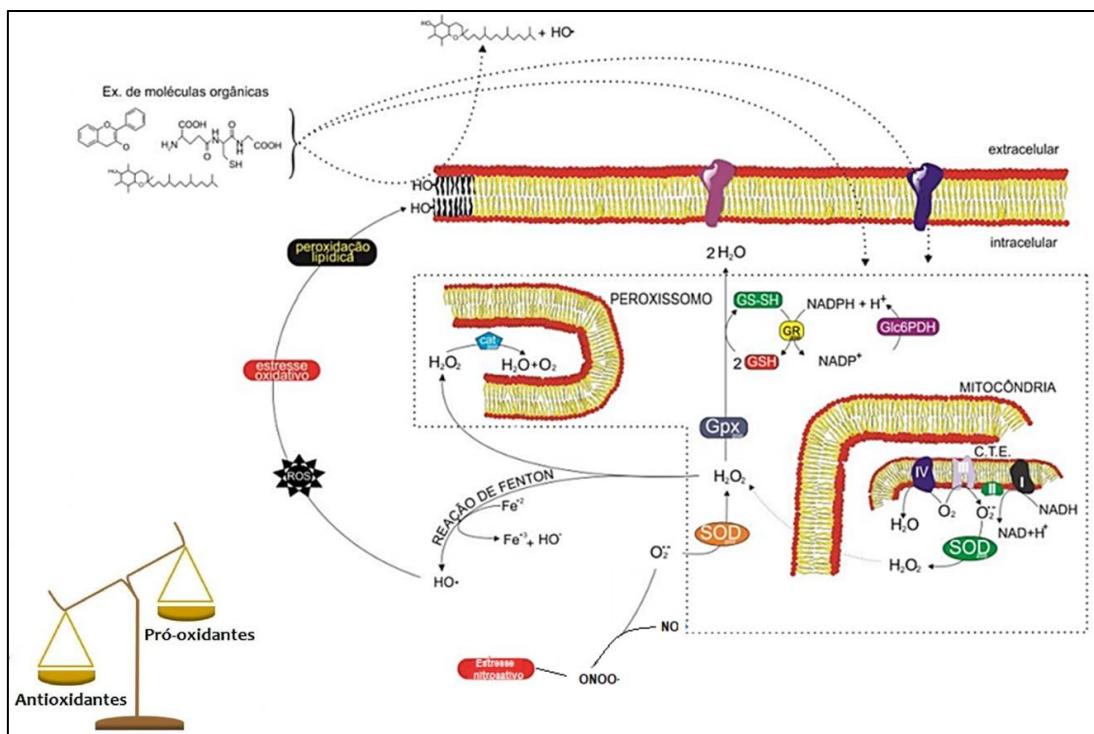
Com o aumento da produção de corticoides em resposta ao estresse físico e/ou psicológico, aliado ao aumento do catabolismo celular e da produção de radicais livres, o organismo poderá entrar em estado de estresse oxidativo, nitrosativo e carbonílico (ASCHBACHER; O'DONOVAN; WOLKOWITZ; DHABHAR *et al.*, 2013; BYUN; YOO; SON; LEE *et al.*, 2017). Os radicais livres são moléculas que apresentam elétrons não pareados, com alta capacidade oxidativa, podendo o organismo obtê-los por meio de fontes endógenas e exógenas (HU; LUO; CHU; SHAN *et al.*, 2012). Entre os radicais livres mais comuns, temos as espécies reativas de oxigênio (EROS) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNS) (RIDNOUR; DHANAPAL; HOOS; WILSON *et al.*, 2012; BUTTERFIELD; HALLIWELL, 2019).

O estado de estresse oxidativo será instaurado na célula quando houver um desbalanço entre suas defesas antioxidantes endógenas e o excesso de radicais livres a que está sendo exposta (SALIM, 2014). A produção inicial de radicais envolve a formação de íons superóxido ( $O_2 \cdot^-$ ), que são reduzidos a  $H_2O_2$  (espécie não radicalar) pela SOD (Bhagat *et al.*, 2016). Então,  $H_2O_2$  pode ser convertido pela catalase em  $H_2O$  e  $O_2$  gasoso; entretanto, no tecido nervoso,  $H_2O_2$  é frequentemente convertido em duas moléculas de água pelo sistema de glutationa (KHAN; BLACK, 2003).

O íon superóxido ( $O_2 \cdot^-$ ) pode ainda reagir com o gás óxido nítrico (NO), gerando o íon peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) um dos ERNS mais reativos e deletérios para a célula capaz de gerar outros radicais e de promover nitratação, alterando o funcionamento e a estrutura de muitas moléculas (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Outro radical de importância para o entendimento do estresse é o íon hidroxila ( $OH \cdot$ ), que pode ser formado pela protonação do radical  $ONOO^-$  ou ainda

a partir da reação de Fenton, que ocorre entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o íon férrico ( $\text{Fe}^{2+}$ ) plasmático (VASQUEZ-MEDRANO; PRATO-GARCIA; VEDRENNE, 2018) (Figura 4).

**Figura 4 – Espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERNS)**



Fonte (Adaptado): VILELA *et al.* 2017

Se a quantidade desses radicais exceder a atividade das enzimas antioxidantes, proteínas e lipídios serão oxidados, ocorrendo mudanças em suas estruturas e perda de suas funções (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016). No caso da oxidação das proteínas e dos lipídeos, observam-se redução nos grupos sulfidrilas e aumento do malonaldeído, respectivamente, além de uma atividade antioxidante total da célula consideravelmente menor (Khan e Ali, 2018; Kösem *et al.*, 2020).

Esse sistema antioxidante endógeno é extremamente eficiente, mas se torna sobrecarregado no organismo submetido ao estresse e com a DA, devido à alta quantidade de EROS e de ERNS produzidos (HAIDARI; OMIDIAN; RAFIEI; ZAREI *et al.*, 2013). A literatura mostra que é possível o estresse oxidativo e nitrosativo serem responsáveis pelo desenvolvimento e agravamento do DA e de transtornos mentais, uma vez que as células do sistema nervoso são particularmente vulneráveis aos radicais livres, principalmente devido à baixa expressão de

enzimas antioxidantes neste tecido (MILLER; LAWRENCE; MONDAL; SEEGAL, 2009). Devido a isso, o consumo de moléculas antioxidantes tais como terpenos e polifenóis podem auxiliar o sistema antioxidante dos neurônios a estabilizar e a combater os radicais livres (SREERAMA; TAKAHASHI; YAMAKI, 2012).

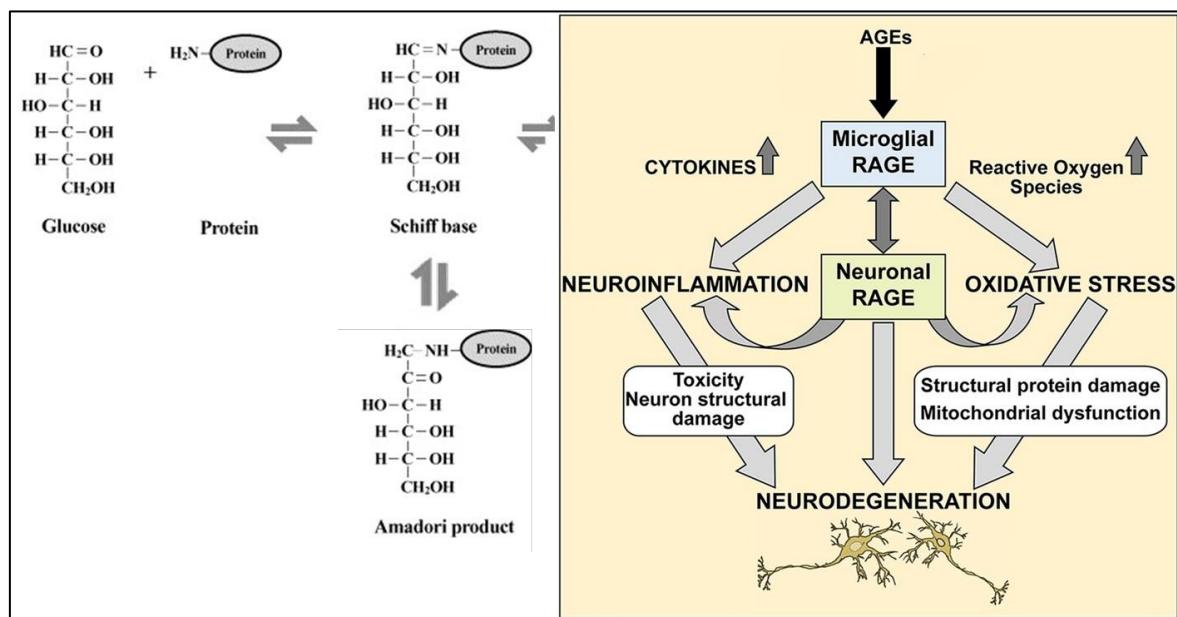
Além da produção de EROS e ERNS, a literatura também aponta o aumento na produção de produtos de glicação avançada (AGES) e de seus receptores (RAGES) em neurônios de pessoas com DA e com estresse físico/psicológico (KO; KO; CHU; SHIEH *et al.*, 2015; LJUBIČIĆ; BAKOVIĆ; ČOZA; PRIBISALIĆ *et al.*, 2020). Os AGES constituem uma grande variedade de moléculas formadas a partir de interações aminocarbonilo, de natureza não enzimática, entre glicose e seus isômeros (açúcares redutores), lipídeos e proteínas oxidadas (VEIRAIAH, 2005). A formação de uma molécula glicada inicia-se com a formação de uma base de Schiff instável, gerada pela condensação de um grupamento carbonila de um açúcar redutor, com um grupamento amina, de um aminoácido ou ácido carboxílico de um ácido graxo (WAUTIER; WAUTIER; SCHMIDT; ANDERSON *et al.*, 1994). Na sequência, a base de Schiff sofre rearranjos, tornando essa estrutura mais estável, gerando um produto de Amadori (WAUTIER; WAUTIER; SCHMIDT; ANDERSON *et al.*, 1994).

*In vivo*, a formação dos produtos de Amadori pode ocorrer em um período de dias e é praticamente irreversível (SINGH; BARDEN; MORI; BEILIN, 2001) Mecanismos alternativos de formação de AGEs incluem a chamada via do estresse carbonílico, na qual a oxidação de lipídeos ou de açúcares gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos. A glicólise e a autoxidação de glicose, por exemplo, produzem metilgioxal e gioxal os quais interagem com aminoácidos para formar AGEs (SINGH; BARDEN; MORI; BEILIN, 2001). Estes compostos dicarbonílicos chegam a ser 20 mil vezes mais reativos do que a glicose e são os principais intermediários durante a formação de AGEs no organismo (URIBARRI; WOODRUFF; GOODMAN; CAI *et al.*, 2010).

Os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade destes compostos apresentam em modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas (WAUTIER; WAUTIER; SCHMIDT; ANDERSON *et al.*, 1994). Por meio da geração de radicais livres, de interações com receptores celulares e do estabelecimento de ligações cruzadas com

proteínas, os AGEs podem promover, respectivamente, estresse oxidativo, aumento da expressão de mediadores inflamatórios e alterações morfológicas (LEWIS; MEJIA; JORDAN; MONSON *et al.*, 2017) (Figura 5).

**Figura 5** – Compostos glicados e seus efeitos no sistema nervoso



Fonte (Adaptado): <https://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13041-016-0272-9>

Uma vez glicadas, as proteínas e os lipídios circulantes modificados podem, então, se ligar a receptores específicos, promovendo a produção de citocinas inflamatórias e de fatores de crescimento, os quais, por sua vez, contribuem para doenças que acometem o sistema nervoso (SINGH; BARDEN; MORI; BEILIN, 2001; GOH; COOPER, 2008). Além disso, os AGEs promovem a agregação das proteínas  $\beta$ -amiloides nas sinapses e são capazes de gerar EROS, ativando indiretamente a morte celular dos neurônios (KONG; WANG; WANG; LIU *et al.*, 2020). O organismo possui defesas naturais responsáveis pela remoção e eliminação dessas glicotoxinas. Os AGEs formados nos componentes teciduais, por exemplo, são degradados a partir da proteólise extracelular ou por células scavenger, como os macrófagos teciduais, que endocitam AGEs via receptores e, posteriormente, os liberam como AGE-peptídeos pequenos e solúveis para serem excretados pelos rins (RABBANI; THORNALLEY, 2018). Ainda que exista

considerável capacidade de eliminação dessas moléculas, a alta taxa de formação de AGES pode exceder a capacidade do organismo em degradá-los ao longo do tempo e, por isso, o uso de produtos naturais se torna um interessante meio de proteção contra os AGES (GOH; COOPER, 2008).

### **1.5 Produtos naturais: *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**

O conhecimento popular sobre os efeitos biológicos dos produtos naturais (etnofarmacologia) foi transmitido entre as gerações humanas através da cultura e hoje contribui com informações valiosas para a descoberta de compostos bioativos com efeitos terapêuticos (HALBERSTEIN, 2005; GULATI; HARDING; PALOMBO, 2012). No Brasil, o Ministério da Saúde estimula a aplicação de plantas medicinais no tratamento complementar de várias doenças, por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), com base em projetos promovidos pelo Programa Nacional de Fitotecnia e Fitoterápicos (ZENI; PARISOTTO; MATTOS; HELENA, 2017).

Os compostos bioativos extraídos das plantas podem ser divididos em três classes principais: terpenos, alcaloides e fenóis. Milhares de compostos secundários foram identificadas até o momento, que por sua vez apresentam função biológica quando consumidos pelos seres humanos e por outros seres vivos (AMSTUTZ, 2008; DE LUCIA, 2008). Estudos indicam que metabólitos secundários, como os polifenóis e terpenos presentes em plantas medicinais, são capazes de eliminar os radicais livres, inibir a glicação não enzimática (YAMAGUCHI; ARIGA; YOSHIMURA; NAKAZAWA, 2000; KIM; KIM, 2003; WU; YEN, 2005), e a enzima acetilcolinesterase (VECCHIO; SORRENTINO; PAOLETTI; MARRA *et al.*, 2021) e tratar as complicações do estresse (SAHOO, 2018), ansiedade (YEUNG; HERNANDEZ; MAO; HAVILAND *et al.*, 2018) e depressão (NABAVI; DAGLIA; BRAIDY; NABAVI, 2017).

A família Amaranthaceae é predominantemente encontrada em regiões tropicais e subtropicais, incluindo cerca de 170 gêneros e 2000 espécies de distribuição cosmopolita, podendo ser encontradas em ambientes abertos e no interior de florestas, exceto em regiões mais frias do Hemisfério Norte (MARTINELLI; MORAES, 2013). A família é representada por 21 gêneros e 147

espécies no Brasil, utilizadas para fins ornamentais e medicinais (MARTINELLI; MORAES, 2013). No cerrado são encontradas 98 espécies da família, 20 exclusivas, com acentuado declínio populacional, uma vez que mais de 40% da vegetação original foi removida para o plantio de monoculturas (PRIMACK; RODRIGUES, 2006; MARCHIORETTO; MIOTTO; SIQUEIRA, 2010; MARTINELLI; MORAES, 2013).

A *P. glomerata* (figura 6) faz parte da família Amaranthaceae, bem como o espinafre (*Spinacia oleracea*), a beterraba (*Beta vulgaris*) e o caruru (*Amaranthus spp*) (MARTINELLI; MORAES, 2013). A planta apresenta formação arbustiva, podendo chegar a 2 metros de altura, com caules eretos, finos e glabros ou até pouco pubescentes; ramos nodosos, folhas opostas, curto-pecioladas a ovado-lanceoladas ou estreito-lanceoladas, acuminadas e mucronadas, com comprimento variando entre 5 a 12 cm e com 1 a 2 cm de largura (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011).

**Figura 6** - Parte aérea (PA) e raiz (R) da *Pfaffia glomerata*



Fonte: o autor.

As inflorescências estão reunidas em dicásios, com flores em panícula completa, fruto aquênio e raízes com forma antropomórfica, sendo que a planta possui perenidade complexa, se reproduzindo assexuadamente por estaquia dos ramos e sexualmente por meio de sementes (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011). Os dois métodos são eficientes para a propagação do ginseng-brasileiro, no entanto, vale salientar que já existem técnicas para a propagação *in vitro* e enxertia

(IAREMA; DA CRUZ; SALDANHA; DIAS *et al.*, 2012). A planta ocorre em regiões tropicais ou subtropicais, com temperaturas entre 20 e 30 °C, não tolerando baixas temperaturas, por isso, por ser uma espécie anfíbia, pode ser encontrada em locais próximos de rios e nas orlas das matas de galeria, locais estes com grande quantidade de água, luz e solo argiloso de boa fertilidade (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011). Apresenta grande plasticidade frente às mudanças ambientais, o que pode tornar viável o seu aproveitamento e cultivo. A planta é nativa, mas não endêmica do Brasil, podendo ser encontrada em todas as regiões e praticamente em todos os Estados com altitudes de 80 a 800 m. Contudo não fora confirmada sua ocorrência nos seguintes estados: Acre, Tocantins, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Alagoas e Sergipe.

O uso popular do ginseng-brasileiro já lhe rendeu diversos outros nomes, tais como para-tudo, anador, novalgina, sempre-viva entre outros que foram consagrados por seus efeitos terapêuticos (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011). Entre as principais indicações populares encontradas na literatura, temos seu uso como energizante; estimulante da memória; rejuvenescedor; afrodisíaco e revitalizante; inibidor de células cancerosas; ativador da circulação; combate diabete; estresse artrite, artrose, anemia, colesterol, estrias, flacidez da pele, tremores, labirintite, hemorróidas e diarréia, além de também estimular o sistema imune e repor hormônios (VIGO; NARITA; NAKAMURA; MARQUES, 2003; CORRÊA JÚNIOR; MING; CORTEZ, 2008; FENNER; ZIMMER; NEVES; KLIEMANN *et al.*, 2008; CARNEIRO; RIBAS FILHO; MALAFIAIA; RIBAS *et al.*, 2010; CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011).

O ginseng-brasileiro é considerado uma planta adaptógena, isto é, possui substâncias que aumentam a resistência dos organismos a estressores diversos (físicos, químicos e biológicos), promovendo sua adaptação e manutenção da homeostase durante o estresse (TODOROVA; IVANOV; DELATTRE; NALBANTOVA *et al.*, 2021). Das partes da planta, as raízes são as que possuem maiores relatos populares sobre atividade biológica e, devido a isso, a exploração da espécie em ambiente natural vem reduzindo as populações de *P. glomerata*, uma vez que a planta morre após remoção de suas raízes; atualmente a espécie foi inserida em conjunto com outras espécies prioritárias para conservação

(MATTOS; DE SALIS, 2004; MARCHIORETTO; MIOTTO; SIQUEIRA, 2010; CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011; DO BRASIL, 2020).

Assim, a hipótese desta tese é de que as partes aéreas e as raízes da planta *P. glomerata* possui compostos adaptogênicos capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase, de reduzirem comportamentos de estresse, ansiedade e depressão, além de aumentarem as defesas antioxidantes do encéfalo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a citotoxicidade, a capacidade antioxidante e a inibição da glicação proteíca e da enzima acetilcolinesterase por extratos e frações da parte aérea e das raízes da *P. glomerata* em diferentes metodologias. Além disso, avaliar o potencial adaptogênico e neuroprotetor da fração de diclorometano do extrato metanólico das raízes dessa planta em modelo de estresse, ansiedade e depressão.

### 2.2 Específicos

- Submeter os extratos metanólicos das raízes, bem como suas frações, a ensaios *in vitro* para determinação da capacidade antioxidante, antiglicante e de inibição da enzima acetilcolinesterase;
- Determinar as frações mais promissoras e avaliá-las quanto sua possível atividade citotóxica, hemolítica e inibidora da oxidação induzida em tecido nervoso;
- Caracterizar os principais compostos presentes nas amostras mais promissoras utilizando espectrometria de massas;
- Quantificar a concentração do princípio ativo 20E em amostras de *P. glomerata* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência;
- Determinar através de modelos *in silico* a interação entre o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase com o composto 20E, além de avaliar as propriedades farmacocinéticas dessa molécula;

- Estudar o potencial terapêutico *in vivo* da fração enriquecida em 20E proveniente das raízes, contra ansiedade, depressão e estresse em camundongos submetidos ao estresse induzido por isolamento social;
- Analisar biomarcadores do estresse oxidativo no córtex, hipocampo e estriado em animais submetidos a estresse induzido por isolamento social.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Reagentes**

Reagentes e solventes de grau analítico foram adquiridos da Sigma (Sigma, St Louis, MO, EUA) ou de fornecedores locais. Foi utilizada água Milli-Q obtida através da filtragem em filtro milipore.

#### **3.2 Obtenção do material vegetal seco**

As plantas utilizadas neste estudo foram obtidas *in vitro* a partir do banco de germoplasma do laboratório de cultura de tecidos vegetais (Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil), fornecidas pelo prof. Dr. Wagner C. Otoni. As plantas foram cultivadas em condições experimentais controladas na fazenda Bela Vista ( $18^{\circ}58'55.5"S - 40^{\circ}15'17.8"W$ ), Vila Valério, ES, Brasil, e colhida em novembro de 2015. A parte aérea e as raízes foram colhidas de plantas com 5 meses de idade e, após a colheita, foram secas em estufa a  $55^{\circ}\text{C}$  e moídas em moinho de facas tipo Willey (SL32; Solab) para obtenção de material vegetal seco. Após a secagem e Trituração, os materiais foram então mantidos em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização do processo de extração e fracionamento. O Voucher (CESJ 63317) de identificação botânica foi depositado no herbário Leopoldo Krieger (UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil).

#### **3.3 Preparação dos extratos metanólicos**

Para o processo de extração, foi utilizado 1.000 g do material vegetal seco das partes aéreas e 1,0 kg das raízes, aplicando-se o método de maceração estática, isto é, sem agitação (FRANCO; DA SILVA CARVALHO; DE MOURA; JUSTINO *et al.*, 2018), na qual cada material, separadamente, foi imerso em 5,0 L

de metanol 99,8% (proporção de 1:5 m.v-1) durante seis dias. Após esse período, as soluções obtidas foram filtradas e o solvente removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida a 40º C. Os materiais vegetais residuais foram remacerados por mais duas vezes, utilizando-se o solvente recuperado na rotaevaporação. Os extratos metanólicos gerados em cada sessão foram misturados, congelados e liofilizados para a remoção da água residual e posteriormente, armazenados em freezer à -20°C.

### **3.4 Processo de fracionamento líquido-líquido dos extratos metanólicos**

Para o processo de fracionamento, aproximadamente 60,0 g de extrato metanólico de cada parte da planta foi solubilizado em 400,0 mL de solução metanol:água (9:1) e adicionados em funil de separação após filtragem com filtro de papel para remoção de fibras insolúveis (a massa desse resíduo foi subtraída da massa inicialmente utilizada). O fracionamento foi realizado utilizando-se 400,0 mL dos seguintes solventes, adicionados separadamente e sequencialmente por quatro vezes ao funil de separação: 1) hexano, 2) diclorometano, 3) acetato de etila, 4) n-butanol e 5) água. Para a remoção dos solventes, as frações foram coletadas e acrescentadas em balão volumétrico para serem rotaevaporadas, sob pressão reduzida a 40º C; após isso, foram colocadas em capela com exaustão por 5 dias, congeladas e liofilizadas para a remoção da água remanescente e, em seguida, armazenadas a -20º C (FRANCO; ZABISKY; DE LIMA JÚNIOR; ALVES *et al.*, 2020).

### **3.5 Atividade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)**

O método de atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH foi baseado no método descrito por Sharma e Bhat (2009). Na análise, a reação entre os compostos fenólicos e o radical pode ocorrer por meio da transferência de hidrogênio atômico ou por perda sequencial de próton durante a transferência de elétron (LIU, 2010). Os extratos/frações foram diluídos a 10mg/mL em metanol, porém o controle ácido ascórbico foi diluído em água nesta mesma concentração. As amostras foram então incubadas com uma solução metanólica de 60 mmol/L de DPPH a 30 ° C por 20 min, na ausência de luz. O ensaio foi feito em microplacas

de 96 poços, acrescentanto 75  $\mu$ L da amostra e 250  $\mu$ L de solução metanólica de DPPH. Para a determinação do  $Cl_{50}$ , as amostras e o ascorbato foram diluídas serialmente, a partir da concentração de 10mg/mL, nas concentrações de 5, 2,5, 1,25, 0,625 e 0, 312 mg/mL para determinação do  $Cl_{50}$ . A redução na absorbância da mistura foi medida em espectrofotômetro a 517 nm. A eliminação dos radicais DPPH foi calculada usando a equação 1:

$$DPPH (\%) = [(A \text{ controle} - (A \text{ amostra} - A \text{ branco}) / (A \text{ controle})) X 100]$$

Equação 1

onde “*A controle*” é o valor de absorbância do radical DPPH, “*A amostra*” é o valor da absorbância do mix amostra + DPPH e “*A branco*” é o valor da absorbância do mix amostra + metanol. Os solventes metanol e água foram usados como controle negativo.

### **3.6 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical peroxil (ORAC)**

A avaliação da capacidade antioxidante pelo método ORAC foi baseada em Prior; Hoang; Gu; Wu et al. (2003). Neste ensaio, todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato a 75 mmol/L e pH 7.4. As amostras foram diluídas a 0,1 mg/mL em metanol para este ensaio, já o controle ácido ascórbico foi diluído em água na mesma concentração. Inicialmente, 25  $\mu$ L das amostras foram misturados a 150  $\mu$ L de fluoresceína (0,085 nmo/L) e incubados em microplaca de 96 poços à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, adicionou-se 30  $\mu$ L da solução de Azobis (2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidrocloreto) para dar início à reação. A intensidade de fluorescência (485 nmex/ 528 nmem) foi medida em espectrofluorímetro e foi verificada a cada 1 min e 30 s durante 90 min. O branco foi realizado substituindo o extrato/partição por tampão fosfato e como controle negativo, foram usados os solventes metanol e água. A perda de fluorescência da fluoresceína foi medida utilizando o cálculo da área sob a curva e a capacidade antioxidante foi determinada por meio de uma curva analítica construída com ácido Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico).

### **3.7 Capacidade de inibição da glicação proteica (método BSA/Frutose)**

O método de capacidade antiglicante foi baseado em Justino et al. (2020). Os extratos/partição e quercetina (controle positivo) foram diluídos em metanol e utilizados na concentração de 10 mg/mL e diluídos serialmente nas concentrações de 5, 2,5, 1,25, 0,625 e 0, 312 mg/mL para determinação do  $C_{50}$ . Para este ensaio, foram adicionados 450  $\mu$ L de tampão fosfato (200 mmol/L, pH 7,4), 150  $\mu$ L de BSA (Albumina sérica bovina) (50 mg/mL em tampão fosfato), 150  $\mu$ L de frutose (1,25 mol/L em tampão fosfato) e 50  $\mu$ L de extrato/partições em microtubos, e então incubados à 37° C por 72 horas, na ausência de luz. Após esse período, 800  $\mu$ L de ácido tricloroacético 20% (m/v) foram adicionados em cada microtubo e então centrifugados a 10000 xg por 10 min. Após a centrifugação, obteve-se um pellet que por sua vez foi ressuspêndido em 800  $\mu$ L de tampão fosfato. A redução da fluorescência do BSA quando se liga ao açúcar (frutose) foi avaliada em espectrofluorímetro, com excitação a 350 nm e emissão a 420 nm. O branco foi realizado substituindo a frutose por tampão fosfato e o extrato/partição por metanol e/ou água. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados são apresentados como porcentagem (%) de inibição, calculados pela equação 2:

$$\text{Inibição (\%)} = [(F \text{ controle} - F \text{ amostra}) / (F \text{ controle})] \times 100$$

onde o “ $F$  controle” é o valor de fluorescência do controle negativo e “ $F$  amostra” é o valor de fluorescência de cada extrato / quercetina. Como controle negativo, utilizou-se os solventes metanol e água.

### **3.8 Inibição da enzima acetilcolinesterase**

O método de inibição da enzima acetilcolinesterase foi baseado no teste descrito por Sharma e Bhat (2009). O ensaio foi realizado com o uso de três tampões: I) tampão Tris-HCl pH 8; II) tampão Tris-HCl contendo 1% de albumina sérica bovina e III) tampão Tris-HCl contendo 0,6% de NaCl e 0,4% de MgCl. As soluções necessárias ao método foram preparadas da seguinte maneira: enzima acetilcolinesterase foi diluída a 0,2 U/mL em tampão I; solução de DTNB 0,1% diluído em tampão III; solução de iodeto de acetilcolina (substrato) 0,4% diluída em água Milli-Q e o inibidor (controle positivo) Galantamina (Sigma, St Louis, MO, EUA)

diluído em água Milli-Q. As amostras foram diluídas em metanol na concentração de 10mg/mL e diluídas serialmente nas concentrações de 5, 2,5, 1,25, 0,625 e 0,312 mg/mL para a obtenção do  $IC_{50}$ . As amostras (25  $\mu$ L) foram acrescentadas na placa com 125 $\mu$ L da solução de DTNB, 50  $\mu$ L de tampão II, 25  $\mu$ L de solução de iodeto de acetilcolina e 25  $\mu$ L da solução de acetilcolinesterase. A absorbância foi medida por 20 min em espectrofotômetro, a 405 nm e 30°C de temperatura. A inibição da enzima foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$Inibição (\%) = [(100 - (A \text{ amostra} - A \text{ branco}) / (A \text{ branco})] X 100$$

Equação 2

onde “A branco” é o valor de absorbância da reação sem inibidores, “A amostra” é o valor da reação obtida para cada amostra avaliada. Como controle negativo, utilizou-se os solventes metanol e água.

### 3.9 Prospecção fitoquímica

Para a análise da classe de compostos presentes nas amostras, os extratos/frações foram solubilizados em metanol na concentração de 1 mg/mL. As soluções foram aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) em fase estacionária de sílica gel (60G). Foi utilizado uma solução de acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (proporção de 10:1,1:1,1:2,6) como eluente (WAGNER; BLADT, 1996).

#### 3.9.1 Avaliação da presença de polifenóis e açúcares

Para a detecção de polifenóis e açúcares, foi utilizado o revelador anisaldeído-ácido sulfúrico. Para a obtenção desse revelador, foi preparada uma solução contendo anisaldeído 5% (v.v-1) em ácido acético glacial, seguida da adição de metanol e ácido sulfúrico concentrado. A placa de CCD foi borrifada com o revelador aquecido a 100° C por 5 min.

#### 3.9.2 Avaliação da presença de terpenos e fitosteróis

Para a detecção de terpenos e fitosteróis, utilizou-se o revelador Liebermann-Buchard. Para o seu preparo, anidrido acético e ácido sulfúrico

concentrado foram misturados (proporção 10:1 mL), sob banho de gelo. A placa de CCD foi pulverizada com a solução recém-preparada e aquecida a 100° C por 5 min. A placa foi observada em luz UV (365 nm).

### **3.9.3 Avaliação da presença de alcaloides**

Para a detecção de alcaloides, foi utilizando o revelador Dragendorff. Para o preparo do revelador, foram feitas 2 soluções (soluções A e B); dissolveu-se nitrato de bismuto em ácido acético glacial e adicionou-se água destilada sob aquecimento (solução A); dissolveu-se iodeto de potássio em água (solução B). As soluções A e B foram misturadas na mesma proporção e o revelador foi obtido misturando a solução recém-preparada com ácido acético glacial e água (proporção de 1:2:10).

### **3.10 Sugestão da composição por espectrometria de massas**

As amostras PAD e RD apresentaram os melhores resultados e por isso foram diluídas a 10mg/mL em metanol padrão CLAE para análise de sua composição. Foi utilizado cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa com ionização por eletrospray (CLAE-IES-EM/EM, Agilent Q-TOF, modelo 6520). A solução Metanol-H<sub>2</sub>O (4:1) foi usada como sistema de solvente e as amostras foram infundidas na fonte ESI do equipamento a uma taxa de fluxo de 200 µl / h. Foi utilizado gás nitrogênio como gás de secagem a uma taxa de fluxo de 8 L/min e como gás nebulizador a 58 psi. A temperatura do nebulizador foi ajustada para 200°C e potencial de 4,5 kV foi aplicado ao capilar. A energia de impacto do elétron foi ajustada para 5-30 eV. Os parâmetros do CLAE foram: coluna Agilent Zorbax modelo 50 x 2,1 mm, partículas de 1,8 µm e diâmetro de poro de 110 Å, fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v-1) (A) e metanol (B). O sistema solvente de gradiente (B) foi: 2% (0 min); 98% (0-15 min); 100% (15-17 min); 2% (17-18 min); 2% (18-22 min), com um fluxo de 0,35 mL/min e detectado a UV de 280 e 360 nm. Os dados foram adquiridos no modo positivo, com ajuste para um intervalo de 20-1000 m/z. Os dados de espectrometria de massas foram avaliados usando o software Agilent Mass Hunter B.07.00 e os íons moleculares e seus fragmentos foram comparados com resultados publicados na literatura e com o software online Metlin ([https://metlin.scripps.edu/landing\\_page.php?pgcontent](https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent)

=mainPage). Erros menores ou iguais a 10 ( $\leq 10$ ) foram considerados adequados e calculados utilizando-se o software online Warwick ([https://warwick.ac.uk/fac/sci/chemistry/research/barrow/barrowgroup/calculatorsmass\\_errors/](https://warwick.ac.uk/fac/sci/chemistry/research/barrow/barrowgroup/calculatorsmass_errors/)) comparando-se os valores de m/z teóricos com os observados (FRANCO; ALVES; ZABISKY; JUSTINO *et al.*, 2020).

### 3.11 Quantificação do composto 20-hidroxiecdisona

Dentre os compostos sugeridos pela espectrometria de massas está o fitosterol 20E. Para a determinação de sua concentração nas amostras PAD e RD, que apresentaram os melhores resultados, foi utilizado um CLAE com detector Shimadzu Prominence diode array (DAD) (bomba LC - 20 CE, detector SPD - M 20A, forno CTO - 20 A, software LabSolutions). As amostras foram solubilizadas em metanol (pureza CLAE) a 1mg / mL e as separações realizadas pelo sistema CLAE em seu injetor automático de amostras. A coluna utilizada nas eluições (Shimpack®, 25 cm por 4,6 mm) foi de fase reversa (C-18). A separação foi realizada em sistema gradiente, utilizando como fase móvel uma mistura de metanol: água. No tempo de 0 a 5 min, a concentração de metanol: água variou de 10:90 (v / v) a 70:30 (v / v). No tempo de 5 a 12 min, a concentração de metanol: água permaneceu em 70:30 (v / v), e no tempo de 12-15 min, a concentração de metanol: água variou de 70:30 (v / v) a 100% de metanol. O comprimento de onda de detecção foi de 245 nm e vazão de 1 mL / min, obtendo uma corrida de 15 min. As condições foram previamente testadas e otimizadas. O volume de injeção da amostra foi de 20  $\mu$ L. A quantificação do composto principal foi feita com uma curva padrão de 20E (93% de pureza, Sigma H5142). A corrida cromatográfica apresentou as mesmas condições citadas acima, mas em concentrações diferentes (24, 60, 120, 180, 230 e 290  $\mu$ g/mL). Em seguida, foi gerado um gráfico linear, permitindo obter a equação da curva, permitindo assim o cálculo da concentração do composto nas amostras (DIAS; MARTINS; DE MELO; DO CARMO CUPERTINO *et al.*, 2019).

### **3.12 Docking molecular e propriedades farmacocinéticas *in silico***

A interação entre as enzimas acetilcolinesterase humana (PDB4EY6) e de *Electrophorus electricus* (PDB:1C2B) com o composto 20E foi analisada por meio do programa GOLD (JONES; WILLETT; GLEN; LEACH *et al.*, 1997), usando os parâmetros pré-definidos pelo programa, exceto a flexibilidade do ligante que foi definida como 200%. O sítio de ligação foi indicado a partir de um raio de 6Å ao redor da posição da galantamina complexada na estrutura do PDB 4EY6. Cada docagem foi realizada 10 vezes e as melhores posições de docagem foram avaliadas a partir de um ranking da função de pontuação ChemPLP. Os diagramas de interação 2D foram gerados após o docking com auxílio do programa LigPlus+ 2.2.4 (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011). Para a predição das propriedades farmacocinéticas do composto 20E foi utilizada a abordagem *Predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures* (pkCSM), disponível online (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsmprediction>) (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

### **3.13 Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (MDMO)**

Devido aos bons resultados e determinação do princípio ativo 20E nas frações PAD e RD, as mesmas foram avaliadas em cultura celular primária de macrófagos. Os macrófagos foram obtidos por diferenciação de células da medula óssea de camundongos C57BL / 6 machos de 6-8 semanas de idade (comitê de ética nº 105/18). As células da medula óssea foram extraídas por lavagem da cavidade óssea com RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) em um tubo de polipropileno estéril de 15 mL. As células foram homogeneizadas e a suspensão celular centrifugada (400 xg durante 8 minutos, 4°C). O sedimento foi homogeneizado em RPMI-1640 e 5,0 x 10<sup>6</sup> células foram cultivadas para gerar MDMO; para isso, em placas de cultura (Corning), as células foram incubadas com 10 mL de RPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM de L-glutamina, 100 U / mL de penicilina, 100 µg / mL estreptomicina e 30% de meio condicionado de células L929 (LCCM), que foi usado como fonte de fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). As células foram mantidas a 37°C

e 5% da atmosfera de CO<sub>2</sub>. Após 3 dias, 10 mL de RPMI-1640 fresco, nas mesmas condições descritas acima, foram adicionados às placas de cultura de células. Os MDMO foram coletados 4 dias depois, removendo o sobrenadante de placas de cultura e destacando células aderentes usando tampão de fosfato-salino (PBS) gelado estéril (LARMONIER; GHIRINGHELLI; LARMONIER; MOUTET *et al.*, 2003). Os procedimentos com animais foram todos previamente aprovados pelo Comitê de Ética Animal da instituição (protocolo número 105/18).

### **3.13.1 Viabilidade celular (MTT)**

Os MDMO foram suspensos em RPMI-1640 suplementado, exceto LCCM que não foi adicionado. As células foram semeadas em microplaca de 96 poços (Corning) na densidade de 0,2 x 10<sup>6</sup> células / poço e tratadas durante 24 h com as amostras PAD e RD nas concentrações de 250, 25 e 2,5 µg/mL, diluídos em DMSO (<0,001%). Em seguida, o sobrenadante foi removido e 100 µL de solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio brometo) a 5 mg / mL, foram adicionados a cada poço para posterior incubação por 2 h. O formazan de cor roxa, formado por células vivas, foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorbância a 570 nm foi medida colorimetricamente. A viabilidade celular foi calculada considerando o grupo de células sem tratamento como 100% de viabilidade.

### **3.13.2 Inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)**

A geração de EROS por MDMO foi monitorada durante 4 horas por meio de emissão quimioluminescente, resultante da oxidação do luminol em leitor de microplacas (En Spire Multimode Plate Reader, Perkin Elmer). Assim, o MDMO foi adicionado em microplaca branca opaca de 96 poços (Perkin Elmer) a uma densidade de 0,2x10<sup>6</sup> células / poço. Os MDMO foram previamente diluídos em solução salina balanceada de Hank (HBSS) sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich) e pré-incubadas com as amostras PAD e RD nas concentrações de 250, 25 e 2,5 µg/mL, diluídos em DMSO (<0,001%), durante 30 minutos (37°C e 5% da atmosfera de CO<sub>2</sub>). Em seguida, luminol (concentração final de 625 nM) (Sigma-Aldrich) foi adicionado a cada poço e a geração de EROS foi induzida por zimosan de

*Saccharomyces cerevisiae* opsonizado (concentração final de 100 µg/mL). Os resultados foram apresentados como área sob a curva (AUC). O zimosan opsonizado foi previamente preparado incubando-se o zimosan com soro de camundongo por 30 minutos a 37°C. Em seguida, a suspensão de zimosan foi centrifugada (400 g durante 8 minutos), o sobrenadante removido e o sedimento homogeneizado em HBSS. Este processo foi repetido por 3 vezes. O cálculo da inibição de EROS foi feito da mesma maneira que o descrito no tópico 3.15.3.

### **3.13.3 Inibição da produção de óxido nítrico (NO)**

A concentração de NO foi avaliado como concentração total de nitrito, um indicador da produção de óxido nítrico, determinado pela reação de Griess (GRANGER; TAINTOR; BOOCKVAR; HIBBS JR, 1996). 50 µL do sobrenadante de MDMO tratado com PAD e RD nas concentrações de 250, 25 e 2,5 µg/mL, diluídos em DMSO (<0,001%), e 50 µL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida e 0,1% de dicloridrato de N- (1-naftil) etilenodiamina em 2,5% de fosfórico ácido) foram incubados à temperatura ambiente durante 10 min. O conteúdo de nitrito foi calculado com base em uma curva padrão construída com nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µM. A absorbância foi medida a 540 nm usando uma microplaca de 96 poços.

## **3.14 Ensaio de hemólise**

Além da análise celular em macrófagos, as frações PAD e RD também foram avaliadas quanto a capacidade hemolítica. O ensaio de hemólise foi feito com base no estudo de Evans; Nelson; Shann; Beavers et al. (2013). Para a avaliação da capacidade hemolítica, as amostras PAD, RD e a saponina *Quillaja sp* (controle positivo Sigma) foram diluídos inicialmente na concentração de 10mg/mL e diluídos serialmente para 250, 25, 2,5 e 0,25 µg/mL em DMSO (<0,001 %). Inicialmente, removeu-se 1 mL de sangue de camundongos C57BL / 6 machos de 6-8 semanas de idade (comitê de ética nº 105/18), devidamente sedados, por meio de tubo revestido com K<sub>2</sub>-EDTA. Após remoção, o sangue foi centrifugado a 500g durante 5 min para que o sobrenadante (plasma) pudesse ser descartado. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em tampão fosfato de

sódio (PBS) (pH 7,4) e a solução foi então centrifugada a 500g durante 5 min. Logo após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o processo repetido por mais 3 vezes, com a finalidade de lavar as células. Em seguida, o sobrenadante foi removido e substituído por PBS enriquecido com glicose (10mmol/L) para obtenção de solução rica em eritrócitos (SRE).

Em um tubo de 10 mL, acrescentou-se 9800 µL de PBS e 200 µL de SRE (diluição de 1:50) para obtenção de solução diluída de eritrócitos (SDE). Para o início do ensaio, foram adicionados 10 µL das amostras PAD, RD e saponina nas concentrações de 250, 25 e 2,5 µg/mL e 190 µL de SDE em placas de 96 poços com fundo em V. As placas foram então incubadas à 37°C durante 1 hora. Após a incubação das placas, as mesmas foram centrifugadas a 500g por 5 min para sedimentar os eritrócitos intactos e então, foram transferidos 100 µL do sobrenadante de cada poço para novos poços de uma placa de 96 poços de fundo plano. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 405 nm. Para o branco, utilizou-se 10 µL de solução de triton (10%). O valor médio de eritrócitos em sangue de camundongo macho C57BL/6 é de  $8,7 \cdot 10^6$  células/µL, portanto, a concentração final de eritrócitos será de aproximadamente  $18 \cdot 10^5$  células por poço (SANTOS; DE OLIVEIRA; HASTREITER; DA SILVA *et al.*, 2016).

### **3.15 Parâmetros antioxidantes ex vivo utilizando tecido nervoso de camundongo**

O potencial antioxidante das amostras PAD e RD também foi avaliado utilizando modelo *ex vivo* de oxidação induzida por Fe<sup>2+</sup>-ascorbato, baseado em método modificado por De Lima Júnior; Franco; Saraiva; Moraes *et al.* (2021). Encéfalo de camundongos machos C57BL / 6 (comitê de ética nº 105/18) com cerca de 6-8 semanas de idade e pesando 20g, foram coletados e homogeneizados em tampão de fosfato (1g:10mL, pH 7,4). O homogenato foi centrifugado a 3000 xg por 10 min a 4 ° C e o sobrenadante foi misturado e incubado com tampão fosfato, 0,01 mmol/L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>, 0,1 mmol/L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e com as frações PAD e RD da *P. glomerata* (250, 25 e 2,5 µg / mL), quercetina (também usada como controle positivo) ou metanol (controle negativo e solvente usado para diluir as amostras) a

37 ° C por 60 min. Estas misturas foram centrifugadas a 3000 xg durante 10 min a 37 ° C e os sobrenadantes (amostras) foram utilizados nos ensaios seguintes.

### **3.15.1 Inibição da Peroxidação lipídica (TBARS)**

As amostras foram incubadas com ácido tiobarbitúrico (0,67% TBA) e ácido tricloroacético (10% TCA), em banho-maria por 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 xg por 10 min e a absorbância medida a 532 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA) (Justino et al., 2019). Os resultados são apresentados como porcentagem (%) de atividade (PA), calculada usando a seguinte equação:

$$PA (\%) = [(A \text{ branco} - A \text{ amostra}) / (A \text{ branco})] \times 100$$

Equação 3

onde “*A branco*” é o valor de absorbância do mix + metanol, “*A amostra*” é o valor da absorbância do mix + amostra.

### **3.15.2 Capacidade da manutenção de grupos tióis (Sulfidrilas)**

Os grupos tióis foram avaliados usando ácido ditionitrobenzóico (DTNB) diluído em tampão fosfato de potássio 0,2M (pH 8,0). As amostras foram incubadas durante 30 min com tampão fosfato 1mM (pH 7,4) e solução DTNB 10mM. A presença de grupos sulfidrila foi lida a 412 nm (Aksenov e Markesbery, 2001). Os resultados são apresentados como porcentagem (%) de atividade (PA), calculada usando a seguinte equação:

$$PA (\%) = [(A \text{ branco} - A \text{ amostra}) / (A \text{ branco})] \times 100$$

Equação 4

onde “*A branco*” é o valor de absorbância do mix + metanol, “*A amostra*” é o valor da absorbância do mix + amostra.

### **3.15.3 Inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)**

As amostras foram incubadas com diacetato de dicloro-di-hidro-floresceína ( $10 \mu\text{M}$ ) e tampão Tris-HCl 5 mM pH 7,4 banho 3 min. Após incubação, sua fluorescência foi medida em 474 nmex e 530 nmem. Os resultados são apresentados como área sob a curva (AUC), calculada usando a seguinte equação:

$$AUC = [(A \text{ branco} - A \text{ amostra}) / (A \text{ branco})] \times 100$$

Equação 5

onde “*A branco*” é o valor de absorbância do branco, “*A amostra*” é o valor da absorbância de cada fração / controle positivo ou negativo.

### **3.15.4 Capacidade de redução de ferro (FRAP)**

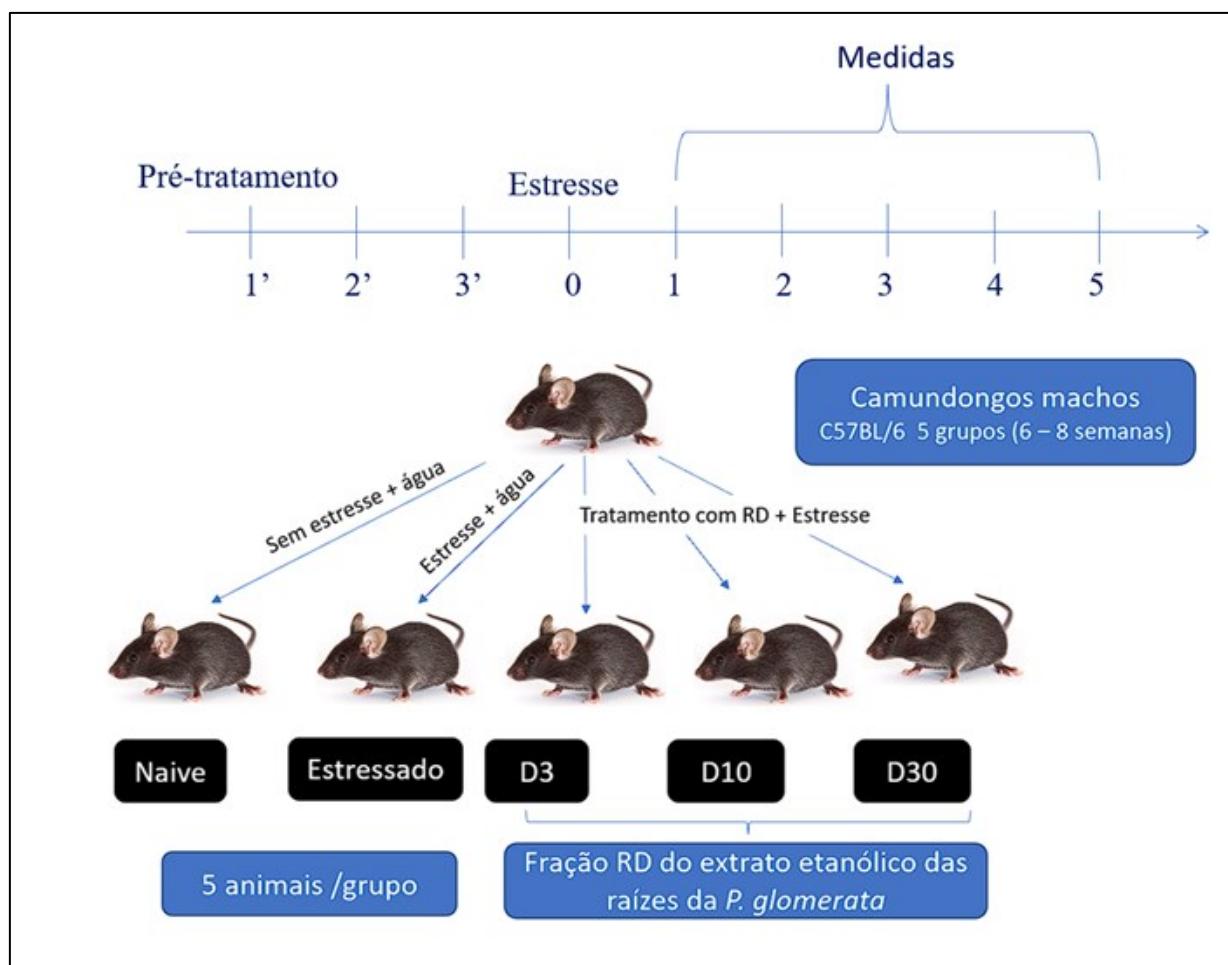
A avaliação da capacidade antioxidante pelo método FRAP foi baseado em Benzie e Strain (1996). Inicialmente, incubou-se 250  $\mu\text{L}$  do reagente de FRAP, constituído por 10 volumes de tampão acetato de sódio (0,3 mol/L e pH 3,6), 1 volume de solução ácida de TPTZ (10 mmol/L) e 1 volume de solução aquosa de cloreto férrico (20 mmol/L), com 10  $\mu\text{L}$  de extrato/partição e 25  $\mu\text{L}$  de água milli-Q durante 6 min a 37° C. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 593 nm e a capacidade antioxidante foi determinada por meio de uma curva analítica construída com ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). O tampão acetato de sódio foi utilizado como branco.

## **3.16 Animais e tratamentos em estudo *in vivo***

Como discutido, a literatura aponta as raízes de *P. glomerata* como sendo a parte da planta de maior uso etnofarmacológico e com mais estudos envolvendo suas propriedades medicinais, devido a isso, optou-se por aplicar a fração de diclorometano (RD) do extrato metanólico das raízes, cujos resultados demonstraram ser enriquecida em 20E, em modelo *in vivo* de estresse induzido em camundongos. Nesta etapa do estudo, foram utilizados camundongos machos C57BL / 6, de 6-8 semanas de idade (20g), fornecidos pelo biotério do Centro de Criação de Ratos da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama

(Comitê de ética 067/18). Os animais foram mantidos em condições adequadas de temperatura (23-25 ° C) e de ciclo claro / escuro de 12 h, com livre acesso a alimentos e água. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o comitê de ética animal da UFU (protocolo 100/16) e Zimmermann (1983). Os animais foram tratados diariamente, uma vez ao dia, sempre pela manhã, com a fração RD nas doses de 3, 10 ou 30 mg/kg, por via oral (gavagem), 3 dias antes da indução do estresse (dia 0) e encerrando no dia 5 após o início do estresse (total de 9 dias de experimento). Foram utilizados 5 grupos no total ( $n=5$ /grupo): naive, estresse sem tratamento e estresse, tratados com 100 $\mu$ L das doses de 3, 10 e 30 mg/kg da fração RD. O delineamento experimental é apresentado na figura 7.

**Figura 7** – Delineamento experimental e os grupos avaliados



Fonte: o autor.

### **3.16.1 Protocolos comportamentais**

Os animais foram separados de seus grupos e expostos a 12h de isolamento social overnight, mantidos individualmente em caixas (30 x 20 x 12,5 cm). Durante o protocolo de indução ao estresse, os animais foram separados em gaiolas individuais e isolados de modo a impedir o contato visual com outros animais e com outras gaiolas. Além disso, os animais foram mantidos com privação de água, comida e luz durante o processo. Após o protocolo, os animais foram recolocados em suas caixas originais, com os mesmos integrantes dos grupos e submetidos às avaliações comportamentais por 5 dias.

#### **3.16.1.1 Teste de campo aberto**

Para avaliar a coordenação motora, os animais foram colocados no centro de uma arena circular (50 cm de diâmetro) com o assoalho marcado com pequenos quadrados simétricos (5 x 5 quadrados), o que permite a quantificação da atividade locomotora dos animais. O tempo de observação foi de 5 minutos, tendo sido anotado o número de cruzamentos de um lado ao outro da arena (crossing), o número de vezes em que o animal fica apoiado nas patas traseiras (rearing), quantidade de defecações e o tempo despendido no centro e na periferia da arena (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012) (Figura 8).

**Figura 8** – Modelo de equipamento usado para teste de campo aberto

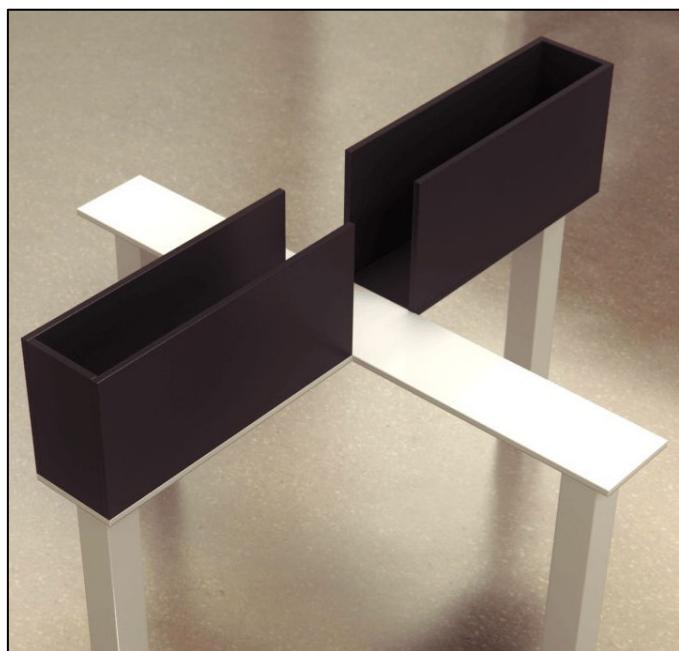


Fonte (Adaptado):<https://geneticacomportamento.ufsc.br/o-laboratorio/rato-modelo-de-estudo/>

### **3.16.1.2 Teste de labirinto em cruz elevado**

Para avaliar o comportamento do tipo ansiedade, os camundongos foram colocados em um labirinto em cruz feito de madeira, sendo constituído por dois braços abertos em sentidos opostos ( $30 \times 5$  cm) sem paredes laterais, mas perpendiculares a dois braços cercados por paredes laterais ( $30 \times 5 \times 15$  cm), apresentando uma plataforma central comum a todos os braços ( $5 \times 5$  cm). A plataforma fica elevada a 50 cm do solo e possui uma borda de madeira (1 cm) nos braços abertos para impedir a queda do animal. Os camundongos foram posicionados no centro da plataforma com a cabeça virada para o braço fechado, podendo explorar livremente o labirinto durante 5 minutos. O tempo de permanência nos braços abertos e fechados foi cronometrado (CAMPOS; ORTEGA; PALAZUELOS; FOGAÇA *et al.*, 2013).

**Figura 9** – Modelo de equipamento usado para teste de labirinto em cruz elevado



Fonte (Adaptado): [medicalexpo.com/pt/prod/mazeengineers/product-125279-908437.html](http://medicalexpo.com/pt/prod/mazeengineers/product-125279-908437.html)

### **3.16.1.3 Teste de nado forçado**

Para avaliar o desenvolvimento de comportamentos do tipo depressivo, os camundongos foram colocados individualmente em cilindros de vidro (17 cm de diâmetro e 25 cm de altura) contendo água até 10 cm de altura e mantidos a 23-25

°C. Os animais foram deixados neste ambiente por 6 minutos, sendo os dois primeiros minutos de ambientação, mas nos demais minutos, foi registrado (cronometrado) o tempo em que permanecerem imóveis (min) (realizando apenas pequenos movimentos para auxiliar na flutuação). A água foi trocada entre cada grupo (ZANELATI; BIOJONE; MOREIRA; GUIMARÃES *et al.*, 2010). Os resultados foram expressos como tempo, em segundos, de imobilidade (Figura 10).

**Figura 10** – Modelo de equipamento usado para teste de nado forçado

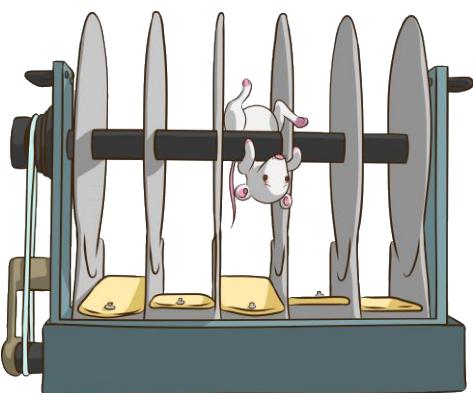


Fonte: <https://loucoengano.blogspot.com/p/teste-do-nado-forcado.html?m=0>

#### **3.16.1.4 Teste da roda giratória (rotarod)**

Para analisar possíveis efeitos sedativos e prejudiciais na coordenação motora da fração RD, os animais foram colocados em um aparato equipado com uma barra de rotação, que gira em velocidade de 5 giros/min, com 1 cm de diâmetro e 5 cm de comprimento. A habituação de todos os camundongos consiste na exposição dos mesmos ao equipamento e, após 24 horas, os camundongos habituados foram submetidos a administração oral da dose de 1mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg, 120 minutos antes do experimento. O animal foi submetido ao experimento durante 2 minutos, sendo o tempo de latência da primeira queda do animal da barra cronometrado manualmente, em segundos (JUSTINO; BARBOSA; NEVES; SILVA *et al.*, 2020) (Figura 11).

**Figura 11** – Modelo de equipamento usado para teste de nado forçado

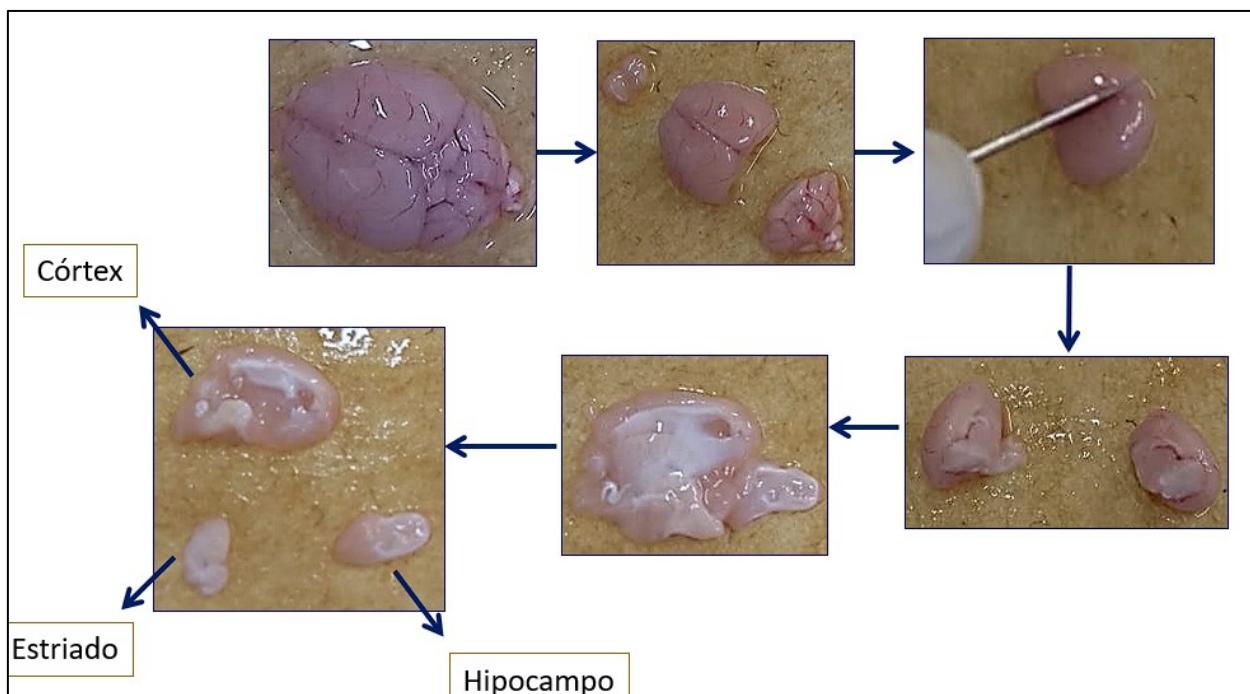


Fonte: <https://conductscience.com/maze/maze-basics-rotarod-test-for-mice/>

### 3.16.2 Análise dos biomarcadores do estresse oxidativo no encéfalo

Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados pela administração de quetamina (100 mg/kg) e xilasina (16 mg/kg) e eutanasiados por punção da aorta abdominal seguida de decaptação para remoção dos encéfalos. Os hemisférios cerebrais foram seccionados e divididos em córtex, hipocampo e estriado (Figura 12). Cada região cerebral foi individualmente homogeneizada (regiões do hemisfério esquerdo foram misturadas com o hemisfério direito) em tampão fosfato de sódio (pH:7,4) e centrifugada a 800xg e 4°C por 10 min. O sobrenadante obtido foi usado para avaliação dos biomarcadores do estresse oxidativo. A concentração total de proteína em cada sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando curva analítica feita com albumina sérica bovina.

**Figura 112 – obtenção do córtex, estriado e hipocampo**



Fonte: o autor.

### 3.16.2.1 Capacidade antioxidante total

Os sobrenadantes foram incubados a 37°C por 6 min com 10 volumes de tampão acetato de sódio 300mM (pH: 3.6), 1 volume de solução de 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina 10mM e 1 volume de solução de cloreto férrico 20mM. A absorbância foi mensurada a 593nm e a capacidade antioxidante foi determinada usando curva analítica construída com Trolox e os resultados foram divididos por mg de proteína. O tampão acetato de sódio foi usado como branco (FRANCO; DA SILVA CARVALHO; DE MOURA; JUSTINO *et al.*, 2018).

### 3.16.2.2 Peroxidação lipídica

Os sobrenadantes foram incubados em banho maria por 120min com solução de ácido tiobarbitúrico 0,67% e com solução de ácido tricloroacético 10%. Após a incubação, foi adicionado às amostras o solvente n-butanol para remoção de fase orgânica. A fluorescência foi avaliada a 515 nm (excitação) e 553 nm

(emissão). A peroxidação lipídica foi determinada utilizando uma curva analítica construída com malondialdeído. O tampão fosfato de sódio foi usado como branco (JUSTINO; PEREIRA; PEIXOTO; VILELA *et al.*, 2017).

### **3.16.2.3 Conteúdo de grupos sulfidrilas**

Os grupos sulfidrilas foram avaliadas utilizando ácido ditionitrobenzóico (DTNB) diluído em tampão fosfato de potássio 0,2M (pH: 8,0). Os homogeneizados foram incubados por 30 min com tampão fosfato de sódio 1mM (pH: 7,4) e com a solução de DTNB 10mM. A presença dos grupos sulfidrilas foi mensurada a 412nm (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

### **3.16.2.4 Concentração de glutationa reduzida (GSH)**

As proteínas dos sobrenadantes foram precipitadas com ácido metafosfórico e as amostras foram centrifugadas a  $7000 \times g$  por 10 min. O sobrenadante foi misturado com tampão fosfato de sódio 100 mM (pH: 8,0) contendo EDTA 5 mM para inibir enzimas metaloproteases e 1 mg / mL de orto-ftaldialdeído diluído em metanol. A fluorescência foi medida a 350 nm (excitação) e 420 nm (emissão). A fluorescência do branco (tampão fosfato de sódio 100mM, pH: 8,0) foi subtraído de todos os valores de fluorescência das amostras. Para determinar o conteúdo de GSH, uma curva analítica foi construída com GSH como padrão (BROWNE; ARMSTRONG, 1998).

### **3.16.2.5 Atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx)**

A atividade da GPx foi medida com base na redução da glutationa oxidada em GSH utilizando NADPH e glutationa redutase. Os sobrenadantes foram incubados com tampão GPx (fosfato de potássio 100 mM pH: 7,7 contendo EDTA 1 mM para desativar enzimas metaloproteases), azida de sódio 40 mM, GSH 100 mM diluído em ácido metafosfórico 5%, 4,5 U de glutationa redutase diluída em tampão GPx, NADPH 2 mM diluído em bicarbonato de sódio a 5% e terc-butil 0,5 mM. O consumo de NADPH foi medida por espectrofotometria durante 10 min a 340 nm (TEIXEIRA; DE SOUZA; PEIXOTO; MACHADO *et al.*, 2017)

### **3.16.2.6 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi avaliada com base na inibição da auto-oxidação do pirogalol. Os sobrenadantes foram misturados com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,2) contendo EDTA 1 mM para desativar enzimas metaloproteases, catalase 80 U / mL e pirogalol 24 mM. O ensaio cinético foi monitorado por 10 min a 420 nm usando uma curva analítica construída com SOD como padrão (JUSTINO; PEREIRA; PEIXOTO; VILELA *et al.*, 2017).

### **3.16.2.7 Atividade da enzima catalase (CAT)**

A atividade da catalase foi avaliada com base na decomposição do peróxido de hidrogênio. Os homogeneizados foram incubados com Triton X-100 10% e misturados com tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) contendo peróxido de hidrogênio 0,2% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A decomposição deste último foi monitorada em 240 nm por 10 min (DINIZ VILELA; GOMES PEIXOTO; TEIXEIRA; BELELE BAPTISTA *et al.*, 2016).

### **3.16.2.8 Conteúdo de nitrito e nitrato (NO<sub>x</sub>)**

Os homogeneizados foram incubados com solução de sulfato de zinco 200 mM e acetonitrila (96%). A mistura foi centrifugada a 3000 g por 20 min a 4 ° C e o sobrenadante foi separado para análise de NO<sub>x</sub> (NO<sub>2</sub> mais NO<sub>3</sub>), conforme descrito por Miranda *et al.* (2001). A concentração de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> / NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foi avaliada em 570 nm usando uma microplaca de 96 poços, utilizando 50 µL do sobrenadante NO<sub>x</sub> e 50 µL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida e 0,1% de dicloridrato de N- (1-naftil) etilenodiamina em 2,5% de fosfórico ácido), sendo então incubados à temperatura ambiente durante 10 min. O conteúdo de NO<sub>x</sub> foi calculado com base em uma curva padrão construída com nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µM (GRANGER; TAINTOR; BOOCKVAR; HIBBS JR, 1996).

### **3.17 Análise estatística**

Todas as análises estatísticas e a confecção dos gráficos foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism versão 8.0. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e a análise da variância foi realizada pelo teste One-Way ANOVA com teste Dunnett para comparações múltiplas entre os controles e as médias das amostras, One-Way e two-Way ANOVA com teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias das amostras e dos controles. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados significativos.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No presente estudo, investigou-se os efeitos das frações obtidas a partir dos extratos metanólicos da parte aérea e das raízes da planta *P. glomerata*, sobre ensaios antioxidantes e em métodos de inibição da enzima acetilcolinesterase e de glicação proteíca, na qual as frações de diclorometano do extrato metanólico da parte aérea (PAD) e das raízes (RD) apresentaram os melhores resultados. As frações PAD e RD foram obtidas usando diclorometano após partição do extrato bruto, uma vez que este solvente é responsável pela retenção e concentração de fitoesteroides (BHAT; NAGASAMPAGI; SIVAKUMAR, 2005; SADÍLEK; SPÁLOVSKÁ; VRANA; VÁROVÁ *et al.*, 2016) como indicado pela análise de cromatografia em camada delgada realizada. Entre os fitoesteroides temos a 20E, conforme indicado aqui por análise de espectrometria de massa; a 20E é o princípio ativo da *P. glomerata* e, segundo a quantificação feita neste trabalho por cromatografia de alta eficiência, é o composto mais abundante na fração PAD do que na RD. A fração RD também foi avaliada em modelo de estresse agudo em camundongos, tendo sido avaliados comportamentos depressivos e ansiosos, bem como biomarcadores de estresse oxidativo. Dentre os indicadores comportamentais, o grupo tratado com 30 mg / kg de RD apresentou melhora significativa em diferentes parâmetros de ansiedade e depressão, sem apresentar efeitos sedativos. Além disso, a mesma concentração de RD estimulou as defesas antioxidantes no cérebro dos animais, reduzindo assim os biomarcadores de estresse oxidativo avaliados. Os resultados obtidos com a planta *P. glomerata*,

apresentados e discutidos a seguir, são inéditos na literatura científica. Os resultados obtidos com PAD nos modelos *in vitro* podem estimular o uso da parte aérea ao invés do uso das raízes, contribuindo para o uso sustentável da espécie no ambiente natural.

#### **4.1 Rendimentos obtidos para cada amostra**

Os rendimentos obtidos para os extratos metanólicos da raiz e da parte aérea estão apresentados na tabela 1 e os rendimentos obtidos para cada fração dos extratos metanólicos são apresentados na tabela 2.

**Tabela 1** - Rendimento dos extratos de *P. glomerata* obtidos através da técnica de maceração

<b>EXTRATO</b>	<b>RAIZ (R) (g)*</b>	<b>PARTE AÉREA (PA) (g)*</b>
Metanol (M)	235g (23,5%)	165g (16,5%)

Nota: \* Rendimentos obtidos para 1.000g (100%) de cada material vegetal seco.

Para cada 1000g de cada material vegetal seco, foram obtidos rendimentos consideráveis nos processos de extração, sendo 235g (23,5%) e 165g (16,5%) para os extratos metanólicos da raiz (RM) e da parte aérea (PAM), respectivamente.

**Tabela 2** - Rendimento das frações de *P. glomerata* obtidas através da técnica de fracionamento líquido-líquido

<b>PARTIÇÃO</b>	<b>RAIZ (R) (g)*</b>	<b>PARTE AÉREA (PA) (g)*</b>
Hexano (H)	1,90g (3,4%)	1,70g (3,5%)
Diclorometano (D)	3,37g (6,1%)	3,83g (7,8%)
Acetato de etila (A)	11,37g (20,6%)	8,68g (17,6)
n-butanol (B)	16,97g (30,7%)	11,53g (23,4)
Água (H <sub>2</sub> O)	21,60g (39,2%)	23,48g (47,7)

Nota: Raiz (R) e Parte aérea (PA). \* Rendimentos obtidos a partir de 55,21g do extrato bruto da raiz. \*\*Rendimentos obtidos a partir de 49,23g do extrato bruto da parte aérea.

Foram obtidos rendimentos variáveis para as frações do extrato metanólico das raízes: RH: 1,90g (3,4%); RD: 3,37g (6,1%); RA:11,37g (20,06%); RB: 16,97g (30,7%); RH<sub>2</sub>O: 21,60g (39,2%) e também para as frações do extrato metanólico

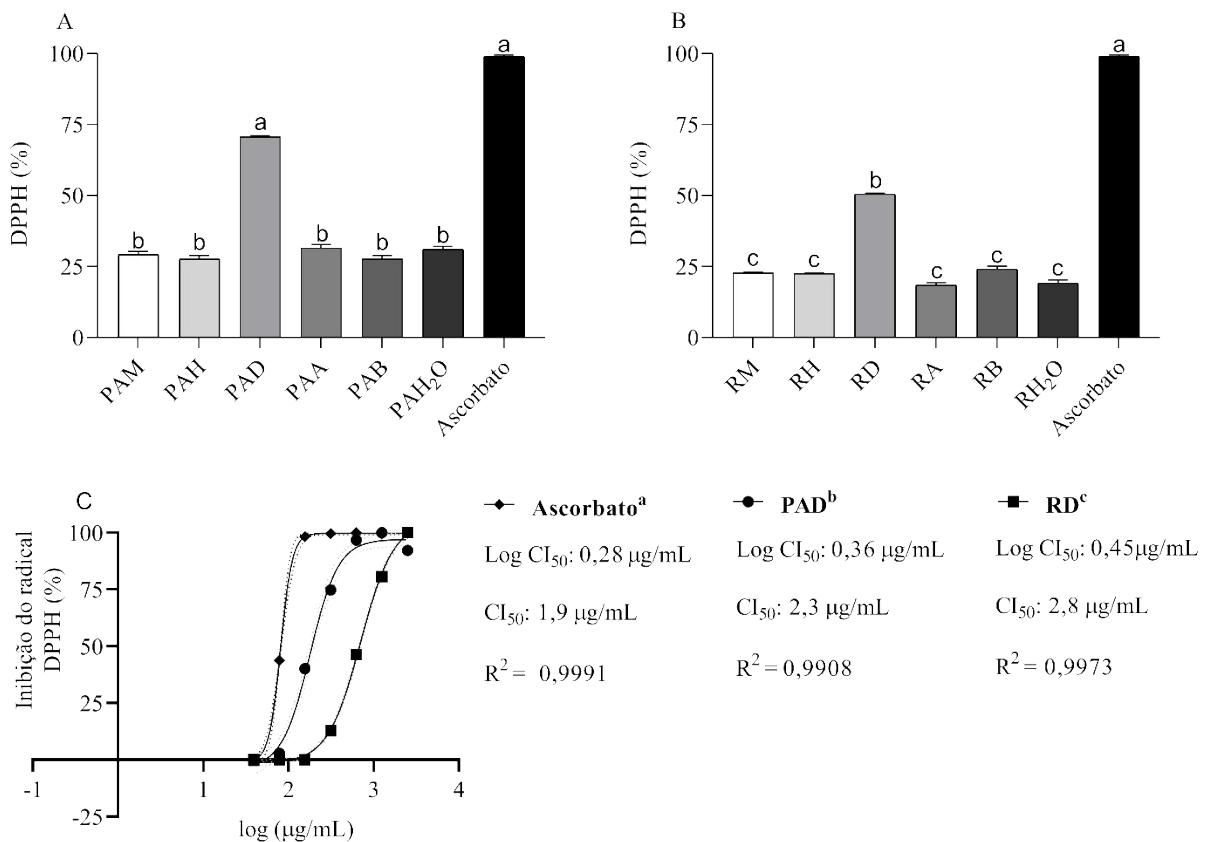
da parte aérea: PAH: 1,70g (3,5%); PAD: 3,83g (7,8%); PAA: 8,68g (17,6%); PAB: 11,53g (23,4%) e PAH<sub>2</sub>O: 23,48g (47,7%).

#### **4.2 Atividade antioxidante e antiglicante**

Os resultados da atividade antioxidante pelo método DPPH são descritos na figura 13, enquanto que os resultados de atividade antioxidante pelo método ORAC e atividade antiglicante pelo método BSA/frutose são apresentados na figura 14. Na concentração de 10 mg/mL, o controle ascorbato apresentou  $99 \pm 1\%$  de capacidade antioxidante, enquanto que o extrato metanólico e as frações da parte aérea, também testados na concentração de 10mg/mL apresentaram os seguintes resultados: PAM:  $29,2 \pm 1,1$ ; PAH:  $27,6 \pm 1,3$ ; PAD:  $70,7 \pm 0,3$ ; PAA:  $31,5 \pm 1,2$ ; PAB:  $27,6 \pm 1,3$ ; PAH<sub>2</sub>O:  $31,1 \pm 0,9\%$ , já o extrato metanólico e as frações da raiz os seguintes: RM:  $22,7 \pm 0,3$ ; RH:  $22,5 \pm 0,2$ ; RD:  $50,5 \pm 0,3$ ; RA:  $18,5 \pm 0,7$ ; RB:  $24,1 \pm 1,0$ ; RH<sub>2</sub>O:  $19,2 \pm 1,1\%$ .

As amostras testadas apresentaram valores semelhantes, tendo as frações PAD e fração RD se destacado entre as demais com valores maiores que 50% de capacidade antioxidante e por isso foram submetidas a determinação do Cl<sub>50</sub> do método DPPH. O controle ascorbato e as frações PAD e RD apresentaram as concentrações de 1,9; 2,3 e 2,8 µg/mL na determinação do Cl<sub>50</sub>, respectivamente. Com base nos resultados, a fração PAD foi a única fração a apresentar atividade antioxidante sem diferença significativa com o controle ascorbato.

**Figura 13** - Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH



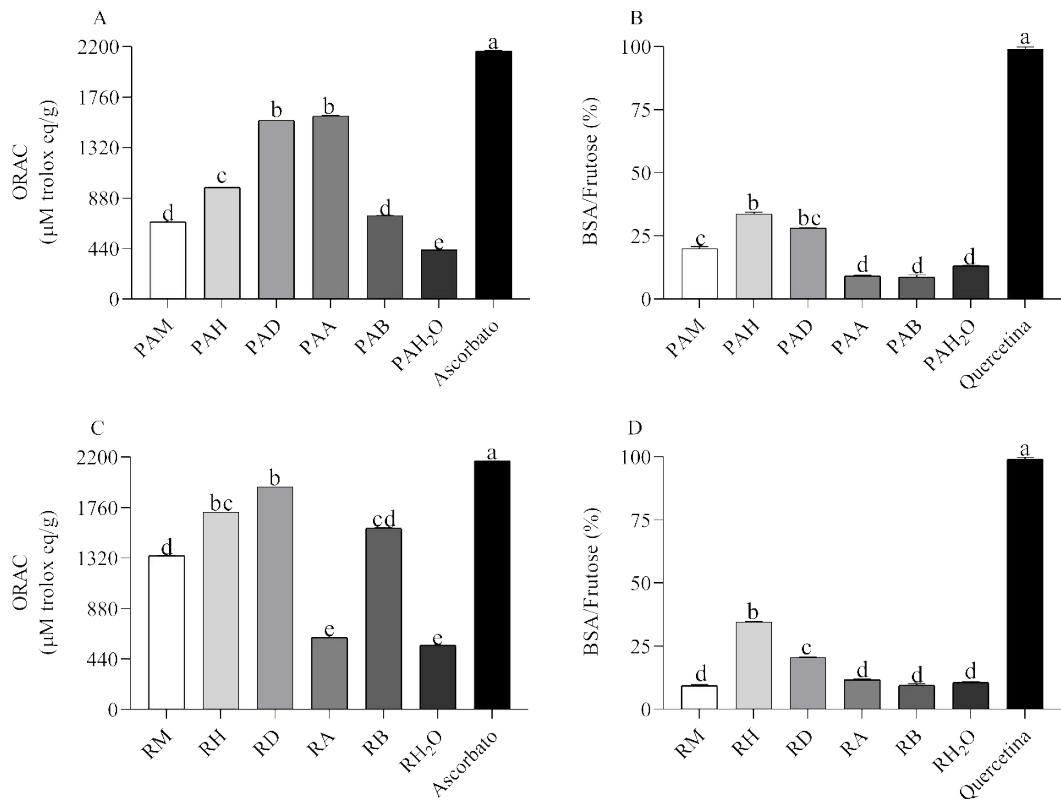
Nota: Capacidade antioxidante do extrato metanólico da parte aérea (PAM) de *P. glomerata* e de suas frações hexano (PAH) diclorometano (PAD), acetato de etila (PAA), n-butanol (PAB) e água (PAH<sub>2</sub>O), além do extrato metanólico das raízes (RM) de *P. glomerata* e de suas frações hexano (RH), diclorometano (RD), acetato de etila (RA), n-butanol (RB) e água (RH<sub>2</sub>O). métodos DPPH (A e B) e Cl<sub>50</sub> de DPPH (C). Todas as amostras foram testadas a 10 mg/mL e diluídas serialmente para o cálculo de Cl<sub>50</sub>. Letras diferentes indicam diferença significativa para P < 0.05.

Os resultados de atividade antioxidante pelo método ORAC mostram que nenhuma das amostras testadas apresentou atividade antioxidante compatível com o obtido com o controle ascorbato ( $2.165 \pm 0,2 \mu\text{M trolox eq/g}$ ) na contração de 10 mg/mL, ainda que as amostras PAD, PAA, RM, RH, RD e RB tenham se destacado, com valores maiores que 1.000  $\mu\text{M trolox eq/g}$ . O extrato metanólico e as frações da parte aérea apresentaram os seguintes resultados: PAM:  $673,0 \pm 0,3$ ; PAH:  $975,0 \pm 0,3$ ; PAD:  $1.559 \pm 0,4$ ; PAA:  $1.597 \pm 0,3$ ; PAB:  $726,0 \pm 0,1$ ; PAH<sub>2</sub>O:  $428,0 \pm 0,1 \mu\text{M trolox eq/g}$ , já o extrato metanólico e as frações da raiz os seguintes: RM:  $1.340 \pm 0,2$ ; RH:  $1.721 \pm 0,1$ ; RD:  $1.941 \pm 0,3$ ; RA:  $621,2 \pm 0,1$ ; RB:  $1.582 \pm 0,2$ ; RH<sub>2</sub>O:  $561,5 \pm 0,6 \mu\text{M trolox eq/g}$ .

As frações e os extratos de *P. glomerata* apresentaram ainda relevante atividade antioxidante pelos métodos ORAC e DPPH, com destaque para as amostras PAD e RD. Essas mesmas amostras também apresentaram resultados promissores nas análises *ex vivo* em tecido nervoso quanto a atividade antioxidante total (FRAP), reduzindo inclusive a geração de EROS e de marcadores de oxidação de lipídeos (TBARS) e de proteínas (sulfidrilas). Segundo Liang e Kitts (2014), o método ORAC avalia a capacidade das amostras em transferir átomos de hidrogênio (*scavanger*); O teste FRAP avalia o mecanismo de transferência de elétrons (*quenching*) e o DPPH, é capaz de detectar os dois mecanismos de redução dos radicais livres. As frações PAD e RD avaliados no presente trabalho, mostraram uma interessante capacidade antioxidante por processo *scavanger* nos modelos *in vitro* e *quenching* no modelo *ex vivo*, provavelmente devido à presença dos compostos identificados.

A análise da atividade antiglicante demonstrou que os extratos metanólicos e as frações de ambas as partes da planta não possuem capacidade considerável em inibir a glicação proteica, uma vez que nenhuma das amostras testadas apresentaram o mínimo de 50% de atividade na concentração de 10 mg/mL ou ainda diferença significativa em relação ao controle quercetina ( $99 \pm 1\%$ ). O extrato metanólico e as frações da parte aérea apresentaram os seguintes resultados: PAM:  $20,0 \pm 0,8$ ; PAH:  $33,8 \pm 0,6$ ; PAD:  $28,1 \pm 0,1$ ; PAA:  $9,2 \pm 0,2$ ; PAB:  $8,7 \pm 0,8$ ; PAH<sub>2</sub>O:  $13,1 \pm 0,2\%$ , já o extrato metanólico e as frações da raiz os seguintes: RM:  $9,3 \pm 0,5$ ; RH:  $34,5 \pm 0,4$ ; RD:  $20,5 \pm 0,2$ ; RA:  $11,6 \pm 0,5$ ; RB:  $9,5 \pm 0,6$ ; RH<sub>2</sub>O:  $10,6 \pm 0,3\%$ .

**Figura 14** - Avaliação da capacidade antioxidante pelo método ORAC e antiglicante pelo método BSA/Frutose



Nota: Atividade antioxidante e antiglicante do extrato metanólico das partes aéreas (PAM) de *P. glomerata* e de suas frações hexano (PAH) diclorometano (PAD), acetato de etila (PAA), n-butanol (PAB) e água (PAH<sub>2</sub>O), além do extrato metanólico das raízes (RM) de *P. glomerata* e de suas frações hexano (RH), diclorometano (RD), acetato de etila (RA), n-butanol (RB) e água (RH<sub>2</sub>O). Métodos ORAC (A e C) e BSA/Frutose (B e D). Todas as amostras foram testadas a 10 mg/mL Letras diferentes indicam diferença significativa para  $P \leq 0,05$ .

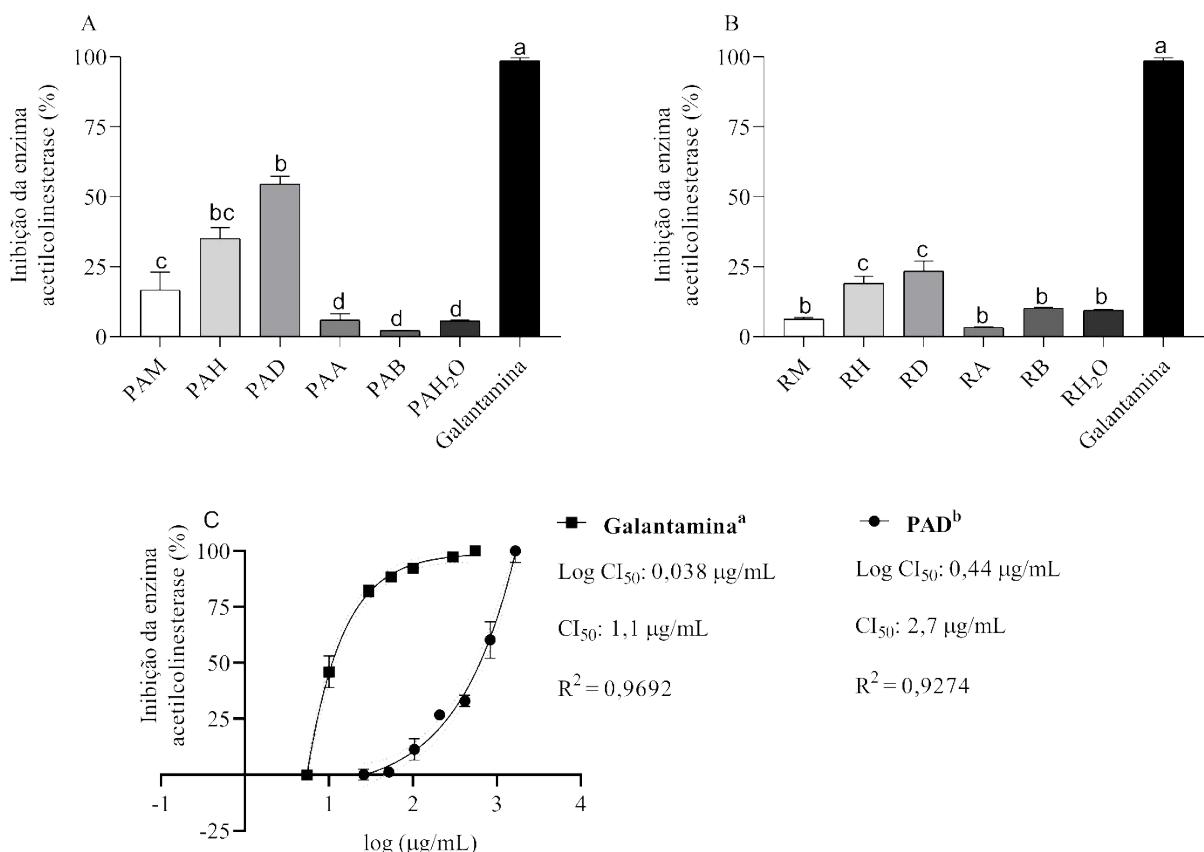
Existem também muitos compostos secundários em produtos naturais que, além de apresentarem atividade antioxidante, têm propriedades antiglicantes e podem influenciar a produção de AGEs por meio de diferentes mecanismos, como inibição da formação de EROS durante a glicação, inibição da base de Schiff e produtos de Amadori e bloqueio do receptor AGE-RAGE (YEH; HSIA; LEE; WU *et al.*, 2017). Neste trabalho, as frações e extratos de *P. glomerata* apresentaram atividade modesta no método de antiglicação BSA/FRU. De acordo com Wang; Yagiz; Buran; Do Nascimento Nunes *et al.* (2011), o modelo BSA / FRU é utilizado para avaliar o efeito dos extratos em todos os estágios da glicação de proteínas. O

método BSA / FRU é de grande importância, uma vez que a frutose gerada pela oxidação do sorbitol na via do poliol ativa, por exemplo, em lentes oculares e nervos periféricos, pode se acumular e gerar moléculas glicadas e espécies reativas de oxigênio nestes tecidos (BROWNLEE, 2001), culminando em retinopatia (HAMMES; DU; EDELSTEIN; TAGUCHI *et al.*, 2003) e neuropatia periférica (SCHEMMEL; PADIYARA; D'SOUZA; COMPLICATIONS, 2010), respectivamente.

#### **4.3 Inibição da enzima acetilcolinesterase**

Os resultados obtidos no método de inibição da enzima acetilcolinesterase estão apresentados na figura 15. No ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase, o controle positivo galantamina apresentou  $98 \pm 0,6\%$  de atividade nos ensaios iniciais. Por outro lado, o extrato metanólico e as frações da parte aérea apresentaram os seguintes resultados: PAM:  $16,8 \pm 3,6$ ; PAH:  $35,1 \pm 2,7$ ; PAD: 54,6; PAA:  $6,0 \pm 1,3$ ; PAB:  $2,2 \pm 0,02$ ; PAH<sub>2</sub>O:  $5,7 \pm 0,13\%$ , já o extrato metanólico e as frações da raiz os seguintes: RM:  $6,4 \pm 0,5$ ; RH:  $19,1 \pm 1,7$ ; RD:  $29,5 \pm 2,4$ ; RA:  $3,4 \pm 0,04$ ; RB:  $10,2 \pm 0,15$ ; RH<sub>2</sub>O:  $9,5 \pm 0,04\%$ . No cálculo de Cl<sub>50</sub>, a galantamina e a fração PAD (fração com melhor atividade) apresentaram, respectivamente, os valores de 1,1 e 2,7 µg/mL.

**Figura 15** - Ensaios de inibição da enzima acetilcolinesterase



Nota: Ensaios de inibição da enzima acetilcolinesterase utilizando do extrato metanólico da parte aérea (*P. glomerata*) e de suas frações hexano (PAH) díclorometano (PAD), acetato de etila (PAA), n-butanol (PAB) e água (PAH<sub>2</sub>O), além do extrato metanólico das raízes (RM) de *P. glomerata* e de suas frações hexano (RH), díclorometano (RD), acetato de etila (RA), n-butanol (RB) e água (RH<sub>2</sub>O). Métodos ORAC (A e C) e BSA/Frutose (B e D). Análises iniciais com as amostras da parte aérea (A) e com as amostras das raízes (B), além do ensaio de IC<sub>50</sub> para a fração de díclorometano do extrato metanólico da parte aérea (PAD). Todas as amostras foram testadas a 10 mg/mL e diluídas serialmente para o cálculo de IC<sub>50</sub>. Letras diferentes indicam diferença significativa para P ≤ 0,05.

As amostras apresentaram ainda atividade anticolinesterásica e, assim como nos demais ensaios, as frações PAD e RD se destacaram. Possivelmente, a atividade inibitória está relacionada com a presença de 20E, uma vez que o composto foi indicado como inibidor dessa enzima por outros estudos (NEJMA; NGUIR; JANNET; DAÏCH *et al.*, 2015; MAMADALIEVA; BÖHMDORFER; ZENGİN; BACHER *et al.*, 2019; MOAWAD; ABUZAID; ARAFA; AHMED *et al.*, 2020). Aqui, foi identificado *in silico* que a estrutura da 20E estabelece muitas ligações de hidrogênio (H) com o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase de *H. sapiens* e de

*E. electricus*, sendo estas ligações capazes de promover a inibição da enzima segundo outros estudos (LEE; KANG; LEE; OH *et al.*, 2019). A inibição da enzima acetilcolinesterase é de grande relevância, uma vez que a literatura indica que entre 40 a 60 por cento das pessoas com DA se beneficiam ao utilizarem um inibidor dessa enzima, podendo apresentar redução da ansiedade; melhorias na motivação, memória e concentração; e melhoria na capacidade de realizar as atividades diárias (DELAGARZA, 2003)

#### 4.4 Prospecção fitoquímica

Os resultados da prospecção fitoquímica estão indicados na tabela 3. As amostras da parte aérea e das raízes da planta *P. glomerata* apresentaram polifenóis, terpenos e esteroides, porém não foram identificados alcaloides nas amostras testadas. As frações PAD e RD apresentaram maior conteúdo qualitativo de polifenóis, terpenos e esteroides quando comparadas as demais amostras. Por conta dos resultados anteriores e pela análise fitoquímica, as amostras PAD e RD foram submetidas a análise de espectrometria de massas para sugestão de seus compostos bioativos.

**Tabela 3** - Prospecção fitoquímica de polifenóis, terpenos/esteroides e alcaloides

Amostras	Polifenóis (Anisaldeído)	Terpenos e esteróides (Liebermann-Buchard)	Alcaloides (Dragendorff)
PAM	+	++	-
PAH	+	+	-
PAD	++++	+++	-
PAA	++	++	-
PAB	++	++	-
PAH <sub>2</sub> O	+	-	-
RM	+	+	-
RH	+	+	-
RD	+++	+++	-
RA	+	++	-
RB	+	+	-
RH <sub>2</sub> O	+	-	-

Nota: Prospecção fitoquímica do extrato metanólico da parte aérea (PAM) de *P. glomerata* e de suas frações hexano (PAH) diclorometano (PAD), acetato de etila (PAA), n-butanol (PAB) e água (PAH<sub>2</sub>O), além do extrato metanólico das raízes (RM) de *P. glomerata* e de suas frações hexano (RH), diclorometano (RD), acetato de etila (RA), n-butanol (RB) e água (RH<sub>2</sub>O). Quanto a presença das classes de metabólitos, + indica presença e – indica ausência.

#### **4.5 Espectrometria de massas**

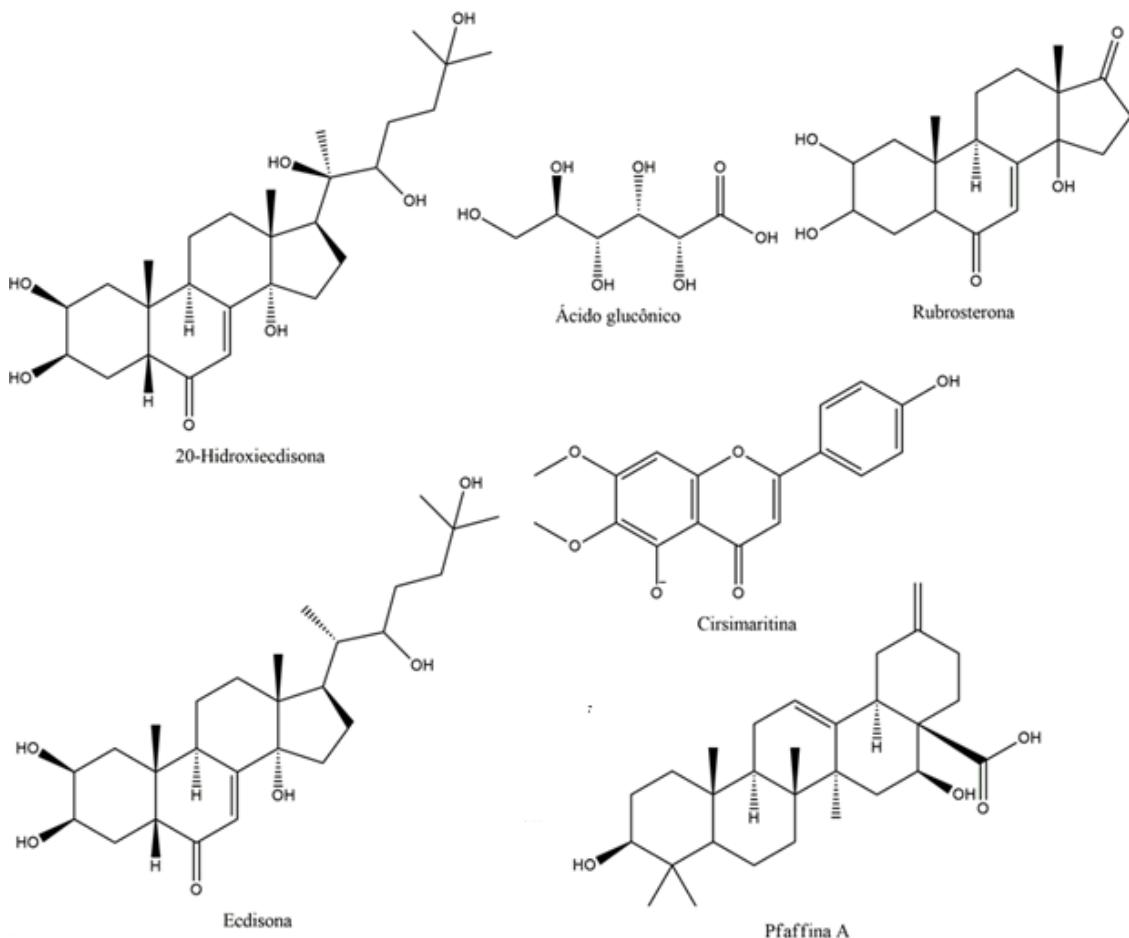
As frações com os melhores resultados nos testes iniciais foram a PAD e RD e, por isso, foram submetidas à análise por espectrometria de massas. As moléculas sugeridas estão descritas na tabela 4. Na fração PAD foram sugeridas as seguintes moléculas: 20-Hidroxiecdsona; alpha-ecdisona; cirsimartina; pfaffina A; ácido glucônico e rubrosterona. Por outro lado, na fração RD, foram sugeridas as seguintes moléculas: 20-hidroxiecdsona; ácido pfáfico; pfaffina A e rubrosterona. A figura 16 apresenta a estrutura das moléculas sugeridas nas amostras PAD e RD.

As moléculas identificadas por espectrometria de massas foram anteriormente determinadas no gênero *Pfaffia* sp. (LI; JADHAV; KHAN, 2010; FELIPE; BRAMBILLA; PORTO; PILAU *et al.*, 2014), porém foram identificadas pela primeira vez nas frações PAD e RD de *P. glomerata*. Além da 20E, presente em ambas as frações, também foram identificadas as moléculas ecdisona; cirsimartina; pfaffina A; ácido glucônico e rubrosterona na fração PAD e pfaffina A e rubrosterone na fração RD. Os compostos naturais encontrados nas amostras podem estabilizar o excesso de radicais livres, evitando o estabelecimento do estresse oxidativo e sua ação prejudicial sobre as estruturas celulares em transtornos mentais (MARTORELL; LUCAS; ALARCÓN-ZAPATA; CAPÓ *et al.*, 2021). Isso é extremamente relevante, uma vez que o estresse oxidativo é apontado como causa ou agravante de mais de 50 doenças, entre elas o Alzheimer, diabetes mellitus, insuficiência renal crônica, artrite entre outras (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016). Portanto, muitos pesquisadores vem concentrando seus esforços na avaliação da atividade biológica das classes de compostos secundários polifenóis, terpenos e alcaloides (SINGH; SHARMA, 2020).

**Tabela 4** - Compostos presentes na fração de diclorometano da parte aérea (PAD) e na fração de diclorometano das raízes (RD) da planta *P. glomerata* usando CLAE-IES-EM/EM (modo positivo e negativo em 5, 10, 15, 20, 25 e 30 eV)

Compostos sugeridos	tR (min)	Fórmula	Massa molecular exata	m/z	Massa vista	Erro (ppm)	MS/MS	Referências
<b>Fração PAD</b>								
20-Hidroxiecdsona	7.060	C <sub>27</sub> H <sub>45</sub> O <sub>7</sub> <sup>+</sup>	481,3160	481,3112 [M + H <sup>+</sup> ]	481,3176	3,32	+ 20 eV: 463, 427, 371, 165	(FELIPE; BRAMBILLA; PORTO; PILAU et al., 2014)
Ecdisona	7.867	C <sub>27</sub> H <sub>45</sub> O <sub>6</sub> <sup>+</sup>	465,3211	465,3152 [M + H <sup>+</sup> ]	465,3218	1,50	+ 5 eV: 447, 436, 429, 411	(LAVRYNENKO; NEDIELKOV; MÖLLER; SHEVCHENKO, 2013)
Cirsimaritina	8,454	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	313,0718	313,0693 [M - H <sup>+</sup> ]	313,0725	2,23	- 20eV: 298, 283, 255, 183	(HOSSAIN; RAI; BRUNTON; MARTIN-DIANA et al., 2010)
Pfaffina A	7.950	C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> NaO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	479,3132	479,2963 [M + Na <sup>+</sup> ]	479,3113	-3,96	+ 15 eV: 461, 443, 425, 407	(LI; JADHAV; KHAN, 2010)
Ácido glucônico	9.074	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub> <sup>+</sup>	197,0656	197,1138 [M + H <sup>+</sup> ]	197,0648	-4,05	+ 5eV: 169, 159, 124, 109	(FELIPE; BRAMBILLA; PORTO; PILAU et al., 2014)
Rubrosterona	6.389	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	335,1853	335,1810 [M + H <sup>+</sup> ]	335,1877	7,16	+ 20 eV: 317, 299, 187, 131	(SHIOBARA; INOUE; KATO; NISHIGUCHI et al., 1993)
<b>Fração RD</b>								
20-Hidroxiecdsona	7.109	C <sub>27</sub> H <sub>45</sub> O <sub>7</sub> <sup>+</sup>	481.3160	481,3126 [M + H <sup>+</sup> ]	481,3182	4,57	+ 20 eV: 445, 409, 371, 165	(FELIPE; BRAMBILLA; PORTO; PILAU et al., 2014)
Pfaffina A	7.998	C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> NaO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	479,3132	479,2949 [M + Na <sup>+</sup> ]	479,3102	-6,25	+ 20 eV: 461, 443, 425, 407	(LI; JADHAV; KHAN, 2010)
Rubrosterona	6.421	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	335,1853	335,1852	335,1830	-6,86	+15 eV: 317, 299, 187, 131	(SHIOBARA; INOUE; KATO; NISHIGUCHI et al., 1993)

**Figura 16** - Moléculas sugeridas nas amostras PAD e RD por espectrometria



Nota: moléculas 20-hidroxiecdisona; ácido glucônico, rubrosterona, ecdisona, ácido gálico cirsimaritina e pfaffina A foram indicadas nas frações PAD (fração de diclorometano do extrato metanólico da parte aérea) e as moléculas 20-hidroxiecdisona; rubrosterona e pfaffina foram indicadas nas frações RD (fração de diclorometano do extrato metanólico das raízes). A avaliação foi realizada por análise de espectrometria de massas (CLAE-IES-EM/EM).

#### 4.6 Quantificação de 20-hidroxiecdionina

O fitoesteroide 20E, identificado nas amostras PAD e RD por espectrometria de massas, foi quantificado em ambas as amostras através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando o padrão de 20E (93% de pureza Sigma H5142). Nas condições cromatográficas descritas, o tempo de retenção médio para a molécula 20E foi de 10,5 min, tanto no padrão quanto nas amostras de PAD e RD. A área do pico da molécula foi de 1541864,5 mA para a fração PAD e de 1159939,5 mA para

RD, fornecendo a concentração de 20E igual a 45 µg e de 33,85 µg para cada 1 mg de fração PAD e RD, respectivamente (tabela 5).

**Tabela 5** - Concentração do composto 20-hidroxyecdisona nas frações PAD e RD

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de 20E*</b> <b>(para cada 1mg de fração)</b>
PAD	45,0 µg
RD	33,85 µg

Nota: PAD (fração de diclorometano do extrato metanólico da parte aérea).

RD (fração de diclorometano do extrato metanólico das raízes).

#### **4.7 Docking molecular e farmacocinética**

Os melhores resultados para cada interação proteína-ligante foram pontuados pela função ChemPLP do programa Gold e estão elencadas na tabela 6.

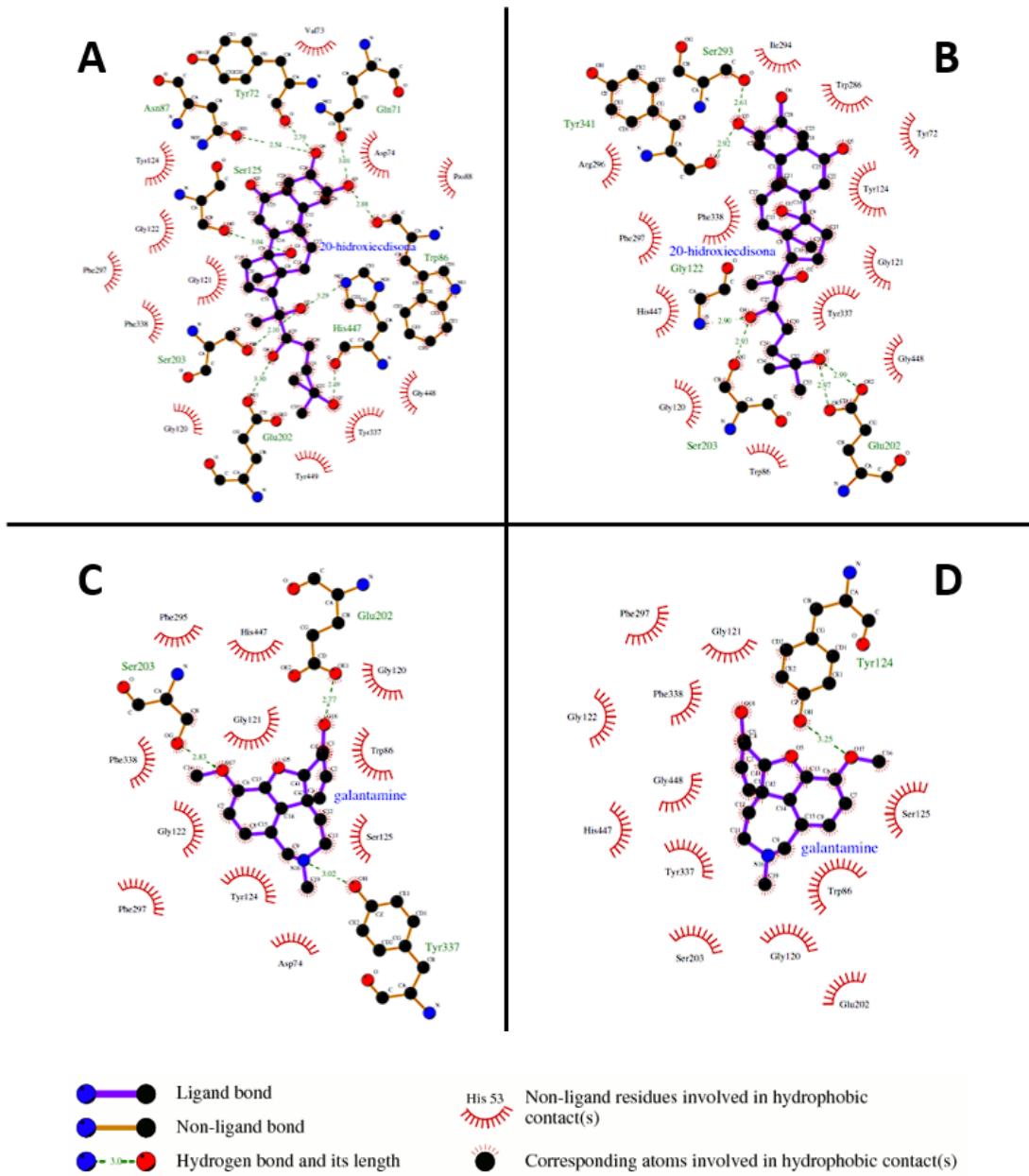
**Tabela 6** - Pontuação máxima resultante da docagem

Docking enzima AChE*	ChemPLP
AChE de <i>Homo sapiens</i> X Galantamina	71,5
AChE de <i>Homo sapiens</i> X 20-hidroxyecdisona	51,7
AChE de <i>Electrophorus electricus</i> X Galantamina	54,4
AChE de <i>Electrophorus electricus</i> X 20-hidroxyecdisona	41,4

Nota: AChE: enzima acetilcolinesterase

Os resultados indicam que o composto 20E possui boa capacidade de interação com o sítio ativo das enzimas acetilcolinesterase de *Homo sapiens* e de *Electrophorus electricus*, com valores sequenciais de 51,7 e 41,4 ChemPLP, porém essa interação é menor quando comparada ao controle galantamina (71,5 e 54,4 ChemPLP, respectivamente). A figura 17 indica que a 20E estabelece uma quantidade considerável de interações de hidrogênio com resíduos presentes no sítio ativo de ambas as enzimas, além de poucas interações hidrofóbicas. Já com a galantamina, os sítios ativos estabeleceram mais interações hidrofóbicas do que de hidrogênio.

**Figura 17** - Diagrama 2D apresentando a interação entre o composto 20-E e o controle galantamina com enzimas acetilcolinesterase humana e de peixe elétrico



Nota: Diagrama 2D indicando as interações entre os compostos 20-hidroxiecdisona e galantamina (controle positivo) com o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase. Nota: Interação da 20-hidroxiecdisona com a enzima acetilcolinesterase de *Homo sapiens* (A) e de *Electrophorus electricus* (C); interação da galantamina com a enzima acetilcolinesterase de *Homo sapiens* (B) e de *Electrophorus electricus* (D).

São apresentados na tabela 7 os resultados obtidos a partir da predição farmacocinética para o composto 20E. A molécula possui baixa solubilidade em água, média permeabilidade em células CaCo2 e em enterócitos humanos, além de baixa permeabilidade pela pele. A molécula atua ainda como substrato da glicoproteína P (permite a entrada de 20E no sangue) e não é considerada inibidora da glicoproteína P I ou II. Quanto a distribuição, o composto apresentam maior distribuição plasmática do que nos tecidos periféricos (VDss) e com fração não ligada baixa, sendo que ainda apresentou considerável capacidade de penetrar no sistema nervoso central, ainda que apresente dificuldade em ultrapassar a barreira hematoencefálica (BBB). A predição indicou ainda que a 20E não atua como substrato ou inibidora das isoformas da enzima citocromo oxidase.

Quanto a excreção da 20E, a predição demonstrou que a molécula não é uma inibidora do transportador de captação renal 2 e que possui boa biodisponibilidade, já que apresentou baixa depuração renal. O composto não foi indicado como um agente mutagênico (AMES), sem desencadear hepatotoxicidade ou sensibilização da pele. A análise apontou ainda que a molécula é inibidora do transportador herg II, porém não do herg I (herg = canais de íons potássio) e possivelmente apresentaria toxicidade para o protozoário de vida livre *Tetrahymena pyriformis*, mas com baixa toxicidade para peixes flathead e para ratos, tendo sido indicado inclusive que a toxicidade em ratos ocorreria em concentrações muito elevadas de 20E (3,706 mol/kg = 1.781,21g/kg). Esses resultados corroboram com a literatura, uma vez que outros estudos também demonstraram que a *P. glomerata* não desencadeia efeitos tóxicos (ALMEIDA; DÜSMAN; MATTGE; TOLEDO *et al.*, 2017; RATES; GOSMANN, 2002).

**Tabela 7 - Avaliação da farmacocinética in sílico para o composto 20-hidroxiecdisona**

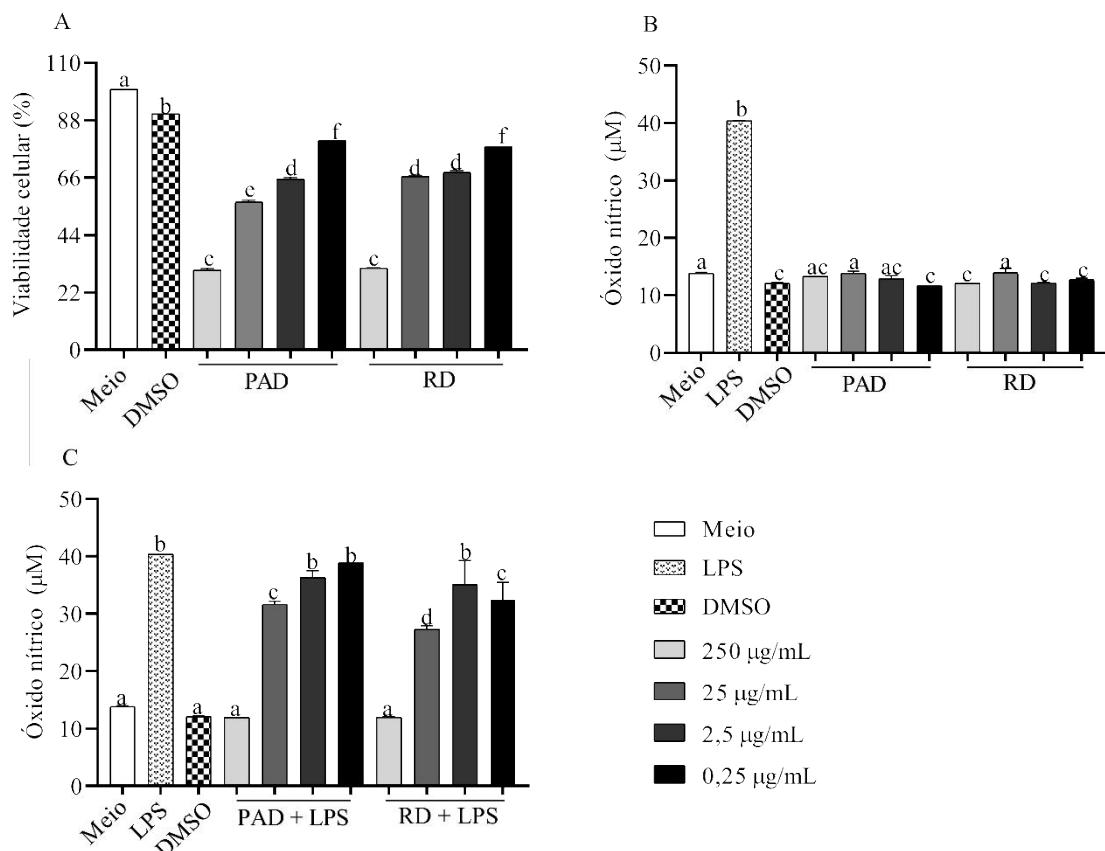
<b>Propriedade</b>	<b>Nome do teste</b>	<b>Predição</b>	<b>Unidade*</b>
Absorção	Solubilidade em água	-3,43	Numérico (log mol/L)
Absorção	Permeabilidade em células Caco2	0,62	Numérico (log Papp em $10^{-6}$ cm/s)
Absorção	Absorção intestinal (humano)	56,523	Numérico (%) Absorção)
Absorção	Permeabilidade pela pele	-2,738	Numérico (log Kp)
Absorção	Substrato da glicoproteína P	Sim	Categórico (Sim/Não)
Absorção	Inibidor da glicoproteína P I	Não	Categórico (Sim/Não)
Absorção	Inibidor da glicoproteína P II	Não	Categórico (Sim/Não)
Distribuição	VDss (humano)	0,35	Numérico (log L/kg)
Distribuição	Fração não ligada ( <i>Homo sapiens</i> )	0,241	Numérico (Fu)
Distribuição	Permeabilidade em BBB	-1,047	Numérico (log BB)
Distribuição	Permeabilidade em SNC	-3,735	Numérico (log PS)
Metabolismo	Substrato do Citocromo P450 (2D6)	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Substrato do Citocromo P450 (3A4)	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor do Citocromo P450 (1A2)	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor do Citocromo P450 (2C19)	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor do CYP2C9	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor do CYP2D6	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor do CYP3A4	Não	Categórico (Sim/Não)
Excreção	Depuração total	0,576	Numérico (log ml/min/kg)
Excreção	Substrato OCT2 renal	Não	Categórico (Sim/Não)
Toxicidade	Toxicidade AMES	Não	Categórico (Sim/Não)
Toxicidade	Dose máxima tolerada ( <i>Homo sapiens</i> )	-0,214	Numérico (log mg/kg/dia)
Toxicidade	Inibidor de hERG I	Não	Categórico (Sim/Não)
Toxicidade	Inibidor de hERG II	Sim	Categórico (Sim/Não)
Toxicidade	Toxicidade aguda em ratos (LD50)	3,706	Numérico (mol/kg)
Toxicidade	Toxicidade crônica em ratos (LOAEL)	2,544	Numérico (log mg/kg/dia)
Toxicidade	Hepatotoxicidade	Não	Categórico (Sim/Não)
Toxicidade	Sensibilização da pele	Não	Categórico (Sim/Não)
Toxicidade	Toxicidade para <i>Tetrahymena pyriformis</i>	0,285	Numérico (log ug/L)
Toxicidade	Toxicidade em peixes flathead	4,823	Numérico (log mM)

Nota: Unidades adotadas e fornecidas pelo sistema pKcsim (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcs/m/prediction>).

#### **4.8 Efeitos das frações PAD e RD em ensaios de hemólise, citotoxicidade, produção de EROS e de NO em cultura de células**

As figuras 18, 19 e 20 apresentam os resultados obtidos nos métodos de citotoxicidade e produção de óxido nítrico, produção de espécies reativas de oxigênio e de hemólise, respectivamente. Os resultados indicam que as frações PAD e RD na concentração de 250 µg/mL foram citotóxicas para macrófagos murinos, apresentando valores próximos a 30% de viabilidade celular. Por outro lado, a concentração de 25 µg/mL, de ambas as frações, apresentou médio efeito tóxico (>50% de viabilidade celular) e nas concentrações de 2,5 e 0,25 µg/mL os efeitos citotóxicos foram reduzidos (>65% de viabilidade celular). Ainda nesta mesma linhagem celular, as frações não estimularam a produção de NO em nenhuma concentração, porém as frações PAD e RD foram capazes de reduzir a produção deste gás em células desafiadas com LPS bacteriano (lipopolissacarídeo) quando testadas nas concentrações de 250 e 25 µg/mL. Além disso, a fração RD também reduziu a produção de NO em células desafiadas pelo LPS, na concentração de 250 µg/mL.

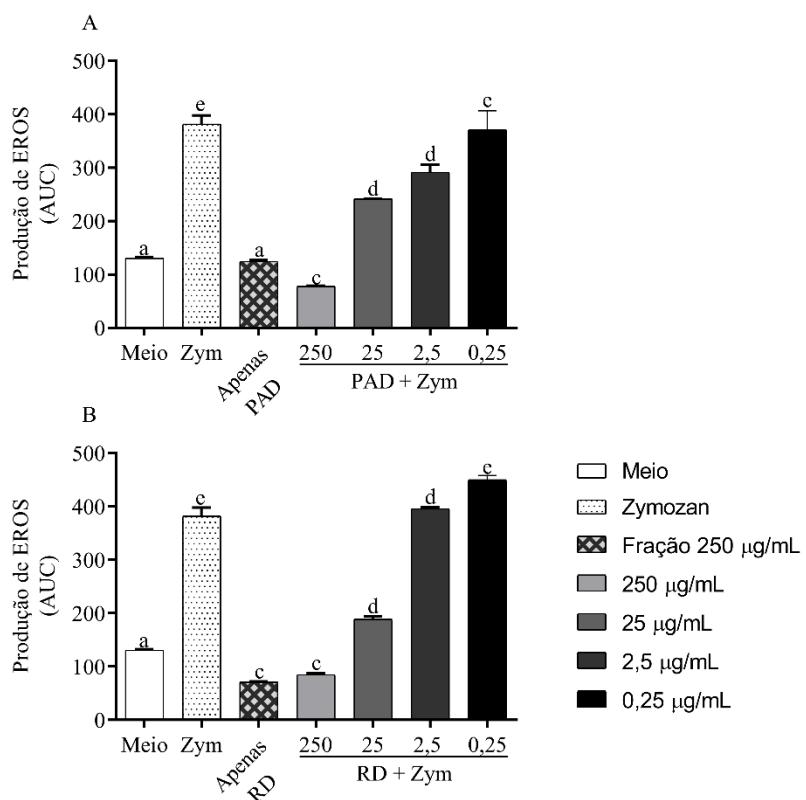
**Figura 18** - Avaliação da viabilidade celular e da produção de NO por macrófagos tratados com as frações PAD e RD



Nota: Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de óxido nítrico (NO) (B e C) por macrófagos desafiados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) utilizando amostras de 250 (A), 25 (B), 2,5 (C) e 0,25 (D) µg/mL das frações PAD (fração de diclorometano do extrato metanólico da parte aérea) e RD (fração de diclorometano do extrato metanólico das raízes), ambas diluídas em DMSO (0,001%). Os valores foram expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

Em relação a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), as frações PAD e RD foram capazes de reduzir a produção desses radicais em macrófagos murinos desafiados com Zymozan, quando testadas nas concentrações de 250 e 25 µg/mL. As frações não apresentaram efeitos oxidativos quando testadas em células de macrófagos não desafiados com Zymozan.

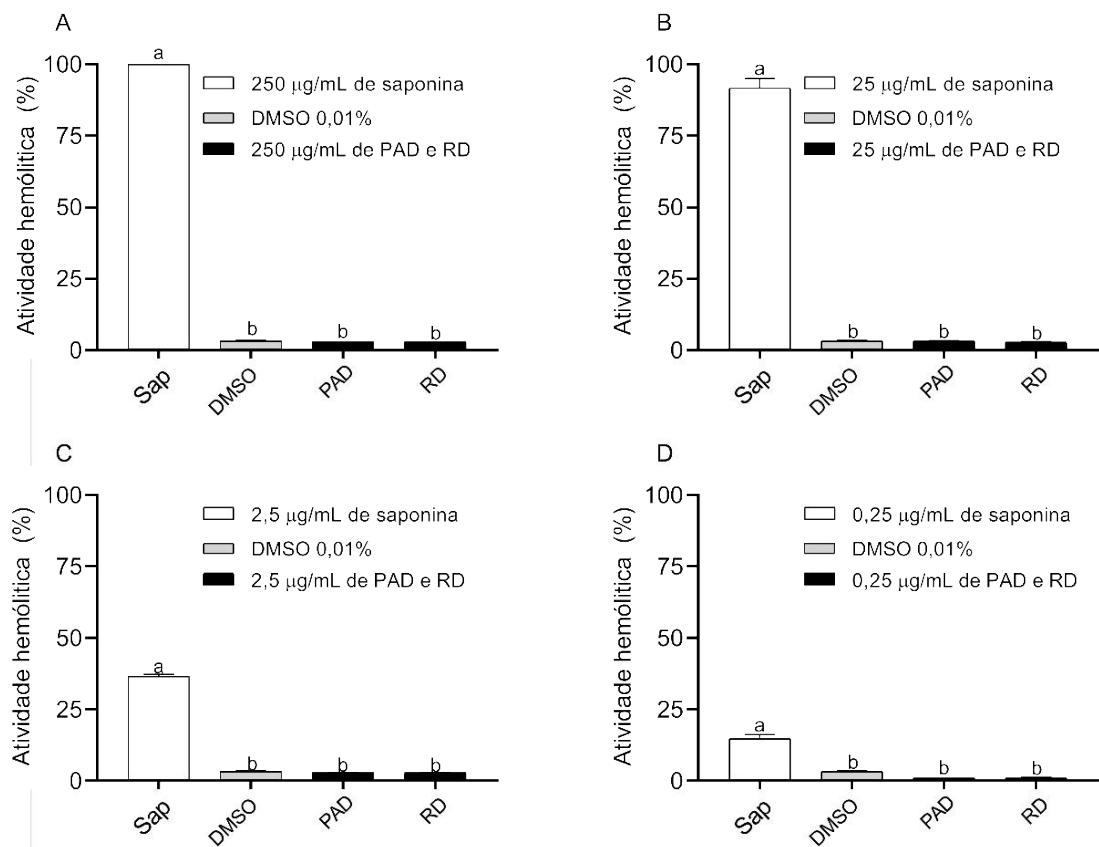
**Figura 19** – Avaliação da produção de EROS por macrófagos tratados com as frações PAD e RD



Nota: Avaliação da inibição da produção de EROS por macrófagos desafiados com zymozan (Zym) utilizando amostras de 250 (A), 25 (B), 2,5 (C) e 0,25 (D)  $\mu\text{g/mL}$  das frações PAD (fração de diclorometano do extrato metanólico da parte aérea) (A) e RD (fração de diclorometano do extrato metanólico das raízes) (B), ambas diluídas em DMSO (0,001%). Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa para  $P \leq 0,05$ .

As frações PAD e RD não desencadearam efeitos hemolíticos quando testadas em hemácias murinas, em nenhuma das concentrações utilizadas (250, 25, 2,5 e 0,25  $\mu\text{g/mL}$ ). Por outro lado, a saponina (controle positivo) apresentou efeitos hemolíticos consideráveis quando testada nas concentrações de 250 e 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $>90\%$  de hemólise), mas baixa capacidade hemolítica quando administrada nas concentrações de 2,5 e 0,25  $\mu\text{g/mL}$  ( $<45\%$  de hemólise).

**Figura 200 – Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos tratados com as frações PAD e RD**



Nota: da atividade hemolítica utilizando 250 (A), 25 (B), 2,5 (C) e 0,25 (D) µg/mL das frações PAD (fração de diclorometano do extrato metanólico da parte aérea), RD (fração de diclorometano do extrato metanólico das raízes) e do controle saponina, todas diluídas em etanol (0,05%). Os valores foram expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa para  $P \leq 0,05$ .

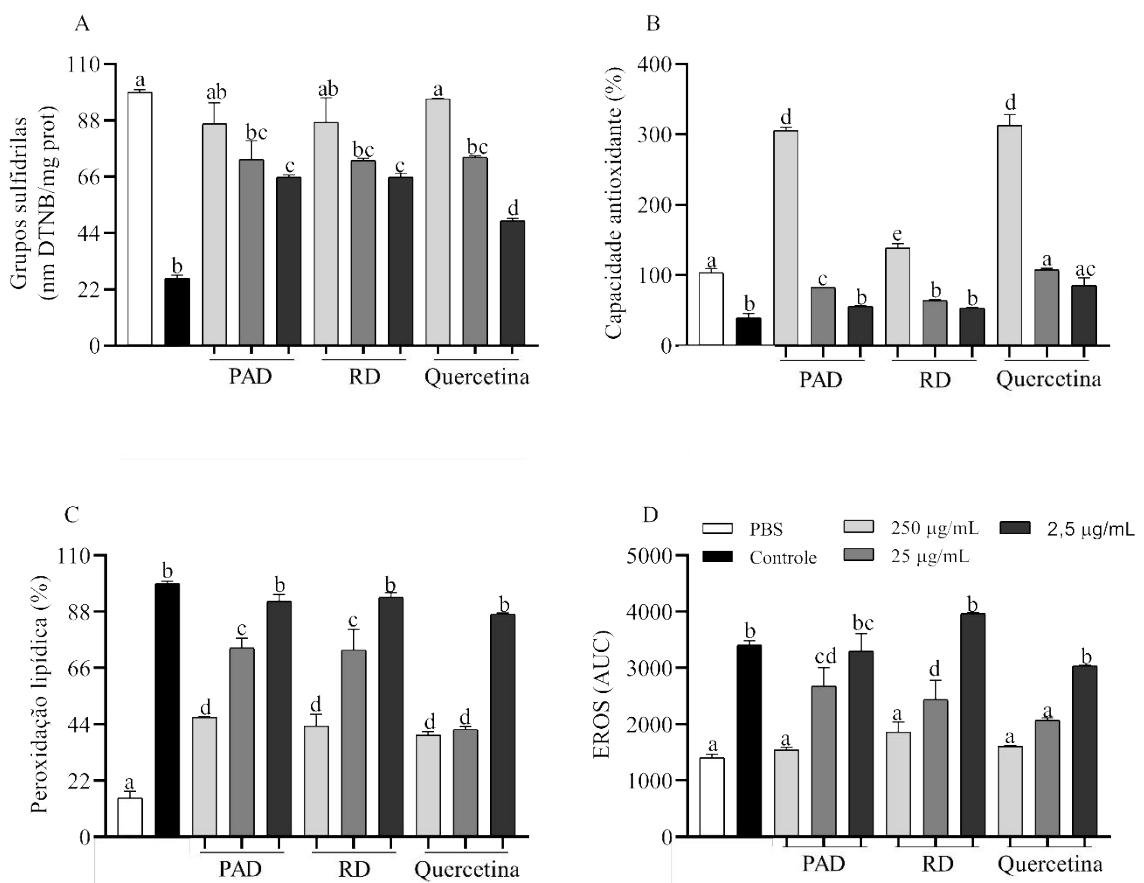
Assim, os resultados obtidos nas análises hemolíticas indicaram que as frações PAD e RD não afetaram as células testadas, contudo, nas análises com macrófagos, foi identificada citotoxicidade na dose elevada de 250 µg/mL.

#### 4.9 Efeitos contra oxidações induzidas *ex vivo*

As amostras PAD e RD apresentaram os melhores resultados nos métodos testados e por isso suas propriedades antioxidantes foram também avaliadas em tecido nervoso de camundongo submetido ao protocolo *ex vivo* de estresse induzido por Fe<sup>2+</sup>-ascorbato. As frações PAD, RD e o controle quercetina foram capazes de inibir a peroxidação lipídica ( $46,7 \pm 0,1$ ;  $43,3 \pm 2,7$  e  $39,8 \pm 0,7$ , respectivamente) e a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) ( $1.545 \pm 35$ ;  $1.860 \pm 130$  e  $1.605$

$\pm 15$ , respectivamente), além de terem mantido altas concentrações de grupos sulfidrilas no tecido na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  ( $86,6 \pm 4,7$ ;  $87,3 \pm 5,4$  e  $96,3 \pm 0,1$  nm DTNB/mg prot), sem diferença significativa entre si. Por outro lado, a amostra PAD foi a única amostra que na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  foi capaz de apresentar resultado sem diferença significativa com o controle quercetina no ensaio de capacidade antioxidante total ( $305,4 \pm 2,7$  e  $312,9 \pm 8,6$   $\mu\text{M trolox eq/g}$ , respectivamente) (Figura 21).

**Figura 211 – Avaliação da atividade antioxidante das frações PAD e RD em tecido nervoso em modelo *ex vivo***



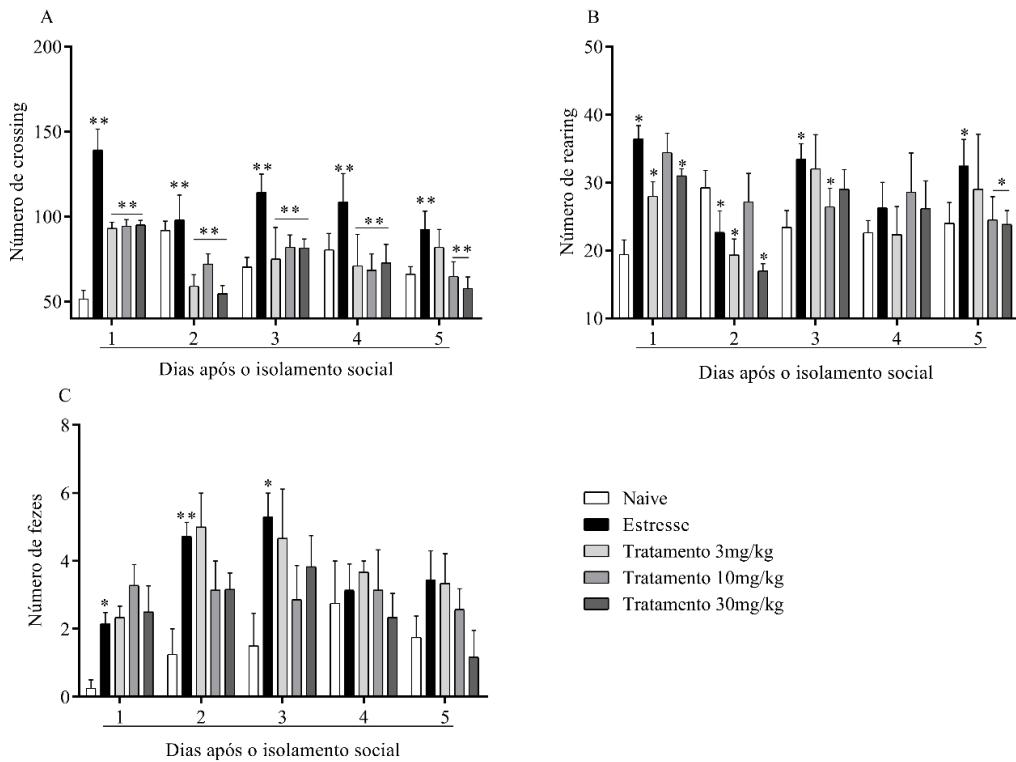
Nota: Avaliação da concentração total de grupos tióis (A), capacidade antioxidante (B), nível de peroxidação lipídica (C) e concentração de espécies reativas de oxigênio (EROS) em tecido nervoso de rato com oxidações induzidas por  $\text{Fe}^{2+}$ -ascorbato. PBS (não oxidado), controle (oxidado) e tecido nervoso oxidado tratado com as frações PAD (fração de diclorometano do extrato metanólico da parte aérea) e RD (fração de diclorometano do extrato metanólico das raízes) de *P. glomerata* nas concentrações de 250, 25 e 2,5  $\mu\text{g/mL}$ . Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos por one-way ANOVA seguido pelo teste Tukey para  $P \leq 0,05$ .

#### **4.10 Efeito da fração RD nas alterações comportamentais relacionadas à ansiedade, estresse e depressão**

No teste do campo aberto, a exposição ao estresse agudo induziu um aumento na função motora (*crossing* e *reading*) dos camundongos nos dias 1 e 3, porém esse aumento foi controlado pelo tratamento com RD a 3, 10 e 30 mg / kg (Fig. 22 A, B). Embora o estresse agudo não tenha aumentado significativamente esses parâmetros nos outros dias, a diminuição da atividade de *crossing* foi observada nos dias 2 e 5 para os animais que receberam 30 mg / kg de RD.

Neste método, a RD reduziu com sucesso a atividade locomotora no grupo de estresse a partir do dia 2 e a manteve baixa até o dia 5. Conforme mostrado na Fig. 11C, o número de fezes aumentou nos dias 1 a 3 após a exposição ao estresse agudo no experimento de campo aberto; no entanto, o tratamento com o RD a 10 ou 30 mg / kg diminuiu o número de fezes no dia 4. Nenhuma diferença significativa foi observada em relação à exploração da periferia e do centro (dados não mostrados).

**Figura 222 – Efeitos da fração RD sobre a função motora, número de Reading e número de fezes em diferentes dias de isolamento social**

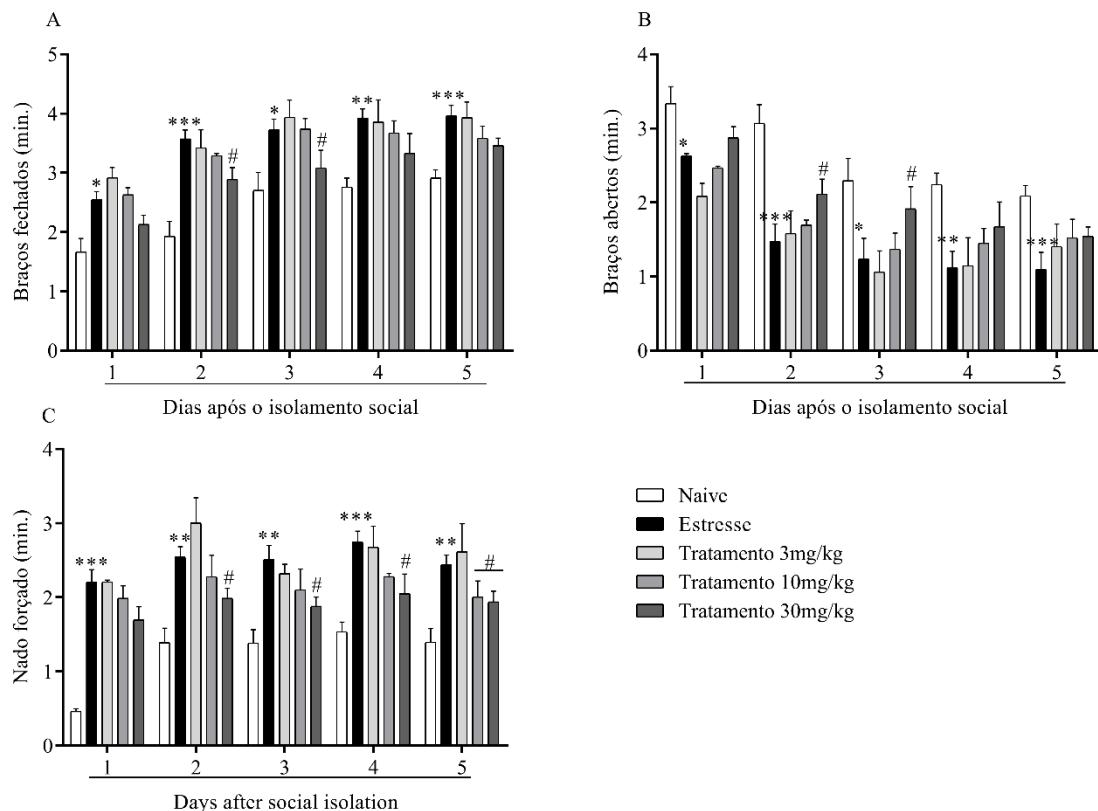


Nota: Número de crossings (A), número de rearing (B), e número de fezes (C) em diferentes dias após o isolamento social. Os resultados se referem a camundongos não estressados tratados com água (Naive), estressados tratados com água (Estresse) e estressados tratados com doses de 3, 10, and 30 mg/kg de RD uma vez ao dia (Tratamento).  $###P \leq 0,001$  e  $\#P \leq 0,05$  indicam diferença significativa entre os grupos Naive e estresse, por outro lado,  $***P \leq 0,001$ ,  $**P \leq 0,01$ , e  $*P \leq 0,05$  indicam diferença significativa entre os grupos estresse e tratamento por two-way ANOVA seguido pelo teste Bonferroni. Usou-se One-way ANOVA seguido pelo teste Dunnet para comparar os grupos diariamente.

A exposição ao estresse agudo causou um aumento gradual no tempo gasto pelos animais nos braços fechados do labirinto (Fig. 22 A). Em animais expostos a estresse agudo e tratados com a fração RD a 30 mg / kg, a permanência nos braços fechados tornou-se significativamente mais curta no dia 2 e permaneceu consideravelmente reduzida depois disso. Da mesma forma, enquanto a exposição ao estresse agudo provocou uma diminuição gradual no tempo gasto nos braços abertos do labirinto (Fig. 22 B), a administração de 30 mg / kg da fração RD reverteu esse efeito nos dias 2 e 3. Além disso, 10 mg / kg da fração RD foi suficiente para reduzir significativamente o tempo de imobilidade após o dia 2 em animais expostos

ao estresse agudo; a mesma tendência foi observada com 30 mg / kg da fração RD (Fig. 22 C).

**Figura 233 – Efeitos protetivos da fração RD sobre o comportamento tipo depressivo e seus efeitos ansiolíticos em camundongos expostos ao isolamento social**



Nota: Os resultados se referem a camundongos não estressados tratados com água (Naive), estressados tratados com água (Estresse) e estressados tratados com doses de 3, 10, and 30 mg/kg de RD uma vez ao dia (Tratamento).  $###P \leq 0,001$  e  $\#P \leq 0,05$  indicam diferença significativa entre os grupos Naive e estresse, por outro lado,  $***P \leq 0,001$ ,  $**P \leq 0,01$ , e  $* P \leq 0,05$  indicam diferença significativa entre os grupos estresse e tratamento por two-way ANOVA seguido pelo teste Bonferroni. Usou-se One-way ANOVA seguido pelo teste Dunnet para comparar os grupos diariamente.

Em seguida, foi realizado o teste de rotação para avaliar o efeito sedativo. A Tabela 8 não revela diferença no tempo de latência da primeira queda dos animais após o tratamento com 30 mg / kg da fração RD ou com solução salina. Além disso, o tempo de latência foi significativamente maior do que o encontrado para o grupo tratado com diazepam, composto utilizado como controle positivo.

**Tabela 8** - Tempo de latência para a primeira queda no teste de rotarod para camundongos tratados com solução salina, 10 mg / kg de diazepam ou 30 mg / kg da fração RD

Grupos	Tempo de latência (min)
<i>Naive</i>	120 ± 6
Diazepam 10 mg/kg	42 ± 2
Fração RD 30 mg/kg	120 ± 2

\* P <0,05 indica diferença significativa entre o Diazepam grupo e o grupo tratado com 30 mg / kg da fração RD utilizando One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

O tratamento com o RD a 30 mg / kg reduziu o número de eventos de cruzamento no experimento de campo aberto, indicando uma diminuição no comportamento de estresse, e promoveu uma redução significativa do tempo de imobilidade no experimento de natação forçada, indicando uma redução no comportamento depressivo comportamentos semelhantes e um papel protetor do RD (BUTTERWECK; JÜRGENLIEMK; NAHRSTEDT; WINTERHOFF, 2000). O aumento do tempo gasto na periferia da caixa no experimento de campo aberto ou nos braços abertos no experimento do labirinto em cruz sugere um efeito protetor para o desenvolvimento da ansiedade (DA SILVA OLIVEIRA; CAVALCANTI; SANTOS-MAGALHÃES; ROLIM *et al.*, 2014).

Nossos resultados diferem daqueles obtidos por De-Paris; Neves; Salgueiro; Quevedo et al. (2000), em que os autores indicaram que o extrato hidroetanólico bruto das raízes de *P. glomerata* não reduziu o estresse, a ansiedade e o comportamento depressivo. Esses resultados opostos podem ser explicados pelo uso de uma fração enriquecida de 20E, que continha uma quantidade maior desse composto, sugerindo assim a necessidade de uma concentração mínima de 20E para desencadear um evento dose-resposta.

O tratamento oral com RD diminuiu a atividade locomotora, promovendo um efeito protetor contra o estresse. Também encurtou o tempo gasto no centro do campo e diminuiu o número de fezes, indicando efeitos ansiolíticos. O 20E pode atuar como um modulador alostérico positivo do receptor GABA<sub>A</sub>, estimulando a inibição GABAérgica nos neurônios corticais de ratos, o que pode desencadear um efeito ansiolítico (TSUJIYAMA; UJIHARA; ISHIHARA; SASA, 1995). Os resultados obtidos no estudo de De-Paris; Neves; Salgueiro; Quevedo et al. (2000) mostraram que os

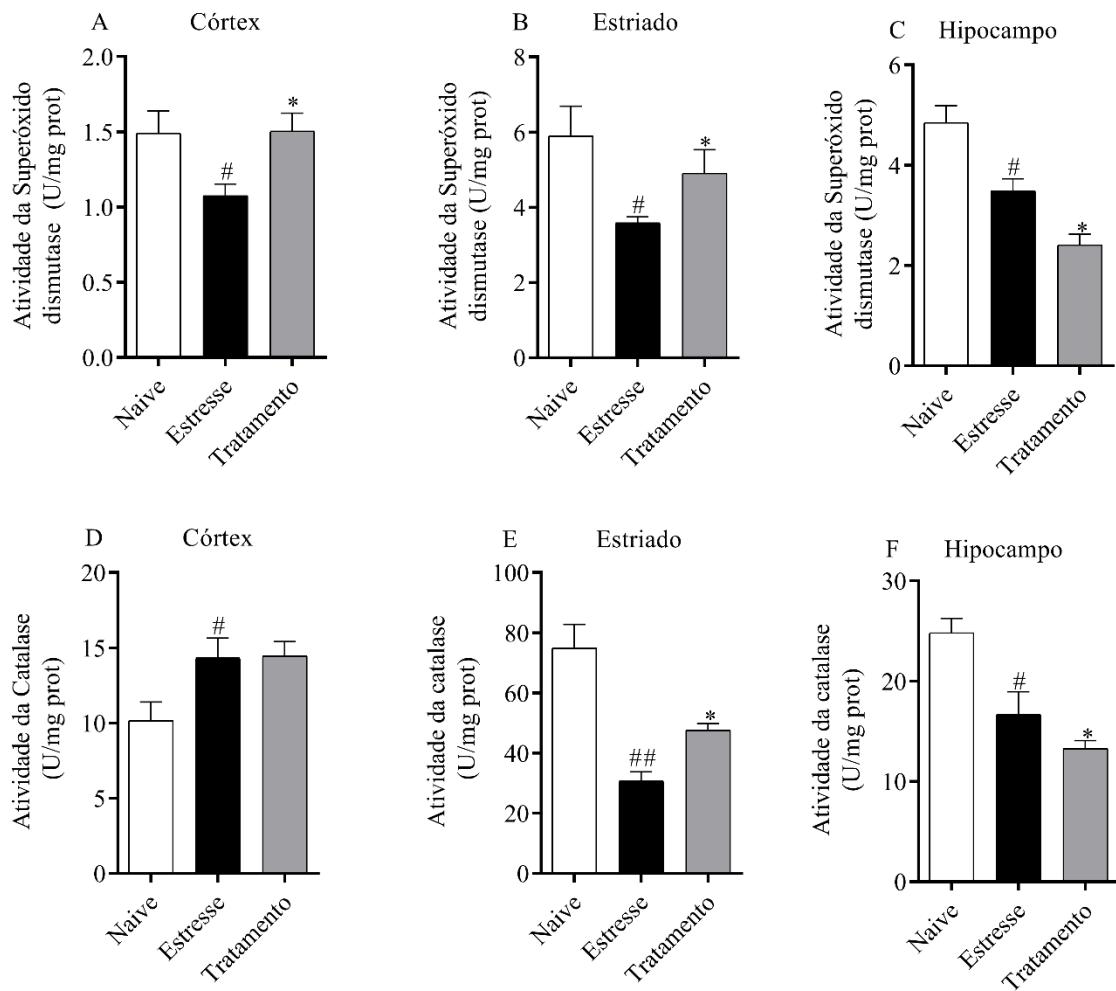
animais tratados com o extrato bruto de *P. glomerata* foram parcialmente protegidos das convulsões, possivelmente indicando efeitos mais específicos no sistema GABA. GABA é o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central de mamíferos (WATANABE; MAEMURA; KANBARA; TAMAYAMA *et al.*, 2002); gera efeitos relaxantes, ansiolíticos e anticonvulsivantes por meio da ativação do receptor GABAA (FOSTER; KEMP, 2006).

#### **4.11 Aumento das defesas antioxidantes pela RD**

Na avaliação do estresse oxidativo, este estudo se concentrou no córtex frontal, hipocampo e corpo estriado devido à sua importância na manutenção da atuação cerebral normal (MORRONE; SCHNORR; BEHR; GASPAROTTO *et al.*, 2016). Durante a adaptação comportamental, o córtex frontal é responsável pela tomada de decisões (RUSHWORTH; NOONAN; BOORMAN; WALTON *et al.*, 2011); enquanto o estriado controla a cognição, o aprendizado e o comportamento motivado (MACPHERSON; HIKIDA, 2019). O hipocampo permite a aquisição de novas memórias vinculadas a eventos ou lugares (CHENG; FRANK, 2008). Vários estudos mostraram que essas regiões são responsáveis pela ansiedade (PANDYA, 2009), depressão (PANDYA; ALTINAY; MALONE; ANAND, 2012) e comportamentos de estresse (MORRONE; SCHNORR; BEHR; GASPAROTTO *et al.*, 2016) em diferentes situações, e são fortemente afetadas ou mesmo desencadeado por estresse oxidativo (FLOYD; HENSLEY, 2002; SALIM, 2014).

Conforme mostrado na Fig. 24 A, B e C, a atividade da enzima SOD foi diminuída no córtex, estriado e hipocampo de animais estressados em comparação com camundongos *Naive*. O tratamento com a fração RD evitou essa redução no córtex e no estriado, mas não no hipocampo. O padrão de atividade da enzima CAT foi mais complexo, pois mostrou uma clara queda no estriado e no hipocampo, mas um aumento no córtex, de animais estressados em comparação com camundongos do grupo *Naive* (Fig. 24 D, E e F). O tratamento com a fração RD foi capaz de restaurar parcialmente a atividade da CAT no estriado, mas nenhum efeito foi observado no córtex ou no hipocampo.

**Figura 244** - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em regiões do encéfalo de camundongos

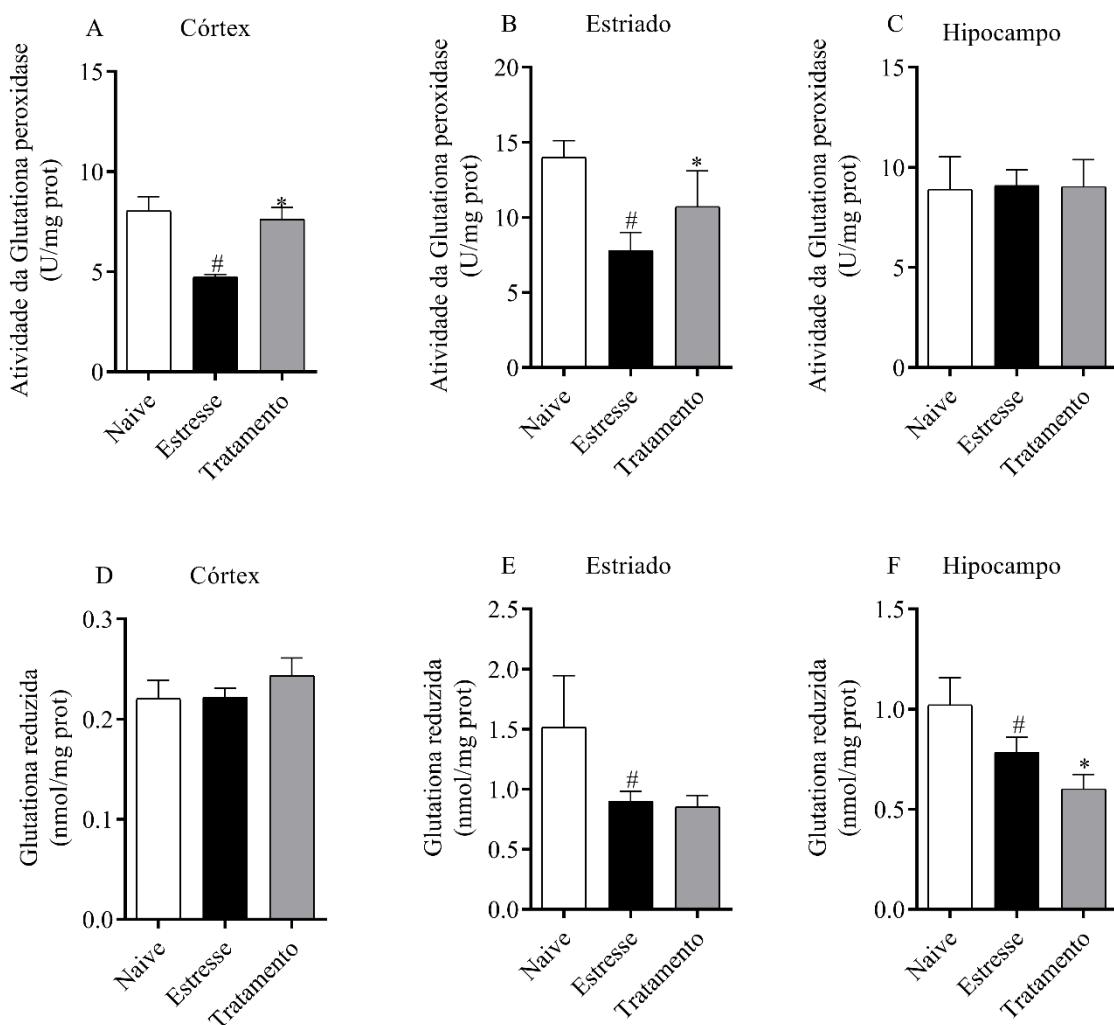


Nota: Côrte (A e D), estriado (B e E) e hipocampo (C e F). Grupos: Não estressado tratado com salina (Naive), estressado tratado com salina (Estresse) e estressado tratado com 30mg/kg da fração RD (fração de diclorometano do extrato metanólico das raízes) (tratamento). ##P ≤ 0,01 e #P ≤ 0,05 indicam diferença significativa entre os grupos Naive e estresse. \*P ≤ 0,05 indica diferença significativa entre os grupos estresse e tratamento por one-way ANOVA seguido pelo teste Dunnet.

Conforme mostrado na figura 25 A, B e C, observamos uma diminuição na atividade da GPx no córte e estriado de animais estressados em comparação com camundongos Naive, mas nenhuma diferença foi observada no hipocampo de nenhum grupo. Por outro lado, o tratamento com a fração RD foi capaz de prevenir a redução da atividade da GPx no córte e estriado. A concentração de GSH diminuiu no estriado e no hipocampo de camundongos estressados em comparação aos

camundongos *Naive*, enquanto nenhuma diferença foi observada no córtex (Figura 25 D, E e F). Em contraste com o GPx, o tratamento com a fração RD não evitou essa diminuição.

**Figura 255 - Atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx) e concentração de glutationa reduzida (GSH) em regiões do encéfalo de camundongos**

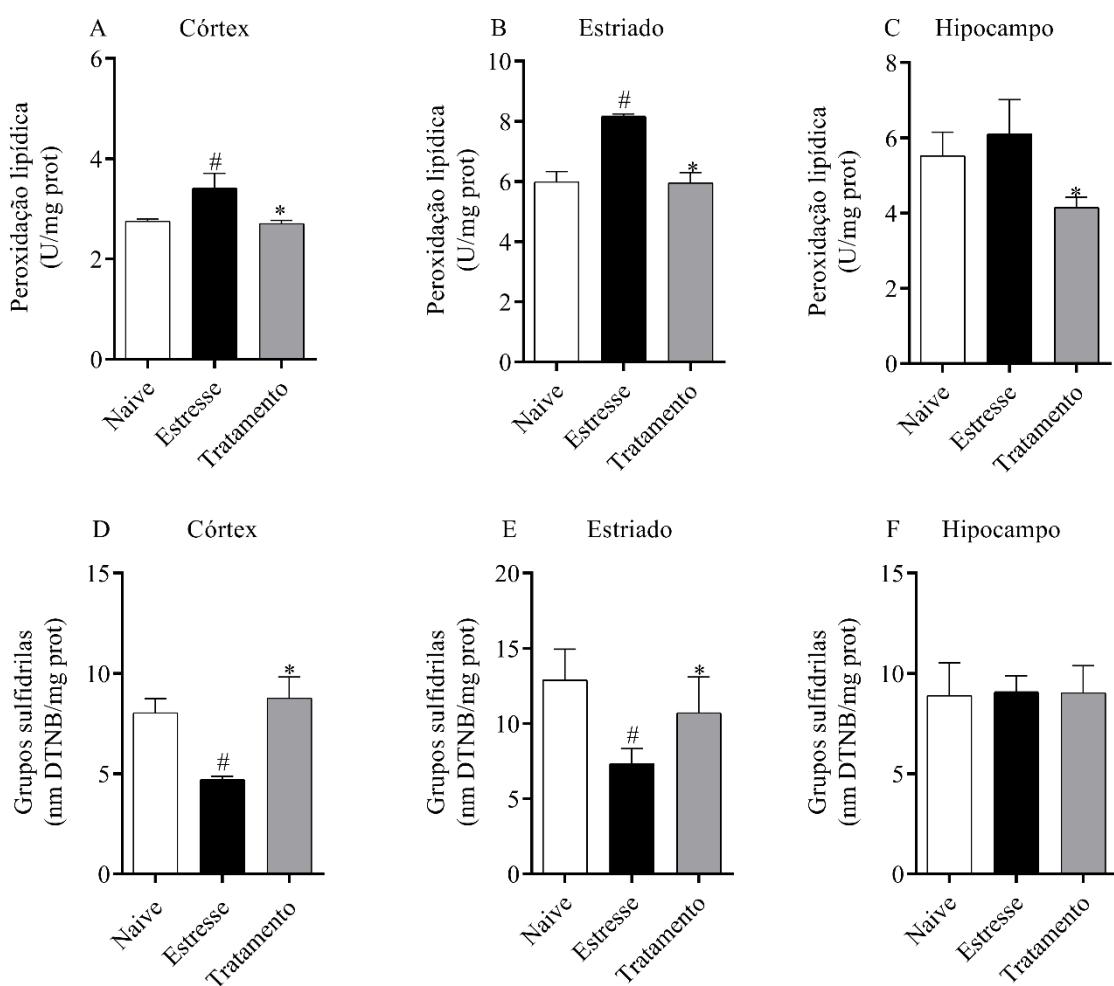


Nota: Córtex (A e D), estriado (B e E) e hipocampo (C e F). Grupos: Não estressado tratado com salina (*Naive*), estressado tratado com salina (Estresse) e estressado tratado com 30mg/kg da fração RD (fração de diclorometano do extrato metanólico das raízes) (tratamento). ##P ≤ 0,01 e #P ≤ 0,05 indicam diferença significativa entre os grupos *Naive* e estresse. \*P ≤ 0,05 indica diferença significativa entre os grupos estresse e tratamento por one-way ANOVA seguido pelo teste Dunnet.

Conforme mostrado na Fig. 26 A, B e C, a peroxidação lipídica aumentou no estriado e no córtex após o estresse agudo, mas nenhuma diferença foi observada no

hipocampo. Já no grupo tratado, a fração RD pode prevenir esse aumento em todas as regiões. A concentração de grupos sulfidrila diminuiu no córtex e estriado de animais estressados em comparação com camundongos *Naive*, mas não no hipocampo (Fig. 26 D, E e F). Aqui, também, o tratamento com a fração RD evitou a redução dos grupos sulfidrilas em todas as regiões do encéfalo.

**Figura 266** - Nível de peroxidação lipídica e concentração total de grupos sulfidrilas em regiões do encéfalo de camundongos

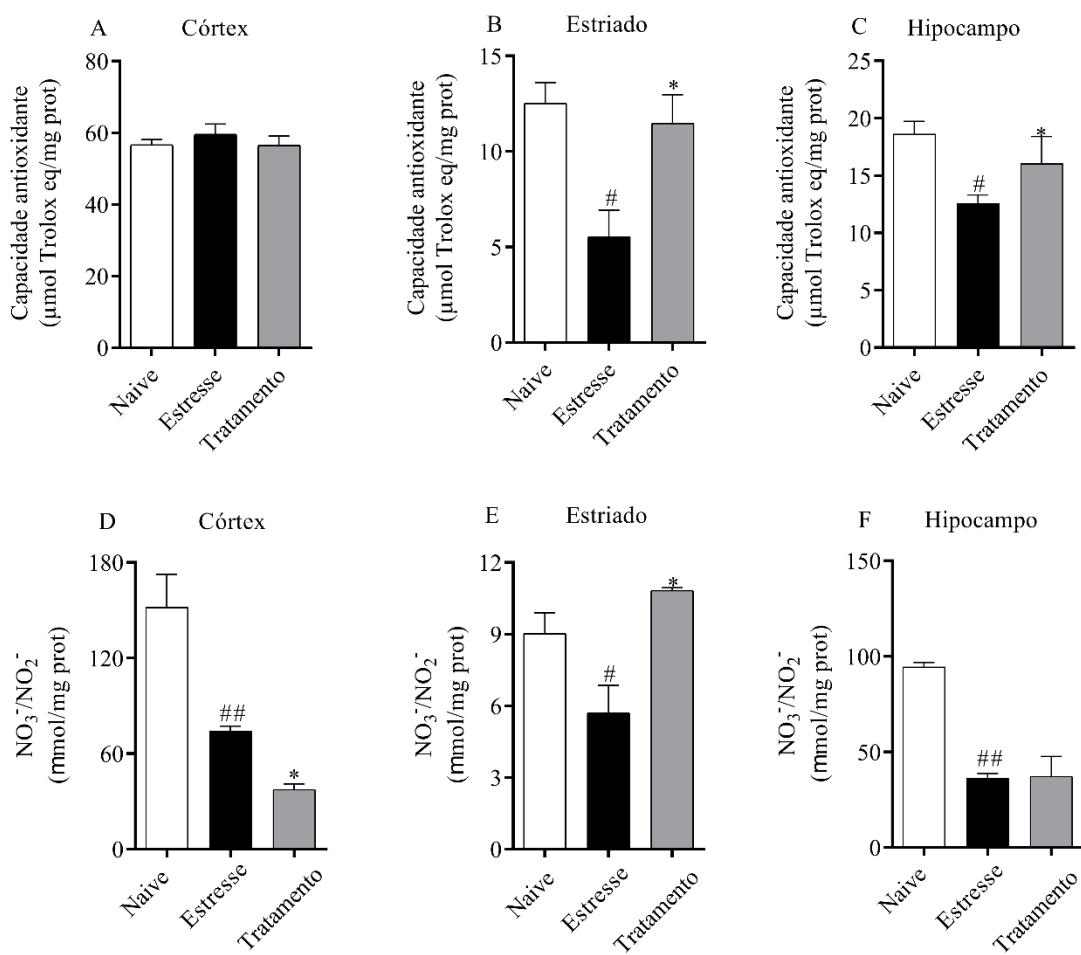


Nota: Cortex (A e D), estriado (B e E) e hipocampo (C e F). Grupos: Não estressado tratado com salina (*Naive*), estressado tratado com salina (Estresse) e estressado tratado com 30mg/kg da fração RD (fração de diclorometano do extrato metanólico das raízes). ##P ≤ 0,01 e #P ≤ 0,05 indicam diferença significativa entre os grupos *Naive* e estresse. \*P ≤ 0,05 indica diferença significativa entre os grupos estresse e tratamento por one-way ANOVA seguido pelo teste Dunnet.

Conforme mostrado na figura 27 A, B e C, observamos uma diminuição no potencial antioxidante do estriado e do hipocampo, mas não no córtex de animais estressados.

Esta diminuição foi evitada pelo tratamento com a fração RD em todas as regiões do encéfalo. A concentração de  $\text{NO}^{3-}$  /  $\text{NO}^{2-}$  diminuiu no córtex, estriado e hipocampo de animais estressados em comparação com camundongos *Naive* (Figura 27 D, E e F). Nesse caso, o tratamento com a fração RD evitou o aumento no estriado, mas não no córtex ou no hipocampo.

**Figura 277 - Capacidade antioxidant e concentração total de nitrato/nitrito (NOx) em regiões do encéfalo de camundongos**



Nota: Córtez (A e D), estriado (B e E) e hipocampo (C e F). Grupos: Não estressado tratado com salina (Naive), estressado tratado com salina (Estresse) e estressado tratado com 30mg/kg da fração RD (fração de diclorometano do extrato metanólico das raízes). ##P ≤ 0,01 e #P ≤ 0,05 indicam diferença significativa entre os grupos Naive e estresse. \*P ≤ 0,05 indica diferença significativa entre os grupos estresse e tratamento por one-way ANOVA seguido pelo teste Dunnet.

Outros estudos também demonstraram o potencial neuroprotetor das raízes de *P. glomerata*. Por exemplo, Marques; Galvão; Espínola; Dias et al. (2004) relataram

que o extrato etanólico reverteu parcialmente a memória induzida pela idade e os déficits de aprendizagem em camundongos. Posteriormente, Wang; Wang; Feng; Wang et al. (2014) descreveram como o 20E evitou a apoptose de neurônios e astrócitos e desempenhou um papel fundamental na melhoria do comprometimento cognitivo em um modelo de gerbil com isquemia cerebral, proporcionando assim novas perspectivas para combater o acidente vascular cerebral isquêmico. Ao mesmo tempo, Xia; Zhang; Liu; Wang et al. (2014) indicou que o 20E teve um papel protetor no combate aos déficits de memória em ratos diabéticos, possivelmente aumentando a capacidade antioxidante do cérebro. Esses achados apoiam a tendência consistente entre os efeitos comportamentais e benefícios de *P. glomerata* ou 20E em biomarcadores de estresse oxidativo.

Especificamente, o tratamento com o RD promoveu um aumento nas defesas antioxidantes em comparação com os animais do grupo estressado. Anteriormente, Hu; Luo; Chu; Shan et al. (2012) mostraram os efeitos do 20E contra a lesão de isquemia cerebral em camundongos, que inibiu a produção de ROS / RNS e modulou as vias de transdução de sinal induzidas pelo estresse oxidativo. Durante o estresse emocional ou fisiológico, as defesas antioxidantes das células podem mudar dependendo da intensidade do estímulo (MUMTAZ; KHAN; ZUBAIR; DEHPOUR, 2018). Quando a produção de ROS excede a capacidade antioxidante endógena da célula, ocorre o estresse oxidativo (HALLIWELL, 2007).

Entre as regiões do cérebro analisadas, o córtex e o estriado apresentaram maiores atividades enzimáticas antioxidantes (catalase, SOD e GPx), maior potencial antioxidante (grupos sulfidrila, capacidade antioxidante e GSH) e menores concentrações de marcadores oxidativos (peroxidação lipídica) nos animais tratados. Esse achado indica que o RD realiza atividade adaptogênica em situações de estresse agudo e principalmente no estriado. Os adaptógenos incluem plantas e várias substâncias que aumentam a resistência inespecífica do corpo, protegendo-o de estressores (PANOSSIAN; WIKMAN, 2010). Eles diminuem o estresse, aumentam a resistência física e visam manter ou reduzir distúrbios relacionados à idade, como cansaço e perda de memória e atenção (CARLINI; RODRIGUES; MENDES; NEGRI et al., 2007).

Na cultura celular, as amostras PAD e RD reduziram a produção de EROS e de NO em macrófagos. Entretanto, no estudo *in vivo* realizado aqui, o RD estimulou a

produção de NO no estriado, mas reduziu sua produção em outras regiões do cérebro. Interessantemente, uma das funções do NO nos artrópodes é a de regular a produção de 20E por meio de feedback negativo (DELALIO; DION; BOOTES; SMITH, 2015). Nos humanos e em outros mamíferos, a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS) apresentam mecanismos de funcionamento parecidos com a NOS de artrópodes, sendo talvez o motivo pela qual as frações PAD e RD não estimularam a produção de NO em macrófagos, uma vez que estas células possuem a isoforma iNOS (óxido nítrico induzível) (XUE; YAN; ZHANG; XIONG, 2018). Dias et al. (2019) mostraram que o extrato hidroetanólico das raízes de *P. glomerata* estimulou a produção de NO testicular e Orie; Raees; Aljaber; Mohamed-Ali et al. (2021) demonstraram que a 20E foi capaz de promover uma dilatação de arteríolas dependente de NO.

Por outro lado, o NO está relacionado a diferentes atividades biológicas no corpo e foi identificado como um neurotransmissor retrógrado por ativação glutamatérgica no corpo estriado e em outros centros cerebrais, estimulando o aprendizado e a memória (DŽOLJIĆ; GRABATINIĆ; KOSTIĆ, 2015). Além disso, o aumento crônico desse gás no estriado tem sido associado às doenças de Alzheimer e Parkinson, além de poder reagir com EROS, gerando o íon peroxinitrito, um radical relacionado a diferentes neuropatologias (PICÓN-PAGÈS; GARCIA-BUENDIA; MUÑOZ, 2019). No geral, o NO pode desempenhar um papel importante na estimulação das defesas antioxidantes no estriado (ZLATKOVIĆ; FILIPOVIĆ, 2013).

Dessa maneira, os resultados obtidos são inéditos e mostraram que as frações PAD e RD, obtidas, respectivamente, a partir da parte aérea e das raízes da planta *P. glomerata*, possuem propriedades antioxidantes e anticolinesterásicas relevantes, com destaque para PAD. Além disso, a fração RD foi capaz de reduzir eventos de ansiedade e depressão em animais estressados, gerando ainda proteção contra o estresse oxidativo.

## 5 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que as frações PAD e RD, provenientes da parte aérea e das raízes de *P. glomerata* respectivamente, são fontes naturais promissoras de 20E, uma molécula bioativa adaptogênica com potenciais aplicações clínicas para o

tratamento da depressão, ansiedade e estresse. Este estudo foi o primeiro a relatar os efeitos benéficos das raízes dessa planta contra marcadores de estresse oxidativo no corpo estriado e de ambas as partes da planta como inibidores de acetilcolinesterase, sugerindo que a fração PAD possua potencial biológico comparável a RD. Nossos resultados apresentam evidências comportamentais e bioquímicas que contribuirão para o entendimento dos possíveis mecanismos pelos quais as raízes de *P. glomerata* induzem efeitos neuroprotetores em camundongos. O RD manteve as defesas antioxidantes ativas, reduzindo o dano oxidativo e, por meio desses mecanismos, protege contra mudanças comportamentais em modelos de ansiedade, estresse e depressão. Além disso, os resultados apresentados nesta tese abrem novas perspectivas para que estudos futuros ampliem o entendimento sobre as propriedades neuroprotetoras das partes aéreas e das raízes do ginseng-brasileiro, testando a PAD no mesmo modelo *in vivo*; promovendo o isolamento e possíveis modificações estruturais de 20E e em busca de novos alvos para esse composto.

## REFERÊNCIAS

- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, 302, n. 2-3, p. 141-145, 2001.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01636-6)
- ALMEIDA, I.; DÜSMAN, E.; MATTGE, G.; TOLEDO, F. et al. In vivo antimutagenic activity of the medicinal plants *Pfaffia glomerata* (Brazilian ginseng) and *Ginkgo biloba*. **Genetics and molecular research**, 16, n. 3, 2017.  
<https://doi.org/10.4238/gmr16039785>
- ALZOBAIDI, N.; QUASIMI, H.; EMAD, N. A.; ALHALMI, A. et al. Bioactive compounds and traditional herbal medicine: promising approaches for the treatment of dementia. 11, p. 1, 2021. <https://doi.org/10.2147/DNND.S299589>
- AMBROSIO, G.; WIRTH, D.; JOSEPH, J. F.; MAZZARINO, M. et al. How reliable is dietary supplement labelling?-Experiences from the analysis of ecdysterone supplements. 177, p. 112877, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112877>
- ASCHBACHER, K.; O'DONOVAN, A.; WOLKOWITZ, O. M.; DHABHAR, F. S. et al. Good stress, bad stress and oxidative stress: insights from anticipatory cortisol reactivity. 38, n. 9, p. 1698-1708, 2013.  
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.02.004>

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. J. S. p. j. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. 24, n. 5, p. 547-553, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>

BARDEEN, J. R.; FERGUS, T. A. The interactive effect of cognitive fusion and experiential avoidance on anxiety, depression, stress and posttraumatic stress symptoms. **Journal of Contextual Behavioral Science**, 5, n. 1, p. 1-6, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcbs.2016.02.002>

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, 239, n. 1, p. 70-76, 1996. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

BHAT, S. V.; NAGASAMPAGI, B. A.; SIVAKUMAR, M. Chemistry of natural products. **Springer Science & Business Media**, 2005. 3540406697.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. In: **Free Radical and Antioxidant Protocols**: Springer, 1998. p. 347-352.  
<https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:347>

BROWNLEE, M. J. N. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. 414, n. 6865, p. 813-820, 2001. <https://doi.org/10.1038/414813a>

BRUCE-KELLER, A. J.; GUPTA, S.; KNIGHT, A. G.; BECKETT, T. L. et al. Cognitive impairment in humanized APP $\times$ PS1 mice is linked to A $\beta$ 1-42 and NOX activation. 44, n. 3, p. 317-326, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.07.012>

BRULÉ, G.; MORGAN, R. J. J. o. N.; MANAGEMENT, S. Working with stress: Can we turn distress into eustress. 3, p. 1-3, 2018. <https://doi.org/10.31872/2018/JNSM-100104>

BUTTERFIELD, D. A.; HALLIWELL, B. J. N. R. N. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. 20, n. 3, p. 148-160, 2019.  
<https://doi.org/10.1038/s41583-019-0132-6>

BUTTERWECK, V.; JÜRGENLIEMK, G.; NAHRSTEDT, A.; WINTERHOFF, H. Flavonoids from Hypericum perforatum show antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta medica**, 66, n. 01, p. 3-6, 2000. <https://doi.org/10.1055/s-2000-11119>

BYUN, K.; YOO, Y.; SON, M.; LEE, J. et al. Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases. 177, p. 44-55, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.030>

CALABRÒ, M.; RINALDI, C.; SANTORO, G.; CRISAFULLI, C. J. A. n. The biological pathways of Alzheimer disease: A review. 8, n. 1, p. 86, 2021.  
<https://doi.org/10.3934/Neuroscience.2021005>

CAMPOS, A. C.; ORTEGA, Z.; PALAZUELOS, J.; FOGAÇA, M. V. et al. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, 16, n. 6, p. 1407-1419, 2013. <https://doi.org/10.1017/S1461145712001502>

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 75, n. 3, p. 501-512, 2003.  
[https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(03\)00112-6](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(03)00112-6)

CARLINI, E. A.; RODRIGUES, E.; MENDES, F. R.; NEGRI, G. et al. Da planta medicinal ao medicamento. **Scientific American Society**, 63, n. 6, p. 70-77, 2007.

CARNEIRO, M. I. d. S.; RIBAS FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; RIBAS, C. A. P. M. et al. Estudo comparativo do uso de extrato de Pfaffia glomerata e do laser de baixa potência (Hélio-Neônio) na cicatrização de feridas em ratos. 23, p. 163-167, 2010.  
<https://doi.org/10.1590/S0102-67202010000300007>

CASTILLO, A. R. G.; RECONDO, R.; ASBAHR, F. R.; MANFRO, G. G. J. B. J. o. P. Transtornos de ansiedade. 22, p. 20-23, 2000. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462000000600006>

CHARLSON, F.; VAN OMMEREN, M.; FLAXMAN, A.; CORNETT, J. et al. New WHO prevalence estimates of mental disorders in conflict settings: a systematic review and meta-analysis. 394, n. 10194, p. 240-248, 2019.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30934-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30934-1)

CHENG, S.; FRANK, L. M. J. N. New experiences enhance coordinated neural activity in the hippocampus. **Neuron**, 57, n. 2, p. 303-313, 2008.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.035>

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; CORTEZ, D. A. G. J. H. B. Sazonalidade na produção de raízes e teor de  $\beta$ -ecdisona em acessos de fávia. 26, p. 393-397, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362008000300020>

CRUZ, A. P. M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotonérgicas. In: in Landeira-Fernandez, J. and Fukushima, S. (org), **Métodos em Neurociência**. São Paulo: Manole., 2012. p. 192-217.

DA SILVA OLIVEIRA, G. Z.; CAVALCANTI, I. M. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; ROLIM, H. M. L. et al. Development and evaluation of liposomal formulation containing nimodipine on anxiolytic activity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 116, p. 64-68, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.10.023>

DAVIES, K. J. J. M. a. o. m. Adaptive homeostasis. 49, p. 1-7, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.04.007>

DE-PARIS, F.; NEVES, G.; SALGUEIRO, J.; QUEVEDO, J. et al. Psychopharmacological screening of Pfaffia glomerata Spreng.(Amaranthaceae) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, 73, n. 1-2, p. 261-269, 2000.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00329-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00329-9)

DE LIMA JÚNIOR, J. P.; FRANCO, R. R.; SARAIVA, A. L.; MORAES, I. B. et al. Anacardium humile St. Hil as a novel source of antioxidant, antiglycation and  $\alpha$ -amylase inhibitors molecules with potential for management of oxidative stress and diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, 268, p. 113667, 2021.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113667>

DE MELO MARTINS, N.; ANDRICH, F.; MARTINS, D. A.; CALAÇA, G. N. et al. Determination of  $\beta$ -ecdysone in infusions of different organs of Brazilian ginseng (Pfaffia glomerata) by high-performance liquid chromatography. 5, n. 7, 2020.  
<https://doi.org/10.21575/25254782rmetg2020vol5n71138>

DELAGARZA, V. W. J. A. F. P. Pharmacologic treatment of Alzheimer's disease: an update. 68, n. 7, p. 1365-1372, 2003.

DELALIO, L. J.; DION, S. M.; BOOTES, A. M.; SMITH, W. A. Direct effects of hypoxia and nitric oxide on ecdysone secretion by insect prothoracic glands. **Journal of insect physiology**, 76, p. 56-66, 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.02.009>

DIAS, F. C. R.; MARTINS, A. L. P.; DE MELO, F. C. S. A.; DO CARMO CUPERTINO, M. et al. Hydroalcoholic extract of Pfaffia glomerata alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes. **Journal of ethnopharmacology**, 233, p. 179-189, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.047>

DINIZ VILELA, D.; GOMES PEIXOTO, L.; TEIXEIRA, R. R.; BELELE BAPTISTA, N. et al. The role of metformin in controlling oxidative stress in muscle of diabetic rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2016, p. 9, 2016.  
<https://doi.org/10.1155/2016/6978625>

DO BRASIL, F. J. J. B. d. R. d. J. D. e. h. f. j. g. b. r. f. F. em construção. 2020.

DOBREK, Ł. The outline of stress pathophysiology and pharmacodynamic action of plant-based eustressors-adaptogens. **Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego**, 46, n. 273, p. 103, 2019.

DU, Y.; DU, Y.; ZHANG, Y.; HUANG, Z. et al. MKP-1 reduces A $\beta$  generation and alleviates cognitive impairments in Alzheimer's disease models. 4, n. 1, p. 1-12, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0091-4>

DUNN, B.; STEIN, P.; CAVAZZONI, P. J. J. i. m. Approval of aducanumab for Alzheimer disease—the FDA's perspective. 2021.  
<https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2021.4607>

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. d. G. J. J. B. d. p. e. m. l. Revisão sobre óxido nítrico. 39, p. 343-350, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442003000400012>

DŽOLJIĆ, E.; GRABATINIĆ, I.; KOSTIĆ, V. Why is nitric oxide important for our brain? **Functional neurology**, 30, n. 3, p. 159, 2015.  
<https://doi.org/10.11138/FNeur/2015.30.3.159>

EVANS, B. C.; NELSON, C. E.; SHANN, S. Y.; BEAVERS, K. R. et al. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 73, 2013. <https://doi.org/10.3791/50166>

FELIPE, D. F.; BRAMBILLA, L. Z.; PORTO, C.; PILAU, E. J. et al. Phytochemical analysis of Pfaffia glomerata inflorescences by LC-ESI-MS/MS. 19, n. 10, p. 15720-15734, 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules191015720>

FENNER, R.; ZIMMER, A. R.; NEVES, G.; KLIEMANN, M. et al. Hypnotic effect of ecdysterone isolated from Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18, n. 2, p. 170-176, 2008.  
<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200005>

FLOYD, R. A.; HENSLEY, K. Oxidative stress in brain aging: implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. **Neurobiology of aging**, 23, n. 5, p. 795-807, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00019-2](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00019-2)

FOSTER, A. C.; KEMP, J. A. Glutamate-and GABA-based CNS therapeutics. **Current opinion in pharmacology**, 6, n. 1, p. 7-17, 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.11.005>

FRANCO, R. R.; ALVES, V. H. M.; ZABISKY, L. F. R.; JUSTINO, A. B. et al. Antidiabetic potential of Bauhinia forficata Link leaves: a non-cytotoxic source of lipase and glycoside hydrolases inhibitors and molecules with antioxidant and antiglycation properties. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 123, p. 109798, 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109798>

FRANCO, R. R.; DA SILVA CARVALHO, D.; DE MOURA, F. B. R.; JUSTINO, A. B. et al. Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus. **JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY**, 215, n. 1, p. 140-146, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.032>

FRANCO, R. R.; ZABISKY, L. F. R.; DE LIMA JÚNIOR, J. P.; ALVES, V. H. M. et al. Antidiabetic effects of Syzygium cumini leaves: a non-hemolytic plant with potential against process of oxidation, glycation, inflammation and digestive enzymes catalysis. **Journal of Ethnopharmacology** p. 113132, 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113132>

GAVIN, R. S.; REISDORFER, E.; DA SILVA GHERARDI-DONATO, E. C.; DOS REIS, L. N. et al. Associação entre depressão, estresse, ansiedade e uso de álcool entre servidores públicos. 11, n. 1, p. 2-9, 2015. <https://doi.org/10.11606/issn.1806-6976.v11i1p2-9>

GBD. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. 2018.

GOH, S.-Y.; COOPER, M. E. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 93, n. 4, p. 1143-1152, 2008.  
<https://doi.org/10.1210/jc.2007-1817>

GRANGER, D. L.; TAINTOR, R. R.; BOOCKVAR, K. S.; HIBBS JR, J. B. J. M. i. e. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. 268, p. 142-151, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)68016-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)68016-1)

GULATI, V.; HARDING, I. H.; PALOMBO, E. A. Enzyme inhibitory and antioxidant activities of traditional medicinal plants: potential application in the management of hyperglycemia. **Bmc complementary and alternative medicine**, 12, n. 1, p. 77, 2012. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-77>

GUO, T.; NOBLE, W.; HANGER, D. P. J. A. n. Roles of tau protein in health and disease. 133, n. 5, p. 665-704, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>

GUTMAN, G. J. R. L. d. P. F. Estresse, ansiedade e depressão; não necessariamente nessa ordem. 13, n. 2, p. 361-367, 2010.  
<https://doi.org/10.1590/S1415-47142010000200016>

HAIDARI, F.; OMIDIAN, K.; RAFIEI, H.; ZAREI, M. et al. Green tea (*Camellia sinensis*) supplementation to diabetic rats improves serum and hepatic oxidative stress markers. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, 12, n. 1, p. 109, 2013.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of epidemiology**, 15, n. 9, p. 686-699, 2005.  
<https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2005.02.004>

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. Biochemical society transactions, 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>

HAMMES, H.-P.; DU, X.; EDELSTEIN, D.; TAGUCHI, T. et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. 9, n. 3, p. 294-299, 2003. <https://doi.org/10.1038/nm834>

HARTMANN, D. Functional roles of APP secretases. In: **Madame Curie Bioscience Database [Internet]: Landes Bioscience**, 2013.

HOSSAIN, M. B.; RAI, D. K.; BRUNTON, N. P.; MARTIN-DIANA, A. B. et al. Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. 58, n. 19, p. 10576-10581, 2010. <https://doi.org/10.1021/jf102042g>

HU, J.; LUO, C. X.; CHU, W. H.; SHAN, Y. A. et al. 20-Hydroxyecdysone protects against oxidative stress-induced neuronal injury by scavenging free radicals and modulating NF-κB and JNK pathways. **PLoS One**, 7, n. 12, p. e50764, 2012.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050764>

HUNYADI, A.; HERKE, I.; LENGYEL, K.; BÁTHORI, M. et al. Ecdysteroid-containing food supplements from Cyanotis arachnoidea on the European market: Evidence for spinach product counterfeiting. **Scientific reports**, 6, p. 37322, 2016.  
<https://doi.org/10.1038/srep37322>

IAREMA, L.; DA CRUZ, A. C. F.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C. et al. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. 110, n. 2, p. 227-238, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0145-6>

JASZCZYK, A.; JUSZCZAK, G. R. J. N.; REVIEWS, B. Glucocorticoids, metabolism and brain activity. 2021.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.007>

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.  
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>

JUSTICE, N. J. J. N. o. s. The relationship between stress and Alzheimer's disease. 8, p. 127-133, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2018.04.002>

JUSTINO, A. B.; BARBOSA, M. F.; NEVES, T. V.; SILVA, H. C. G. et al. Stephalagine, an aporphine alkaloid from Annona crassiflora fruit peel, induces antinociceptive effects by TRPA1 and TRPV1 channels modulation in mice. **Bioorganic Chemistry**, 96, p. 103562, 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103562>

JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; PEIXOTO, L. G.; VILELA, D. D. et al. Hepatoprotective Properties of a Polyphenol-Enriched Fraction from Annona crassiflora Mart. Fruit Peel against Diabetes-Induced Oxidative and Nitrosative Stress. **Journal of agricultural and food chemistry**, 65, n. 22, p. 4428-4438, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01355>

KANG, X.-L.; ZHANG, J.-Y.; WANG, D.; ZHAO, Y.-M. et al. The steroid hormone 20-hydroxyecdysone binds to dopamine receptor to repress lepidopteran insect feeding and promote pupation. 15, n. 8, p. e1008331, 2019.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008331>

KAUR, P.; MAKANJUOLA, V. O.; ARORA, R.; SINGH, B. et al. Immunopotentiating significance of conventionally used plant adaptogens as modulators in biochemical and molecular signalling pathways in cell mediated processes. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 95, p. 1815-1829, 2017.

KIM, H. Y.; KIM, K. Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts in vitro. **Journal of agricultural and food chemistry**, 51, n. 6, p. 1586-1591, 2003. <https://doi.org/10.1021/jf020850t>

KNIGHT, E. L.; GIULIANO, R. J.; SHANK, S. W.; CLARKE, M. M. et al. Parasympathetic and sympathetic nervous systems interactively predict change in cognitive functioning in midlife adults. 57, n. 10, p. e13622, 2020.  
<https://doi.org/10.1111/psyp.13622>

KO, S.-Y.; KO, H.-A.; CHU, K.-H.; SHIEH, T.-M. et al. The possible mechanism of advanced glycation end products (AGEs) for Alzheimer's disease. 10, n. 11, p. e0143345, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143345>

KONG, Y.; WANG, F.; WANG, J.; LIU, C. et al. Pathological mechanisms linking diabetes mellitus and Alzheimer's disease: the receptor for advanced glycation end products (RAGE). 12, p. 217, 2020. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00217>

LARMONIER, N.; GHIRINGHELLI, F.; LARMONIER, C. B.; MOUTET, M. et al. Freshly isolated bone marrow cells induce death of various carcinoma cell lines. 107, n. 5, p. 747-756, 2003. <https://doi.org/10.1002/ijc.11463>

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. : **ACS Publications** 2011.  
<https://doi.org/10.1021/ci200227u>

LAVRYNENKO, O.; NEDIELKOV, R.; MÖLLER, H. M.; SHEVCHENKO, A. J. J. o. I. r. Girard derivatization for LC-MS/MS profiling of endogenous ecdysteroids in Drosophila. 54, n. 8, p. 2265-2272, 2013. <https://doi.org/10.1194/jlr.D035949>

LEE, J. P.; KANG, M.-G.; LEE, J. Y.; OH, J. M. et al. Potent inhibition of acetylcholinesterase by sargachromanol I from Sargassum siliquastrum and by selected natural compounds. 89, p. 103043, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103043>

LEWIS, J. B.; MEJIA, C.; JORDAN, C.; MONSON, T. D. et al. Inhibition of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) protects from secondhand smoke (SHS)-induced intrauterine growth restriction IUGR in mice. **Cell and tissue research**, 370, n. 3, p. 513-521, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2691-z>

LI, J.; JADHAV, A. N.; KHAN, I. A. Triterpenoids from Brazilian ginseng, Pfaffia paniculata. 2010. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1240631>

LIANG, N.; KITTS, D. D. J. M. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. 19, n. 11, p. 19180-19208, 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>

LIU, Y.; LIU, F.; IQBAL, K.; GRUNDKE-IQBAL, I. et al. Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. 582, n. 2, p. 359-364, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.12.035>

LIU, Z.-Q. Chemical methods to evaluate antioxidant ability. Chemical reviews, 110, n. 10, p. 5675-5691, 2010. <https://doi.org/10.1021/cr900302x>

LJUBIĆ, M.; BAKOVIĆ, L.; ČOZA, M.; PRIBISALIĆ, A. et al. Awakening cortisol indicators, advanced glycation end products, stress perception, depression and anxiety in parents of children with chronic conditions. 117, p. 104709, 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104709>

LUTHRA, R.; ROY, A. J. C. P. B. Role of medicinal plants against neurodegenerative diseases. 2021.  
<https://doi.org/10.2174/1389201022666210211123539>

MACPHERSON, T.; HIKIDA, T. Role of basal ganglia neurocircuitry in the pathology of psychiatric disorders. **Psychiatry clinical neurosciences** 73, n. 6, p. 289-301, 2019.

MAES, M.; KUBERA, M.; OBUCHOWICZWA, E.; GOEHLER, L. et al. Depression's multiple comorbidities explained by (neuro) inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. **Neuroendocrinol Letters**, 32, n. 1, p. 7-24, 2011.

MAMADALIEVA, N. Z.; BÖHMDORFER, S.; ZENGİN, G.; BACHER, M. et al. Phytochemical and biological activities of *Silene viridiflora* extractives. Development and validation of a HPTLC method for quantification of 20-hydroxyecdysone. 129, p. 542-548, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.041>

MARCHIORETTTO, M. S.; MIOTTO, S. T. S.; SIQUEIRA, J. C. d. J. H. O gênero *Pfaffia* Mart.(Amaranthaceae) no Brasil. 37, p. 461-511, 2010.  
<https://doi.org/10.1590/S2236-8906201000300004>

MARQUES, L. C. Avaliação da ação adaptógena das raízes de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen-Amaranthaceae. 1998. -, Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

MARQUES, L. C.; GALVÃO, S. M. P.; ESPÍNOLA, E.; DIAS, R. F. et al. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, 18, n. 7, p. 566-572, 2004.  
<https://doi.org/10.1002/ptr.1500>

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 2013.

MARTORELL, M.; LUCAS, X.; ALARCÓN-ZAPATA, P.; CAPÓ, X. et al. Targeting xanthine oxidase by natural products as a therapeutic approach for mental disorders. 27, n. 3, p. 367-382, 2021.  
<https://doi.org/10.2174/1381612826666200621165839>

MATTOS, P. P.; DE SALIS, S., 2004, Características de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen cultivada no Pantanal, sub-região do Paraguai, Corumbá, Mato Grosso do Sul. In: **SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL**, 4.

MAUST, D. T.; BLOW, F. C.; WIECHERS, I. R.; KALES, H. C. et al. National trends in antidepressant, benzodiazepine, and other sedative-hypnotic treatment of older adults in psychiatric and primary care. 78, n. 4, p. 0-0, 2017.  
<https://doi.org/10.4088/JCP.16m10713>

MILLER, V.; LAWRENCE, D.; MONDAL, T.; SEEGAL, R. J. B. r. Reduced glutathione is highly expressed in white matter and neurons in the unperturbed mouse brain-implications for oxidative stress associated with neurodegeneration. 1276, p. 22-30, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.04.029>

MOAWAD, A.; ABUZAID, H.; ARAFA, W. M.; AHMED, O. et al. Anticholinesterase and acaricidal activities of steroids isolated from *Trianthema portulacastrum* L. against *Rhipicephalus annulatus* tick. 10, n. 04, p. 047-055, 2020. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2020.104008>

MORRONE, M. D. S.; SCHNORR, C. E.; BEHR, G. A.; GASPAROTTO, J. et al. Oral administration of curcumin relieves behavioral alterations and oxidative stress in the frontal cortex, hippocampus, and striatum of ovariectomized Wistar rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 32, p. 181-188, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.03.010>

MÜLLER, U. C.; DELLER, T.; KORTE, M. J. N. R. N. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. 18, n. 5, p. 281-298, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>

MUMTAZ, F.; KHAN, M. I.; ZUBAIR, M.; DEHPOUR, A. R. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model-A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 105, p. 1205-1222, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.086>

NABAVI, S. M.; DAGLIA, M.; BRAIDY, N.; NABAVI, S. F. J. N. n. Natural products, micronutrients, and nutraceuticals for the treatment of depression: A short review. 20, n. 3, p. 180-194, 2017. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2015.1103461>

NEJMA, A. B.; NGUIR, A.; JANET, H. B.; DAÏCH, A. et al. New septanoside and 20-hydroxyecdysone septanoside derivative from *Atriplex portulacoides* roots with preliminary biological activities. 25, n. 8, p. 1665-1670, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.03.028>

NESSE, R.; BHATNAGAR, S.; ELLIS, B. J. S. c., cognition, emotion,; BEHAVIOR. Evolutionary origins and functions of the stress response system. p. 95-101, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800951-2.00011-X>

NIKI, E. J. A. o. b.; BIOPHYSICS. Oxidative stress and antioxidants: distress or eustress? 595, p. 19-24, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.017>

O'BRIEN, R. J.; WONG, P. C. J. A. r. o. n. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. 34, p. 185-204, 2011. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>

OJALA, J. O.; SUTINEN, E. M.; SALMINEN, A.; PIRTTILÄ, T. J. J. o. n. Interleukin-18 increases expression of kinases involved in tau phosphorylation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. 205, n. 1-2, p. 86-93, 2008.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.09.012>

ORIE, N. N.; RAEES, A.; ALJABER, M. Y.; MOHAMED-ALI, N. et al. 20-hydroxyecdysone dilates muscle arterioles in a nitric oxide-dependent, estrogen ER- $\beta$  receptor-independent manner. p. 100078, 2021.  
<https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100078>

PANDYA, A. J. F. Adult disaster psychiatry. 7, n. 2, p. 155-159, 2009.  
<https://doi.org/10.1176/foc.7.2.foc155>

PANDYA, M.; ALTINAY, M.; MALONE, D. A.; ANAND, A. Where in the brain is depression? Current psychiatry reports, 14, n. 6, p. 634-642, 2012.  
<https://doi.org/10.1007/s11920-012-0322-7>

PANOSSIAN, A.; WIKMAN, G. Effects of adaptogens on the central nervous system and the molecular mechanisms associated with their stress-protective activity. **Pharmaceuticals**, 3, n. 1, p. 188-224, 2010.  
<https://doi.org/10.3390/ph3010188>

PERL, D. P. J. M. S. J. o. M. A. J. o. T.; TRANSLATIONAL, P. M. A. J. o.; MEDICINE, P. Neuropathology of Alzheimer's disease. 77, n. 1, p. 32-42, 2010.  
<https://doi.org/10.1002/msj.20157>

PERROTTA, G. J. J. N. Anxiety disorders: definitions, contexts, neural correlates and strategic therapy. 6, n. 1, p. 042, 2019.

PICÓN-PAGÈS, P.; GARCIA-BUENDIA, J.; MUÑOZ, F. J. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, 1865, n. 8, p. 1949-1967, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2018.11.007>

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. Biologia da conservação. In: **Biologia da conservação**, 2006. p. vii, 327-vii, 327.

PIRES, D. E.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. J. J. o. m. c. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>

PRINCE, M.; WIMO, A.; GUERCHET, M.; ALI, G. et al. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia: An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends. London, England: **Alzheimer's Disease International**; 2015. 2017.

PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of agricultural and food chemistry**, 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003. <https://doi.org/10.1021/jf0262256>

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. **Kidney international**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.11.034>

RATES, S. M. K.; GOSMANN, G. Gênero Pfaffia: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 12, n. 2, p. 85-93, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2002000200005>

RIDNOUR, L. A.; DHANAPAL, S.; HOOS, M.; WILSON, J. et al. Nitric oxide-mediated regulation of amyloid clearance via alterations of MMP-9/TIMP-1. 123, n. 5, p. 736-749, 2012. <https://doi.org/10.1111/jnc.12028>

RODRIGUES, D. I. Q. G. Synaptic localization of the amyloid precursor protein in the rat hippocampus. 2011. Tese de Doutorado.

RUSHWORTH, M. F.; NOONAN, M. P.; BOORMAN, E. D.; WALTON, M. E. et al. Frontal cortex and reward-guided learning and decision-making. **Neuron**, 70, n. 6, p. 1054-1069, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.014>

SADÍLEK, J.; SPÁLOVSKÁ, P.; VRANA, B.; VÁVROVÁ, M. et al. Comparison of extraction techniques for isolation of steroid oestrogens in environmentally relevant concentrations from sediment. **International journal of environmental analytical chemistry**, 96, n. 11, p. 1022-1037, 2016. <https://doi.org/10.1080/03067319.2016.1232718>

SADOCK, B. J.; SADOCK, V. A.; RUIZ, P. **Compêndio de Psiquiatria-: Ciência do Comportamento e Psiquiatria Clínica**. Artmed Editora, 2016. 8582713797.

SAHOO, S. J. J. M. P. A review of some medicinal plants used for nervous disorders. 6, p. 220-224, 2018.

SALIM, S. J. C. n. Oxidative stress and psychological disorders. 12, n. 2, p. 140-147, 2014. <https://doi.org/10.2174/1570159X11666131120230309>

SANTOS, E. W.; DE OLIVEIRA, D. C.; HASTREITER, A.; DA SILVA, G. B. et al. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. 53, n. 2, p. 138-145, 2016. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i2p138-145>

SCHEMMEL, K. E.; PADIYARA, R. S.; D'SOUZA, J. J. J. J. o. D.; COMPLICATIONS, i. Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a review. 24, n. 5, p. 354-360, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2009.07.005>

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. Food chemistry, 113, n. 4, p. 1202-1205, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>

SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y. et al. nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from Pfaffia glomerata. 1993. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85172-N](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85172-N)

SINGH, A.; SHARMA, S.; ARORA, S.; ATTRI, S. et al. New coumarin-benzotriazole based hybrid molecules as inhibitors of acetylcholinesterase and amyloid aggregation. 30, n. 20, p. 127477, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127477>

SINGH, B.; SHARMA, R. A. Secondary Metabolites of Medicinal Plants, 4 Volume Set: Ethnopharmacological Properties, Biological Activity and Production Strategies. **John Wiley & Sons**, 2020. 3527347321. <https://doi.org/10.1002/9783527825578>

SINGH, R.; BARDEN, A.; MORI, T.; BEILIN, L. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia**, 44, n. 2, p. 129-146, 2001. <https://doi.org/10.1007/s001250051591>

SOUSA, M. B. C. d.; SILVA, H. P. A.; GALVÃO-COELHO, N. L. J. E. d. P. Resposta ao estresse: I. Homeostase e teoria da alostase. 20, p. 2-11, 2015. <https://doi.org/10.5935/1678-4669.20150002>

SPIRES-JONES, T. L.; HYMAN, B. T. J. N. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. 82, n. 4, p. 756-771, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.004>

SREERAMA, Y. N.; TAKAHASHI, Y.; YAMAKI, K. Phenolic Antioxidants in Some Vigna Species of Legumes and their Distinct Inhibitory Effects on  $\alpha$ -Glucosidase and Pancreatic Lipase Activities. **Journal of food science**, 77, n. 9, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02848.x>

TEIXEIRA, R. R.; DE SOUZA, A. V.; PEIXOTO, L. G.; MACHADO, H. L. et al. Royal jelly decreases corticosterone levels and improves the brain antioxidant system in restraint and cold stressed rats. **Neuroscience letters**, 655, p. 179-185, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.010>

TODOROVA, V.; IVANOV, K.; DELATTRE, C.; NALBANTOVA, V. et al. Plant Adaptogens-History and Future Perspectives. 13, n. 8, p. 2861, 2021.  
<https://doi.org/10.3390/nu13082861>

TSUJIYAMA, S.; UJIHARA, H.; ISHIHARA, K.; SASA, M. Potentiation of GABA-induced inhibition by 20-hydroxyecdysone, a neurosteroid, in cultured rat cortical neurons. **The Japanese Journal of Pharmacology**, 68, n. 1, p. 133-136, 1995.  
<https://doi.org/10.1254/jjp.68.133>

UDDIN, M. S.; AL MAMUN, A.; KABIR, M. T.; JAKARIA, M. et al. Nootropic and anti-Alzheimer's actions of medicinal plants: molecular insight into therapeutic potential to alleviate Alzheimer's neuropathology. **Molecular neurobiology**, 56, n. 7, p. 4925-4944, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1420-2>

URIBARRI, J.; WOODRUFF, S.; GOODMAN, S.; CAI, W. et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. **Journal of the American Dietetic Association**, 110, n. 6, p. 911-916. e912, 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.jada.2010.03.018>

VASQUEZ-MEDRANO, R.; PRATO-GARCIA, D.; VEDRENNE, M. Ferrioxalate-mediated processes. In: **Advanced Oxidation Processes for Waste Water Treatment**: Elsevier, 2018. p. 89-113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810499-6.00004-8>

VECCHIO, I.; SORRENTINO, L.; PAOLETTI, A.; MARRA, R. et al. The State of The Art on Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease. 13, p. 11795735211029113, 2021. <https://doi.org/10.1177/11795735211029113>

VEIRAIAH, A. Hyperglycemia, lipoprotein glycation, and vascular disease. **Angiology**, 56, n. 4, p. 431-438, 2005.  
<https://doi.org/10.1177/000331970505600411>

VIGO, C.; NARITA, E.; NAKAMURA, C.; MARQUES, L. Avaliação dos efeitos das raízes de Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen sobre o tempo de sono e crescimento bacteriano. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 13, p. 14-17, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2003000400006>

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. **Springer Science & Business Media**, 1996. 3540586768.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-00574-9>

WANG, L.; MUXIN, G.; NISHIDA, H.; SHIRAKAWA, C. et al. Psychological stress-induced oxidative stress as a model of sub-healthy condition and the effect of TCM. 4, n. 2, p. 195-202, 2007. <https://doi.org/10.1093/ecam/nel080>

WANG, W.; WANG, T.; FENG, W.-Y.; WANG, Z.-Y. et al. Ecdysterone protects gerbil brain from temporal global cerebral ischemia/reperfusion injury via preventing neuron apoptosis and deactivating astrocytes and microglia cells. **Neuroscience research**, 81, p. 21-29, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.01.005>

WANG, W.; YAGIZ, Y.; BURAN, T. J.; DO NASCIMENTO NUNES, C. et al. Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. 44, n. 9, p. 2666-2673, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.022>

WATANABE, M.; MAEMURA, K.; KANBARA, K.; TAMAYAMA, T. et al. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. **International review of cytology**, 213, p. 1-47, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(02\)13011-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(02)13011-7)

WAUTIER, J.; WAUTIER, M.; SCHMIDT, A.; ANDERSON, G. et al. Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 91, n. 16, p. 7742-7746, 1994. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7742>

WHO. World Health Organization: Depression and other common mental disorders: global health estimates. **World Health Organization**. 2017.

WHO. World Health Organization. **Towards a dementia plan: a WHO guide**. 2018.

WILKINS, H. M.; SWERDLOW, R. H. J. B. r. b. Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. 133, p. 71-79, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.009>

WU, C.-H.; YEN, G.-C. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. **Journal of agricultural and food chemistry**, 53, n. 8, p. 3167-3173, 2005. <https://doi.org/10.1021/jf048550u>

XIA, X.; ZHANG, Q.; LIU, R.; WANG, Z. et al. Effects of 20-hydroxyecdysone on improving memory deficits in streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rat. **European journal of pharmacology**, 740, p. 45-52, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.026>

XUE, Q.; YAN, Y.; ZHANG, R.; XIONG, H. J. I. j. o. m. s. Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. 19, n. 12, p. 3805, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19123805>

YAMAGUCHI, F.; ARIGA, T.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. **Journal of agricultural and food chemistry**, 48, n. 2, p. 180-185, 2000.  
<https://doi.org/10.1021/jf990845y>

YEH, W.-J.; HSIA, S.-M.; LEE, W.-H.; WU, C.-H. J. J. o. f. et al. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. 25, n. 1, p. 84-92, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.017>

YEUNG, K. S.; HERNANDEZ, M.; MAO, J. J.; HAVILAND, I. et al. Herbal medicine for depression and anxiety: A systematic review with assessment of potential psycho-oncologic relevance. 32, n. 5, p. 865-891, 2018.  
<https://doi.org/10.1002/ptr.6033>

ZANELATI, T.; BIOJONE, C.; MOREIRA, F.; GUIMARÃES, F. S. et al. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. **British journal of pharmacology**, 159, n. 1, p. 122-128, 2010.  
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00521.x>

ZENI, A. L. B.; PARISOTTO, A. V.; MATTOS, G.; HELENA, E. T. d. S. Use of medicinal plants as home remedies in Primary Health Care in Blumenau-State of Santa Catarina, Brazil. **Ciência & Saúde Coletiva**, 22, n. 8, p. 2703-2712, 2017.  
<https://doi.org/10.1590/1413-81232017228.18892015>

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, 16, n. 2, p. 109-110, Jun 1983.  
[https://doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(83)90201-4)

ZLATKOVIĆ, J.; FILIPOVIĆ, D. Chronic social isolation induces NF-κB activation and upregulation of iNOS protein expression in rat prefrontal cortex. **Neurochemistry international**, 63, n. 3, p. 172-179, 2013.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.06.002>

ZOTOVA, E.; NICOLL, J. A.; KALARIA, R.; HOLMES, C. et al. Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. 2, n. 1, p. 1-9, 2010.  
<https://doi.org/10.1186/alzrt24>

## Anexos

**Anexo 1:** Autorização de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético.

<p> Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico</p> <p><b>Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético</b></p> <p>O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.</p> <p>Brasília, 02 de outubro de 2015</p> <p>Marcelo Marcos Morales</p> <p>Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 513/2013</p>	<p>Processo: 010743/2015-4 Validade: 02/11/2015 a 02/11/2017 Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA CNPJ: 256.483.870/0001-18 Pesquisador: Foued Salmen Espindola CPF: 242.039.476-34 RG: M1189277 - SSP / MG</p> <p><i>Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <a href="http://servicosweb.cnpq.br/visualizador">http://servicosweb.cnpq.br/visualizador</a> e informar o número do protocolo 9504814591790738 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i></p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Anexo 2: Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU-067/18).**



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito adaptogênico da fração de diclorometano de *pfaffia glomerata* (spreng) pedersen sobre parâmetros de estresse e ansiedade em camundongos”, protocolo nº 067/18, sob a responsabilidade de Cássia Regina da Silva – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 21 de Setembro de 2018.

(We certify that the project entitled intitulado “Efeito adaptogênico da fração de diclorometano de *pfaffia glomerata* (spreng) pedersen sobre parâmetros de estresse e ansiedade em camundongos”, protocol 067/18, under the responsibility of - Cássia Regina da Silva involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of September 21th, 2018).

Vigência do Projeto	Inicio: 01/11/2018 Término: 01/11/2020
Espécie/Linhagem/Grupos Taxonômicos	Camundongos C57BL6
Número de animais	120
Peso/Idade	20 gramas /6 semanas
Sexo	Machos
Origem/Local	Biotério Central da UFU
Local onde serão mantidos os animais:	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal CBEA/PROPP/UFU

Uberlândia, 26 de setembro de 2018

**Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão**  
Coordenador da CEUA/UFU

**Anexo 2: Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU-105/18).**



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito anti-inflamatório e antioxidante das frações orgânicas do extrato etanólico das folhas de *Bauhinia forficata* subsp. *forficata* e *Syzygium cumini* (L.) Skeels em neutrófilos e macrófagos de camundongos C57BL/6", protocolo nº 105/18, sob a responsabilidade de Foued Salmen Espindola – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 19 de Novembro de 2020.

(We certify that the project entitled "Efeito anti-inflamatório e antioxidante das frações orgânicas do extrato etanólico das folhas de *Bauhinia forficata* subsp. *forficata* e *Syzygium cumini* (L.) Skeels em neutrófilos e macrófagos de camundongos C57BL/6.", protocol 105/18, under the responsibility of Foued Salmen Espindola - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of November 19th, 2020).

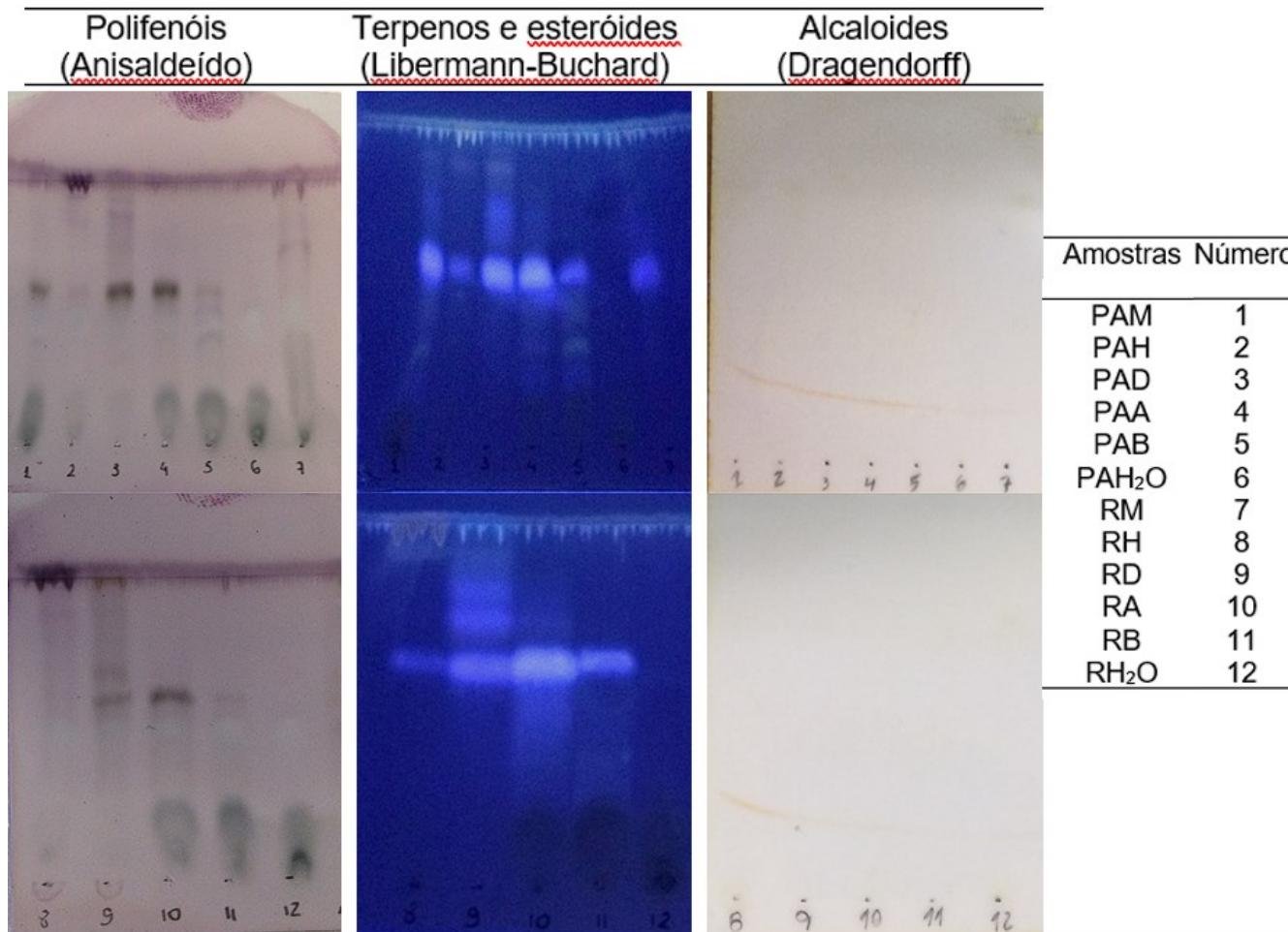
Vigência do Projeto	Início: 05/05/2019 Término: 20/12/2022
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico C57BL/6
Número de animais	24
Peso / Idade	20g/ 6 semanas
Sexo	Macho
Origem / Local	Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU)
Local onde serão mantidos os animais:	Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU)

Alteração realizada: Alteração na data término do dia 05/11/2020 para 20/12/2022.

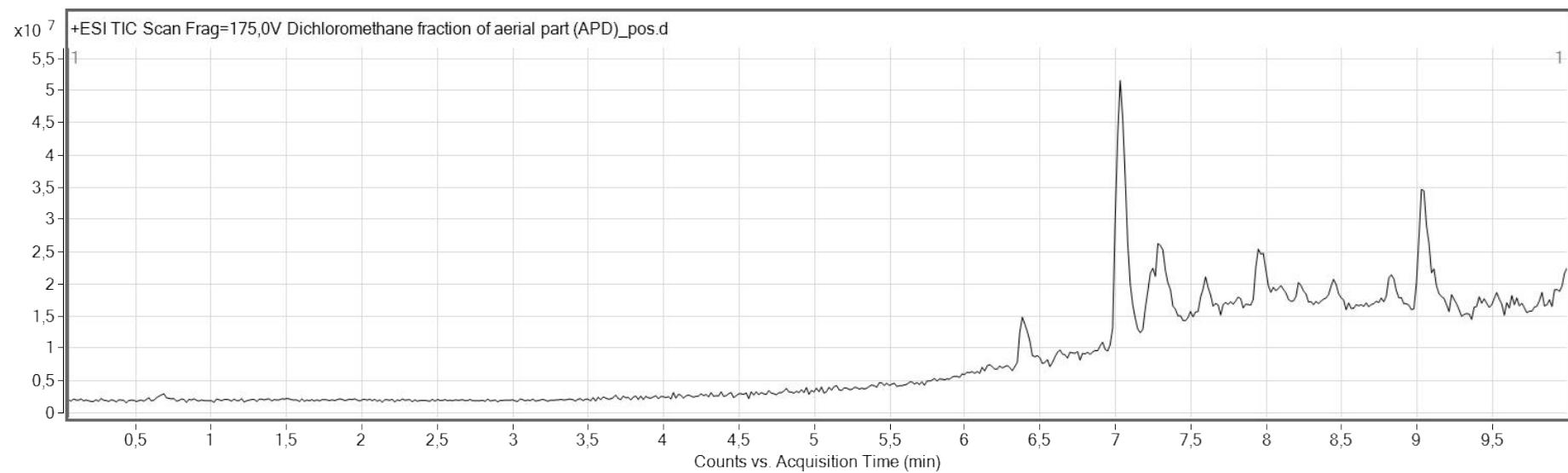
Uberlândia, 19 de novembro de 2020.

Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Comissão de Ética na Utilização de Animais  
Coordenador da CEUA

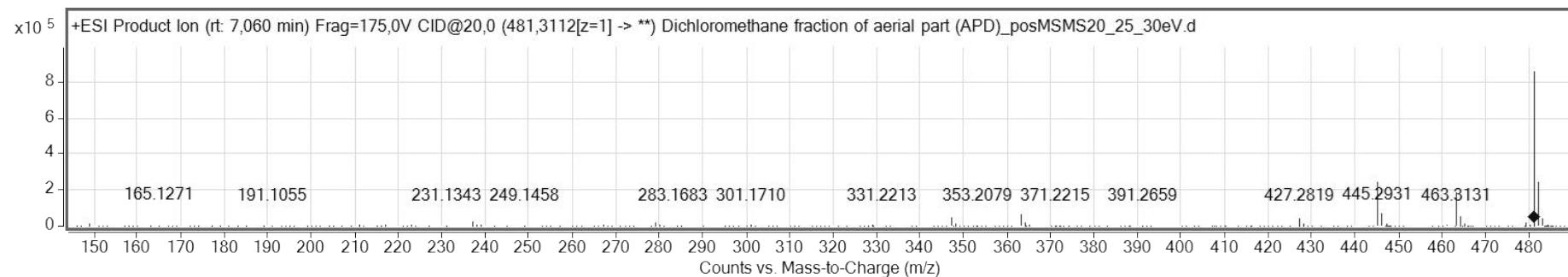
**Anexo 3: Análise da cromatografia em camada delgada.**



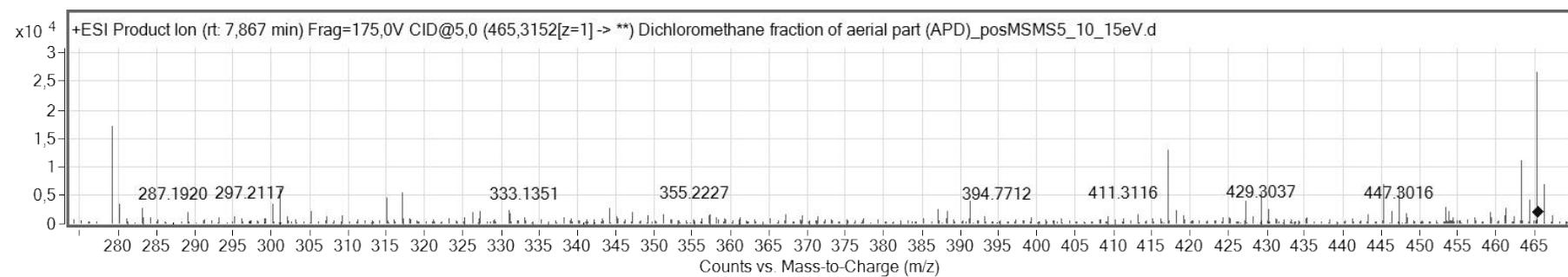
#### Anexo 4. Avaliação por CLAE-IES-EM/EM



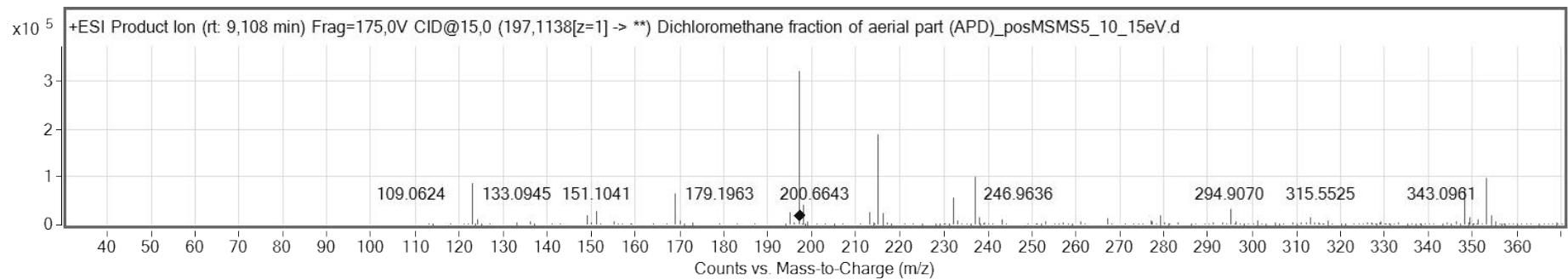
**Anexo 4.1.** Cromatograma da fração de diclorometano (PAD) do extrato metanólico da parte aérea da *Pfaffia glomerata* por CLAE-IES-EM/EM (modo positivo).



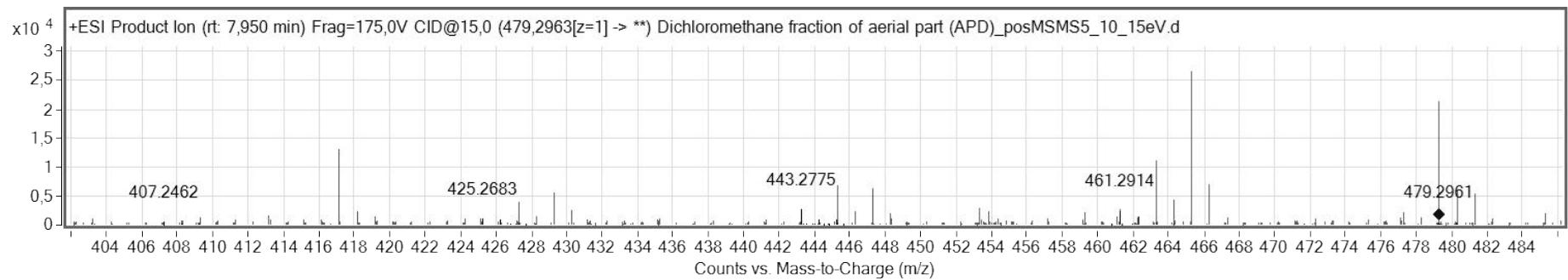
**Anexo 4.2.** CLAE-IES-EM/EM da 20-hidroxiecdisona presente na fração diclorometano da parte aérea (PAD) ( $m / z$  481 [ $M-H$ ] +).



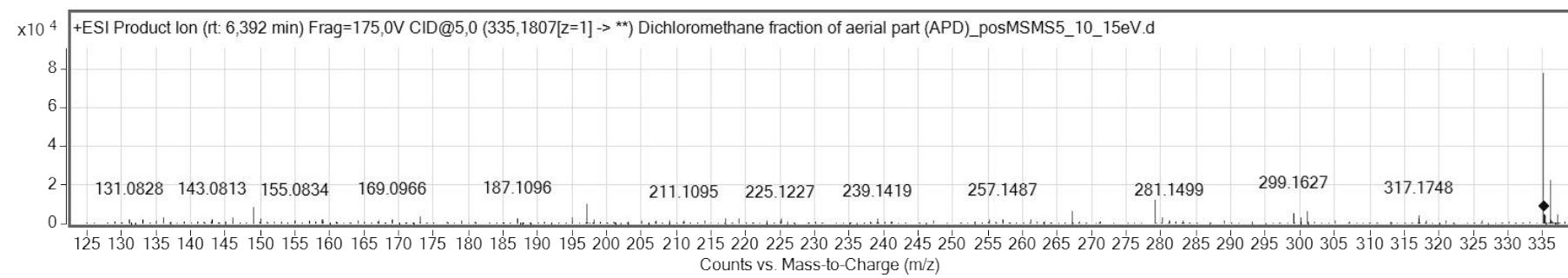
**Anexo 4.3.** CLAE-IES-EM/EM da ecdisona presente na fração diclorometano da parte aérea (PAD) ( $m / z$  465 [ $M-H$ ] +).



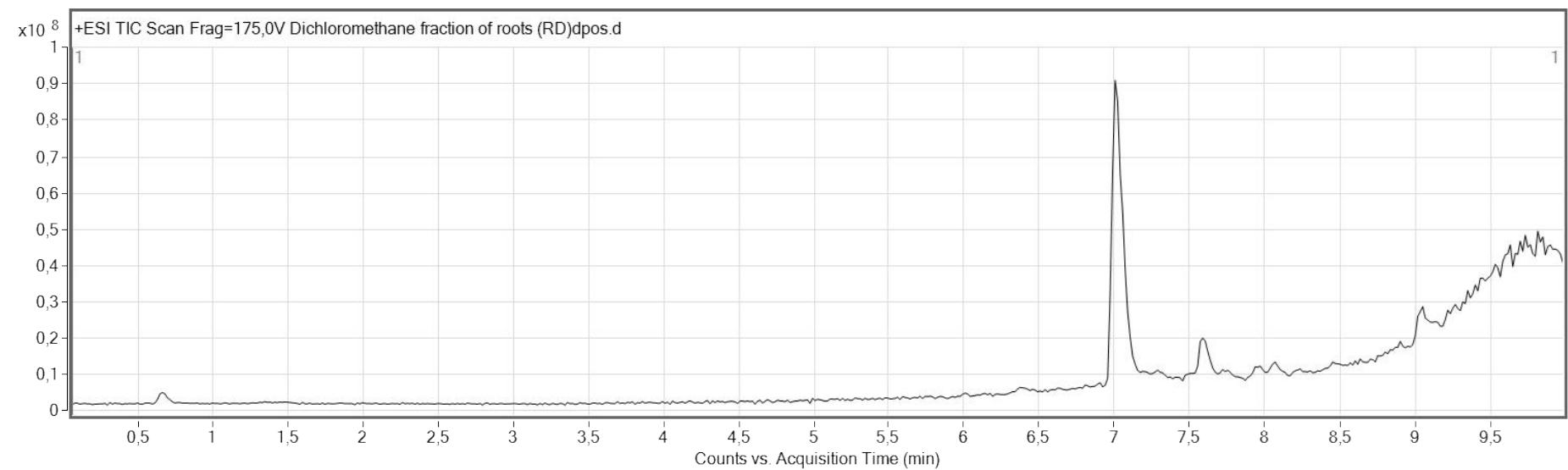
Anexo 4.4. CLAE-IES-EM/EM do ácido glucônico presente na fração diclorometano da parte aérea (PAD) ( $m / z$  197 [ $M-H^-$ ]).



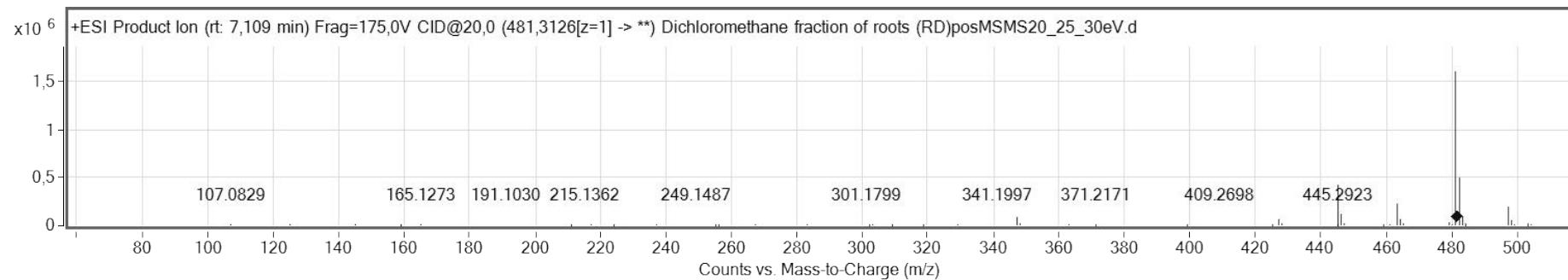
Anexo 4.5. CLAE-IES-EM/EM da pfaffina A presente na fração diclorometano da parte aérea (PAD) ( $m / z$  479 [ $M-H^-$ ]).



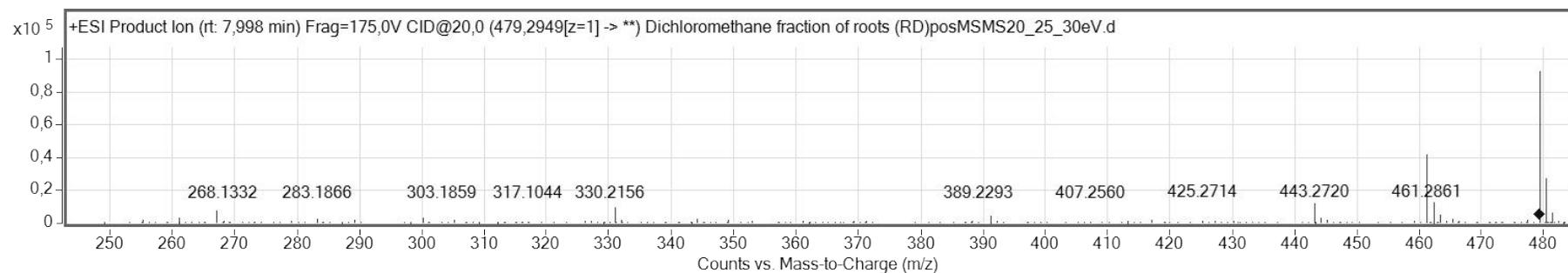
**Anexo 4.6.** CLAE-IES-EM/EM da rubrosterona presente na fração diclorometano da parte aérea (PAD) ( $m / z$  335 [ $M-H^-$ ]).



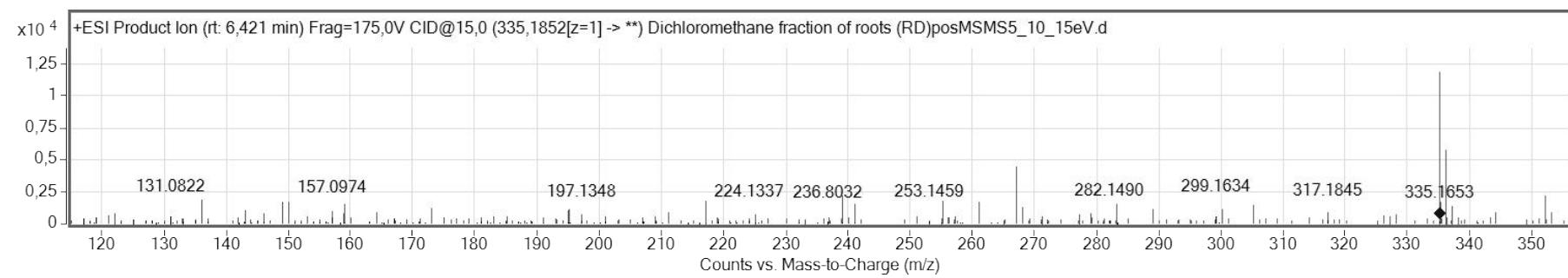
**Anexo 4.7.** Cromatograma da fração de diclorometano (RD) do extrato metanólico das raízes da *Pfaffia glomerata* por CLAE-IES-EM/EM (modo positivo).



Anexo 4.8. CLAE-IES-EM/EM da 20-hidroxiecdisona presente na fração diclorometano das raízes (RD) (m / z 481 [M-H] +).

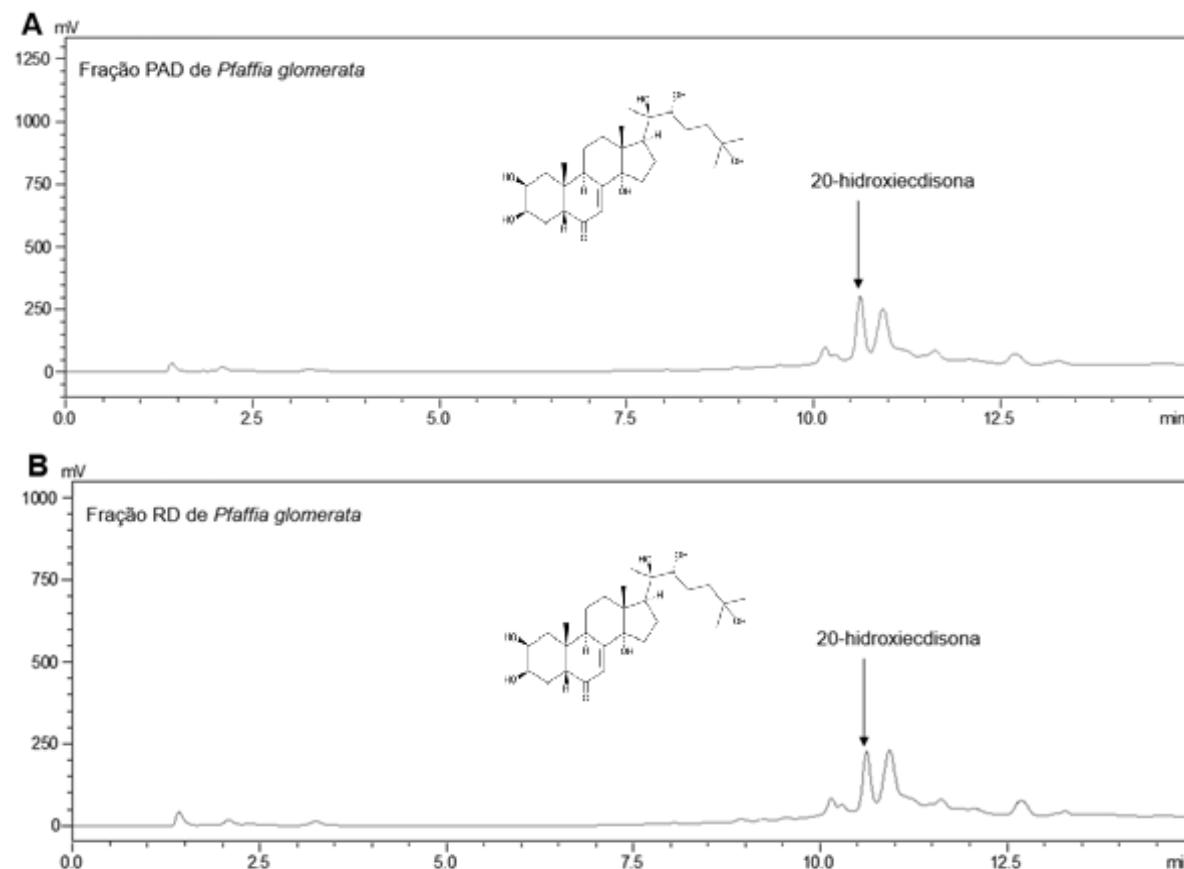


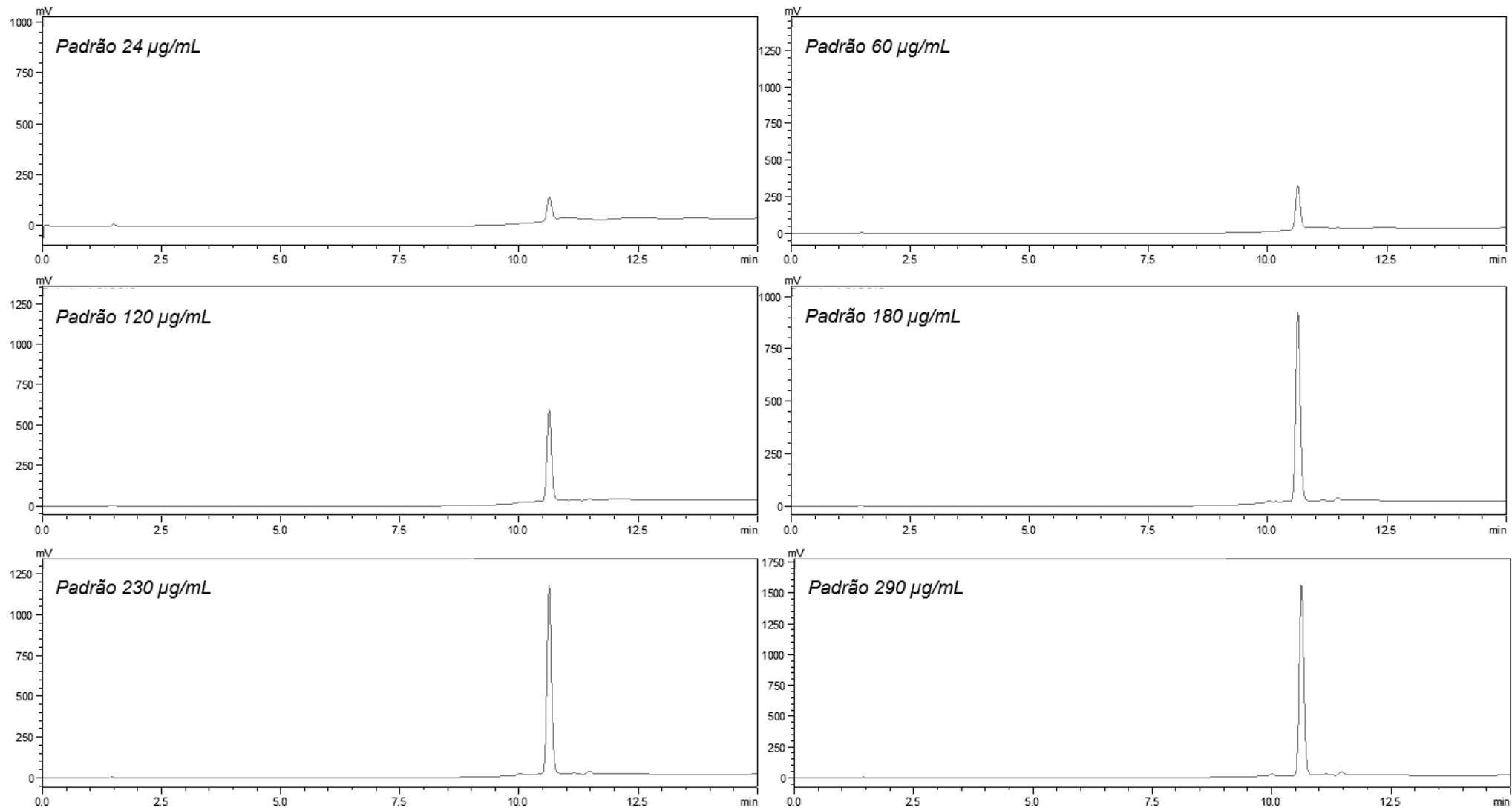
Anexo 4.9. CLAE-IES-EM/EM da pfaffina A presente na fração diclorometano das raízes (RD) (m / z 479 [M-H] +).



**Anexo 4.10.** CLAE-IES-EM/EM da rubrosterona presente na fração diclorometano das raízes (RD) ( $m / z$  335 [ $M-H^-$ ]).

**Anexo 5.** Cromatogramas das frações PAD (A) e RD (B) de *Pfaffia glomerata* para o método de quantificação do teor de 20-hidroxiecdisona por meio de CLAE utilizando o padrão de 20-hidroxiecdisona 93% de pureza (C).



**C**

# Artigo publicado (IF:4,36 e Qualis/CAPES B1)

Journal of Ethnopharmacology 267 (2021) 113599



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)



## A 20-hydroxyecdysone-enriched fraction from *Pfaffia glomerata* (Spreng.) pedersen roots alleviates stress, anxiety, and depression in mice

Rodrigo Rodrigues Franco<sup>a</sup>, Letícia de Almeida Takata<sup>a</sup>, Kristhiano Chagas<sup>b</sup>, Allisson Benatti Justino<sup>b</sup>, André Lopes Saraiva<sup>b</sup>, Luiz Ricardo Goulart<sup>b</sup>, Veridiana de Melo Rodrigues Ávila<sup>b</sup>, Wagner Campos Otoni<sup>b</sup>, Fouad Salmen Espindola<sup>a</sup>, Cássia Regina da Silva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Genetics and Biochemistry, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, 38408-100, Uberlândia, MG, Brazil

<sup>b</sup> Department of Plant Biology, Plant Tissue Culture Laboratory/BIOAGRO, Federal University of Viçosa, 36570-900, Viçosa, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

Keywords:  
Brazilian ginseng  
 $\beta$ -ecdysone  
Oxidative stress  
Natural products  
Nervous system  
Adaptogenic effect

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Pfaffia glomerata* roots are widely used in Brazil to treat various pathological conditions, particularly psychological disorders. 20-hydroxyecdysone, a phytosteroid present in the plant, can promote greater body resistance against exogenous and endogenous stressors. The objective of this study was to evaluate the possible neuroprotective effect of a 20-hydroxyecdysone-enriched fraction (20E-EF), obtained from *P. glomerata* roots, in an acute murine stress model.

**Material and methods:** The 20E-EF was obtained by partitioning the methanol extract from *P. glomerata* roots with dichloromethane. Mice were treated by gavage with three doses of 20E-EF (3, 10, and 30 mg/kg) and parameters of stress, anxiety, and depression were evaluated. Biomarkers of oxidative stress (enzymes, antioxidant profile, and oxidized molecules) were evaluated in the cortex, striatum (basal ganglia), and hippocampus of animals treated with 30 mg/kg of 20E-EF.

**Results:** Mass spectrometry revealed that 20E was the main compound in the dichloromethane fraction. At a dose of 30 mg/kg, 20E-EF reduced stress, anxiety, and depression, while stimulating antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase), promoting antioxidant activity (antioxidant capacity, sulfhydryl groups, and reduced glutathione), and reducing oxidative markers (lipid peroxidation). In addition, 20E increased the concentration of NO in the striatum, possibly improving memory function and antioxidant activity.

**Conclusion:** A 30 mg/kg dose of 20E-EF was able to reduce stress, anxiety, and depression, in addition to maintaining antioxidant defenses of the cortex and striatum. These findings open new perspectives for understanding the therapeutic properties of *P. glomerata* and the underlying mechanism(s).

### 1. Introduction

Stress has become a major mental health concern and can be an important factor in the development of anxiety and depression (WHO, 2017). Exposure to different stressful situations leads to psychopathological manifestations that elicit considerable physiological and biochemical changes, which may comprise inflammation and oxidative stress (Bardeen and Fergus, 2016; Maes et al., 2011). Medicinal plants and their bioactive compounds with adaptogenic and nootropic properties have been recommended as complementary therapeutic options to manage stress and its psychopathological symptoms (Carlini, 2003;

Dobrek, 2019; Kaur et al., 2017; Uddin et al., 2019; Mendes and Carlini, 2007).

Adaptogens include plants and various substances that increase the body's nonspecific resistance, protecting it from stressors (Panossian and Wikman, 2010). Among these plants, we highlight *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, an Amaranthaceae family species, native to Brazil and popularly known as "Brazilian ginseng", due to its medicinal properties associated with Asian ginseng (*Panax ginseng*) (Marques, 1998). In traditional Brazilian medicine, *P. glomerata* roots are used as antioxidants and as a treatment in numerous physical and mental disorders (Carlini 2003; Mendes and Carlini 2007). The adaptogenic effect

\* Corresponding author.

E-mail address: [cassia.regina@ufu.br](mailto:cassia.regina@ufu.br) (C.R. da Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113599>

Received 29 July 2020; Received in revised form 19 October 2020; Accepted 15 November 2020

Available online 18 November 2020

0378-8741/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

of *P. glomerata* may be attributed to the phytosteroid 20-hydroxyecdysone (20E), a non-androgenic steroid, which is used as an ingredient in dietary supplements (Ambrosio et al., 2020; Hunyadi et al., 2016).

*P. glomerata* roots and 20E have been suggested to play a role in the central nervous system, in treating mental disorders (De-Paris et al., 2000; Fenner et al., 2008; Vigo et al., 2003) and does not exhibit any cytotoxic or mutagenic activity (Almeida et al., 2017). Animal studies have indicated that 20E prevents apoptosis of neurons and astrocytes, improves cognitive impairment (Wang et al., 2014), has beneficial effects against brain injury, and inhibits the production of reactive oxygen species (ROS) and nitrous species (RNS) (Hu et al., 2012).

Xia et al. (2014) showed that 20E is protected against memory deficits in diabetes, possibly by enhancing antioxidant capacity of the brain. Tsujiyama et al. (1995) indicated that 20E acted at the gamma-aminobutyric acid (GABA)<sub>A</sub> receptor modulatory site and enhanced GABAergic inhibition in cortical neurons, triggering an anxiolytic effect. According to Marques et al. (2004), ethanolic extracts from *P. glomerata* roots partially reversed age-induced memory and learning deficits. Similarly, Vigo et al. (2003) showed that the same extracts triggered sedative effects and reduced sleep time in animals.

The present study investigated the possible neuroprotective action of *P. glomerata* roots by treating mice exposed to acute stress with a 20-hydroxyecdysone-enriched fraction (20E-EF). Behavioral parameters of anxiety and depression, as well as changes in enzymatic and non-enzymatic biomarkers of oxidative stress in various brain regions were evaluated.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

The propagation material used in this study was obtained from the in vitro Germplasm Bank of the Plant Tissue Culture Laboratory (Federal University of Vigo, MG, Brazil). Cloned plants were grown under experimental field conditions in Bela Vista Farm ( $18^{\circ}58'55.5''S$ – $40^{\circ}15'17.8''W$ ), Vila Valério, ES, Brazil, and harvested in November 2015. The roots were harvested from 5-month-old plants, dried in an oven at  $55^{\circ}C$  and ground in a Wiley-type knife mill (SL32; Solab). Dried and powdered roots were kept in a freezer at  $-20^{\circ}C$  until the extraction and fractionation procedures were carried out. Voucher material was deposited at the Leopoldo Krieger Herbarium (UFJF, Juiz de Fora, MG, Brazil) under code number CBSJ 63317.

### 2.2. Semi-purification of the 20E-EF

The powdered root material was subjected to static maceration for seven days using 98% methanol (1:5 m/v). After extraction, the solutions were filtered and the solvent was completely removed using a rotary evaporator under reduced pressure at  $35^{\circ}C$ . The maceration process was repeated three times, and the extract was frozen and lyophilized to remove any remaining water. The crude extract was subjected to liquid-liquid fractionation using different solvents in the following increasing order of polarity: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol, and water. The solvents were removed using a rotary evaporator under reduced pressure at  $35^{\circ}C$ , and the fractions were frozen and lyophilized to remove any remaining water (Franco et al., 2020a). The dichloromethane fraction, named 20-hydroxyecdysone-enriched fraction (20E-EF), was used for in vivo assays.

### 2.3. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis

To determine the presence of 20E in the dichloromethane fraction, high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization and tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS; Agilent Q-TOF, model 6520) was used. A methanol:water solution (4:1) was used as solvent and the samples were infused in the ESI source at a flow rate of

200  $\mu$ L/h. Nitrogen gas was used as drying gas at a flow rate of 8 L/min and as nebulizer gas at 58 psi. The temperature of the nebulizer was set to  $200^{\circ}C$  and a potential of 4.5 kV was applied in the capillary. The electron impact energy was set to 10–30 eV. The HPLC parameters were as follows: Agilent Zorbax column of  $50 \times 2.1$  mm, particles of  $1.8 \mu$ m and pore diameter of  $110 \text{ \AA}$ , mobile phase consisting of water acidified with formic acid (0.1% v/v) (A) and methanol (B). The gradient solvent system was: 0 min, 2% B; 0–15 min, 98% B; 15–17 min, 100% B; 17–18 min, 2% B; 18–22 min, 2% B. Flow was 0.35 mL/min and UV detection occurred at 280 and 360 nm. Data were acquired in positive mode, with adjustment for a range of 20–1000 m/z. Mass spectrometry data were evaluated using Agilent Mass Hunter B.07.00 software, and the molecular ions and their fragments were compared with published results. An error  $\leq 10$  was calculated by comparing the theoretical and observed m/z values (Franco et al., 2020b).

### 2.4. Animals, groups, and treatments

Male C57BL/6J mice (approximately 6–8-week-old and weighing 20 g) were kept under standard conditions ( $22 \pm 1^{\circ}C$ , humidity  $60 \pm 5\%$ , 12 h light/12 h dark cycle) and given food and water ad libitum. Experiments were conducted following current ethical guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983). All animal handling and procedures were approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Federal University of Uberlândia (CEUA/UFU 067/18). The animals were treated by oral gavage once a day, every morning, starting 3 days before stress induction and ending at day 5 after stress. The animals were divided into five groups (n = 5/group): naïve, stress without treatment, and stress with treatment at doses of 3, 10, or 30 mg/kg of 20E-EF.

### 2.5. Acute stress induction

Animals were exposed once to 12 h of social isolation overnight, whereby they were placed in individual cages ( $30 \times 20 \times 12.5$  cm). During this time, the animals were kept in the absence of water, food, and visual contact with the others (Takatsu-Coleman et al., 2013). After this period, the animals were reallocated to the same groups and subjected to behavioral analysis over a period of 5 days, once a day.

### 2.6. Behavior protocols

#### 2.6.1. Open-field test (assessment of motor coordination)

The animals were placed in the center of a circular arena (50 cm in diameter) with the floor marked by small symmetrical squares, which allowed the quantification of the animals' locomotor activity. The observation time was 5 min, and the number of crossings, number of times that the animal was resting on the rear legs (rearing), number of feces, and time spent exploring the arena's periphery and center were measured.

#### 2.6.2. Elevated plus maze test (evaluation of anxiety development)

The maze was made of wood and consisted of two open arms pointing in opposite directions ( $30 \times 5$  cm) without lateral walls, perpendicular to two arms surrounded by lateral walls ( $30 \times 5 \times 15$  cm), and presenting a central platform common to all arms ( $5 \times 5$  cm). The platform was placed 50 cm from the ground and had a wooden edge (1 cm) along the open arms to prevent the animals from falling. The mice were positioned in the center of the platform with the head turned towards the closed arm and were allowed to freely explore the labyrinth for 5 min. The time spent in the open and closed arms was recorded (Campos et al., 2013).

#### 2.6.3. Forced swimming test (assessment of the development of depressive behaviors)

The mice were individually placed in glass cylinders ( $17 \times 25$  cm)

containing water up to 10 cm in height and kept at 23–25 °C. The animals were left in this environment for 6 min, with the first 2 min intended for settling. During the rest of the experiment, the time the animals remained immobile (performing only small movements to aid in flotation) was recorded. Water was exchanged between groups (Zanelati et al., 2010). Results were expressed as time of immobility.

#### 2.6.4. Rotation test (evaluation of sedative effect)

The animals were placed in an apparatus equipped with a rotating bar of 1 cm in diameter and 5 cm in length, which gyrated at a speed of 5 turns/min. All mice were trained to the equipment; those that fell three times or more for 120 min were excluded from the test. After 24 h, habituated mice received 30 mg/kg of 20E-EF and 10 mg/kg of diazepam (positive control) via the oral route 120 min before the experiment. The animals were subjected to a rotation test for 2 min, and the latency to the first fall from the bar was determined manually (Justino et al., 2020).

#### 2.7. Tissue processing

After the behavioral tests, the animals were euthanized by the administration of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (16 mg/kg). Cerebral hemispheres were divided into the cortex, hippocampus, and striatum. After sectioning, the samples were individually homogenized in sodium phosphate buffer (pH 7.4) and centrifuged at 800×g and 4 °C for 10 min. The supernatant was used to evaluate biomarkers of oxidative stress. Total protein concentration in the supernatant was determined by the Bradford method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin for the analytical curve. Absorbance was measured at 570 nm.

#### 2.8. Biomarkers of oxidative stress

##### 2.8.1. Total antioxidant capacity

The homogenates were incubated with 10 vol of 300 mM sodium acetate buffer (pH 3.6), 1 volume of 10 mM 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine, and 1 volume of 20 mM ferric chloride at 37 °C for 6 min. Absorbance was measured at 593 nm, and antioxidant capacity was determined using an analytical curve constructed with Trolox. Sodium acetate buffer was used as a blank (Franco et al., 2020b).

##### 2.8.2. Lipid peroxidation

The homogenates were incubated with 0.67% thiobarbituric acid and 10% trichloroacetic acid in a water bath for 120 min. After this, n-butanol was added to the samples to remove the organic phase, and fluorescence was measured at 515 nm (excitation) and 553 nm (emission). Lipid peroxidation was determined using an analytical curve constructed with malondialdehyde. Sodium phosphate buffer was used as a blank (Justino et al., 2017).

##### 2.8.3. Sulphydryl group content

Sulphydryl groups were evaluated using dithionitrobenzoic acid (DTNB) diluted in 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 8.0). The homogenates were incubated for 30 min with 1 mM phosphate buffer (pH 7.4) and 10 mM DTNB solution. The presence of sulphydryl groups was recorded at 412 nm (Aksenenov and Markesberry, 2001).

##### 2.8.4. Reduced glutathione (GSH)

Proteins from the homogenate were precipitated by metaphosphoric acid and the samples were centrifuged at 7000×g for 10 min. The supernatant was mixed with 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 5 mM EDTA to deactivate metal-dependent enzymes such as metalloproteases and 1 mg/ml of ortho-phthalaldehyde diluted in methanol. Fluorescence was measured at 350 nm (excitation) and 420 nm (emission). A blank fluorescence value (from wells without homogenates) was subtracted from all fluorescence values. To determine

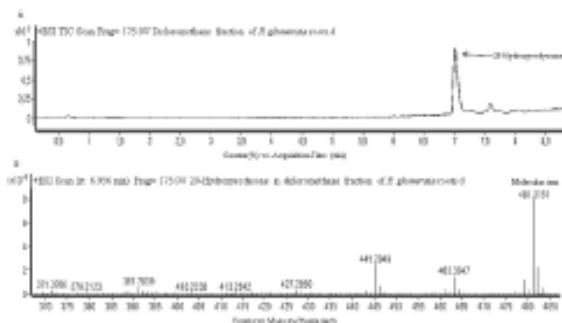


Fig. 1. Detection of 20-hydroxyecdysone in the 20-hydroxyecdysone-enriched fraction (20E-EF) of *Puffia glomerata* roots. Note: (A) Chromatogram and (B) HPLC-ESI-MS/MS in positive mode ( $m/z$  481 [ $M+H$ ] $^{+}$ ). Retention time: 6.956 min. Formula:  $C_{27}H_{45}O_7$ . Calculated mass: 480.3092;  $m/z$  of [ $M+H$ ] $^{+}$ : 481.3151; error (ppm): 0.2;  $m/z$  of fragments of [ $M+H$ ] $^{+}$ : 463, 445, 427, 409, 371.

GSH content, an analytical curve was constructed with GSH as the standard (Teixeira et al., 2017).

##### 2.8.5. Glutathione peroxidase (GPx)

GPx activity was measured based on the recycling of oxidized glutathione back to GSH utilizing NADPH and glutathione reductase. The latter reduced the glutathione disulfide bridge created by GPx. The homogenates were incubated with GPx buffer (100 mM potassium phosphate pH 7.7 containing 1 mM EDTA to deactivate metal-dependent enzymes such as metalloproteases), 40 mM sodium azide, 100 mM GSH diluted in 5% metaphosphoric acid, 4.5 U glutathione reductase diluted in GPx buffer, 2 mM NADPH diluted in 5% sodium bicarbonate, and 0.5 mM tert-butyl. The decay of NADPH was evaluated for 10 min at 340 nm (Teixeira et al., 2017).

##### 2.8.6. Catalase (CAT)

Catalase activity was evaluated based on hydrogen peroxide decomposition. The homogenates were incubated with 10% Triton X-100 and mixed with 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.2% hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). Decomposition of the latter was monitored at 240 nm for 10 min (Justino et al., 2017).

##### 2.8.7. Superoxide dismutase (SOD)

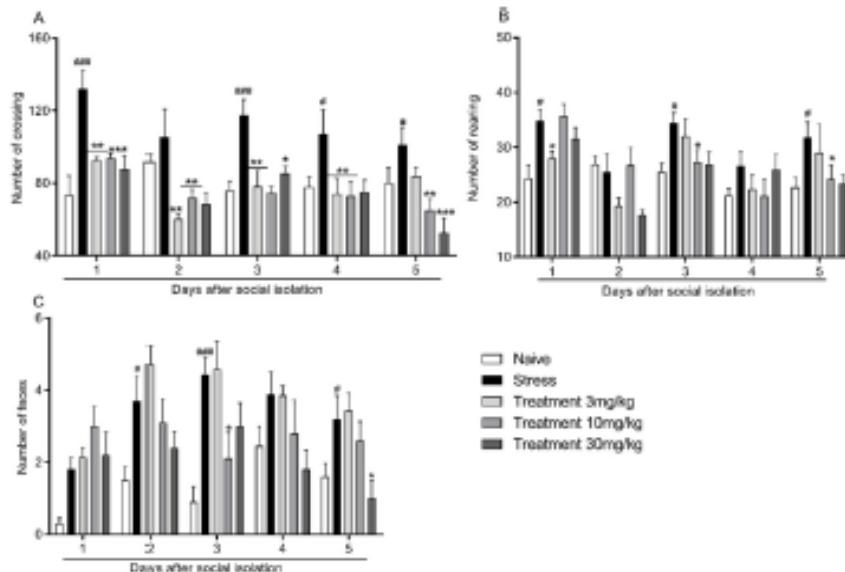
SOD activity was assessed based on inhibition of pyrogallol auto-oxidation. The homogenates were mixed with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) containing 1 mM EDTA to deactivate metal-dependent enzymes such as metalloproteases, 80 U/ml catalase, and 24 mM pyrogallol. The kinetic assay was monitored for 10 min at 420 nm using an analytical curve constructed with SOD as the standard (Justino et al., 2017).

##### 2.8.8. Nitric oxide synthesis

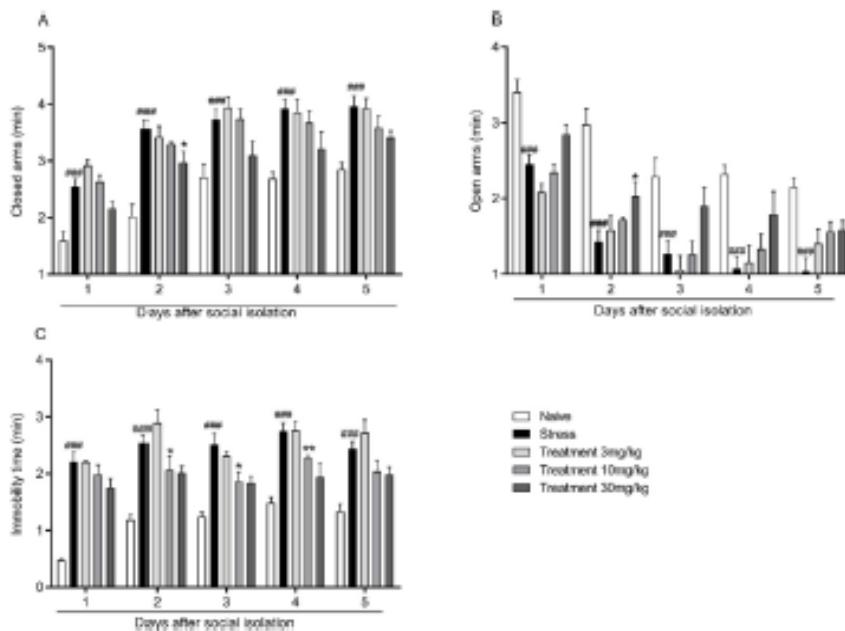
The homogenates were incubated with 200 mM ZnSO<sub>4</sub> and acetonitrile (96%). The mixture was centrifuged at 3000 g for 20 min at 4 °C and the supernatant was separated for analysis of NO<sub>x</sub> (NO<sub>2</sub> plus NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), as described by Miranda et al. (2001). The concentration of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub> was evaluated at 540 nm.

#### 2.9. Statistical analysis

Statistical analyses and graphic visualization were performed in GraphPad Prism 8.0 software. Data were expressed as mean ± standard error of the mean. Two-way or one-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Bonferroni's or Dunnett's post-test. P values < 0.05 were considered significant.



**Fig. 2.** Protective effect of the 20-hydroxyecdysone-enriched fraction (20E-EF) on the motor function of mice exposed to social isolation. Number of crossing events (A), number of rearing events (B), and number of feces (C) on different days after social isolation are shown. Results refer to mice subjected to no stress treated with water (Naive), stress treated with water (Stress), and stress treated with 20E-EF at doses of 3, 10, and 30 mg/kg once a day (Treatment). Vertical bars represent average values and horizontal points refer to the days after social isolation. \*\*\*P < 0.001 and \*P < 0.05 indicate significant difference between the Naive and Stress groups by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test. \*\*P < 0.01, and \*P < 0.05 indicate significant difference between the Stress and Treatment groups; one-way ANOVA followed by Dunnett's test was used when comparing groups on each day.



**Fig. 3.** Protective effect of the 20-hydroxyecdysone-enriched fraction (20E-EF) on acute stress-induced anxiety and depressive-like behavior. Time spent by the animals in the closed arms of the maze (A), time spent in the open arms of the maze (B), and immobility time (C) are shown. Results refer to mice subjected to no stress treated with water (Naive), stress treated with water (Stress), and stress treated with 20E-EF at doses of 3, 10, and 30 mg/kg once a day (Treatment). Vertical bars represent average values and horizontal points refer to the days after social isolation. \*\*\*P < 0.001 indicates significant difference between the Naive and Stress groups by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test. \*\*P < 0.01 and \*P < 0.05 indicate significant difference between the Stress and Treatment groups; one-way ANOVA followed by Dunnett's test was used when comparing groups on each day.

### 3. Results

#### 3.1. Confirmation of 20E in the 20E-EF by mass spectrometry

The presence of the ecdysteroid 20E in the 20E-EF was confirmed by mass spectrometry in positive mode (Fig. 1). 20E was identified as the major compound in this fraction, with a retention time of 6.956 min (Fig. 1A). The molecular ion at 481 m/z [M+H]<sup>+</sup> generated fragments at 463, 445, 427, 409, and 371 m/z. The molecular formula of this

compound was C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>O<sub>7</sub>, corresponding to a mass of 480.3092, while the [M+H]<sup>+</sup> m/z was 481.3151 and the error was 0.2 ppm (Fig. 1B).

#### 3.2. Protective effect of 20E-EF treatment on anxiety and depression-like behaviors

Exposure to the acute stress model induced an increase in motor function (crossing and rearing) of mice on days 1 and 3, which was prevented by treatment with 20E-EF at 3, 10, and 30 mg/kg (Fig. 2A and

Table 1

Latency time to the first fall in the rotarod test for mice treated with saline solution, 10 mg/kg diazepam or 30 mg/kg of the 20-hydroxyecdysone-enriched fraction (20E-EF).

Groups	Latency time (min)
Naive (saline)	120 ± 6
Diazepam 10 mg/kg	42 ± 2
20E-EF 30 mg/kg	120 ± 2*

\*P < 0.05 indicates significant difference between the diazepam group and the group treated with 30 mg/kg 20E-EF by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test.

B). Although acute stress failed to significantly increase these parameters on the other days, decreased crossing activity was observed on days 2 and 5 for the animals that received 30 mg/kg of 20E-EF. An increase in locomotor activity is normally associated with greater agitation/anxiety of the animals due to exposure to stress. Here, 20E-EF successfully reduced locomotor activity in the stress group from day 2 and maintained it low until day 5. No significant differences were observed regarding the exploration of the periphery and the center (data not shown). As shown in Fig. 2C, the number of stools increased on days 1–3 following exposure to acute stress in the open-field experiment; however, treatment with the 20E-EF at 10 or 30 mg/kg decreased the number of feces on day 4.

Exposure to acute stress caused a gradual increase in the time spent

in the closed arms of the maze (Fig. 3A). In animals exposed to acute stress and treated with the 20E-EF at 30 mg/kg, permanence in the closed arms became significantly shorter on day 2 and remained considerably reduced thereafter. Similarly, while exposure to acute stress elicited a gradual decrease in the time spent in the open arms of the maze (Fig. 3B), administration of 30 mg/kg of 20E-EF prolonged this time on days 2 and 3. Additionally, 10 mg/kg of 20E-EF was sufficient to significantly reduce immobility time after day 2 in animals exposed to acute stress; the same trend was observed with 30 mg/kg of 20E-EF (Fig. 3C).

Next, the rotation test was performed to evaluate the sedative effect. Table 1 reveals no difference in the latency time of the animals' first fall upon treatment with 30 mg/kg of 20E-EF or with saline. Moreover, the latency time was significantly longer than when diazepam, which served as positive control, was used.

### 3.3. Control of oxidative stress by the 20E-EF

As shown in Fig. 4A–C, SOD activity was decreased in the cortex, striatum, and hippocampus of stressed animals in comparison with naive mice. Treatment with the 20E-EF prevented this reduction in the cortex and striatum, but not in the hippocampus. The pattern of CAT activity was more complex, as it showed a clear drop in the striatum and hippocampus of stressed animals compared with naive mice, but an increase in the cortex (Fig. 4D–F). Treatment with the 20E-EF was able to partially restore activity in the striatum, but no effect was observed in

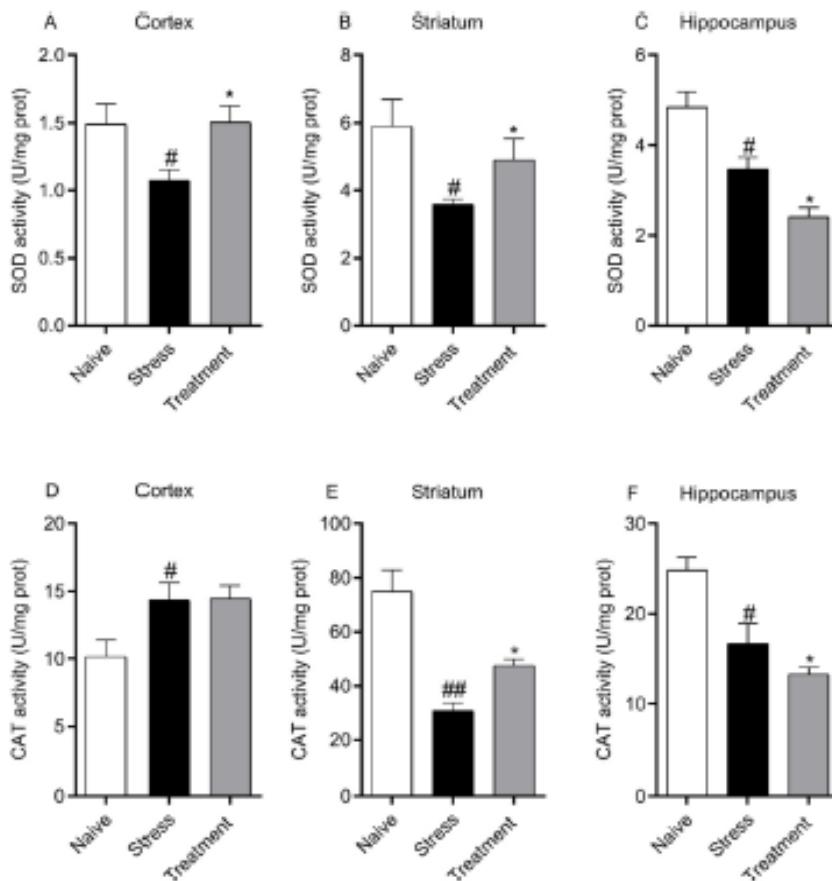
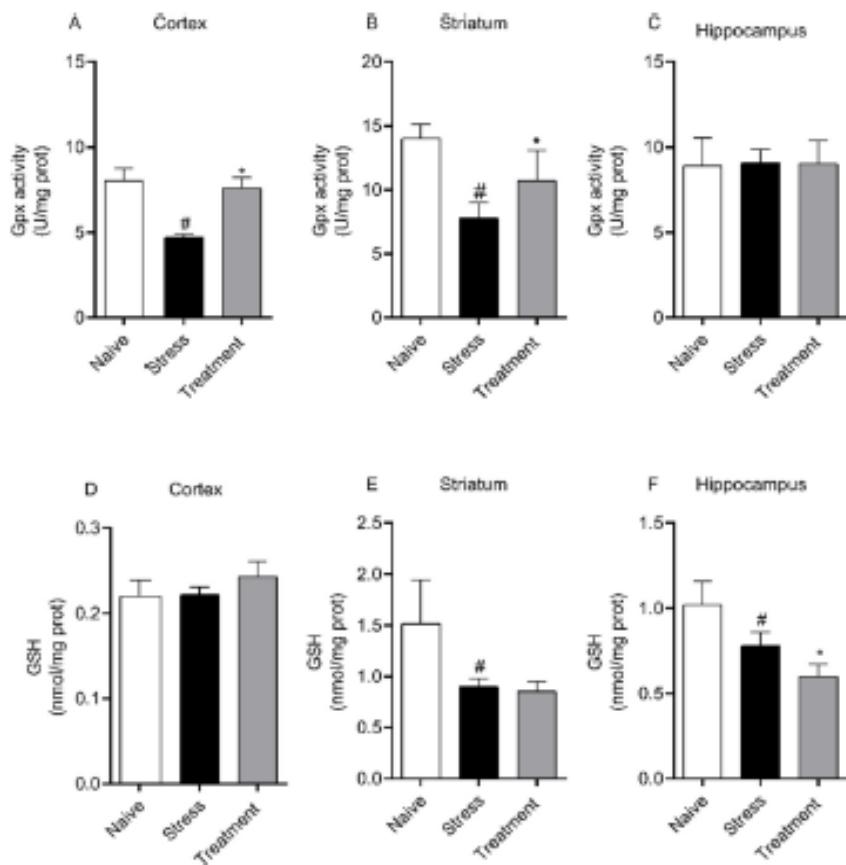


Fig. 4. Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in mouse brain regions: cortex (A and D), striatum (B and E), and hippocampus (C and F). Groups: no stress (Naive), stress (Stress), and stress treated with a 20-hydroxyecdysone-enriched fraction at 30 mg/kg (Treatment). \*\*P < 0.01 and \*P < 0.05 indicate significant difference between the Naive and Stress groups. \*P < 0.05 indicates significant difference between the Stress and Treatment groups by one-way ANOVA followed by Dunnett's test.



**Fig. 5.** Glutathione peroxidase (GPx) enzymatic activity and reduced glutathione (GSH) concentration in mouse brain regions cortex (A and D), striatum (B and E), and hippocampus (C and F). Groups: no stress (Naive), stress (Stress), and stress treated with a 20-hydroxyecdysone-enriched fraction at 30 mg/kg (Treatment). \* $P < 0.05$  indicates significant difference between the Naive and Stress groups. # $P < 0.05$  indicates significant difference between the Stress and Treatment groups by one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

the cortex or hippocampus.

As shown in Fig. 5A-C, we observed a decrease in GPx activity in the cortex and striatum of stressed animals compared with naive mice, but no difference was detected in the hippocampus; importantly, treatment with the 20E-EF was able to prevent this decrease. The concentration of GSH decreased in the striatum and hippocampus of stressed mice as opposed to naive mice, while no difference was observed in the cortex (Fig. 5D-F). In contrast to GPx, 20E-EF treatment did not prevent this decrease.

As shown in Fig. 6A-C, lipid peroxidation was increased in the striatum and cortex following acute stress, but no difference was observed in the hippocampus. Again, treatment with 20E-EF could prevent the above increase. The concentration of sulfhydryl groups decreased in the cortex and striatum of stressed animals in comparison with naive mice, but not in the hippocampus (Fig. 6D-F). Here, too, treatment with 20E-EF prevented the above decrease.

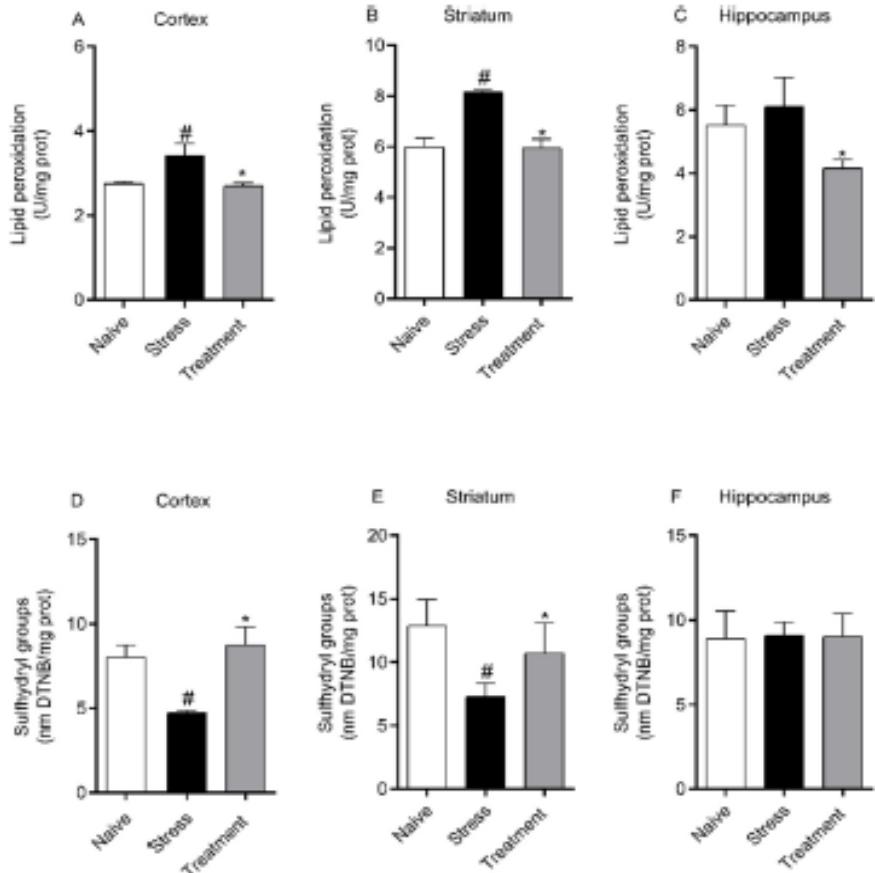
As shown in Fig. 7A-C, we observed a decrease in antioxidant potential of the striatum and hippocampus but not in the cortex of stressed animals. This decrease could be prevented by 20E-EF treatment. The concentration of  $\text{NO}^{3-}/\text{NO}^{2-}$  decreased in the cortex, striatum, and hippocampus of stressed animals in comparison with naive mice (Fig. 7D-F). In this case, treatment with 20E-EF prevented the increase in the striatum, but not in the cortex or hippocampus.

#### 4. Discussion

Our study focused on the frontal cortex, hippocampus, and striatum due to their importance in maintaining normal brain function (Morrone et al., 2016). During behavioral adaptation, the frontal cortex is responsible for making decisions (Rushworth et al., 2011); whereas the striatum controls cognition, learning, and motivated behavior (Macpherson and Hikida, 2019). The hippocampus enables the acquisition of new memories linked either to events or places (Cheng and Frank, 2008). Several studies have shown that these regions are responsible for anxiety (Pandya et al., 2009), depression (Pandya et al., 2012), and stress behaviors (Morrone et al., 2016) in different situations, and are heavily affected or even triggered by oxidative stress (Floyd and Hensley, 2002).

Treatment with the 20E-EF at 30 mg/kg reduced the number of crossing events in the open-field experiment, indicating a decrease in stress behavior, and promoted significant shortening of immobility time in the forced swimming experiment, indicating a reduction in depressive-like behaviors and a protective role of the 20E-EF (Butterweck et al., 2000). The increase in time spent in the periphery of the box in the open-field experiment or in the open arms in the plus maze experiment suggests a protective effect toward anxiety development (da Silva Oliveira et al., 2014).

Our results differ from those obtained by De-Paris et al. (2000), whereby the authors indicated that the crude hydroethanolic extract of *P. glomerata* roots did not reduce stress, anxiety, and depressive



**Fig. 6.** Levels of lipid peroxidation and total sulfhydryl groups in mouse brain regions cortex (A and D), striatum (B and E), and hippocampus (C and F). Groups: no stress (Naive), stress (Stress), and stress treated with a 20-hydroxyecdysone-enriched fraction at 30 mg/kg (Treatment). \* $P < 0.05$  indicates significant difference between the Naive and Stress groups. \*\* $P < 0.05$  indicates significant difference between the Stress and Treatment groups by one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

behavior. These opposing results can be explained by our use of an enriched fraction of 20E, which contained a higher amount of this compound, thus suggesting the need for a minimum concentration of 20E to elicit a dose-response event.

Oral treatment with 20E-EF decreased locomotor activity, promoting a protective effect against stress. It also shortened the time spent in the center of the field and lowered the number of stools, indicating anxiolytic effects. 20E can act as a positive allosteric modulator of the GABA<sub>A</sub> receptor, stimulating GABAergic inhibition in the cortical neurons of rats, which can trigger an anxiolytic effect (Tsujiyama et al., 1995). De-Paris et al. (2000) showed that animals treated with the crude extract of *P. glomerata* were partially protected from convulsions, possibly indicating more specific effects on the GABA system. GABA is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system of mammals (Watanabe et al., 2002); it generates relaxing, anti-anxiety, and anti-convulsant effects through the activation of the GABA<sub>A</sub> receptor (Foster and Kemp, 2006).

Other studies have also demonstrated the neuroprotective potential of *P. glomerata* roots. For example, Marques et al. (2004) reported that the ethanolic extract partially reversed age-induced memory and learning deficits in mice. Subsequently, Wang et al. (2014) described how 20E prevented apoptosis of neurons and astrocytes, and played a key role in improving cognitive impairment in a cerebral ischemia gerbil model, thus providing new perspectives to combat ischemic stroke. At the same time, Xia et al. (2014) indicated that 20E had a protective role in fighting memory deficits in diabetic rats, possibly by enhancing

antioxidant capacity in the brain. These findings support the consistent trend between behavioral effects and benefits of *P. glomerata* or 20E on biomarkers of oxidative stress.

Specifically, treatment with the 20E-EF promoted an increase in antioxidant defenses compared with animals from the stressed group. Previously, Hu et al. (2012) showed the effects of 20E against cerebral ischemia injury in mice, which inhibited the production of ROS/RNS and modulated the signal transduction pathways induced by oxidative stress. During emotional or physiological stress, the antioxidant defenses of cells can change depending on the intensity of the stimulus (Mumtaz et al., 2018). When, ROS production exceeds the cell's endogenous antioxidant capacity, oxidative stress ensues (Halliwell, 2007).

Among the brain regions analyzed, the cortex and striatum showed higher antioxidant enzymatic activities (catalase, SOD, and GPx), higher antioxidant potential (sulfhydryl groups, antioxidant capacity, and GSH), and lower concentrations of oxidative markers (lipid peroxidation) in treated animals. This finding indicates that the 20E-EF performs adaptogenic activity under acute stress situations and mainly in the striatum. They decrease stress, increase physical endurance, and aim to maintain or reduce age-related disorders, such as tiredness and loss of memory and attention (Mendes and Carlini, 2007).

Here, 20E-EF stimulated also the production of NO in the striatum but reduced its output in other regions of the brain. The increase in NO can be explained by the presence of 20E, which favors the production of this gas in animal tissues (DeLallo et al., 2015). NO is related to different biological activities in the body, and has been identified as a retrograde

Souza, Tamiris Alves and Mário Machado Martins, from the Federal University of Uberlândia, for standardizing some experiments. The authors would also like to thank PROPP-UFGU and REBIR-UFGU for supplying animals, infrastructure, and services. This study was supported by grants from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ). The fellowships from CNPQ, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) are also acknowledged.

## References

- Akimenov, M.Y., Markenberry, W.B., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 302 (2–3), 141–145.
- Almeida, I., Díazman, E., Matos, G., Toledo, F., Reusig, A., Vicentini, V., 2017. In vivo antiamnesic activity of the medicinal plant *Pfaffia glomerata* (Brazilian ginseng) and Gingko biloba. *Genet. Mol. Res.* 16 (3).
- Ambruso, G., Wirth, D., Joseph, J.F., Mazzarino, M., de la Torre, X., Boite, P., Parr, M.K., 2020. How reliable is dietary supplement labelling?—experiences from the analysis of ecdysterone supplements. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 177, 113877.
- Bardeos, J.R., Pergola, T.A., 2016. The interactive effect of cognitive fusion and experiential avoidance on anxiety, depression, stress and posttraumatic stress symptoms. *Journal of Contextual Behavioral Science* 5 (1), 1–6.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1–2), 248–254.
- Butterweck, V., Jürgensleim, G., Nahrstedt, A., Winterhoff, H., 2000. Flavonoids from Hypericum perforatum show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med.* 66, 3–6, 61.
- Carmon, A.C., Ortega, Z., Palmeiro, J., Fogaca, M.V., Aguiar, D.C., Diaz-Alonso, J., Ortega-Gutiérrez, S., Vázquez-Villa, H., Moreira, F.A., Guzmán, M., 2013. The anxiolytic effect of camassolol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16 (8), 1407–1419.
- Carlén, E.A., 2003. Plants and the central nervous system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75 (3), 501–512.
- Cheng, S., Frank, L.M., 2008. New experiences enhance coordinated neural activity in the hippocampus. *Neuron* 57 (2), 303–313.
- da Silva Oliveira, G.Z., Cavalcanti, L.M.P., Santos-Magalhães, N.S., Rolim, H.M.L., de Freitas, R.M., 2014. Development and evaluation of liposomal formulation containing mirodinopine on anxiolytic activity in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 116, 64–68.
- De-Páris, F., Neves, G., Salgueiro, J., Quevedo, J., Izquierdo, I., Rates, S., 2000. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 73 (1–2), 261–269.
- Delallo, L.J., Dion, S.M., Bootz, A.M., Smith, W.A., 2015. Direct effects of hypoxia and nitric oxide on ecdysone secretion by insect prothoracic glands. *J. Insect Physiol.* 76, 56–66.
- Dobrek, I., 2019. The outline of stress pathophysiology and pharmacodynamic action of plant-based entrapases-adaptogens. *Pol. Merkur. Lek.: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego* 46 (273), 103.
- Dholakia, E., Grabauskiene, I., Kostic, V., 2015. Why is nitric oxide important for our brain? *Front. Neurosci.* 30 (3), 159.
- Fenner, R., Zimmer, A.R., Neves, G., Ellermann, M., Goennen, G., Rates, S.M., 2008. Hypnotic effect of ecdysterone isolated from *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18 (2), 170–176.
- Floyd, R.A., Henley, K., 2002. Oxidative stress in brain aging: implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* 23 (5), 795–807.
- Forster, A.C., Kemp, J.A., 2006. Glutamate-and GABA-based CNS therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6 (1), 7–17.
- Franco, R.R., Alves, V.H.M., Zabitsky, L.F.R., Justino, A.B., Martins, M.M., Sartori, A.I., Gorham, L.R., Espindola, F.S., 2020a. Antidiabetic potential of *Bauhinia forficata* Link leaves: a non-toxic source of lipase and glycoside hydrolase inhibitors and molecules with antioxidant and anticyclic properties. *Biomed. Pharmacother.* 123, 109798.
- Franco, R.R., Zabitsky, L.F.R., de Lima Júnior, J.P., Alves, V.H.M., Justino, A.B., Sartori, A.I., Gorham, L.R., Espindola, F.S., 2020b. Antidiabetic effects of *Syzygium cumini* leaves: a non-harmful plant with potential against process of oxidation, glycation, inflammation and digestive enzymes catalysis. *J. Ethnopharmacol.* 113132.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35 (5), 1147–1150.
- He, J., Luo, C.X., Chu, W.H., Shan, Y.A., Qian, Z.-M., Zhu, G., Yu, Y.B., Feng, H., 2012. 20-Hydroxyecdysone protects against oxidative stress-induced neuronal injury by scavenging free radicals and modulating NF- $\kappa$ B and JNK pathways. *PLoS One* 7 (12), e50764.
- Hunyadi, A., Herke, I., Lengyel, K., Báthori, M., Kele, Z., Simon, A., Tóth, G., Szendrei, K., 2016. Ecdysteroid-containing food supplements from *Cyanotis arachnoidea* on the European market: evidence for spinach product counterfeiting. *Sci. Rep.* 6, 37322.
- Justino, A.B., Barbosa, M.P., Neves, T.V., Silva, H.C.G., da Silva Brum, E., Falho, M.P.P., Costa, A.C., Sartori, A.I., Arão, V.d.M.R., Oliveira, S.M., 2020. Stephalagine, an aporphine alkaloid from *Annona crassifolia* fruit peel, induces antinociceptive effects by TRPA1 and TRPV1 channels modulation in mice. *Bioorg. Chem.* 96, 103562.
- Justino, A.B., Pereira, M.N., Peixoto, L.G., Vilela, D.D., Caixeta, D.C., de Souza, A.V., Teixeira, R.L., Silva, H.C.G., de Moraes, F.R.L., Morais, I.B., 2017. Hepatoprotective properties of a polyphenol-enriched fraction from *Annona crassifolia* mart. fruit peel against diabetes-induced oxidative and nitrosative stress. *J. Agric. Food Chem.* 65 (22), 4428–4438.
- Kaur, P., Makaranda, V.O., Arora, R., Singh, B., Arora, S., 2017. Immunopotentiating significance of conventionally used plant adaptogens as modulators in biochemical and molecular signalling pathways in cell mediated processes. *Biomed. Pharmacother.* 95, 1815–1829.
- Macpherson, T., Hildick, T., 2019. Role of basal ganglia neurodegeneration in the pathology of psychiatric disorders. *Psychiatr. Clin. Neurosci.* 73 (6), 289–301.
- Mao, M., Kubera, M., Obuchowiczka, E., Goehler, L., Brauner, J., 2011. Depression's multiple comorbidities explained by (neuro) inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. *Neuroendocrinol. Lett.* 32 (1), 7–24.
- Marques, L.C., 1991. Avaliação da ação adaptogênica das raízes de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen-Ananthescaea. Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.
- Marques, L.C., Galvão, S.M.P., Espíndola, E., Dias, R.P., Mattel, R., Oliveira, M.G.M., de Araújo Carlini, E.L., 2004. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extract ENT-06) in rodents. *Phytther. Res.* 18 (7), 566–572.
- Mendes, F.R., Carlini, E.A., 2007. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 109 (3), 493–500.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5 (1), 63–71.
- Morone, M.D.S., Schmitz, C.E., Behr, G.A., Gasparotto, J., Bertolini, R.C., Moreira, K.S., Bittencourt, L., Zanotto-Ribeiro, A., Gelati, D.P., Moreira, J.C.F., 2016. Oral administration of curcumin relieves behavioral alterations and oxidative stress in the frontal cortex, hippocampus, and striatum of ovariectomized Wistar rats. *J. Nutr. Biochem.* 32, 181–188.
- Murntaz, P., Khan, M.E., Zubair, M., Dehpuri, A.R., 2018. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model—a comprehensive review. *Biomed. Pharmacother.* 108, 1205–1222.
- Pandya, A., 2009. Adult disaster psychiatry. *Focus* 7 (2), 155–159.
- Pandya, A., Altinay, M., Malone, D.A., Anand, A., 2012. Where in the brain is depression? *Curr. Psychiatr. Rep.* 14 (6), 634–642.
- Panossian, A., Wikman, G., 2010. Effects of adaptogens on the central nervous system and the molecular mechanisms associated with their stress—protective activity. *Pharmacological Sciences* 3 (1), 188–224.
- Pierucci, M., Galati, S., Valentino, M., Di Matteo, V., Benigno, A., Piruzzelli, A., Muscat, R., Di Giovanni, G., 2011. Nitric oxide modulation of the basal ganglia circuitry: therapeutic implication for Parkinson's disease and other motor disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 10 (7), 777–791.
- Rangan-Shaw, S., Nilai, M., Ahmad, N., 2006. Dose translation from animal to human studies revisited. *Pharm. J.* 22 (3), 659–661.
- Rushworth, P., McNamee, P., Beemster, D., E., Walton, E., M., Behrens, E., T., 2011. Frontal cortex and reward-guided learning and decision-making. *Neuron* 70 (6), 1054–1069.
- Takács-Coleman, A.E., Patti, G.L., Zaini, K.A., Zager, A., Carvalho, R.C., Borod, A.R., Ceccon, L.M., Berro, I.P., Tufik, S., Andersen, M.L., 2013. Short-term social isolation induces depressive-like behaviour and reinstates the retrieval of an aversive task: mood-congruent memory in male mice? *J. Psychiatry Neurosci.: JPN* 38 (4), 259.
- Teixeira, R.L., de Souza, A.V., Peixoto, L.G., Machado, H.L., Caixeta, D.C., Vilela, D.D., Baptista, N.B., Franco, C.R., Espindola, F.S., 2017. Royal jelly decreases corticosterone levels and improves the brain antioxidant system in restraint and cold stressed rats. *Neurosci. Lett.* 655, 179–185.
- Tsuruyama, S., Ujihara, H., Ishihara, K., Sato, M., 1995. Potentiation of GABA-induced inhibition by 20-hydroxyecdysone, a neurosteroid, in cultured rat cortical neurons. *Jpn. J. Pharmacol.* 68 (1), 133–136.
- Uddin, M.S., Al Mamun, A., Kabir, M.T., Jakaria, M., Mathew, B., Barreto, G.E., Ashraf, G.M., 2019. Nootropic and anti-Alzheimer's actions of medicinal plants: molecular insight into therapeutic potential to alleviate Alzheimer's neuropathology. *Mol. Neurobiol.* 56 (7), 4925–4944.
- Vigo, C., Narita, E., Nakamura, C., Marques, L., 2003. Avaliação dos efeitos das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen sobre o tempo de sono e crescimento bacteriano. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 13, 14–17.
- Wang, W., Wang, T., Feng, W.-Y., Wang, Z.-Y., Cheng, M.-S., Wang, Y.-J., 2014. Ecdysone protects gerbil brain from temporal global cerebral ischemia/reperfusion injury via preventing neuron apoptosis and deactivating astrocytes and microglia cells. *Neurosci. Res.* 81, 21–29.
- Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tazayama, T., Hayashi, H., 2002. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int. Rev. Cytol.* 213, 3–47.
- WHO, 2017. World Health Organization: Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. World Health Organization.
- Xia, X., Zhang, Q., Liu, R., Wang, Z., Tang, N., Liu, F., Huang, G., Jiang, X., Gui, G., Wang, L., 2014. Effects of 20-hydroxyecdysone on improving memory deficits in

- streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 740, 45–52.
- Zandlai, T., Biojone, C., Moreira, F., Guimaraes, F.S., Joca, S.R.L., 2010. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 59 (1), 123–128.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16 (2), 109–110.