

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
Programa de Pós-graduação em Ciências em Saúde

**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE
NOOTRÓPICA E TOXICIDADE DO EXTRATO
BRUTO DE *Cnidoscolus urens* (L.) ARTHUR
(EUPHORBIACEAE)**

VALFRAN DA SILVA LIMA

Sinop, Mato Grosso
Dezembro, 2023

VALFRAN DA SILVA LIMA

**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE
NOOTRÓPICA E TOXICIDADE DO EXTRATO
BRUTO DE *Cnidoscolus urens* (L.) ARTHUR
(EUPHORBIACEAE)**

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Luz Emerick

Coorientadora: Profa. Dra. Valéria Dornelles Gindri Senhorin

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Sinop, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Saúde.

Sinop, Mato Grosso
Dezembro, 2023

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

L732a Lima, Valfran da Silva.

Avaliação da potencial atividade nootrópica e toxicidade do extrato bruto de *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur (Euphorbiaceae) [recurso eletrônico] / Valfran da Silva Lima. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 116 f., il. color., pdf). -- 2023.

Orientador: Guilherme Luz Emerick.

Coorientador: Valéria Dornelles Gindri Senhorin.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde, Sinop, 2023.

Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.

Inclui bibliografia.

1. Memória. 2. Toxicidade. 3. Colinesterases. I. Emerick, Guilherme Luz, *orientador*. II. Senhorin, Valéria Dornelles Gindri, *coorientador*. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS EM SAÚDE
FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE NOOTRÓPICA E TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DE *Cnidocolus urens* (L.) Arthur EUPHORBIACEAE

AUTOR (A): MESTRANDO (A) VALFRAN DA SILVA LIMA

Dissertação defendida e aprovada em **01 de dezembro de 2023**.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

1. **Doutor(a)** Guilherme Luz Emerick (Orientador(a))
INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso
2. **Doutor(a)** Guilherme Luz Emerick (Presidente Banca)
INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso
3. **Doutor(a)** Márcia Queiroz Latorraca (Examinador(a) Externo(a))
INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso
4. **Doutor(a)** Farah Maria Drumond Chequer Baldoni (Examinador(a) Externo(a))
INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de São João del-Rei
5. **Doutor(a)** Michel Leandro de Campos (Examinador(a) Suplente)
INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso
6. **Doutor(a)** Vinícius Pereira Arantes (Examinador(a) Suplente)
INSTITUIÇÃO: Centro Univesitário -Unifatecie

Sinop, 01/12/2023.



Documento assinado eletronicamente por **GUILHERME LUZ EMERICK, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 06/12/2023, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Farah Maria Drumond Chequer Baldoni**, **Usuário Externo**, em 12/12/2023, às 08:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARCIA QUEIROZ LATORRACA**, **Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 12/12/2023, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6376950** e o código CRC **83D1C14F**.

Dedico ao meu pai Valfredo e, em especial, a minha mãe Rita que por diversas vezes abriu mão dos seus próprios sonhos para concretizar os meus, a minha doce e amada irmã Ritane Rose que foi meu braço direito no desenvolver e concluir desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente ao meu Criador, Salvador, Consolador e Mantenedor (Deus) que fez nascer em meu coração o desejo de fazer parte do meio científico e providenciou os meios para que esse sonho se tornasse possível, sendo o provedor de minhas necessidades em todos os âmbitos da minha vida. Deus é Bom o tempo Todo!!!

Agradeço, a minha mãe Rita que enxergou o meu potencial quando pequenininho e desde então tem me apoiado, ajudado, sendo cúmplice em minhas escolhas, renunciando ao seu bem-estar para me tornar um cidadão valoroso, te amo mãe!

Agradeço, a minha irmã Ritane Rose que esteve ao meu lado desde o início da concepção do trabalho, me ajudou na coleta do material botânico, no preparar dos extratos, foi minha aluna de Iniciação Científica, lavou muitas caixas de maravalha para manter o bem-estar dos animais, segurou minha mão por vezes nos momentos de dificuldades, enfim, não existem palavras para expressar minha gratidão.

Agradeço, a meu grande e eterno amigo, se não um superpai Jhannes Marcos, pelos ensinamentos preciosos a mim direcionados quando passávamos as madrugadas fazendo pesquisa, desenvolvendo técnicas, viajando nas reações bioquímicas, o homem mais reto, justo e honesto que eu conheço. Tudo que sou e o que eu de ser na minha vida de academia devo ao seu companheirismo e inspiração. Te amo pra caramba amigo!

Agradeço, ao meu amigo Érico Satélis quem me incentivou a fazer o ENEM, fez minha matrícula na faculdade, me deu o primeiro teto para morar aqui em Sinop e esteve sempre no meu rol de amigos especiais, se hoje sou enfermeiro, esse mérito é seu, Gratidão!!!

Agradeço, a profa. Dr. Valéria Dornelles que foi a minha primeira orientadora de iniciação científica, me abriu as portas de seu laboratório, me moldou, despertou meu amor pela pesquisa e me deu excelentes frutos, frutos esses que abrilhantam o meu currículo e suas preciosas orientações enquanto minha coorientadora nesse processo rumo ao título de mestre.

Agradeço, a profa. Dr. Pacífica Cavalcanti que durante minha graduação foi muito mais que uma professora e orientadora, foi minha amiga, minha mãe e por muitas vezes supriu minhas necessidades básicas, profa. amada, nunca me esquecerei de ti, fica aqui expressa a minha eterna gratidão.

Agradeço, a meu orientador prof. Dr. Guilherme Luz Emerick por sua sensatez, ética, empatia, humanidade, profissionalismo, competência e diversos outros atributos que não são traduzidos em palavras. Gratidão por acreditar e assumir a postura de fazer o possível e o impossível para me “orientar” e redirecionar meu futuro na academia. Tenha certeza de que se

hoje eu retornei ao sonho de lutar pelo título de doutor e permanecer na academia enquanto professor e pesquisador é porque desde o primeiro contato que tivemos após o meu desligamento do programa, em suas sábias palavras, encontrei inspiração, acolhimento e motivação para continuar. Escrevo essas palavras em lágrimas e oro ao meu Criador e Redentor pela sua vida, para que continue a inspirar outros. Louvado seja Deus pela sua vida e existência mais que necessária.

Agradeço, ao prof. Dr. Ricardo de Oliveira pela contribuição nesta pesquisa, a professora Dr. Vanessa Raia pelo delineamento estatístico e a profa. Dr. Carla R. Andrighetti por ceder seu laboratório, reagentes, equipamentos e seu tempo na orientação e realização da extração e triagem química da planta em estudo, ao meu amigo e excelente fotógrafo Felipe Weissaupt pelo empenho em fotografar meu experimento, editar fotos e até a criação do campo aberto redondo, fica aqui minha eterna gratidão.

Agradeço, aos meus ex. patrões e amigos Cristina Derré e Marcelo Naves por saber o quando era importante para meu crescimento esse título de Mestre, foram compreensivos ao flexibilizar meus horários de trabalho para que fosse possível conciliar minha vida profissional a vida acadêmica, agradeço ao exemplo de excelentes profissionais que ambos são, sem dúvida alguma vocês são os meus espelhos dentro da área da saúde.

Agradeço, a UFMT *campus* de Sinop por fomentar a bolsa de iniciação científica da minha aluna (IC) e ceder as suas dependências em específico ao Núcleo de Pesquisa e Apoio Didático em Saúde (NUPADS) onde realizei minha pesquisa e aos técnicos de laboratório envolvidos.

Agradeço, as pessoas amigas que de alguma forma se fazer presentes em minha vida me apoiando em cada passo do caminho: Michelly Paniago, Elder e Juranda Stanghilin, Lucinéia Albiero (meu exemplo de Lattes), Patrícia Leandro, Flávia D. Rodrigues, Tatiane Cordeiro e Débora Linsbiski, fica aqui a minha eterna gratidão.

Agradeço, aos parceiros científicos Bruna Francisquete Costa, Vitoria Hioko da Silva Nakamura, Juliandra Spagnol Bonache, Dayana Veruska Lentz, Marion Ehrich, Marina Mariko Sugui, Luisa Del Carmen Barrett Reina, Júlio Onésio Ferreira Melo, Elvio Mora Junior, Francielly Rieger Silveira e Amanda Lika Mizuno Saito, vocês foram primordiais ao sucesso deste trabalho.

Agradeço, aos membros da banca examinadora os Prof. Dr. Júlio Cezar de Oliveira, Michel Leandro de Campos e Vinicius Pereira Arantes e as Profa. Dra. Nadia Aléssio Velloso, Carla Regina Andrighetti, Farah Maria Drumond Chequer Baldoni e Márcia Queiroz Latorraca

que contribuíram significativamente para o aprimoramento dessa dissertação e delineamentos para o futuro desta pesquisa.

Agradeço, por fim, porém não menos importante, ao meu cachorrinho Locke, que todas as vezes independente do horário que eu estivesse escrevendo esse trabalho, estava comigo em meu escritório deitado em meu colo, às vezes prestando atenção na tela do PC e sendo minha dose diária de endorfina, te amo tanto que chega doer meu doguinho.

"Não existe vento favorável para o marinheiro que não sabe onde deseja ir"

(SÊNECA, Séc. I)

RESUMO

Estima-se que até 2030, a população global com idade superior a 65 anos alcançará 1 bilhão, correspondendo a 12% da população total. Essa mudança demográfica traz consigo desafios socioeconômicos e de saúde pública, dado o aumento das doenças relacionadas à idade, como a doença de Alzheimer. As opções de tratamentos paliativos atuais para essa patologia consistem em fármacos químicos dotados de efeitos adversos, e por esse motivo faz-se necessário o estudo de novas alternativas farmacológicas eficientes, de fácil acesso e com menor incidência de efeitos adversos. *Cnidocolus urens* (L.) Arthur (Euphorbiaceae) é uma planta nativa de várias regiões do Brasil. Essa espécie é utilizada pela população em geral para o tratamento de muitas condições patológicas e pesquisas voltadas à elucidação de suas propriedades farmacológicas se tornam indispensáveis. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil químico, a potencial atividade nootrópica e o perfil toxicológico do extrato bruto de *C. urens* em camundongos *Swiss* com déficit cognitivo induzido por escopolamina. Para alcançar tais objetivos, foi realizada a análise fitoquímica preliminar, empregando o método de cromatografia em camada delgada e a análise do perfil químico por *Paper Spray*. Para avaliar a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) e calcular a concentração que inibe 50% da atividade (IC₅₀), seguimos o protocolo baseado no método de Ellman com algumas modificações próprias implementadas durante a padronização das técnicas. A avaliação da toxicidade oral *in vivo* de uma única dose administrada, foi realizada através do protocolo OECD 423. As memórias aversiva, social e declarativa, assim como os efeitos centrais do extrato etanólico bruto de *C. urens*, foram avaliados por meio dos testes de esQUIVA inibitória do tipo *Step-down*, testes de reconhecimento social e de objetos, e teste de locomoção espontânea, respectivamente. Ficou evidente no presente trabalho que o extrato etanólico bruto de *C. urens* possui flavonoides, taninos e terpenos em sua composição. O perfil de inibição do extrato de *C. urens* foi evidenciado através da IC₅₀ da amostra eritrocitária da atividade da enzima AChE de 0,004652 (g/mL); e IC₅₀ da amostra plasmática de BChE 0,003984 (g/mL). Devido a inexistência de morte ou sinais de maior significância, o extrato recebeu a classificação 5 de acordo o protocolo OECD nº 423, sendo a DL₅₀ superior a 2000 mg/kg, mostrando perfil toxicológico desejável. Ainda, o extrato bruto de *C. urens* não alterou os parâmetros comportamentais de locomoção espontânea, memória aversiva, social e declarativa de camundongos *Swiss* com déficit cognitivo induzido por escopolamina. Embora a limitação do modelo escolhido não nos permita inferir que o extrato etanólico bruto de *C. urens* possa ter potencial para o tratamento futuro da Doença de Alzheimer, o perfil químico e a inibição da atividade das enzimas AChE e BChE (uma das frentes de tratamento atual da doença) nos encorajam a prosseguir com a purificação do extrato, identificação das novas moléculas responsáveis por tais resultados, adotar um protocolo específico para a Doença de Alzheimer e aumentar o tempo de tratamento empregado, nos direcionando a novas investigações.

Palavras-chave: Memória; toxicidade; colinesterases.

ABSTRACT

It is estimated that by 2030, the global population aged over 65 will reach 1 billion, accounting for 12% of the total population. This demographic shift brings socio-economic and public health challenges due to the increasing prevalence of age-related diseases such as Alzheimer's disease. Current palliative treatment options for this condition consist of chemical drugs with adverse effects, hence the need for studying new pharmacological alternatives that are efficient, easily accessible, and have lower incidence of adverse effects. *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur (Euphorbiaceae) is a plant native to various regions of Brazil. This species is commonly used by the general population for the treatment of many pathological conditions, making research to elucidate its pharmacological properties indispensable. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the chemical profile, potential nootropic activity, and toxicological profile of the crude extract of *C. urens* in *Swiss* mice with scopolamine-induced cognitive deficit. To achieve these objectives, preliminary phytochemical analysis was conducted using thin-layer chromatography method and chemical profile analysis by *Paper Spray*. To evaluate the activity of the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) and calculate the concentration that inhibits 50% of the activity (IC_{50}), we followed a protocol based on the Ellman method with some modifications implemented during technique standardization. The assessment of in vivo oral toxicity of a single administered dose was performed using the OECD 423 protocol. Aversive, social, and declarative memories as well as central effects of the crude ethanolic extract of *C. urens* were evaluated through *step-down* inhibitory avoidance tests, social and object recognition tests, and spontaneous locomotion test, respectively. It was evident in this study that the crude ethanolic extract of *C. urens* contains flavonoids, tannins, and terpenes in its composition. The inhibition profile of the *C. urens* extract was evidenced by the IC_{50} of the erythrocyte sample of AChE enzyme activity of 0.004652 (g/mL); and IC_{50} of the plasma sample of BChE 0.003984 (g/mL). Due to the absence of death or signs of greater significance, the extract received a classification 5 according to the OECD no. 423 protocol, with LD_{50} greater than 2000 mg/kg, showing a desirable toxicological profile. Furthermore, the crude extract of *C. urens* did not alter the behavioral parameters of spontaneous locomotion, aversive, social, and declarative memory of *Swiss* mice with scopolamine-induced cognitive deficit. Although the limitation of the chosen model does not allow us to infer that the crude ethanolic extract of *C. urens* may have potential for future treatment of Alzheimer's disease, the chemical profile and inhibition of AChE and BChE enzyme activity (one of the current treatment approaches for the disease) encourage us to proceed with the purification of the extract, identification of new molecules responsible for such results, adopt a specific protocol for Alzheimer's disease, and extend the treatment time employed, directing us towards further investigations.

Keywords: Memory; toxicity; cholinesterases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comparação de um neurônio normal com neurônio afetado pela DA	19
Figura 2 – Espécime de <i>C. urens</i>	26
Figura 3 – Localização geográfica do ponto de coleta das amostras	29
Figura 4 – Exsicata para identificação botânica e registro de tombo da amostra vegetal	30
Figura 5 – Material vegetal triturado	31
Figura 6 – Rotaevaporação do extrato	31
Figura 7 – Preparo das amostras de sangue para dosagem das colinesterases	35
Figura 8 – Ilustração do teste de campo aberto monitorado	38
Figura 9 – Ilustração do teste de reconhecimento de objetos monitorado	39
Figura 10 – Ilustração da disposição dos objetos nas duas fases do teste	39
Figura 11 – Ilustração do teste de reconhecimento social	40
Figura 12 – Ilustração do teste de esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i> monitorado	41
Figura 13 – Espectrograma <i>PS-MS</i> no modo de ionização negativo	45
Figura 14 – Espectrograma <i>PS-MS</i> no modo de ionização positivo	45
Figura 15 – Curva padrão de proteína	46
Figura 16 – Atividade das colinesterases	47
Figura 17 – Atividade locomotora espontânea nos testes de memória	48
Figura 18 – Reconhecimento de Objetos	50
Figura 19 – Reconhecimento social	51
Figura 20 – Esquiva inibitória do tipo do tipo <i>step-down</i>	52
Figura 21 – Consumo alimentar e hídrico, OECD 423 Machos	59
Figura 22 – Consumo alimentar e hídrico, OECD 423 Fêmeas	59
Figura 23 – Atividade locomotora espontânea nos testes OECD 423	60
Figura 24 – Ganho Ponderal nos testes OECD 423	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos diferentes tipos de memória	22
Tabela 2 – Estudos científicos realizados na família da <i>C. urens</i>	26
Tabela 3 – Análise fitoquímica preliminar	31
Tabela 4 . Esquema para preparação dos pontos da curva analítica de proteína	33
Tabela 5 . Esquema para preparação das amostras para dosagem de proteína	34
Tabela 6 – Esquema para doseamento da atividade das colinesterases	35
Tabela 7 – Resultado da análise fitoquímica preliminar	44
Tabela 8 – Triagem hipocrático OECD 423 Machos e Fêmeas (5 mg/kg)	55
Tabela 9 – Triagem hipocrático OECD 423 Machos e Fêmeas (50 mg/kg)	56
Tabela 10 – Triagem hipocrático OECD 423 Machos e Fêmeas (300 mg/kg)	57
Tabela 11 – Triagem hipocrático OECD 423 Machos e Fêmeas (2000 mg/kg)	58
Tabela 12 – Peso relativo dos órgãos OECD 423 Machos	60
Tabela 13 – Peso relativo dos órgãos OECD 423 Fêmeas	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 A relação entre a longevidade e a importância dos estudos nootrópicos para doenças neurocognitivas.....	17
1.2 A mais prevalente entre as doenças neurocognitivas na população idosa.....	18
1.3 Processos de aprendizado e memória	21
1.4 Papel da acetilcolina e os efeitos da escopolamina nos processos da memória	23
1.5 Piracetam: fármaco usado para a melhora da DA	24
1.6 Plantas medicinais com aplicações nootrópicas	24
1.7 A espécie <i>Cnidoscolus urens</i> (L.) Arthur (Euphorbiaceae): suas características físico-químicas e usos na medicina popular	25
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Acesso ao patrimônio genético.....	29
3.2 Coleta e identificação botânica.....	29
3.3 Preparação dos extratos de <i>C. urens</i>	30
3.4 Análises fitoquímicas dos extratos etanólicos	31
3.5 Análise do perfil químico por <i>paper spray</i> (PS-MS)	32
3.6 Determinação da IC50 das enzimas AChE e BChE.....	33
3.6.1 Determinação de proteínas	33
3.6.2 Técnicas para análise de colinesterases	34
3.7 Aspectos éticos	36
3.8 Obtenção dos animais e aclimação	36
3.9 Tratamento dos animais.....	37
3.10 Teste de locomoção espontânea	37
3.11 Teste de reconhecimento de objetos.....	38

3.12	Teste de reconhecimento social.....	39
3.13	Teste de esquiiva inibitória do tipo step-down.....	40
3.14	Teste de toxicidade in vivo (dose única).....	42
3.15	Consumo alimentar, hídrico e ganho ponderal.....	42
3.16	Análise estatística.....	43
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1	Avaliação química dos extratos etanólicos.....	44
4.2	Análise do perfil químico por <i>paper spray</i> (PS-MS).....	44
4.3	Determinação da IC ₅₀ das enzimas AChE e BChE.....	46
4.3.1	Proteínas.....	46
4.3.2	Atividade das colinesterases.....	46
4.4	Teste de locomoção espontânea.....	48
4.5	Tarefa de reconhecimento de objetos.....	49
4.6	Tarefa de reconhecimento social.....	50
4.7	Teste de esquiiva inibitória do tipo step-down.....	51
4.8	Teste de toxicidade in vivo (dose única).....	52
5.	CONCLUSÃO.....	62
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
7.	ARTIGO.....	72
8.	ANEXOS.....	105
8.1	Anexo A - Acesso ao Patrimônio Genético.....	105
8.2	Anexo B e C – Certificados do comitê de ética animal.....	105
8.3	Anexo D – Parecer Consubstanciado do CEP.....	105

1. INTRODUÇÃO

Na atualidade tem sido constatado o aumento da expectativa de vida e com isso vem a preocupação com doenças relacionadas à terceira idade, e estudos voltados para essa temática têm o intuito de proporcionar a melhora da qualidade de vida nessa etapa. Os fatores que têm contribuído para a longevidade da população mundial são a melhora na qualidade de vida em vários aspectos, tanto sociais quanto os avanços da medicina moderna (HAMDAN, 2017). No entanto, a longevidade muitas vezes vem acompanhada por doenças neurodegenerativas, como é o caso da doença de Alzheimer (DA). Pessoas idosas são mais propensas a desenvolver essa doença, e em média, a partir dos 65 anos, a taxa de incidência é de 10%, sendo ainda maior na idade de 80 anos, com cerca de 40% (SERENIKI; VITAL, 2008).

Estima-se que, em 2050, mais de 25% da população mundial será idosa, aumentando assim a prevalência da doença com cerca de 80 milhões de pacientes com DA no mundo (TORRES et al., 2012). Para atender a essa demanda, tem-se intensificado os estudos relacionados à memória, na busca por medicamentos que melhorem os aspectos da demência como o caso dos nootrópicos. Também chamados de fármacos inteligentes, podem atuar como intensificadores da memória, inteligência, concentração e motivação (CRESPO-BUJOSA; SUÁREZ RODRÍGUEZ, 2019) e agem aumentando a ação dos neurotransmissores, das enzimas e dos hormônios no cérebro. No entanto, os mecanismos de ação destes medicamentos ainda carece de esclarecimentos, e a busca por fitoterápicos tem sido uma opção mais segura e com menor intensidade de efeitos adversos (SCHELTENS et al., 2016).

Nesse contexto, as plantas medicinais são apontadas em vários estudos como possível agente para melhora da memória e na neuroproteção, pois nelas estão presentes os antioxidantes que ajudam a proteger de danos oxidativos (SCHELTENS et al., 2016). Estudos apontam que a geração de radicais livres num cenário de estresse oxidativo tem papel importante no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e os antioxidantes podem ajudar a prevenir esses danos (MÜLLER et al., 2013).

Nesse sentido, a *C. urens*, popularmente conhecida como urtiga cansaço, vem sendo utilizada na medicina popular por suas aplicações anti-inflamatória, antitumoral, antisséptica e para tratar infecções renais, lesões dermatológicas e oftalmológicas, feridas, verrugas, disenteria, hemorragia, apendicite e reumatismo (DE ALMEIDA et al., 2005). A espécie mencionada ainda tem poucos estudos, porém é possível encontrar trabalhos com espécies do mesmo gênero como é o caso da *C. infestus* (extrato metanólico obtido da raiz), no qual foi avaliado o perfil fitoquímico da planta e foram encontrados compostos fenólicos ativos para

neuroproteção (DE ALMEIDA et al., 2005). Em adição (US MEDINA et al., 2019) avaliaram a espécie *C. aconitifolius* (extrato etanólico e aquoso) onde obteve-se uma ação antioxidante e anti-inflamatória. Visto isso, a espécie *C. urens*, que pertence ao mesmo gênero que as espécies citadas, possui potencial a ser explorado na área nootrópica.

Diante da relevância dos estudos nootrópicos e o uso de plantas medicinais com esse propósito, este trabalho se faz necessário e oportuno na tentativa de prospectar novas fontes de compostos que possam atuar como potencial nootrópico, utilizando a espécie *C. urens* na reversão de falta de memória em camundongos que tiveram a exposição ao agente amnésico escopolamina, sendo avaliados parâmetros por meio de testes comportamentais.

1.1 A relação entre a longevidade e a importância dos estudos nootrópicos para doenças neurocognitivas

A média da expectativa de vida tem aumentado significativamente nos últimos anos, resultando no aumento do grupo de pessoas com mais de 65 anos e, ao mesmo tempo, gerando desafios devido às doenças neurodegenerativas (CAZARIM et al., 2016). Os principais motivos que têm propiciado o aumento da expectativa de vida são os fatores relacionados a melhora nas condições de vida e os avanços na área da saúde, como à redução da mortalidade infantil, desenvolvimento de vacinas e antibióticos, hábitos alimentares mais saudáveis, melhora da saúde pública, diminuição da curva populacional, avanço no tratamento e prevenção de doenças cardíacas e cerebrais (ÁVILA; MIOTTO, 2003).

As projeções futuras para a população mundial preveem que a população idosa com idade maior que 65 anos chegará a 1 bilhão até 2030, o equivalente a 12% da população global total. Essa mudança nas características demográficas em direção ao aumento da população idosa apresenta não apenas um revés socioeconômico, mas também um grande desafio para a saúde pública, uma vez que está intimamente associada ao aumento da prevalência de doenças relacionadas à idade, como as demências (SAID-SADIER et al., 2023). A população dessa faixa etária ou mais tendem a ter dificuldades de memória, no domínio da linguagem e coordenação motora. Como consequência, muitas pesquisas têm se voltado para as alterações cognitivas típicas do envelhecimento (ÁVILA; MIOTTO, 2003; BONDI; EDMONDS; SALMON, 2017).

Neste cenário, dentre as doenças neurodegenerativas em decorrência da idade, a DA é a mais prevalente e apresenta difícil diagnóstico na fase inicial, o que acarreta numa diminuição da qualidade de vida dos pacientes e de seus familiares. A DA é uma doença que ainda não tem cura, sendo possível apenas atrasar o seu avanço e seus sintomas (KUMAR; KHANUM, 2012).

Os estudos da neurociência moderna são importantes para compreensão dos circuitos neurais e dos neurotransmissores, pois ajudam a entender as desordens neurológicas e psiquiátricas, sendo uma ferramenta muito importante para o desenvolvimento de terapias direcionadas. Os fármacos inteligentes ou também chamadas de nootrópicas, podem aumentar a atenção, o raciocínio lógico, a criatividade, a atenção e toda a performance cognitiva (ZAAMI et al., 2020).

Fármacos nootrópicos podem ser sintéticos ou naturais, sendo que os naturais englobam plantas, vitaminas, aminoácidos, ácidos graxos, antioxidantes e minerais (CRESPO-BUJOSA; SUÁREZ RODRÍGUEZ, 2019), enquanto que os sintéticos atuam por meio da neurotransmissão colinérgica, dos bloqueadores de GABA, de ativadores de glutamato, de inibidores da colinesterase e de agonistas muscarínicos ou serotoninérgicos (ONAOLAPO; OBELAWO; ONAOLAPO, 2019). São fármacos usados para tratamento das enfermidades mentais (ansiedade, depressão, esquizofrenia, mania, síndrome do pânico, enxaqueca) e neurológicas (Doença de Parkinson, de Huntington e epilepsias) (VALZELLI; BERNASCONI; SALA, 1980).

Vale destacar que os fármacos que afetam o sistema nervoso têm grande influência na vida das pessoas (GUDAITYTĖ; DVYLYS; ŠIMELIŪNAITĖ, 2017). Atualmente, dispõe-se de medicamentos que incrementam a atenção, reduzem ou aumentam o sono, tratam a depressão e outros transtornos de comportamento, além das doenças neurodegenerativas já mencionadas (VALZELLI; BERNASCONI; SALA, 1980).

1.2 A mais prevalente entre as doenças neurocognitivas na população idosa

A DA é uma patologia neurodegenerativa, progressiva e crônica que está relacionada com o avanço da idade. Essa doença afeta aproximadamente 10% dos indivíduos com idade superior a 65 anos e 40% acima de 80 anos. Inicialmente é observada perda progressiva da memória recente e posterior a isso o quadro clínico resulta no comprometimento de funções da linguagem e motoras, gerando, em um paciente de estágio avançado, uma dependência para a realização de atividades diárias, necessitando muitas vezes de cuidadores especializados (SERENIKI; VITAL, 2008). Esses sintomas são frequentemente acompanhados por distúrbios comportamentais, incluindo agressividade, depressão e alucinações (BURNS; ILIFFE, 2009).

No cérebro de uma pessoa com DA é observado, histopatologicamente, a perda maciça sináptica e morte neuronal nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, incluindo o córtex cerebral, o hipocampo, o córtex entorrinal e o estriado, levando a atrofia

cerebral e perda do volume do cérebro (GUO; NOBLE; HANGER, 2017). Para tanto, são observados deposição e a agregação da substância chamada de β -amiloide ($A\beta$) (Figura 01), localizada nas paredes dos vasos sanguíneos, e que quando associadas são os principais componentes que formam as placas senis e o acúmulo de filamentos anormais da proteína Tau e consequente formação de novelos neurofibrilares (NFT) nos neurônios, o que leva a perda neuronal e sináptica, ativação da glia e inflamação (LONG; HOLTZMAN, 2019; SERENIKI; VITAL, 2008).

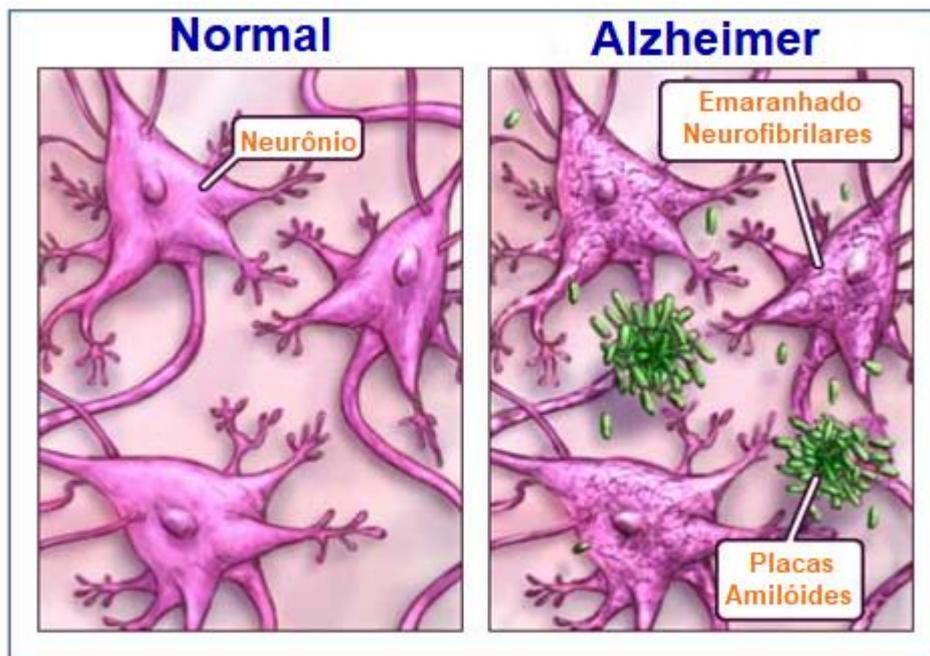


Figura 01 – Comparação de um neurônio normal com neurônio afetado pela Doença de Alzheimer, mostrando formação de placas amiloides e novelos neurofibrilares (LIMA; DECKNIS, 2016).

A $A\beta$ é um peptídeo formado por 37 a 39 aminoácidos produzidos através do processo de proteólise da proteína precursora de amiloide (APP), uma proteína de membrana expressa em diversos tecidos e concentrada nas sinapses dos neurônios. Tem como principal função a formação das sinapses e a neuroplasticidade, no entanto, também forma as placas de amiloide que se encontram no cérebro de pessoas com DA (CHEN et al., 2017). As placas de $A\beta$ podem bloquear a sinalização entre as células nas sinapses e podem ativar as células do sistema imunológico que causam inflamações e fagocitam as células deficientes (WELLER; BUDSON, 2018).

A proteína Tau é responsável pela estabilização, polimerização e modulação dos microtúbulos. Em células nervosas saudáveis, a proteína Tau está associada aos microtúbulos, nos quais sua função é estabilizar essas estruturas pela agregação da tubulina (JOSVIK et al.,

2015). No entanto, em células nervosas doentes, a Tau se converte em filamentos torcidos e em emaranhados, devido a hiperfosforilação, espalhados no corpo celular e nos dendritos. Não conseguindo manter a estrutura original, se rompem e se desintegram, com isso os nutrientes e outros suprimentos essenciais não conseguem mais se movimentar através das células, que acabam morrendo (BRANDT; HUNDELT; SHAHANI, 2005).

A proteína Tau pode ser encontrada na forma solúvel ou insolúvel, esta última é encontrada nos emaranhados neurofibrilares, sendo desencadeada pelo aumento da atividade das tauquinases e das fosfatases. O acúmulo de proteína Tau é cada vez mais reconhecido como a marca neuropatológica de uma série de demências e distúrbios conhecidos como tauopatias (MIETELSKA-POROWSKA et al., 2014).

A progressão e curso da DA podem variar muito, pois as pessoas podem apresentar estágios leve a moderado e geralmente vivem de 2 a 10 anos e, estágio grave podendo viver de 1 a 5 anos (LONG; HOLTZMAN, 2019). O diagnóstico é feito a partir de testes de memória, exames sanguíneos, exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) retirado por punção lombar e exames de neuroimagem (Tomografia por Emissão de Pósitrons PET e imagem de Ressonância Magnética) (SCHIPPER, 2010; TORRES et al., 2012). Ainda há a hipótese que a disfunção no sistema colinérgico é suficiente para levar a DA, dessa forma, as análises de marcadores colinérgicos como a acetiltransferase e a acetilcolinesterase, ajudam nesse diagnóstico e também no tratamento (WELLER; BUDSON, 2018).

Até o momento não existe cura para a DA, no entanto os avanços da medicina têm permitido que os pacientes tenham uma sobrevida maior e uma qualidade de vida melhor (SCHELTENS et al., 2016). Os tratamentos farmacológicos disponíveis atualmente para o tratamento específico da DA são os inibidores das colinesterases (I-ChE), dentre eles podemos destacar o Donepezil, Rivastigmina, Memantina, Galantamina e Tacrina (elevada hepatotoxicidade) (FORLENZA, 2005). No SUS (Sistema Único de Saúde) os medicamentos fornecidos gratuitamente para o tratamento da DA são: Rivastigmina (cápsula de 1,5 mg, 3 mg, 4,5 mg e 6 mg; e frasco de 120 mL – 2 mg/mL), Rivastigmina adesivo transdérmico (5 cm e 10 cm), Donepezila (comprimido de 5 mg e 10 mg) e Galantamina (comprimido de 8 mg, 16 mg e 24 mg) (ABRAZ, 2019). É recomendado também terapias alternativas, pois há evidências científicas que atividades de estimulação cognitiva, social e física beneficiam a manutenção de habilidades preservadas e favorecem a funcionalidade (GARUF et al., 2012).

Os fatores de risco para o desenvolvimento da DA estão relacionados ao fator genético, pois pacientes afetados pela DA têm 50% de chance de ter filhos também afetados pela patologia. Além do componente genético, a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs)

e nitrogênio (ERNs) foram apontadas como um fator para a neurodegeneração (VALZELLI; BERNASCONI; SALA, 1980). A deficiência de vitamina D também foi identificada como um risco independente para o desenvolvimento de demência, e a suplementação é recomendada (KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015).

1.3 Processos de aprendizado e memória

A retenção e evocação de informações aprendidas é chamada memória (LYNCH, 2004) e é considerada um processo complexo que requer a atividade integrada de diferentes regiões do encéfalo e sistemas de neurotransmissão (HU et al., 2005). Já o mecanismo pelo qual novas informações ou conhecimentos são adquiridos é chamado de aprendizado, ou seja, é a aquisição de novas informações, sendo o primeiro estágio da memória (LYNCH, 2004).

O fato das memórias tanto dos animais quanto dos seres humanos serem provenientes de suas experiências, seria mais correto usar o termo “memórias” ou então “processos de memória” do que simplesmente memória, uma vez que podem existir tantas memórias quanto o número de experiências possíveis (IZQUIERDO, 2013).

Atualmente, existem dezenas de diferentes classificações para os processos de aprendizado e memória, podendo ser classificados de acordo com a sua natureza, conteúdo e tempo de retenção. Essas classificações propostas por Izquierdo podem ser observadas na Tabela 1 (IZQUIERDO, 2013).

Quando pensamos em quanto tempo dura a retenção da memória, a literatura relata que em nível celular, o armazenamento da memória de longa duração é associado com síntese de proteínas, expressão gênica e novas conexões sinápticas, por isso inibidores de síntese proteica podem bloquear a formação da memória de longa duração, sem afetar a memória de curta duração (LYNCH, 2004).

Há mais de um século existe a busca pela localização espacial da memória no encéfalo. No início, os pesquisadores traziam o neocórtex como o centro onde os processos cognitivos aconteciam. Nos dias atuais, sabe-se que diversas estruturas encefálicas estão envolvidas com as diferentes etapas da aquisição, consolidação e evocação da memória, tais como o hipocampo, o septo medial, a amígdala, o córtex pré-frontal, o córtex temporal, o estriado e o cerebelo (LENT, 2010). Dentre essas estruturas encefálicas, o hipocampo é considerado o principal componente a exercer um papel crucial nos processos de aprendizado e memória, principalmente nas etapas de consolidação das memórias do tipo declarativa ou explícita em seres humanos e roedores (OTTO; EICHENBAUM, 1992; WANG et al., 2006).

TABELA 1. Classificação dos diferentes tipos de memória quanto à natureza, tempo de retenção e principais características.

Tipos e Características da Memória		
	Tipos e subtipos	Características
Quanto ao tempo de retenção	Ultrarrápida	Duração de frações de segundos a alguns segundos; memória sensorial
	Curta duração	Duração de minutos ou horas, garante o sentido de continuidade do presente
	Longa duração	Duração de horas, dias ou anos, garante o registro do passado autobiográficos e dos conhecimentos dos indivíduos
Quanto a natureza	Explícita	Pode ser descrita por meio de palavras
	Episódica	Tem uma referência temporal, memória de fatos sequenciados
	Semântica	Envolve conceitos atemporais, memória cultural
	Implícita	Não pode ser descrita por meio de palavras,
	De representação percentual	Imagens sem significado conhecido, memória pré-consciente
	De procedimentos	Hábitos, habilidades e regras
	Associativa	Condicionamento clássico e operante
	Não associativa	Habituação ou sensibilização
	Operacional	Permite o raciocínio e o planejamento do comportamento

Legenda: Tipos, subtipos e características da memória.

Fonte: modificado de Izquierdo (2013).

Toda memória implica na mudança de comportamento, podendo ser avaliada somente através dessa mudança, sendo assim, determinadas habilidades ou conhecimentos são adquiridos quando estão sendo utilizados e, portanto, recordados para a realização de uma tarefa ou atividade. Sendo assim, se não é possível medir a evocação, isto é, a alteração do comportamento, não é possível detectar a existência da memória (IZQUIERDO, 1988).

Foi a partir desse pressuposto que surgiu o desenvolvimento de testes visando medir comportamentos específicos, permitindo a avaliação do aprendizado e do estado da memória

em seres humanos. Da mesma forma, a avaliação do aprendizado e memória em animais de laboratório, tendo como principal foco os roedores, é possível através do desenvolvimento de modelos experimentais capazes de detectar aprendizados específicos. Tendo em vista que os animais não são capazes de expressar verbalmente o seu conhecimento e as suas aptidões aprendidas, as mesmas aptidões poderão ser avaliadas através da mudança do seu comportamento (GOLD, 1986).

1.4 Papel da acetilcolina e os efeitos da escopolamina nos processos da memória

A acetilcolina (ACh) demonstra um papel importante no processo de aprendizado e memória e na regulação da transmissão colinérgica envolvidas neste processo. Embora outros neurotransmissores estejam envolvidos no processo cognitivo, o sistema que mais se destaca é o colinérgico. Além disso, foi evidenciado através de pesquisas que o déficit cognitivo observado em doenças neurodegenerativas está associado a uma diminuição da concentração de ACh (BLOKLAND, 1996), como por exemplo, na DA, onde foi observada uma concentração reduzida de ACh no hipocampo e córtex promovida pela degeneração dos neurônios colinérgicos. Devido tal achado, o tratamento com anticolinesterásicos consiste em uma abordagem terapêutica eficaz para o tratamento cognitivo da doença, uma vez que promove a melhora da função cognitiva (PERRY et al., 1999; SAXENA et al., 2008).

A escopolamina é um fármaco alcaloide anticolinérgico (antagonista muscarínico) obtido a partir de plantas da família Solanaceae. Suas propriedades farmacológicas surgem pela interferência de impulsos nervosos para o sistema nervoso central através da inibição da ação do neurotransmissor ACh (SPINKS et al., 2007).

A escopolamina é usada como um medicamento de referência para induzir déficits cognitivos em humanos saudáveis e animais para validar novos modelos de teste da função cognitiva (SHERMAN et al., 2003). Sendo a hipótese de que o declínio relacionado à idade nas funções cognitivas estivesse predominantemente relacionado a uma diminuição na integridade da neurotransmissão colinérgica, e como a amnésia induzida pela escopolamina é provavelmente causada por um bloqueio da sinalização colinérgica, esse fármaco vem sendo utilizado para modelar déficits cognitivos associados ao envelhecimento e a DA (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010).

No que diz respeito a ACh, ela está envolvida em processos de aprendizagem e memória, desempenha um papel importante na aquisição de novas informações, enquanto o aumento na

concentração de ACh permitiria a recuperação de memórias (HASSELMO; MCGAUGHY, 2004).

1.5 Piracetam: fármaco usado para a melhora da DA

O Piracetam (2-oxo-1-pirrolidina acetamida) foi o primeiro medicamento nootrópico usado na melhora da memória e outras funções intelectuais, mas seus mecanismos ainda são pouco compreendidos. Derivado cíclico do ácido gama-aminobutírico (GABA), o Piracetam pode atravessar a barreira hematoencefálica e é seletivamente concentrado no córtex cerebral. Mesmo em altas doses, tem efeitos sedativos, estimulantes, locomotores ou autonômicos (FLICKER; GRIMLEY EVANS, 2004). Ainda, este fármaco demonstrou melhorar a função cognitiva tanto em humanos quanto em animais, atuando na melhora da fluidez da membrana de células mitocondriais envelhecidas, contribuindo assim, na eficácia terapêutica e na melhora de distúrbios cognitivos e demência (KEIL et al., 2006). Sua aplicação vai além de indicações nootrópicas, pois também age como neuroprotetor, anticonvulsivante e na melhora da neuroplasticidade. Na estrutura vascular, diminui a adesão dos eritrócitos ao endotélio vascular, facilitando a microcirculação. Ademais, é indicado para a vertigem, mioclonia cortical, dislexia e anemia falciforme (WINBLAD, 2005).

Em adição, apresenta efeitos importantes na neurotransmissão colinérgica, serotoninérgica, noradrenérgica e glutamatérgica (OLPE; STEINMANN, 1981; VALZELLI; BERNASCONI; SALA, 1980). Participa também no aumento da disponibilidade no receptor pós-sinápticos e foi apontado por modificar os níveis de ACh no hipocampo de ratos em até 40% (WURTMAN; MAGIL; REINSTEIN, 1981).

1.6 Plantas medicinais com aplicações nootrópicas

Tanto na medicina tradicional quanto em estudos científicos existem relatos do uso de plantas para o tratamento de distúrbios cognitivos. Em destaque, os flavonoides adquiridos pela alimentação ganharam atenção devido ao seu potencial antioxidante, neuroprotetor, propriedades anti-inflamatórias, anti-amiloidogênicas e como candidatos alternativos à terapia contra a DA (KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015). A neuroproteção refere-se a mecanismos capazes de defender o sistema nervoso central (SNC) de lesões (HOLLMAN; KATAN, 1999).

Evidências crescentes confirmam potencial neuroprotetor dos flavonoides, inclusive podem proteger da DA, interferindo na produção e agregação de peptídeos A β e/ou diminuindo

a agregação de Tau por meio da ativação da autofagia, além do potencial inibitório da colinesterase e melhora da memória (KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015). Os flavonoides também são encontrados para subjugar a ativação microglial, mediar processos inflamatórios no SNC, possuir potentes efeitos antidepressivos, anti-amiloidogênicos bem como para melhorar a memória e a capacidade de aprendizado. Além disso, essas substâncias naturais possuem atividades descritas na literatura com excelentes propriedades anti-inflamatória, neuroprotetora, antienvelhecimento e anticolinesterásica (NABAVI et al., 2015; SPENCER et al., 2012).

A principal característica físico-química de um neuroprotetor ou de um fármaco nootrópico é sua capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica. Essa barreira constitui-se de uma membrana composta por células endoteliais justapostas que está presente na camada interna de microvasos cerebrais e tem a função de controle de entrada de componentes do plasma no SNC, impedindo a entrada de moléculas que causam danos ao cérebro (JAMPILEK et al., 2015; OVAIS et al., 2018).

1.7 A espécie *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur (Euphorbiaceae): suas características físico-químicas e usos na medicina popular

O gênero *Cnidoscolus* compreende cerca de 50 a 70 espécies com distribuição no Nordeste, Sudeste e Centro-oeste do Brasil (WEBSTER, 1994). Uma das características do gênero, é a presença de tricomas urticantes em quase todas as suas partes vegetativas e florais, os quais, quando tocados, provocam fortes dores localizadas, urticárias e até, em raros casos, desmaios (MELO; SALES, 2008).

A espécie *C. urens*, conhecida popularmente como urtiga cansaço por apresentar tricomas urticantes, é uma herbácea muito comum na Caatinga (SOUZA, 2014). *C. urens* é um pequeno arbusto com inflorescências do tipo dicásio (Figura 02), cujas flores estaminadas e pistiladas possuem disco nectarífero proeminente, constituída de pétalas brancas com comprimento médio de 1cm. Os frutos são do tipo cápsula, verdes quando imaturos e apresentam uma média de 1,4 cm. Quando maduros, adquirem coloração castanho escuro abrindo-se logo em seguida para a dispersão das sementes por barocoria (CANDIDO; CAVALCANTI; BESERRA, 2013; MELO; SALES, 2008).

O gênero *Cnidoscolus* tem sido amplamente pesquisado devido as suas aplicações etnofarmacológicas (AGRA et al., 2008; ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002). Na Tabela 2

mostramos alguns estudos com gênero *Cnidoscolus* e os resultados obtidos a partir da aplicação destas plantas.



Figura 02 – Espécime de *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur (Euphorbiaceae)

Fonte: <https://images.app.goo.gl/bMpik97HhuE72bkj8>

TABELA 2. Estudos científicos realizados na família da *Cnidoscolus urens* (L.).

ESPÉCIE/ EXTRATO	RESULTADOS OBTIDOS	AUTORES
<i>C. infestus</i> (Extrato metanólico obtido da raiz);	Antioxidante, compostos fenólicos;	Almeida & Amorim (2009).
<i>C. infestus</i> e <i>C. urens</i> (Extratos metanólicos das partes aéreas e raízes);	Antiproliferativa (linhagem HEP-2), antocianinas;	Tavares & Amorim (2010).
<i>C. quercifolius</i> (Extrato metanólico da casca);	Antibacteriana (<i>Staphylococcus</i>), cumarinas.	Sobrinho et al. (2012).
<i>C. urens</i> (Extrato das folhas);	Enzimas proteolíticas, ação anti-hemorrágico, trombolítico e agente cicatrizante.	Menezes et al. (2014).
<i>C. quercifolius</i> (Extrato da casca e das folhas);	Atividade anti-inflamatória.	Gomes et al. (2014).
<i>C. aconitifolius</i> (Extrato etanólico e aquoso).	Ação antioxidante e redução de citocinas pró-inflamatórias	Medina et al. (2019).

Legenda: Espécie estudada, resultados encontrados na espécie e autores que realizaram os estudos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil químico, a potencial atividade nootrópica e o perfil toxicológico do extrato bruto de *C. urens* (L.) Arthur (Euphorbiaceae).

2.2 Objetivos específicos

Avaliar perfil químico do extrato bruto de *C. urens* através da triagem fitoquímica preliminar, empregando o método de cromatografia em camada delgada e *paper spray*;

Padronizar análise de proteínas de sangue humano e posteriormente em sangue de camundongos para que a análise enzimática pudesse ser realizada;

Padronizar as técnicas de avaliação *in vitro* da atividade das enzimas AChE e BChE em sangue humano.

Calcular a concentração inibitória de 50% da atividade das enzimas AChE e BChE (IC₅₀) em sangue humano e, assim, estimar o potencial inibitório do extrato bruto de *C. urens* frente às colinesterases sanguíneas.

Avaliar os potenciais efeitos centrais do extrato bruto de *C. urens* através do teste de locomoção espontânea de camundongos *Swiss* com déficit cognitivo induzido por escopolamina;

Avaliar a potencial atividade nootrópica do extrato bruto de *C. urens* sobre a memória declarativa (explícita) de camundongos *Swiss* com déficit cognitivo induzido por escopolamina através do teste de reconhecimento de objetos;

Avaliar a potencial atividade nootrópica do extrato bruto de *C. urens* sobre a memória social de camundongos *Swiss* com déficit cognitivo induzido por escopolamina através do teste de reconhecimento social;

Avaliar a potencial atividade nootrópica do extrato bruto de *C. urens* sobre a memória aversiva de camundongos *Swiss* com déficit cognitivo induzido por escopolamina através do teste de esQUIVA inibitória do tipo *step-down*;

Avaliar o perfil toxicológico do extrato bruto de *C. urens* através da triagem hipocrática descrita no protocolo nº 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico – OECD.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Acesso ao patrimônio genético

O acesso aos recursos genéticos, proteção e acesso ao conhecimento tradicional associado e a repartição dos benefícios (ABS) foi autorizado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético - CGEN sob o cadastro nº AB72871 (Anexo A), respeitando todas as normas estabelecidas pela Lei 13.123/2015 e pelo Decreto Regulamentador 8.772/2016.

3.2 Coleta e identificação botânica

O material vegetal foi coletado em propriedade particular do Sr. Valfredo Teles de Lima no povoado de *Ciriaco*, situado na cidade de Serra Dourada, Bahia, sob as coordenadas geográficas S12°84'06.35" e O43°63'30.40" (Figura 3).

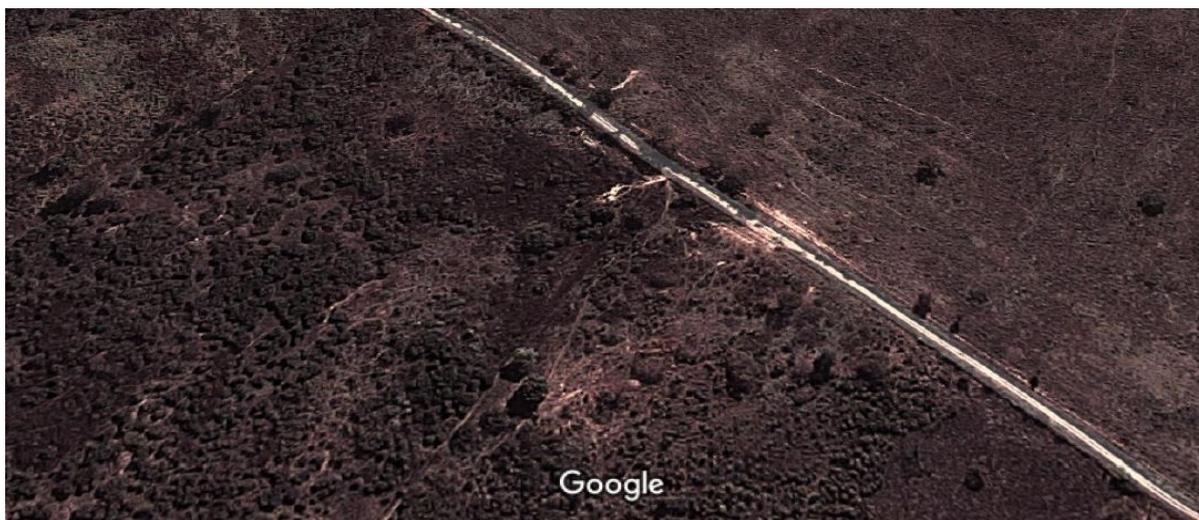


Figura 3: Localização geográfica do ponto de coleta das amostras da folha *Cnidoscolus urens*
Fonte: www.google.com/maps

Dos espécimes da planta coletados *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur Euphorbiaceae foram confeccionados três exemplares de exsicatas contendo folhas, flores e frutos que posteriormente foram identificadas pelo Prof. Ms. Milton Omar Cordova Neyra. As exsicatas (3 exemplares) desta espécie estão depositadas no Herbário Centro-norte Matogrossense no Acervo Biológico da Amazônia Meridional – ABAM, da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), campus Sinop-MT, sob número de tombo **CNMT 6563** (Figura 4).



Figura 4: Exsicata para identificação botânica e registro de tombo da amostra vegetal, acervo pessoal

Para a extração etanólica via maceração, os espécimes da planta *C. urens* (L.) Arthur Euphorbiaceae, apenas com folhas sem talos ou caule, foram colhidos no dia 17/01/2020, no período entre as 07:00 e as 10:00 horas da manhã.

3.3 Preparação dos extratos de *C. urens*

Para a extração do material vegetal, as folhas da planta foram colhidas, retiradas as impurezas e possíveis contaminantes com o auxílio de um pincel.

O material foi mantido em estufa com ventilação forçada, à temperatura média de 40 °C, durante sete dias. Após a secagem, o material vegetal foi processado em triturador (Triturador Trapp modelo TRF-70 1,5 CV), com granulometria média de 1,0 mm (Figura 5). A obtenção dos extratos foi realizada por maceração de 1,00 kg do material vegetal com 10 litros de álcool etílico a 80%, sendo agitadas uma vez ao dia durante 15 dias e mantidos em local escuro em temperatura ambiente. Ao final, os extratos foram filtrados em papel filtro sob pressão reduzida, resultando no extrato bruto etanólico.



Figura 5: Material vegetal triturado, acervo pessoal



Figura 6: Rotaevaporação do extrato, acervo pessoal.

Para a concentração dos extratos e retirada dos solventes, foi utilizado o evaporador rotativo (IKA® RV 05 Basic) com temperatura média do banho termostático de 40 °C e sob pressão reduzida de 600 mmHg (bomba para vácuo Kolbach, modelo 131 1/4CV) e dissecador de vidro, contendo carbonato de cálcio (Figura 6). O rendimento final dos extratos obtidos foi de 172,97 gramas do extrato etanólico (consistência pastosa) armazenado à temperatura de -20 °C até o momento de uso.

3.4 Análises fitoquímicas dos extratos etanólicos

As análises fitoquímicas preliminares para determinação dos principais metabólitos secundários presentes nos extratos obtidos foram realizadas empregando-se o método de cromatografia em camada delgada (CCD), conforme metodologia descrita por (WAGNER; BLADT, 1996), utilizando como fase fixa cromatofolhas de sílica gel 60 F254 (Macherey-Nagel), diferentes sistemas de eluição e reveladores, como descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Análise fitoquímica preliminar, empregando o método de cromatografia em camada delgada.

Metabólito secundário	Fase Móvel	Revelador
ALCALOIDES	Tolueno: Acetato de Etila: Dietilamina (70:20:10). Clorofórmio: Metanol: Hidróxido de Amônio (60:40:1).	Dragendorff

CUMARINAS	Clorofórmio: Acetona: Ácido Fórmico (75:16,5:8,5).	KOH 5% em Etanol
FLAVONOIDES	Acetato de Etila: Ácido Fórmico: Ácido Acético: H ₂ O (100:11:11:0,5). Clorofórmio: Acetona: Ácido Fórmico. (75:16,5:8,5)	NP/PEG* visualizado na luz ultravioleta (UV) a 365 nm;
SAPONINAS	Clorofórmio: Ácido Fórmico: Metanol: H ₂ O (64:32:12:8).	Vanilina Sulfúrica
TANINOS	Acetato de Etila: Ácido Fórmico: H ₂ O (100:11:5).	Cloreto férrico 1% em Etanol
TERPENOS	Hexano: Acetato de Etila (75:25). Hexano: Acetato de Etila (75:25).	Anisaldeído-sufúrico Libermann-Burchard

* NP-PEG = solução de difenilborato de aminoetanol a 1% em metanol, seguido de uma solução de polietilenoglicol 400 a 5% em etanol.

3.5 Análise do perfil químico por *paper spray* (PS-MS)

Os ensaios foram realizados em triplicata nos modos negativo e positivo, seguindo a metodologia descrita por Ramos et al. (2020) e García et al. (2021), com pequenas modificações. Alíquotas de 2 µL das amostras e de 40 µL de metanol (para auxiliar no processo de ionização) foram aplicadas a papel cromatográfico recortado em formato de um triângulo equilátero de 1,5 cm de comprimento, e que foi acoplado ao equipamento, a uma distância da ponta do papel cromatográfico à entrada do equipamento de 0,5 cm.

Para a aquisição dos dados, a fonte de voltagem foi ligada sob as condições instrumentais de voltagem de fonte *PS-MS* de +4,5 kV para o modo positivo e -3 kV para o modo negativo; voltagem do capilar de 40 V; temperatura do tubo de transferência de 275 °C; voltagem das lentes do tubo de 120 V; faixa de massas de 100 a 1000 m/z no modo de ionização negativo e no modo de ionização positivo. As energias de colisão para a fragmentação dos íons foram de 15 e 45 eV.

Os espectros de massas formados foram processados usando o software Xcalibur versão 2.1 (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). O *software* Excel, 2020 (Microsoft, Redmond, WA, EUA) foi usado para listar e organizar os espectros médios para análise posterior. A identificação dos compostos se dará pela comparação dos sinais com as relações massa-carga da literatura, seguidos da fragmentação por Espectrometria de Massas sequencial. Esta etapa

ainda está sendo executada e será apresentada no momento de submissão do trabalho gerado por esta dissertação.

3.6 Determinação da IC50 das enzimas AChE e BChE

3.6.1 Determinação de proteínas

Este trabalho refere-se em parte ao projeto de pesquisa cadastrado na Propeq (SGPP, Sistema de Gerenciamento de Projetos de Pesquisa sob número 492/2023), denominado “Colinesterases sanguíneas humanas como biomarcadores: Estudo comparativo utilizando diferentes métodos para análise”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), conforme Parecer Consubstanciado do CEP, número 6.249.176. É importante ressaltar que para realização destas técnicas foi necessária padronização prévia e os dados da padronização estão publicados no item 7 desta dissertação.

A dosagem de proteínas totais foi dada pela construção de uma curva analítica no tampão fosfato pH 8,0 com solução de albumina bovina sérica como padrão. A preparação da curva de dosagem de proteína foi realizada conforme descrito por BRADFORD, 1976. A Tabela 4 mostra a composição dos reagentes necessários para cada ponto da curva.

Tabela 4. Esquema para preparação dos pontos da curva analítica de proteína

Ponto da curva	BSA (500 $\mu\text{g/mL}$)	Tampão	Sol. Brilhante Blue
Branco	-----	100 μL	4,9 mL
1	10 μL (5 μg)	90 μL	4,9 mL
2	20 μL (10 μg)	80 μL	4,9 mL
3	50 μL (25 μg)	50 μL	4,9 mL
4	80 μL (40 μg)	20 μL	4,9 mL
5	100 μL (50 μg)	0	4,9 mL

Realizou-se as leituras em duplicata no espectrofotômetro UV/VIS a 595 nm após 5 minutos de reação (temperatura ambiente). Para dosagem de proteínas nas amostras, utilizou-se o esquema da Tabela 5.

Tabela 5. Esquema para preparação das amostras para dosagem de proteína

	BSA (500 µg/mL)	Amostra	Tampão	Sol. Brilhante Blue
Branco	-----	-----	100 µL	4,9 mL
Padrão	40 µL	-----	60 µL	4,9 mL
Amostra	-----	40 µL	60 µL	4,9 mL

Para determinar a atividade das colinesterases, conforme descrito por (ELLMAN et al., 1961) com algumas modificações, precisou-se dosear a quantidade de proteína no plasma e nos eritrócitos para obter a atividade em grama de proteína. A avaliação da atividade enzimática após o doseamento das proteínas foi determinada conforme descrito na Tabela 6.

3.6.2 Técnicas para análise de colinesterases

A padronização das técnicas para avaliação da atividade das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase em sangue humano, foi realizada baseando-se no método de ELLMAN et al., 1961, com algumas modificações, efetuadas em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisas. Ademais, as coletas de sangue periférico e análises das amostras biológicas aconteceram no laboratório do bloco NUPADS, da UFMT.

Todas as recomendações do Ministério da Saúde quanto aos cuidados preventivos da Covid-19 (uso de máscaras e álcool para higienização das mãos; EPIs para coleta de sangue; cuidado ao manusear as amostras e descarte adequado) foram seguidas em todas as etapas da pesquisa.

Primeiramente, coletou-se 1 mL de sangue venoso humano em seringas de 5 mL, o qual foi transferido rapidamente para tubos heparinizados de coleta a vácuo. Posteriormente, realizou-se a separação do plasma dos demais elementos celulares, utilizando uma centrífuga a 2.500 rpm por 10 minutos.

Para a dosagem da BChE, foi necessário realizar a diluição do plasma em água destilada (1/142, 40 µL de plasma em 5640 µL de água). Na dosagem da atividade da AChE, uma amostra de 2 mL de sangue total, previamente retirada do plasma, foi utilizada, seguida por duas lavagens com 3,0 mL de solução salina, utilizando o mesmo ciclo de centrifugação para separação do plasma. Posteriormente, o concentrado de eritrócitos foi diluído 1/600 (10 µL de

eritrócitos em 5990 μL de água) conforme a Figura 7, e as análises foram realizadas. Ambas as dosagens são destinadas à análise enzimática.

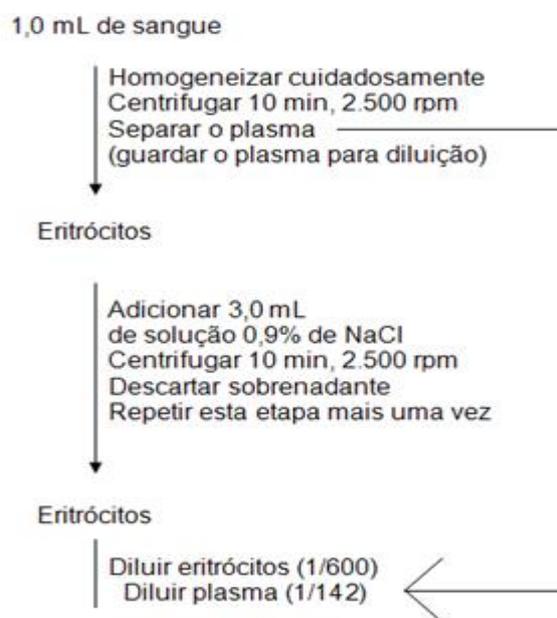


Figura 7 - Preparo das amostras de sangue para dosagem das colinesterases.

A avaliação da atividade enzimática após o doseamento das proteínas foi determinada conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6. Esquema para doseamento da atividade das colinesterases.

Reagente	Volume de Reagente		
	IC ₅₀	Colinesterases	Branco
Tampão fosfato pH 8,0	1650 μL	1875 μL	1875 μL
DTNB	75 μL	75 μL	75 μL
Amostra	225 μL	225 μL	-----
Inibidor	225 μL	-----	-----
H ₂ O	-----	-----	225 μL
ATCh (0 s)	225 μL	225 μL	225 μL
Volume Total	2400 μL	2400 μL	2400 μL

Para determinar a concentração capaz de inibir 50% da atividade das enzimas (IC₅₀), foram adicionados 225 μL do extrato com 5 concentrações decrescentes em água para avaliar a atividade da AChE (0,01000; 0,00780; 0,00390; 0,00200 e 0,00098 g/mL de extrato) e BChE

(0,01600; 0,00780; 0,00390; 0,00200; 0,00098 g/mL de extrato) que permaneceram em contato com a amostra por 30 minutos antes do início das leituras. Posteriormente, acetilcolina (ATCh) foi adicionada como substrato, e o programa cinético do espectrofotômetro foi iniciado, com 4 leituras a 450 nm, começando em 0 segundos e com intervalos de 1 minuto entre elas.

A IC₅₀ das enzimas foi calculada utilizando a equação da reta do percentual da atividade da colinesterase em relação ao log da concentração do inibidor, e os coeficientes de regressão dessas retas foram calculados pelo método dos quadrados mínimos.

3.7 Aspectos éticos

O presente trabalho respeitou todas as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório com constituição, deveres e responsabilidades regidos pela Lei nº 11.794, de 2008 (NEVES; FILHO; MENEZES, 2013).

Esta pesquisa foi submetida à Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso, através dos Processos nº 23108.021967/2019-41 e 23108.007432/2023-43 sendo aprovada (Anexos B e C) de acordo com os princípios éticos e da legislação vigente adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Devido as colinesterases terem sido purificadas a partir do sangue humano, também submetemos nossa pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), sendo aprovada conforme Parecer Consubstanciado do CEP, nº 6.249.176 (Anexo D), de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde - CNS nº 466/2012.

3.8 Obtenção dos animais e aclimação

Para o presente trabalho, foram obtidos 86 camundongos *Swiss*, 15 fêmeas com média de peso $34,21 \pm 0,69$ e 71 machos com média de peso $27,70 \pm 0,69$, oriundos do biotério central da Universidade Federal de Mato Grosso, *campus* Cuiabá. Os animais foram aclimatados com água e ração *ad libitum* em gabinete desmontável para biotério, com circulação de ar, temperatura, umidade, luminosidade e exaustão controlada. Durante todo o experimento a temperatura se manteve em média 23 °C, ciclo circadiano 12/12, circulação de ar média e umidade de 47%.

3.9 Tratamento dos animais

Os fármacos utilizados foram o antagonista de receptores muscarínicos, a escopolamina (ESC) (lote: 825151, val: 02/2023 fab: Boehringer Ingelheim Espanha S.A.), o nootrópico Piracetam (lote: 844859, val: 09/2020 fab: Sanofi Medley Farmacêutica Ltda) e solução fisiológica estéril (lote: 74NF2520, val: 05/2021 fab: Fresenius Medical Care Ltda) que foi utilizada como veículo.

Para análise dos possíveis efeitos nootrópicos do extrato em estudo, foram utilizados 56 camundongos *Swiss* machos com dois 2 meses de idade, que após aclimatados por 15 dias sob condições controladas, água e ração peletizadas à vontade, foram divididos em 7 grupos com 8 animais. Os camundongos foram tratados somente uma vez, uma hora antes das tarefas comportamentais, por via oral - Gavagem (v.o.) e via intraperitoneal (i.p.), conforme descrito abaixo:

- ✓ Controle Veículo (100 μ L v.o. + i.p.) \rightarrow C;
- ✓ Escopolamina (0,4 mg/kg i.p.) \rightarrow ESC;
- ✓ Escopolamina (0,4 mg/kg i.p.) + Piracetam (200 mg/kg v.o.) \rightarrow ESC + PIR;
- ✓ Escopolamina (0,4 mg/kg i.p.) + Extrato bruto (150 mg/kg v.o.) \rightarrow ESC + CU.

Todos os grupos receberam os volumes máximos de 100 μ L/100 g de peso corporal do camundongo, via oral e via intraperitoneal dos tratamentos supracitados conforme concentração respectivas e a escopolamina (intraperitoneal) foi administrada somente uma hora antes dos testes de memória (JOSHI; MEGERI, 2008).

3.10 Teste de locomoção espontânea

Para uma análise dos efeitos centrais do extrato bruto de *C. urens*, os animais foram submetidos ao teste de locomoção espontânea seguindo protocolo original determinado por (HALL, 1941). Este teste foi baseado na metodologia descrita por (SIEGEL, 1946) e validado por (ARCHER, 1973), o qual permite uma avaliação da atividade estimulante ou depressora de um dado composto, podendo ainda indicar atividades mais específicas como ação tipo ansiolítica. Este procedimento consiste em avaliar os efeitos de substâncias sobre roedores em um espaço acessível para a observação da atividade locomotora e estado comportamental do animal (LUCENA, 2012).

O animal foi posicionado no centro da arena redonda que contém 4 quadrantes centrais e 8 dispostos circularmente em volta dos 4 centrais (Figura 8). Os animais foram colocados, 60 minutos após o tratamento, em um campo-aberto confeccionado em acrílico e foram observados durante 5 minutos, sendo avaliados a atividade exploratória dos animais (número total de cruzamentos).

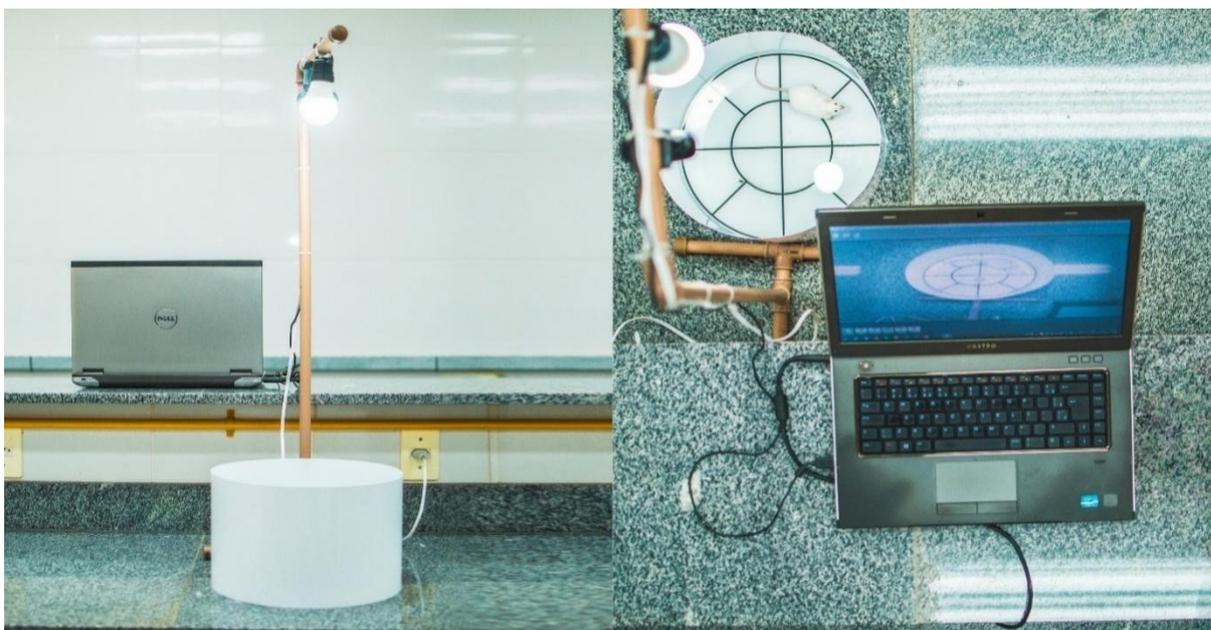


Figura 8: Ilustração do teste de campo aberto monitorado. Acervo pessoal.

3.11 Teste de reconhecimento de objetos

A tarefa de reconhecimento de objetos é um teste comportamental utilizado para acessar a memória declarativa (explícita) em roedores, que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido. Para obtenção de tais resultados seguimos o protocolo determinado por Leger et al. (2013).

Este teste consistiu em 3 sessões: habituação (5 min), treino (10 min) e teste (10 min) (LEGER et al., 2013). Na habituação, os animais foram colocados em uma caixa retangular de madeira com 33 cm×33 cm×20 cm, na qual exploraram livremente (Figura 9). No treino, 24 h após a habituação e 1 hora após receber seus respectivos tratamentos, os animais foram colocados na mesma caixa que continham dois objetos iguais (Figura 10A). Foi cronometrado o tempo que o animal explorou cada um dos objetos. Os animais deveriam explorar cada objeto, entre 40 e 60% do tempo, do contrário, foram excluídos dos experimentos.

Duas horas (para memória de curta duração) e vinte e quatro horas (para memória de longa duração) após o treino, foi realizado o teste na mesma caixa contendo um objeto familiar

e um objeto novo (figura 10B). O tempo de exploração dos objetos forneceu o índice de discriminação (ID) (parâmetro de memória) que foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $ID = (\text{tempo novo} - \text{tempo familiar}) / (\text{tempo novo} + \text{tempo familiar})$. Nesse parâmetro valores próximos a 1 representariam os animais que são capazes de discriminar o objeto novo do familiar, enquanto valores próximos a -1 representariam animais que não discriminam bem os objetos apresentados (SOUSA, 2013).

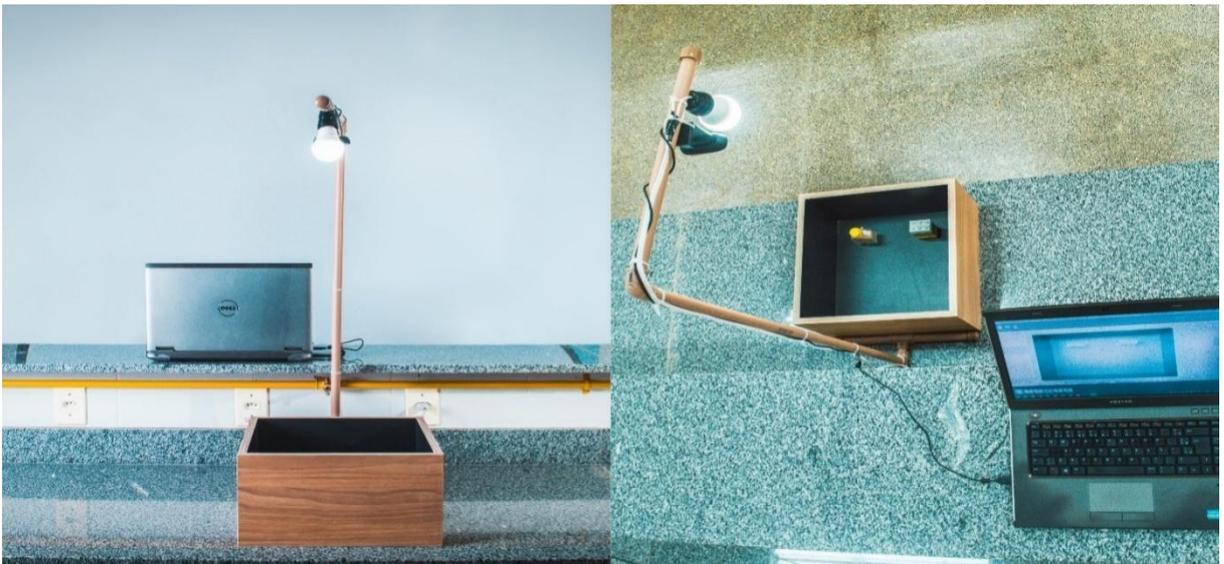


Figura 9: Ilustração do teste de reconhecimento de objetos monitorado. Acervo pessoal.

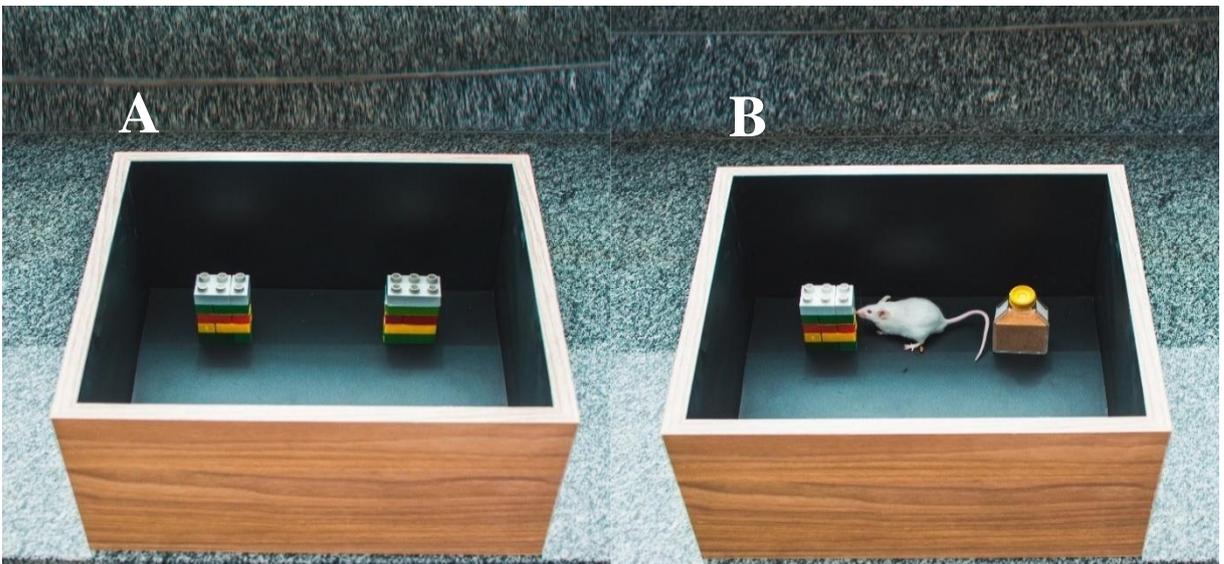


Figura 10: Ilustração da disposição dos objetos nas duas fases do teste. Acervo pessoal.

3.12 Teste de reconhecimento social

O paradigma intruso/residente vem sendo intensamente empregado em estudos para avaliar a memória de reconhecimento social em roedores. Foi utilizado este teste para a avaliação dos possíveis efeitos nootrópicos do extrato bruto de *C. urens* através do protocolo adaptado de Kasahara et al. (2011).

Inicialmente cada camundongo foi inserido em uma caixa de madeira com dimensões de 33 cm×33 cm×20 cm durante 10 minutos para habituação ao ambiente experimental. Após a habituação ao ambiente, um animal jovem de mesma linhagem e sexo (Animal B) foi adicionado à caixa por 3 minutos e registrou-se o tempo gasto em interação social entre o animal testado e o intruso, observando o contato corporal à distância menor/igual a 1 cm, investigação oro-genital e comportamentos de limpeza direcionados ao intruso (Figura 11).

Esta exposição de 3 minutos ao intruso repetiu-se por 3 vezes, com intervalos de 10 minutos entre as sessões. Na quarta sessão, foi inserido um animal completamente desconhecido ao animal testado (Animal C) e o tempo de exploração deste novo indivíduo foi registrado também durante 3 minutos.

O tempo de exploração social forneceu o índice de discriminação (ID) (parâmetro de memória) que foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $ID = (\text{tempo novo} - \text{tempo familiar}) / (\text{tempo novo} + \text{tempo familiar})$. Nesse parâmetro valores próximos a 1 representariam os animais que são capazes de discriminar o animal intruso do familiar, enquanto valores próximos a -1 representam animais que não discriminam bem os objetos apresentados (SOUSA, 2013).

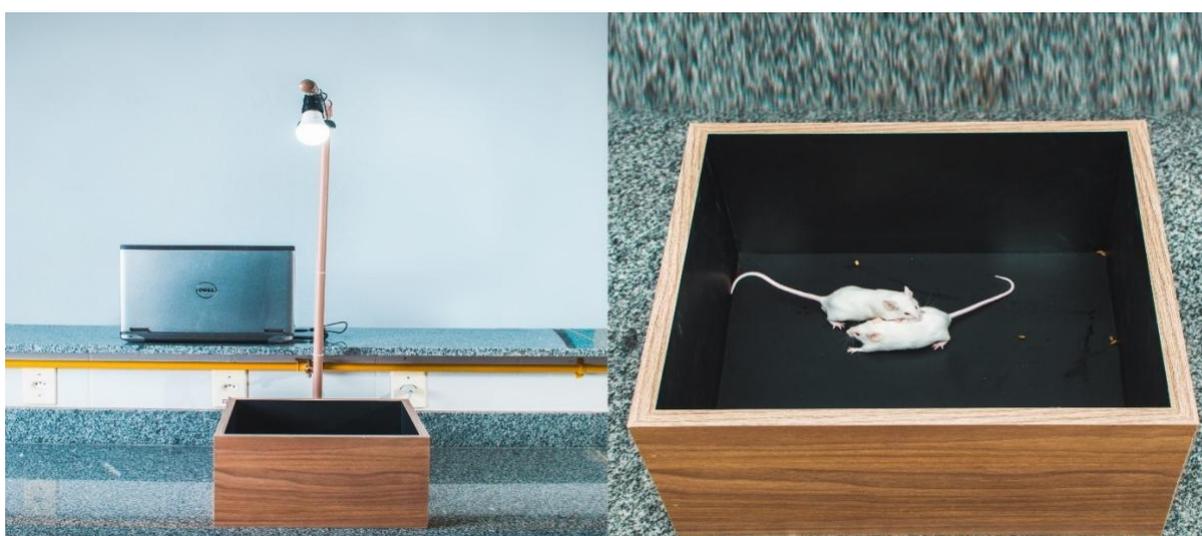


Figura 11: Ilustração do teste de reconhecimento social. Acervo pessoal.

3.13 Teste de esquiva inibitória do tipo step-down

A resposta de esquiva envolve a aquisição de um comportamento que antecipa a ocorrência de um evento aversivo futuro. Existem duas formas desse tipo de aprendizagem: a esquiva ativa e passiva ou inibitória. Em ambas as situações, o animal necessita executar (esquiva ativa) ou suprimir (esquiva passiva) uma resposta para evitar um evento aversivo que estava programado para ocorrer (RODRIGUES et al., 2011). Para o presente trabalho foi adotado o protocolo adaptado de IZQUIERDO et al. (1999) e utilizado a esquiva passiva do tipo *step-down* (Figura 12).

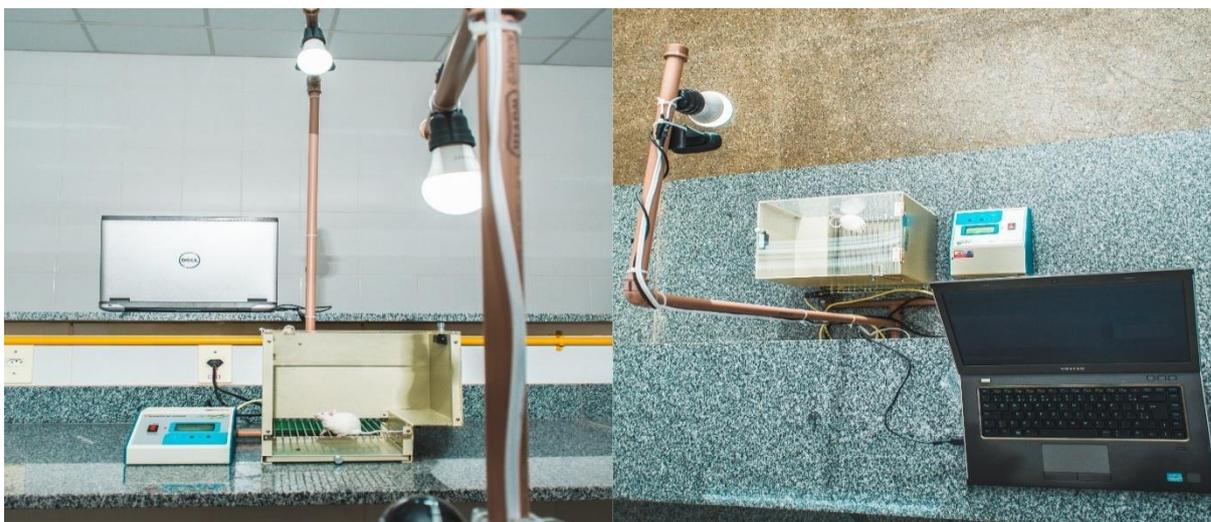


Figura 12: Ilustração do teste da esquiva inibitória do tipo *step-down* monitorada. Acervo pessoal.

Um dia antes de serem tratados, os animais foram condicionados na sala de testes comportamentais. Para a ambientação com o equipamento, os camundongos foram posicionados sobre a plataforma com a cabeça direcionada ao lado oposto do observador e deixados por 5 minutos para interagir com o equipamento, na tentativa de minimizar viés de estresse ao ambiente novo.

No dia seguinte, uma hora após receber seus respectivos tratamentos supracitados, os animais foram posicionados sobre a plataforma da mesma maneira descrita acima e quando o animal se deslocasse para a parte inferior à plataforma, com as 4 patas sobre a grade, uma leve estimulação de choque nas patas foi acionada (0.4 mA) durante 2 segundos. O tempo de deslocamento do animal até a parte inferior sobre as grades, não podia ultrapassar 180 segundos e caso esse tempo se esgotasse, o animal deveria ser cuidadosamente direcionado às grades e o choque aplicado. Após o choque, o animal foi retirado imediatamente do equipamento e retornado à sua gaiola.

Após uma hora e trinta minutos, o animal novamente foi posicionado sobre a plataforma sendo observado por 180 segundos. O período que este levou para descer ou não da plataforma

no tempo determinado, foi registrado como sendo a latência da memória aversiva ao choque, um parâmetro utilizado para a memória em curta duração.

Para obtermos o parâmetro da memória de longa duração, o mesmo procedimento foi repetido 24 horas após o choque.

3.14 Teste de toxicidade in vivo (dose única)

Para se testar a possível toxicidade, foram utilizadas diferentes concentrações do extrato bruto etanólico de *C. urens* (5; 50; 300 e 2000 mg/kg) que foram adotados no presente trabalho o protocolo 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico – OECD, com exceção do teste histopatológico (OECD, 2002), e administradas através de gavagem, no volume fixo de 100 µL uma única vez, 15 minutos antes do início das observações.

O teste consistiu em tratar através de gavagem, 3 camundongos machos e 3 fêmeas com 5 mg/kg do extrato em administração única. Neste protocolo, nos tempos 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 e 24 horas e diariamente até o 14º dia após a administração do extrato, e foram observados os seguintes sinais: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto da cauda, contorção, queda da posição do trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, straub, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose palpebral, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte.

Não manifestados os sinais supracitados, o teste foi repetido nas doses de 50, 300 e 2000 mg/kg, respectivamente. Ao final dos 14 dias, os animais foram pesados após 6 horas de jejum, anestesiados via intraperitoneal com ketamina 50 mg/kg, xilaxina 2 mg/kg e acepromazina 2 mg/kg e após o deslocamento cervical, os rins, coração e fígado foram pesados separadamente a fim de se obter o peso relativo dos órgãos através da equação: $[(\text{peso do órgão} \times 100) / (\text{peso corporal})]$. A necropsia dos órgãos também auxilia na observação de qualquer alteração morfológica macroscópica dos órgãos supracitados (OECD, 2002).

3.15 Consumo alimentar, hídrico e ganho ponderal

O consumo alimentar e hídrico foi avaliado diariamente como uma média de consumo de toda a caixa de moradia (n=3). As mensurações ocorreram durante os 14 dias do teste OECD 423, colocando-se uma quantidade conhecida de água e ração e medindo as sobras as 18:00 e

06:00 para média de consumo diurno e noturno, respectivamente. O resultado obtido foi a média de consumo do grupo de camundongos que habitaram a caixa (n=3).

Para determinar o ganho ponderal, os pesos individuais dos animais foram mensurados no dia em que a substância em estudo foi administrada e na hora da morte ou sacrifício, após os 14 dias da triagem hipocrática (período de teste), a média do ganho ponderal foi calculado subtraindo-se o peso inicial pelo peso atual dos camundongos avaliados.

3.16 Análise estatística

No que diz respeito às análises e tratamentos estatísticos, após tabulados em planilha do programa Microsoft Excel[®], os resultados foram analisados no GraphPad Prism[®] 8, por meio de uma análise descritiva e analítica. O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para verificação da normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias e posterior determinação do desenho estatístico mais adequado. Após, foi utilizado o teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey para comparar amostras pareadas e avaliar as diferentes frequências ao longo do experimento. Os dados foram obtidos como médias \pm erro padrão das médias (EPM) e a probabilidade aceita como indicativa da existência de diferença estatisticamente significativa foi adotada como $p < 0,05$ (LUCENA, 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação química dos extratos etanólicos

Os testes colorimétricos para a triagem fitoquímica realizados no extrato etanólico bruto de *C. urens*, mostraram-se positivos para os compostos taninos, flavonoides e terpenos conforme demonstrados na Tabela 7. Estes dados estão de acordo com os observados por Sobrinho et al. (2012), no qual foi observada a presença dos metabólitos secundários taninos, flavonoides e terpenos em seu estudo de triagem fitoquímica e atividade antibacteriana de quatro espécies de *Cnidocolus* (Euphorbiaceae).

O teste colorimétrico realizado para investigar a presença de flavonoides no extrato de *C. urens* demonstrou em seu resultado qualitativo uma banda idêntica ao do padrão rutina encontrado na cromatografia de camada delgada, o que nos sugere que a planta em sua composição deve possuir rutina ou substância com características semelhantes em seu extrato etanólico bruto.

TABELA 7. Triagem fitoquímica do extrato etanólico (EE) obtidos das partes aéreas de *C. urens*.

COMPOSTOS	EXTRATO ETANÓLICO
TANINOS	+
SAPONINAS	-
FLAVONOIDES	+++
ALCALOIDES	-
CUMARINAS	-
TERPENOS	++

Legenda: Intensidade da reação colorimétrica classificada como; reação intensa (+++), moderada (++) fraca (+) e ausente (-).

4.2 Análise do perfil químico por *paper spray* (PS-MS)

A análise do perfil químico realizada através da técnica de *paper spray* foi realizada com o objetivo de dar continuidade ao processo de elucidação de moléculas presentes no extrato bruto de *C. urens*. A Figura 13 mostra o espectrograma PS-MS no modo de ionização negativo e a Figura 14 mostra o espectrograma PS-MS no modo de ionização positivo. Os resultados obtidos com a técnica de PS-MS serão comparados com a literatura com a finalidade de elucidação de moléculas presentes no extrato bruto de *C. urens*.

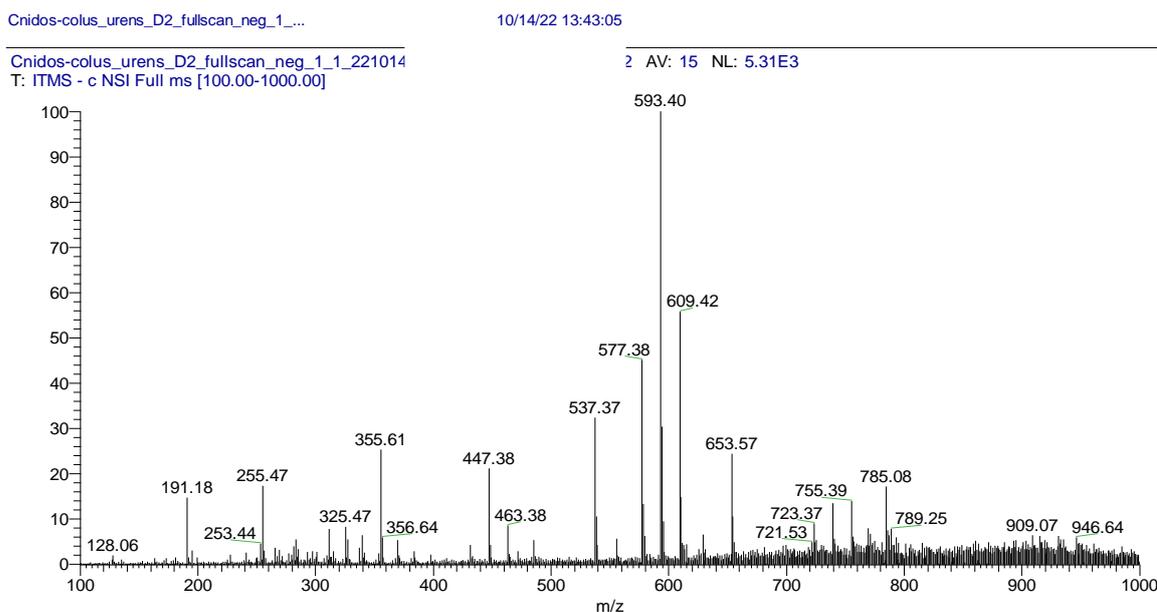


Figura 13: Espectrograma *PS-MS* no modo de ionização negativo obtido a partir de uma amostra do extrato bruto etanólico de *Cnidoscolus urens*.

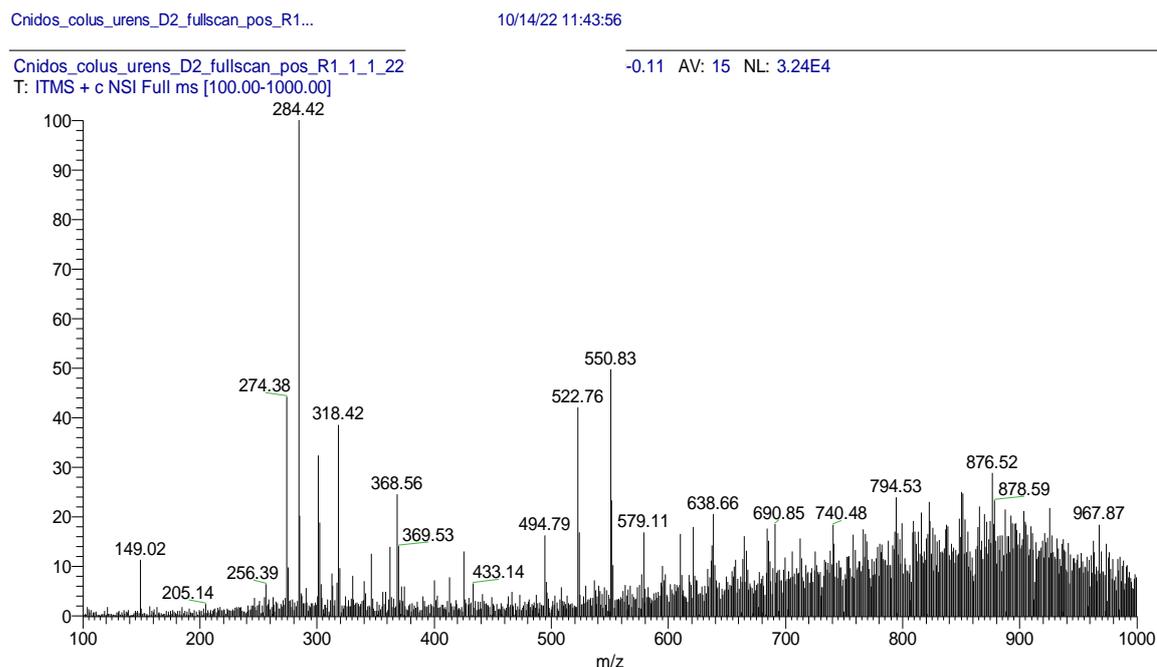


Figura 14: Espectrograma *PS-MS* no modo de ionização positivo obtido a partir de uma amostra do extrato bruto etanólico de *Cnidoscolus urens*.

Um recente trabalho de revisão publicado sobre o perfil fitoquímico de plantas do gênero *Cnidoscolus* evidenciou que a maioria dos compostos presentes nos extratos destas espécies ainda não foram identificados. Flavonoides, triterpenos, taninos, cumarinas, alcaloides e os esteroides representam as principais classes de metabólitos secundários que foram isolados de *Cnidoscolus*, não necessariamente da espécie *C. urens* (MOURA et al., 2019)

4.3 Determinação da IC₅₀ das enzimas AChE e BChE

4.3.1 Proteínas

Antes de iniciar a análise da atividade das colinesterases sanguíneas foi necessário padronizar a análise de proteínas do sangue para que a atividade da enzima seja dada por miligrama de proteína. A curva apresentou valor de R² de 0,9972 e equação da reta de $y=0,009264.x + 0,01302$ (Figura 15). Assim, passou-se para etapa de análise das enzimas.

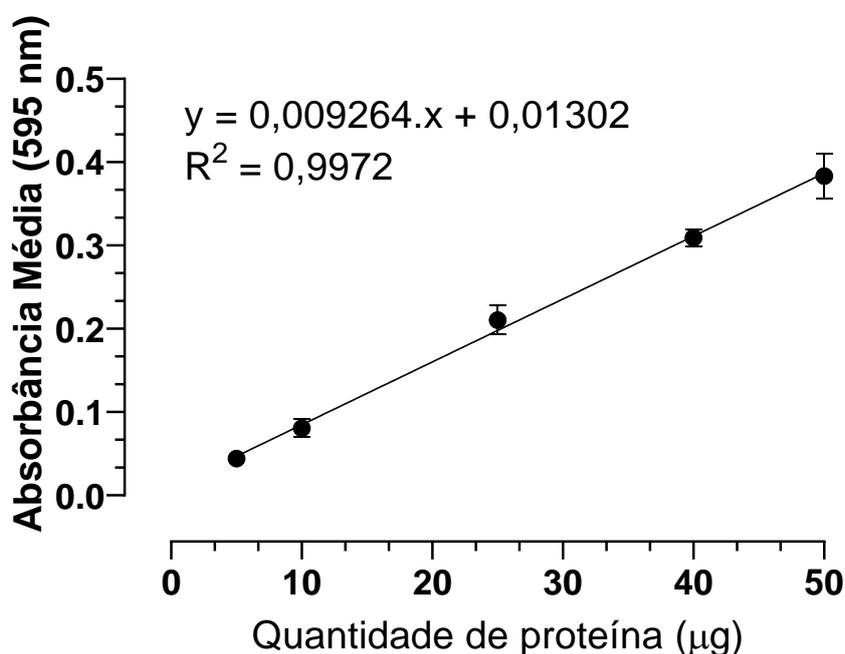


Figura 15: Curva padrão de proteína feita com tampão fosfato pH 8,0. Cada ponto foi feito em triplicata e a equação é a média de três curvas feitas em diferentes dias. As equações das retas foram calculadas usando o método dos quadrados mínimos. Esta curva se encontra no artigo inserido ao final desta dissertação no item 7.

4.3.2 Atividade das colinesterases

Para o cálculo da IC_{50} , utilizou-se a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obter a concentração do extrato com capacidade de inibir 50% da atividade das enzimas em questão. Os resultados da IC_{50} para AChE e BChE do extrato etanólico de *C. urens* estão apresentados nas Figuras 16A e 16B, respectivamente. Essas representações correspondem à construção da reta a partir dos valores de porcentagem de atividade das enzimas especificadas e da concentração do extrato utilizado.

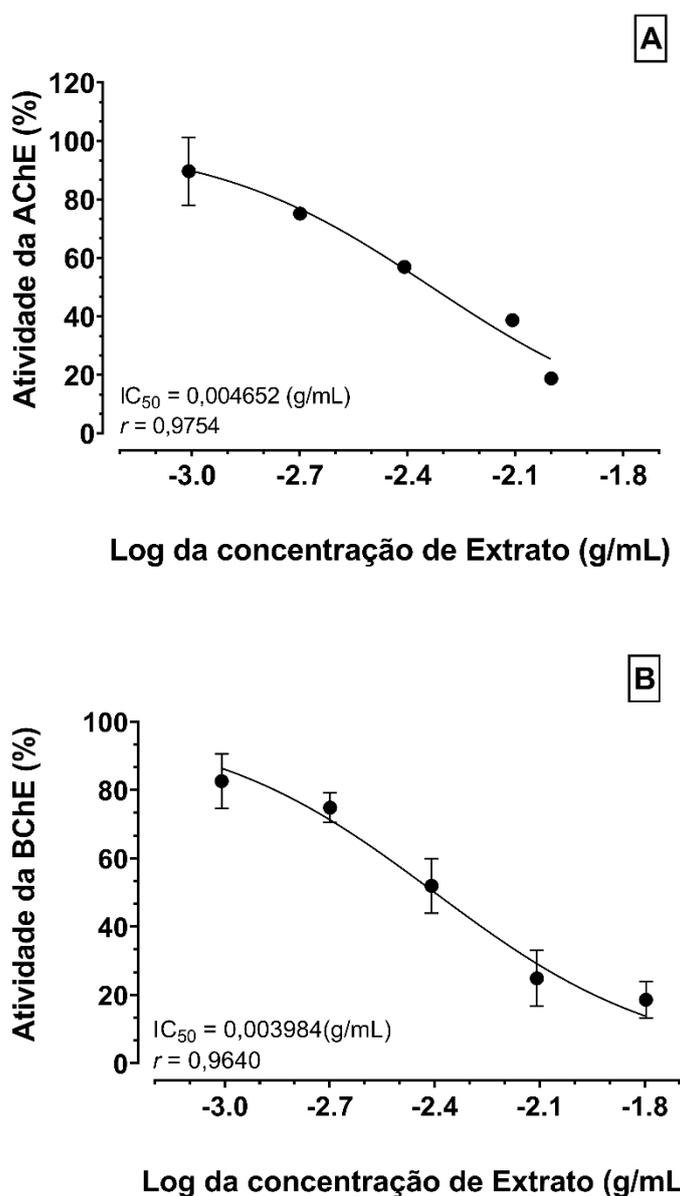


Figura 16: Atividade da AChE e BChE x Log das concentrações de *Cnidioscolus urens*.

Conforme apresentado na Figura 16A, a amostra eritrocitária da atividade da enzima AChE apresentou $r = 0,9754$ e o valor de IC_{50} igual a 0,004652 (g/mL). Na Figura 16B, a

atividade da amostra plasmática de BChE, apresentou $r = 0,9640$ e o valor de IC_{50} igual a $0,003984$ (g/mL).

Em resumo, os efeitos inibitórios do extrato etanólico de *C. urens* testados na atividade das colinesterases sanguíneas em diferentes concentrações apresentaram maior potencial inibitório para BChE quando comparados à AChE. Os compostos presentes no extrato podem ter maior afinidade com a BChE, justificando esse resultado. Além disso, é importante considerar que a BChE é um biomarcador de exposição menos sensível, enquanto a AChE é um biomarcador de efeito mais sensível à atividade enzimática, reforçando ainda mais o potencial inibitório do extrato em relação à BChE.

4.4 Teste de locomoção espontânea

O teste de locomoção espontânea é utilizado como um pré-teste, como um ponto de checagem que permite avaliar o estado geral do animal e se o animal está apto a prosseguir nos demais experimentos, pois o resultado obtido por este teste pode ser influenciado por substâncias que agem no sistema nervoso central (WEISS et al., 1998).

No presente trabalho, o teste de atividade locomotora espontânea, realizado antes dos testes de memória, não apresentou diferença estatística significativa (Figura 17), o que possibilitou a prosseguir com os demais testes experimentais. Esses dados corroboram com os encontrados por Santos (2011), que ao testar o efeito da *Ilex paraguariensis* sobre o déficit de memória induzido por escopolamina, não verificou a alteração dos parâmetros de atividade locomotora espontânea.

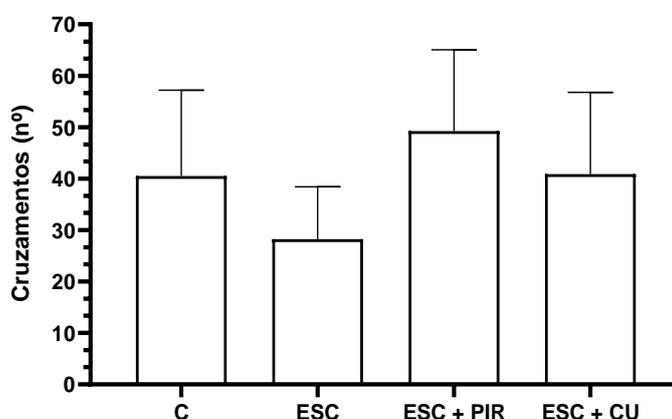


Figura 17: Efeito em tratamento de dose única do extrato etanólico de *Cnidioscolus urens* na atividade locomotora espontânea de camundongos *Swiss* machos avaliados após uma hora do tratamento único. Para análise comparativa foi usado o piracetam (PIR, 200 mg/kg) e salina (C, controle negativo). Os resultados foram expressos

demonstrando as médias \pm EPM dos resultados (n=8). Teste de Shapiro-Wilk, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey.

4.5 Tarefa de reconhecimento de objetos

Assim, na sequência do teste de locomoção espontânea, os animais foram avaliados na tarefa de reconhecimento de objetos, a fim de verificar a possível ação do extrato bruto de *C. urens* na tarefa de reconhecimento de objetos que é um teste comportamental utilizado para acessar memória declarativa em roedores, que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido. Para obtenção de tais resultados seguimos o protocolo determinado por (LEGER et al., 2013).

Está bem estabelecido que existem três tipos de memórias e que podem ser classificadas como memória de trabalho, uma memória imediata que dura segundos ou poucos minutos, memória de curta duração que se desenvolve em poucos segundos/minutos e dura por algumas horas e pôr fim a memória de longa duração que é consolidada lentamente, sendo relativamente permanente (IZQUIERDO et al., 1999). Por esse motivo optamos em avaliar os animais em dois momentos 1,5 e 24 horas após o treino na tentativa de obter parâmetros relacionados a memória de curta e longa duração.

Para tanto, investigamos o efeito do extrato etanólico bruto obtidos de *C. urens* na memória de trabalho, de curta (Figura 18 A) e longa duração (Figura 18 B), avaliadas 90 min e 24 h após a sessão de treino, respectivamente. Os resultados obtidos nos mostram que não há diferença estatística significativa (Figura 18 A e B) ao comparamos os grupos tratados com *C. urens* quando comparados ao controle, o que nos sugere que nesse protocolo de dose única, nas condições testadas, a planta não foi capaz de alterar a memória declarativa dos animais testados.

Processos distintos estão envolvidos na formação desses três tipos de memórias supracitadas, no qual ocorre participação de vários sistemas de neurotransmissores em áreas distintas do cérebro, mecanismos esses que parecem estar envolvidos em mais de um tipo de memória (IZQUIERDO et al., 1998, 1999) e que parecem não terem sido afetados pelos fármacos utilizados nesse protocolo experimental.

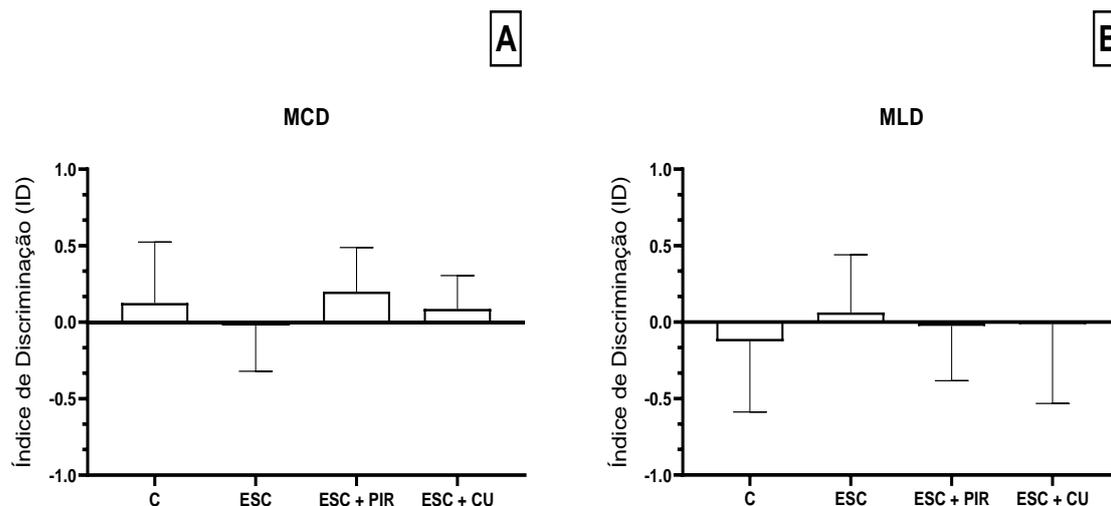


Figura 18: Efeito em tratamento de dose única do extrato etanólico de *Cnidioscolus urens* na memória de curta duração (A) e memória de longa duração (B) de camundongos avaliados na tarefa de reconhecimento de objetos por 10 min. Para análise comparativa foi usado o piracetam (PIR, 200 mg/kg) e salina (C, controle negativo). Os resultados foram expressos demonstrando as médias \pm EPM dos resultados (n=8). Teste de Shapiro-Wilk, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey.

4.6 Tarefa de reconhecimento social

Dando sequência ao nosso estudo, na tentativa de acessar a memória de reconhecimento social em roedores, foi utilizado o protocolo adaptado de (KASAHARA et al., 2011), já que o paradigma intruso-residente vem sendo intensamente empregado em estudos para avaliar esse tipo de memória. No presente trabalho foi utilizado o índice de discriminação que indica a capacidade que o animal tem de discriminar o animal familiar do intruso durante o tempo em que eles passam em observação interagindo próximos um ao outro, já que atualmente, na tentativa de simplificar a análise dos comportamentos sociais em roedores de laboratório, têm-se observado o tempo que os animais permanecem próximos ao seu co-específico (BURMAN; MENDEL, 2000).

Os dados obtidos durante o teste do reconhecimento social não revelaram qualquer alteração significativa nos índices de discriminação (Figura 19) após o tratamento agudo com o *C. urens*, nem mesmo o grupo de controle positivo tratado com Piracetam 200 mg/kg, o que difere dos resultados obtidos por (KWON et al., 2010), no qual observaram que uma única administração via gavagem pré-treino de Piracetam foi capaz de prevenir o déficit cognitivo induzido pela administração sistêmica pós-treino de escopolamina, tanto na tarefa da esQUIVA inibitória, quanto na tarefa do reconhecimento de objetos. Os mesmos resultados também foram observados por CHOPIN; BRILEY (1992) e SCHINDLBR (1989).

Determinadas rotinas laboratoriais podem influenciar o desempenho de ratos no paradigma intruso-residente, o que pode explicar a ausência de alterações significantes em nosso teste uma vez que nem mesmo o controle positivo se comportou como esperado (BURMAN; MENDL, 2000).

Esses resultados ressaltam que rotinas laboratoriais devem ser cuidadosamente consideradas ao se planejar testes comportamentais para avaliar memória de reconhecimento social, uma vez que os resultados experimentais podem ser influenciados não apenas pelas variáveis que o experimentador julga controlar, mas também por variáveis sobre as quais nem sempre existe um controle explícito (MOURA; XAVIER, 2010).

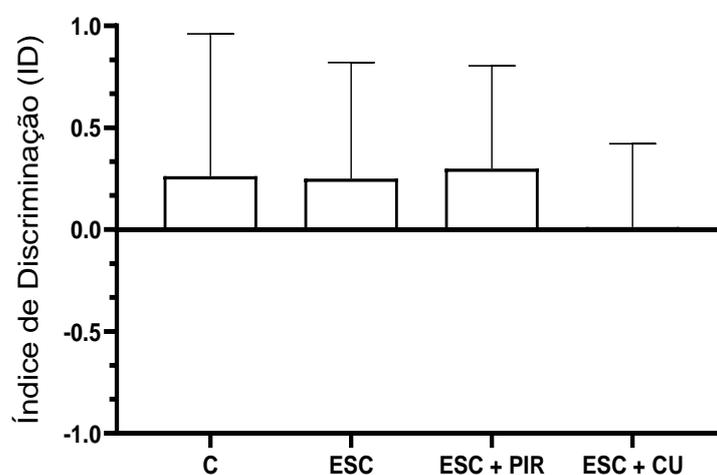


Figura 19: Efeito em tratamento de dose única do extrato etanólico de *Cnidoscopus urens* na memória de curta duração (1,5 horas) no índice de discriminação de camundongos avaliados na tarefa de reconhecimento social por 3 min. Para análise comparativa foi usado o piracetam (PIR, 200 mg/kg) e salina (C, controle negativo). Os resultados foram expressos demonstrando as médias \pm EPM dos resultados (n=8). Teste de Shapiro-Wilk, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey.

4.7 Teste de esQUIVA inibitória do tipo step-down

E por fim, na sequência do teste de reconhecimento social, os animais foram avaliados no teste de esQUIVA inibitória do tipo *Step Dow*, a fim de se verificar a possível ação do extrato bruto de *C. urens* na memória aversiva de camundongos com déficit de memória induzido por escopolamina.

Para o presente trabalho adotamos o protocolo adaptado de Izquierdo et al., (1999) na avaliação de memória aversiva através do teste de esQUIVA inibitória. O resultado deste experimento não mostra alteração significativa da latência para a descida da plataforma nos dois tipos de memória avaliada (memória de curta duração figura 20 A e longa duração figura 20 B), após o tratamento com *C. urens*. Em outras palavras o extrato não foi capaz de prevenir o

déficit cognitivo causado pela administração de escopolamina nos animais na memória de curta e longa duração.

Atribuímos tais resultados a sensibilidade do teste em sofrer alterações provenientes do ambiente de teste, uma vez que a diferença entre as médias obtidas (que apresenta comportamento favorável a diferenças em todos os testes de memórias realizados) do tempo de latência de descida da plataforma eram muito diferentes entre os animais, nos levando a um erro padrão da média muito grande, o que não favoreceu o surgimento de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Tendo em vista que no presente trabalho o número de animais por grupo é pequeno ($N=8$), novos experimentos aumentando o número de animais observados por grupo, seriam necessários para verificar possíveis efeitos do extrato de *C. urens* sobre o déficit de memória induzido por escopolamina.

Além disso, o uso do teste da esquiua inibitória pode não revelar se a substância em teste é capaz de promover a melhora cognitiva, uma vez que a intensidade do choque pode promover o valor teto do teste, não sendo possível observar um aumento da latência (QUILLFELDT, 2016).

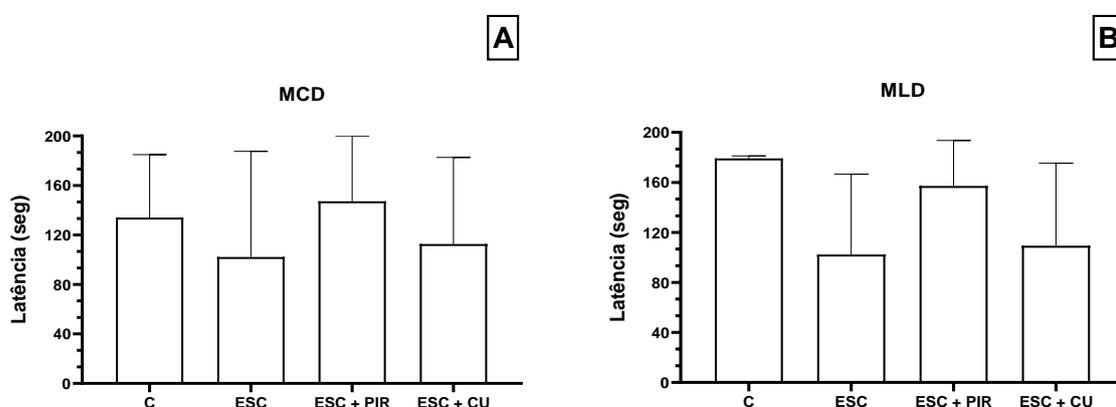


Figura 20: Efeito em tratamento de dose única do extrato etanólico de *Cnidocolus urens* na memória de curta duração (A) e memória de longa duração (B) de camundongos avaliados no teste de esquiua *Step Down* por 3 min. Para análise comparativa foi usado o piracetam (PIR, 200 mg/kg) e salina (C, controle negativo). Os resultados foram expressos demonstrando as médias \pm EPM dos resultados ($n=8$). Teste de Shapiro-Wilk, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey.

4.8 Teste de toxicidade in vivo (dose única)

O protocolo OECD 423 foi adotado para avaliar a toxicidade aguda dos extratos em estudo e foi realizado utilizando a via oral, tomando como parâmetros norteadores o fato de a maioria dos estudos realizados na família de *C. urens* utilizaram tal via, considerando ainda relatos etnobotânicos de uso da planta via oral sendo também a via mais comum utilizada pela

população para tratamento de problemas relacionados a memória. É importante ressaltar que o teste de toxicidade aguda primordialmente deve seguir a mesma via adotada pelos humanos, mesmo que as respostas obtidas não apresentem o mesmo perfil que outras vias como a intraperitoneal, já que o pH, temperatura, absorção, entre outros fatores influenciam na eficácia do fármaco (KLAASSEN; WATKINS III, 2001).

A primeira dose administrada foi de 5 mg/kg do extrato bruto de *C. urens*, já que não foi encontrada quaisquer informações na literatura sobre o extrato a ser administrado, o protocolo foi iniciado como recomendado pela OECD 423. Esses animais foram observados por 14 dias e não apresentaram nenhum sinal de alteração comportamental ocasionado pela ingestão do extrato durante a realização do Triagem hipocrática, sendo eutanasiados após o tempo decorrido (Tabela 8). O mesmo procedimento foi repetido para as doses de 50, 300 e 2000 mg/kg (OECD, 2002), e não foi registrada morte dos animais na avaliação da administração aguda do extrato em camundongos *Swiss* nas doses supracitadas e no período observado. Da mesma forma, nenhuma alteração significativa em relação à triagem toxicológica (Triagem hipocrático) foi observada, conforme demonstrados nas Tabelas 9, 10 e 11.

A observação de alterações macroscópicas na necropsia, os machos, na concentração de 300 mg/kg, demonstraram diferença estatisticamente significativa quanto ao peso do coração, fígado e rim, quando comparados ao controle, ainda tais observações também foram apresentadas na concentração de 2000 mg/kg para os pesos do fígado e rim (Tabela 12). As mesmas alterações foram notadas nas fêmeas (Tabela 13), no fígado na concentração de 2000 mg/kg, quando comparados ao controle. A inexistência de morte ou sinais de maior significância indica a substância como pouco tóxica ou quase não tóxica em uma única dose testada (BARBOSA, 2014; OECD, 2002).

A Figura 23 demonstram que o extrato de *C. urens* não alterou a movimentação espontânea dos camundongos machos (23 A) e fêmeas (23 B) no teste de campo aberto. Tal fato sugere que esse extrato não causa efeitos sobre a atividade locomotora dos animais, pois o número total de cruzamentos avalia a atividade exploratória do animal, uma vez que tal atividade pode ser afetada por fármacos com ação no SNC (ARCHER, 1973; SIEGEL, 1946).

Outros parâmetros observados por esse estudo foram o consumo alimentar e hídrico diurno e noturno, onde é possível observar que durante o teste houve um aumento no consumo alimentar diurno, nos grupos compostos por fêmeas, nas concentrações de 50 e 300 mg/kg (Figura 22 A), no consumo alimentar noturno o aumento foi observado na concentração de 5 mg/kg (Figura 22 B), nos grupos compostos por machos, o aumento foi observado nas

concentrações de 5 e 300 mg/kg quando comparados ao controle (Figura 21A), não sendo observada nas demais concentrações testadas, tanto em machos quanto em fêmeas, conforme Figuras 21 A e B; 22 A e B.

Já no tocante ao consumo hídrico diurno, houve um aumento nos grupos compostos por fêmeas, nas concentrações de 5, 300 e 2000 mg/kg (Figura 22 C), no consumo hídrico noturno o aumento foi observado nas concentrações de 5 e 50 mg/kg (Figura 22 D), nos grupos compostos por machos, o aumento foi observado nas concentrações de 5 e 300 mg/kg quando comparados ao controle (Figura 21 C). No entanto, as demais concentrações tanto em machos quanto em fêmeas, não demonstraram diferença estatisticamente significativa (Figuras 21 C e D; 22 C e D).

Na figura 24 A observa-se que houve uma diminuição significativa do ganho ponderal no grupo composto por machos testados na concentração de 2000 mg/kg quando comparado ao controle, porém as demais concentrações não apresentaram diferenças. Em contrapartida, o grupo composto por fêmeas não apresentaram alterações significativas quanto ao ganho ponderal (Figura 24 B).

Uma substância pode manifestar sua toxicidade sistêmica de diversas maneiras, e também por meio da alteração do peso relativo dos órgãos, redução no consumo de água e comida, alteração comportamental, apatia e alterações na pelagem do animal, sendo o peso corporal um dos parâmetros mais empregados nas avaliações toxicológicas na tentativa de indicar o aparecimento, em alguns casos precoces, de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal (GONZÁLEZ et al., 2017).

O protocolo número 423 da OECD foi adotado em março de 1996 como a segunda alternativa ao teste convencional de toxicidade aguda, descrito na Diretriz de Teste 401. Esta revisão foi considerada oportuna para que fosse alcançado um acordo sobre valores de dose letal para 50% dos animais avaliados (DL_{50}) para a classificação de produtos químicos em categorias de 1 a 5 (sendo a categoria 1 mais tóxica e a categoria 5 menos tóxica). De maneira geral, o protocolo 423 não se destina a permitir o cálculo da DL_{50} com precisão, mas permite a determinação de intervalos de exposição definidos onde a letalidade é esperada. O protocolo permite a determinação de um valor de DL_{50} apenas quando pelo menos duas doses resultam em mortalidade superior a 0% e inferior a 100%, situação que não foi evidenciada com os resultados do presente trabalho. Desta forma, foi possível inferir que o extrato bruto avaliado pode ser classificado na categoria 5 de substâncias com baixa toxicidade aguda oral, sendo a DL_{50} superior a 2000 mg/kg (OECD 423).

TABELA 8. Triagem hipocrática de camundongos *Swiss* machos e fêmeas tratados com *Cnidoscopus urens* – 5 mg/kg.

PARÂMETROS AVALIADOS	DIA 1																		
	15 M	30 M	1 H	2 H	4 H	8 H	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Atividade geral	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Frêmito vocal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resposta ao toque	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resposta aperto cauda	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Contorção	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Queda do trem posterior	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo endireitamento	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tônus do corpo	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Força para agarrar	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ataxia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo auricular	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Reflexo corneal	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tremores	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Straub	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipnose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micção	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Defecação	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Piloereção	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipotermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Respiração	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cianose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperemia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Morte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: Classificação das avaliações: (0) ausente, (1) presente, (2) preservado. N = 3 machos e 3 fêmeas.

TABELA 9. Triagem hipocrática de camundongos *Swiss* machos e fêmeas tratados com *Cnidoscopus urens* – 50 mg/kg.

PARÂMETROS AVALIADOS	DIA 1																		
	15 M	30 M	1 H	2 H	4 H	8 H	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Atividade geral	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Frêmito vocal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resposta ao toque	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resposta aperto cauda	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Contorção	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Queda do trem posterior	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo endireitamento	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tônus do corpo	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Força para agarrar	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ataxia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo auricular	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Reflexo corneal	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tremores	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Straub	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipnose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micção	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Defecação	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Piloereção	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipotermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Respiração	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cianose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperemia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Morte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: Classificação das avaliações: (0) ausente, (1) presente, (2) preservado. N = 3 machos e 3 fêmeas.

TABELA 10. Triagem hipocrática de camundongos *Swiss* machos e fêmeas tratados com *Cnidoscopus urens* – 300 mg/kg.

PARÂMETROS AVALIADOS	DIA 1																		
	15 M	30 M	1 H	2 H	4 H	8 H	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Atividade geral	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Frêmito vocal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resposta ao toque	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resposta aperto cauda	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Contorção	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Queda do trem posterior	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo endireitamento	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tônus do corpo	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Força para agarrar	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ataxia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo auricular	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Reflexo corneal	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tremores	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Straub	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipnose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micção	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Defecação	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Piloereção	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipotermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Respiração	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cianose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperemia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Morte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: Classificação das avaliações: (0) ausente, (1) presente, (2) preservado. N = 3 machos e 3 fêmeas.

TABELA 11. Triagem hipocrática de camundongos *Swiss* machos e fêmeas tratados com *Cnidoscolus urens* – 2000 mg/kg.

PARÂMETROS AVALIADOS	DIA 1																		
	15 M	30 M	1 H	2 H	4 H	8 H	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Atividade geral	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Frêmito vocal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resposta ao toque	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resposta aperto cauda	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Contorção	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Queda do trem posterior	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo endireitamento	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tônus do corpo	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Força para agarrar	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ataxia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo auricular	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Reflexo corneal	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tremores	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Straub	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipnose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micção	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Defecação	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Piloereção	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipotermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Respiração	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cianose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperemia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Morte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: Classificação das avaliações: (0) ausente, (1) presente, (2) preservado. N = 3 machos e 3 fêmeas.

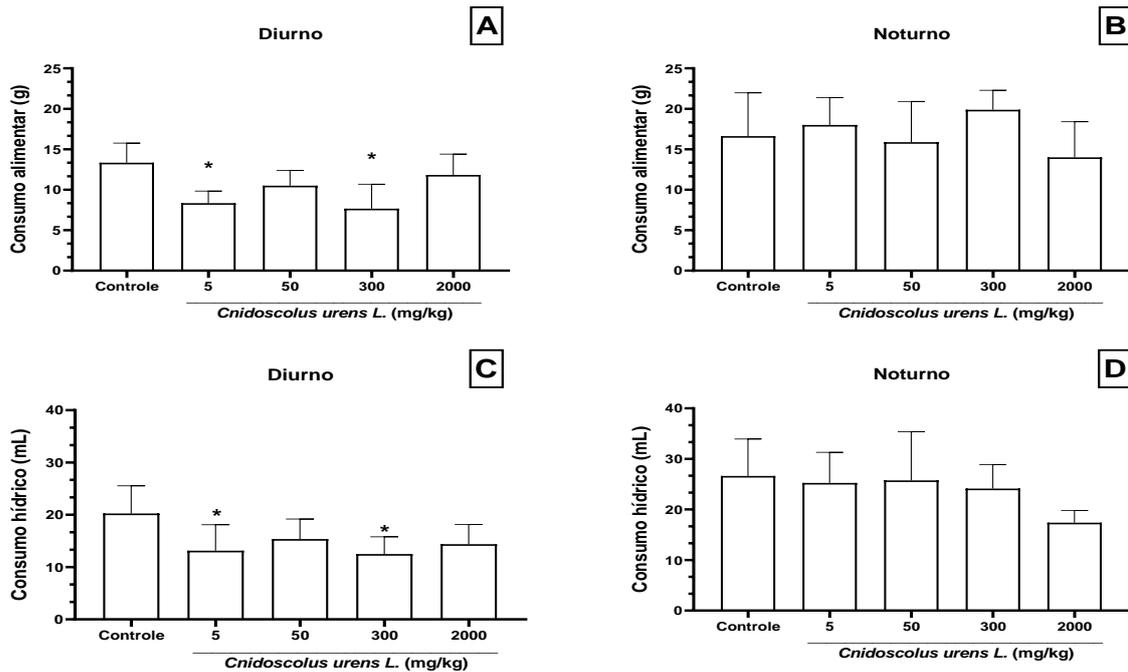


Figura 21: Efeito do tratamento agudo, em diferentes doses, do extrato etanólico de *Cnidoscopus urens* no consumo alimentar diurno (A) e noturno (B) e no consumo hídrico diário diurno (C) e noturno (D) de camundongos Swiss machos avaliados diariamente durante o transcorrer dos 14 dias do protocolo OECD 423. Para análise comparativa foi utilizada a salina (Controle), os resultados foram expressos demonstrando as médias \pm EPM dos resultados onde * $p < 0,05 \neq$ Controle ($n=3$). Teste de Shapiro-Wilk, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey.

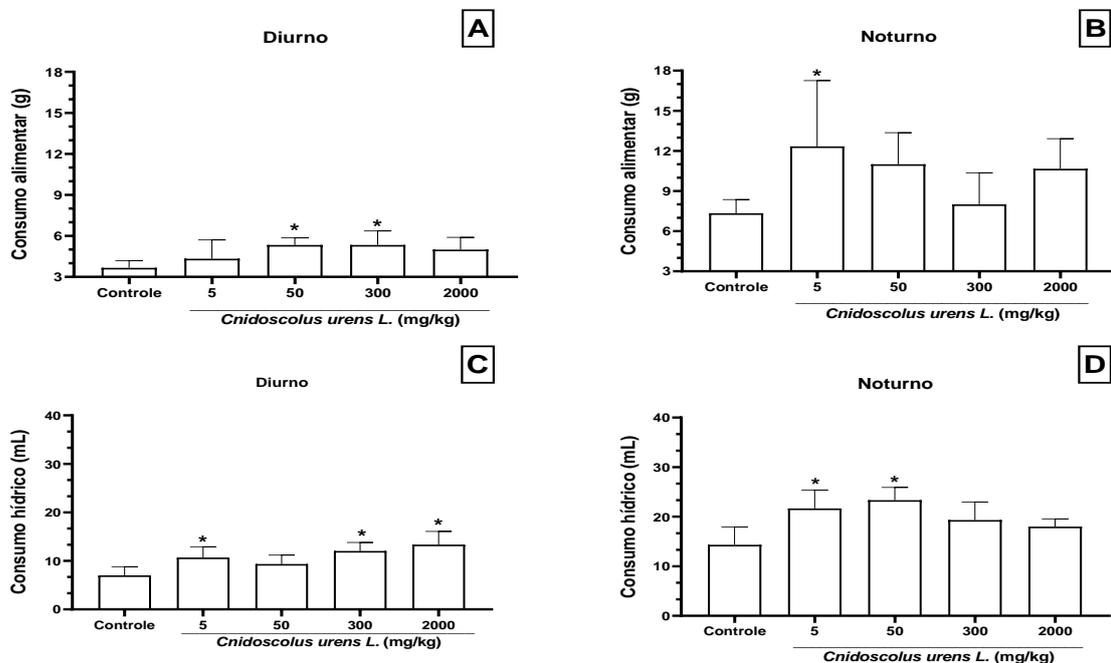


Figura 22: Efeito do tratamento agudo, em diferentes doses, do extrato etanólico de *Cnidoscopus urens* no consumo alimentar diurno (A) e noturno (B) e no consumo hídrico diário diurno (C) e noturno (D) de camundongos Swiss fêmeas avaliados diariamente durante o transcorrer dos 14 dias do protocolo OECD 423. Para análise comparativa foi utilizada a salina (Controle), os resultados foram expressos demonstrando as médias \pm EPM dos resultados onde * $p < 0,05 \neq$ Controle ($n=3$). Teste de Shapiro-Wilk, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey.

TABELA 12. Peso relativo dos órgãos de camundongos *Swiss* machos tratados com *Cnidoscolus urens*.

ORGÃOS	Controle	5 mg/kg	50 mg/kg	300 mg/kg	2000 mg/kg
Coração (g)	0,48±7,07	0,44±1,93	0,44±0,03	0,56±0,00*	0,47±3,76
Fígado (g)	4,42±2,65	4,35±2,25	4,17±0,25	4,86±1,87*	4,90±3,23*
Rim direito (g)	0,74±2,85	0,70±2,59	0,61±0,03	0,65±2,50*	0,73±4,79
Rim esquerdo (g)	0,70±4,78	0,74±3,30	0,65±0,03	0,65±1,91	0,81±3,26*

Legenda: Peso relativo dos órgãos apresentados em gramas onde * $p < 0,05 \neq$ Controle (N = 3). Teste de Shapiro-Wilk, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey.

TABELA 13. Peso relativo dos órgãos de camundongos *Swiss* fêmeas tratadas com *Cnidoscolus urens*.

ORGÃOS	Controle	5 mg/kg	50 mg/kg	300 mg/kg	2000 mg/kg
Coração (g)	0,55±0,02	0,42±0,03	0,43±0,02	0,47±0,03	0,53±0,05
Fígado (g)	3,95±0,03	4,15±0,07	4,13±0,24	3,77±0,24	5,54±0,08*
Rim direito (g)	0,60±0,03	0,60±0,00	0,51±0,02	0,54±0,03	0,59±0,06
Rim esquerdo (g)	0,58±0,01	0,54±0,03	0,51±0,02	0,54±0,03	0,59±0,03

Legenda: Peso relativo dos órgãos apresentados em gramas onde * $p < 0,05 \neq$ Controle (N = 3). Teste de Shapiro-Wilk, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey.

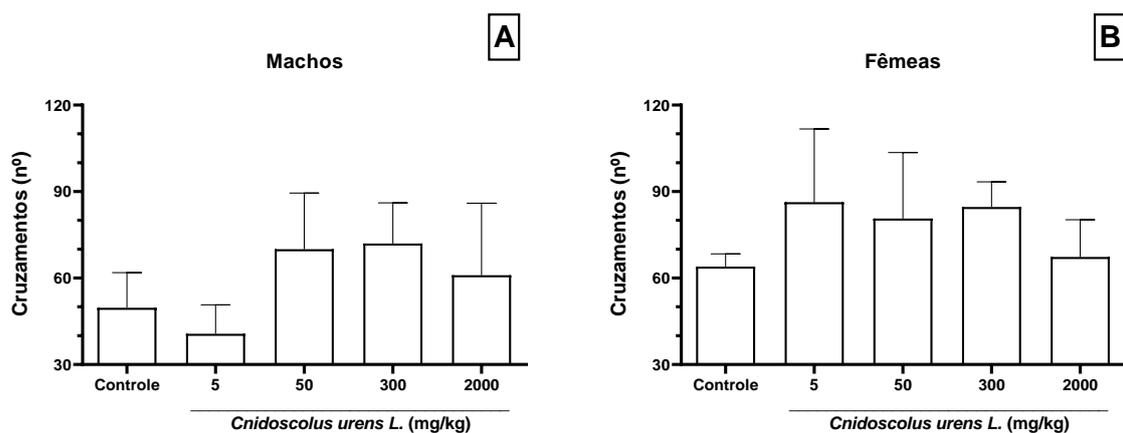


Figura 23: Efeito do tratamento agudo, em diferentes doses, do extrato etanólico de *Cnidoscolus urens* na atividade locomotora espontânea de camundongos *Swiss* machos (A) e fêmeas (B) avaliados através do teste de campo aberto, após uma hora do tratamento único (OECD 423). Para análise comparativa foi usado a salina (C, controle negativo). Os resultados foram expressos demonstrando as médias \pm EPM dos resultados (n=3). Teste de Shapiro-Wilk, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey.

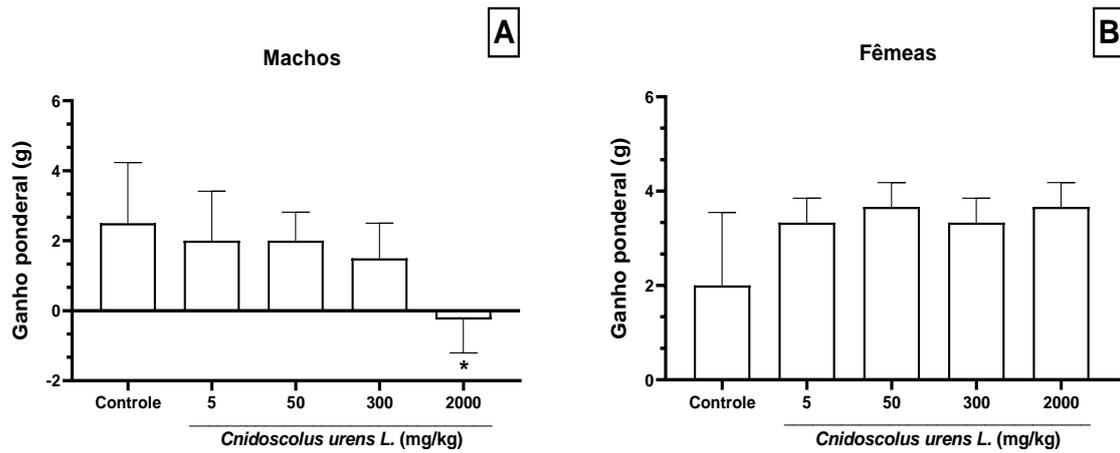


Figura 24: Efeito do tratamento agudo, em diferentes doses, do extrato etanólico de *C. urens* no ganho ponderal de camundongos *Swiss* machos (A) e fêmeas (B) avaliados diariamente durante 14 dias antes e depois do teste OECD 423. Para análise comparativa foi usado a salina (C, controle negativo). Os resultados foram expressos demonstrando as médias \pm EPM dos resultados onde * $p < 0,05 \neq C$ (n=3). Teste de Shapiro-Wilk, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey.

5. CONCLUSÃO

Fica evidente no presente trabalho que o extrato etanólico bruto de *C. urens* L. (Arthur) Euphorbiaceae possui flavonoides, taninos e terpenos em sua composição. Devido a inexistência de morte ou sinais de maior significância, o extrato recebe a classificação 5 de acordo o protocolo OECD nº 423, sendo a DL_{50} superior a 2000 mg/kg, mostrando perfil toxicológico desejável. Ainda, o extrato bruto de *C. urens* não alterou os parâmetros comportamentais de locomoção espontânea, memória declarativa, social ou aversiva de camundongos *Swiss* com déficit cognitivo induzido por escopolamina.

Embora a limitação do modelo escolhido não nos permita inferir que o extrato etanólico bruto de *C. urens* possa ter potencial para o tratamento futuro da Doença de Alzheimer, o seu perfil químico, bem como o perfil de inibição da atividade da enzima AChE evidenciado através da IC_{50} de 0,004652 g/mL para a amostra eritrocitária e IC_{50} de 0,003984 g/mL para a amostra plasmática de BChE (uma das frentes de tratamento atuais da doença), nos encorajam a prosseguir com a purificação do extrato, identificação das novas moléculas responsáveis por tais resultados, adotar um protocolo específico para a Doença de Alzheimer e aumentar o tempo de tratamento empregado, direcionando-nos a novos resultados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAZ. **Medicamentos para doença de Alzheimer: aquisição na rede SUS**. Disponível em: <<https://abraz.org.br/2020/2019/05/28/medicamentos-para-doenca-de-alzheimer-aquisicao-na-rede-sus/>>.

AGRA, M. DE F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 472–508, set. 2008.

ALBUQUERQUE, U. P. DE; ANDRADE, L. DE H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 3, p. 273–285, set. 2002.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–235, maio 1973.

ÁVILA, R.; MIOTTO, E. C. Executive Functions in Normal Aging and Alzheimer ' S Disease. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 52, n. 01, p. 53–62, 2003.

BARBOSA, C. E. S. Avaliação da toxicidade oral aguda e da atividade antitumoral in vivo do látex e extratos de uma apocynaceae de uso popular. **Encyclopedia of volcanoes.**, v. 08, n. 1995, p. 662, 2014.

BLOKLAND, A. REVIEWS Acetylcholine : a neurotransmitter for learning and memory ? **Brain Research Reviews**, v. 21, p. 285–300, 1996.

BONDI, M. W.; EDMONDS, E. C.; SALMON, D. P. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. **Journal of the International Neuropsychological Society**, v. 23, n. 9–10, p. 818–831, 4 out. 2017.

BRANDT, R.; HUNDELT, M.; SHAHANI, N. Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1739, n. 2–3, p. 331–354, jan. 2005.

BURMAN, O. H. P.; MENDEL, M. Short-term social memory in the laboratory rat: its susceptibility to disturbance. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 67, n. 3, p. 241–254, abr. 2000.

BURNS, A.; ILIFFE, S. Alzheimer's disease. **BMJ**, v. 338, n. feb05 1, p. b158–b158, 5 fev.

2009.

CANDIDO, L. P.; CAVALCANTI, M. T.; BESERRA, E. B. Bioactivity of plant extracts on the larval and pupal stages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 420–425, jul. 2013.

CAZARIM, M. DE S. et al. Perspectives for treating Alzheimer's disease: a review on promising pharmacological substances. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 134, n. 4, p. 342–354, ago. 2016.

CHEN, G.-F. et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 9, p. 1205–1235, 17 set. 2017.

CHOPIN, P.; BRILEY, M. Effects of four non-cholinergic cognitive enhancers in comparison with tacrine and galanthamine on scopolamine-induced amnesia in rats. **Psychopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 26–30, jan. 1992.

CRESPO-BUJOSA, H. B.; SUÁREZ RODRÍGUEZ, R. L. F. Nootropics: Phytochemicals with Neuroprotective and Neurocognitive Enhancing Properties. **European Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 17, n. 3, p. 250–255, 2019.

DE ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, n. 1, p. 127–142, jul. 2005.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, jul. 1961.

FLICKER, L.; GRIMLEY EVANS, J. Piracetam for dementia or cognitive impairment (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, p. 1–53, 26 jan. 2004.

FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 32, n. 3, p. 137–148, jun. 2005.

GARUF, M. et al. Atividade Física Para Promoção Da Saúde De Idosos Com Doença De Alzheimer E Seus Cuidadores. **Atividade Física Para Promoção Da Saúde De Idosos Com Doença De Alzheimer E Seus Cuidadores**, v. 16, n. 1, p. 80–83, 2012.

GARCÍA, Y.M. et al. Physicochemical Characterization and Paper Spray Mass Spectrometry Analysis of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg Accessions. **Molecules**, 26, 7206, 2021.

GARCÍA, Y.M. et al. Physicochemical Characterization and Paper Spray Mass Spectrometry Analysis of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg Accessions. **Molecules**, 26, 7206, 2021.

GOLD, P. E. Glucose modulation of memory storage processing. **Behavioral and Neural Biology**, v. 45, n. 3, p. 342–349, maio 1986.

GONZÁLEZ., F. H. D. et al. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. 3ª edição ed. [s.l: s.n.].

GUDAITYTĖ, J.; DVYLYS, D.; ŠIMELIŪNAITĖ, I. Anaesthetic challenges in cancer patients: current therapies and pain management. **Acta Medica Lituanica**, v. 24, n. 2, p. 121–127, 17 jul. 2017.

GUO, T.; NOBLE, W.; HANGER, D. P. Roles of tau protein in health and disease. **Acta Neuropathologica**, v. 133, n. 5, p. 665–704, 6 maio 2017.

HALL, C. S. Emotional Behavior in the Rat. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 5, p. 385–403, 1941.

HAMDAN, A. C. Avaliação neuropsicológica na doença de alzheimer e no comprometimento cognitivo leve. **Psicologia Argumento**, v. 26, n. 54, p. 183, 10 nov. 2017.

HASSELMO, M. E.; MCGAUGHY, J. High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation. In: **Progress in Brain Research**. [s.l: s.n.]. v. 145p. 207–231.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Health Effects and Bioavailability of Dietary Flavonols. **Free Radical Research**, v. 31, n. sup1, p. 75–80, 31 jan. 1999.

HU, Y. et al. A new approach to the pharmacological regulation of memory: Sarsasapogenin improves memory by elevating the low muscarinic acetylcholine receptor density in brains of memory-deficit rat models. **Brain Research**, v. 1060, n. 1–2, p. 26–39, 26 out. 2005.

IZQUIERDO, I. **Organização, consolidação, construção e reconstrução da memória**. [s.l.]

Ed. da UFRJ, 1988.

IZQUIERDO, I. et al. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. **Behavioural Pharmacology**, v. 9, p. 421–427, 1998.

IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 1–11, ago. 1999.

IZQUIERDO, I. Memórias. **Arquivo Maaravi: Revista Digital de Estudos Judaicos da UFMG**, v. 7, n. 12, p. 203–205, 30 mar. 2013.

JAMPILEK, J. et al. Preparation of Silica Nanoparticles Loaded with Nootropics and Their In Vivo Permeation through Blood-Brain Barrier. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

JOSHI, H.; MEGERI, K. Antiamnesic evaluation of *C. phlomidis* Linn. bark extract in mice. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 717–725, dez. 2008.

JOSVIK, N. D. et al. Revisão dos principais genes e proteínas associadas à demência frontotemporal tau-positiva. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 18, n. 1, p. 201–211, mar. 2015.

KASAHARA, M. et al. Influence of transgenic corticotropin-releasing factor (CRF) over-expression on social recognition memory in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 218, n. 2, p. 357–362, 15 abr. 2011.

KEIL, U. et al. Piracetam improves mitochondrial dysfunction following oxidative stress. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. 2, p. 199–208, jan. 2006.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)**. 5ª ed. [s.l.: s.n.].

KLINKENBERG, I.; BLOKLAND, A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 8, p. 1307–1350, jul. 2010.

KUMAR, A.; SINGH, A.; EKAVALI. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 2, p. 195–203, abr. 2015.

KUMAR, GP.; KHANUM, F. Neuroprotective potential of phytochemicals. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 12, p. 81, 2012.

KWON, S.-H. et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 649, n. 1–3, p. 210–217, 15 dez. 2010.

LEGER, M. et al. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, v. 8, n. 12, p. 2531–2537, 21 dez. 2013.

LENT, R. **Cem bilhoes de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. [s.l.] Atheneu, 2010.

LIMA, F. R.; DECKNIS, G. T. **DOENÇA DE ALZHEIMER: AS PERSPECTIVAS DE SE ENCONTRAR BIOMARCADORES-** por Fabiana Rodrigues Lima e Gabrielle Torres Decknis. Disponível em: <<http://cienciasecognicao.org/neuroemdebate/arquivos/3249>>.

LONG, J. M.; HOLTZMAN, D. M. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. **Cell**, v. 179, n. 2, p. 312–339, 3 out. 2019.

LUCENA, G. M. R. DE S. **Efeitos da Cipura paludosa nos déficits comportamentais de ratos adultos expostos ao etanol e/ou metilmercúrio durante o desenvolvimento do snc**. [s.l: s.n.].

LYNCH, M. A. Long-Term Potentiation and Memory. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 87–136, jan. 2004.

MELO, A. L. DE; SALES, M. F. DE. O gênero *Cnidocolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 3, p. 806–827, set. 2008.

MIETELSKA-POROWSKA, A. et al. Tau Protein Modifications and Interactions: Their Role in Function and Dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 4671–4713, 18 mar. 2014.

MOURA, P. J.; XAVIER, G. F. Memória de reconhecimento social em ratos. **Psicologia USP**, v. 21, n. 2, p. 355–389, jun. 2010.

MOURA, L. F. W. G.; SILVA NETO, J. X. DA; LOPES, T. D. P.; BENJAMIN, S. R.; BRITO, F. C. R.; MAGALHÃES, F. E. A.; FLOREAN, E. O. P. T.; SOUSA, D. DE O. B. DE; GUEDES, M. I. F. Ethnobotanic, phytochemical uses and ethnopharmacological profile of genus *Cnidocolus* spp. (Euphorbiaceae): A comprehensive overview. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1670–1679, jan. 2019.

MÜLLER, K. R. et al. Avaliação do Potencial Neuroprotetor do Extrato de *Anacardium microcarpum* no Modelo de Parkinsonismo Induzido por Paraquat em *Drosophila melanogaster*. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3esp, p. 150, 10 ago. 2013.

NABAVI, S. F. et al. Neuroprotective effects of chrysin: From chemistry to medicine. **Neurochemistry International**, v. 90, p. 224–231, nov. 2015.

NEVES, S. M. P.; FILHO, J. M.; MENEZES, E. W. DE. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. [s.l.] Universidade de São Paulo. Instituto de Química, 2013.

OECD. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. **Oecd Guideline for Testing of Chemicals**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. n. 12, p. 1–14, 8 fev. 2002.

OLPE, H.-R.; STEINMANN, M. W. The activating action of vincamine, piracetam, and hydergine on the activity of the noradrenergic neurons of the locus coeruleus. **Behavioral and Neural Biology**, v. 33, n. 2, p. 249–251, out. 1981.

ONAOLAPO, A. Y.; OBELAWO, A. Y.; ONAOLAPO, O. J. Brain Ageing, Cognition and Diet: A Review of the Emerging Roles of Food-Based Nootropics in Mitigating Age-related Memory Decline. **Current Aging Science**, v. 12, n. 1, p. 2–14, 25 set. 2019.

OTTO, T.; EICHENBAUM, H. Neuronal activity in the hippocampus during delayed non-match to sample performance in rats: Evidence for hippocampal processing in recognition memory. **Hippocampus**, v. 2, n. 3, p. 323–334, jul. 1992.

OVAIS, M. et al. Phyto-Therapeutic and Nanomedicinal Approaches to Cure Alzheimer's Disease: Present Status and Future Opportunities. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 10, n. 284, p. 1–67, 23 out. 2018.

PERRY, E. et al. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? **Trends Neurosci**, v. 22, p. 273–280, 1999.

QUILLFELDT, J. A. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. In: ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S. (Eds.). **Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 271–311.

RAMOS, A. L. C. C. et al. Chemical profile of *Eugenia brasiliensis* (Grumixama) pulp by PS/MS paper spray and SPME-GC/MS solid-phase microextraction. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e318974008, 2020.

RAMOS, A. L. C. C. et al. Chemical profile of *Eugenia brasiliensis* (Grumixama) pulp by PS/MS paper spray and SPME-GC/MS solid-phase microextraction. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e318974008, 2020.

RODRIGUES, D. H. et al. Behavioral investigation of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 69, n. 6, p. 938–942, dez. 2011.

SAID-SADIER, N. *et al.* Association between Periodontal Disease and Cognitive Impairment in Adults. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 7 mar. 2023. v. 20, n. 6, p. 4707.

SANTOS, E. C. D. S. **Investigação da atividade neurofarmacológica de *Ilex paraguariensis* em camundongos**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2011.

SAXENA, G. et al. Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin-induced model of dementia in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 581, n. 3, p. 283–289, 10 mar. 2008.

SCHELTENS, P. et al. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 388, n. 10043, p. 505–517, 30 jul. 2016.

SCHINDLBR, U. PRE-CLINICAL EVALUATION OF COGNITION ENHANCING DRUGS. **Pharmacology of Cognition Enhancing Drugs**, v. 13, p. 99–115, 1989.

SCHIPPER, H. M. Biological Markers and Alzheimer Disease: A Canadian Perspective. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2010, n. i, p. 1–7, 2010.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. Alzheimer's disease: pathophysiological and pharmacological features Adriana. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, n. 1 suppl, 2008.

SHERMAN, S. J. et al. Scopolamine impairs human recognition memory: Data and modeling. **Behavioral Neuroscience**, v. 117, n. 3, p. 526–539, jun. 2003.

SIEGEL, P. S. A Simple Electronic Device for the Measurement of the Gross Bodily Activity of Small Animals. **The Journal of Psychology**, v. 21, n. 2, p. 227–236, 2 abr. 1946.

SOBRINHO, T. J. DA S. P. et al. Phytochemical triagem and antibacterial activity of four *Cnidoscopus* species (Euphorbiaceae) against standard strains and clinical isolates. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 21, p. 3742–3748, 9 jun. 2012.

SOUSA, J. A. B. M. **Caracterização comportamental e distribuição de neurônios inibitórios em um modelo animal de autismo induzido por ácido valpróico**. [s.l: s.n.].

SOUZA, A. J. DE. **Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidoscopus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE)**. [s.l: s.n.]. Falta algo aqui, não

SPENCER, J. P. E. et al. Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, n. 1, p. 83–97, fev. 2012.

SPINKS, A. et al. Scopolamine (hyoscine) for preventing and treating motion sickness (Review). In: WASIAK, J. (Ed.). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2007. p. 1–33.

TORRES, K. C. DE L. et al. Biomarcadores na doença de Alzheimer. **Geriatrics, Gerontology and Aging**, v. 6, n. 3, p. 273–282, 2012.

US MEDINA, U. et al. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of chaya extracts (*Cnidoscopus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst). **Nutrición Hospitalaria**, v. 37, n. 1, p. 46–55, 17 fev. 2019.

VALZELLI, L.; BERNASCONI, S.; SALA, A. Piracetam Activity May Differ According to the Age of the Recipient Mouse. **International Pharmacopsychiatry**, v. 15, n. 3, p. 150–156, 1980.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996.

WANG, W.-P. et al. Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons. **Brain Research**, v. 1084, n. 1, p. 210–216, 21 abr. 2006.

WEBSTER, G. L. Synopsis of the Genera and Suprageneric Taxa of Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, n. 1, p. 33, 13 nov. 1994.

WEISS, S. . et al. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 265–271, dez. 1998.

WELLER, J.; BUDSON, A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. **F1000Research**, v. 7, n. 0, p. 1161, 31 jul. 2018.

WINBLAD, B. Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical uses. **CNS Drug Reviews**, v. 11, n. 2, p. 169–82, 7 jun. 2005.

WURTMAN, R. J.; MAGIL, S. G.; REINSTEIN, D. K. Piracetam diminishes hippocampal acetylcholine levels in rats. **Pergamon Press**, v. 28, n. c, p. 1091–1093, 1981.

ZAAMI, S. et al. Nootropics use in the workplace: psychiatric and ethical aftermath towards the new frontier of bioengineering. **European Review for Medical and Pharmacological sciences**, v. 24, n. 4, p. 2129–2139, 2020.

7. ARTIGO

HUMAN BLOOD MARKERS OF CHOLINERGIC NEUROTOXICITY AND NEUROPATHY: A USEFUL GUIDE FOR LABORATORY APPLICATIONS

Authors: Guilherme Luz Emerick ^{a,*}; Valfran da Silva Lima ^a; Bruna Francisquete Costa ^a; Vitoria Hioko da Silva Nakamura ^a; Dayana Veruska Lentz ^a; Juliandra Spagnol Bonache ^a; Marion Ehrich ^b.

a Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso – ICS/CUS/UFMT – Sinop, MT, Brazil.

b Department of Biomedical Science and Pathobiology, Virginia-Maryland College of Veterinary Medicine, Blacksburg, VA, USA.

*** Corresponding Author: Guilherme L. Emerick**

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso - Campus Sinop.

Avenida Alexandre Ferronato, 1200, Distrito Industrial, 78557-267, Sinop, Mato Grosso, Brazil.

E-mail address: glemerick@yahoo.com.br

Phone: +55 66 3533-3124

ABSTRACT

Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) are useful markers to assess the effects of exposure to anticholinesterase insecticides (AChEI). In addition, lymphocyte neuropathy target esterase (LNTE) has been used as biomarker of neuropathic organophosphate compounds (OPs). Thus, this study evaluates the main

types of circulating biomarkers related to the cholinergic system and to the neuropathy induced by OPs in standardized human samples. To achieve this objective, total protein of human plasma, erythrocytes and lymphocytes were first standardized, and then AChE, BChE and LNTE activities in human blood were evaluated in the presence of inhibitors. The acceptance criteria of the regulatory agency was respected with coefficients of regression of curves of 0.9972 for cholinesterase and 0.9956 for LNTE analyses. The wavelength established to perform cholinesterase assay was 450 nm and the time of incubation of the enzymes with inhibitors was 30 minutes. Differences were observed among the IC₅₀ values regarding the in vitro inhibition of AChE, BChE and LNTE in the presence of OPs. In conclusion, the procedures demonstrated by the present work were simple, fast, inexpensive, sensitive, easy to be replicated and suitable to make conclusions about the neurotoxicity induced by AChEI and neuropathic OPs.

Keywords: Circulating Biomarkers, Neurotoxicity, Anticholinesterase insecticides, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Lymphocyte Neuropathy Target Esterase.

1) INTRODUCTION

Brazil has been considered one of the largest consumer of pesticides in the world, with an estimate of seven liters of pesticides exposure per person per year. The population can be exposed to these compounds from environmental, occupational, intentional, accidental and contaminated food sources. Most health problems induced by pesticide poisoning in Brazil have been associated with insecticides classified as organophosphates (OP) and carbamates (CB) (Ferreira et al., 2018; Panis et al.,

2022). From 2007 to 2017, around 40,000 cases of acute pesticide poisoning were reported in Brazil, with around 1,900 people dying (Ministério da Saúde, 2018). Pesticide poisonings are considered a public health problem for Brazil and for the world, since it is estimated to be the cause of more than 3 million cases of human poisoning each year (Guignet et al., 2020). In addition, the World Health Organization recognizes that underreporting of pesticide poisoning is on the order of 1:50 for each registered case and the absence of diagnosis based on laboratory tests makes it difficult to associate clinical signs and exposure to pesticides (Tosetto et al., 2021).

In this context, there is a great demand for laboratories doing toxicological analyses to have simple, fast, inexpensive and efficient methods that meet the requirements of regulatory agencies in their routine for analyzing biomarkers that can assist in the diagnosis and treatment of exposure to OPs. Acetylcholinesterase (AChE) or erythrocyte cholinesterase and butyrylcholinesterase (BChE) or plasma cholinesterase are useful markers to assess the effects of exposure to OPs. Even though there are several studies in the literature that provide different methods for analyzing blood cholinesterases (Wilson et al., 2005, 2002), the need to standardize sample handling, assay methods, enzyme unit and enzyme inhibition for in vitro testing in laboratories monitoring exposures in Brazil and similar countries is substantial.

The method of Ellman (Ellman et al., 1961) is most widely used to assess the activity of blood cholinesterases. The principle of this method (Figure 1A) is based on reactions between 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and sulphhydryl groups released by hydrolysis of acetylthiocholine, which is used as substrate for the enzymatic reaction. The yellow color generated is measured spectrophotometrically at 412 nm. A great advantage of this method is the possibility to analyze both blood

cholinesterases (AChE and BChE) with the same protocol but using erythrocytes or heparinized plasma, respectively.

Neurotoxicity induced by OPs is not limited to the cholinergic system (Tsai and Lein, 2021). Organophosphorus-induced delayed neuropathy (OPIDN) is a neurodegenerative disorder characterized by ataxia progressing to paralysis with concomitant central and peripheral distal axonopathy (Ehrich and Jortner, 2010; Emerick et al., 2012a, 2012c, 2010; Johnson, 1969). The initial molecular event of this syndrome is the inhibition and aging of neuropathy target esterase (NTE) and the activity of this esterase can be verified in human lymphocytes as well as in the central nervous system and peripheral nerves of animal models (Schwab and Richardson, 1986). The method for assessing the activity of this enzyme is based on the detection in the visible region (510 nm) of an orange color formed from the reaction of phenol (Figure 1B) released by the breakage of the phenyl valerate (substrate) and potassium ferricyanide (Maroni and Bleecker, 1986).

Thus, the objective of this work is to present a practical guide for laboratories in Brazil and elsewhere that need to evaluate the main types of circulating biomarkers related to the cholinergic neurotoxicity and to the neuropathy induced by organophosphates (OPs). To achieve this objective, total protein of human plasma, erythrocyte and lymphocyte were standardized, and AChE, BChE and lymphocyte neuropathy target esterase (LNTE) activities in human blood were evaluated. In addition, the activities of these enzymes were assessed in the presence of several OP compounds to demonstrate the differences between the inhibition of each compound with the enzymes.

2) MATERIALS AND METHODS

2.1) Chemicals and Equipment

Sodium dodecyl sulfate (SDS), bovine serum albumin (BSA), Coomassie Brilliant Blue G-250, Histopaque-1077, tris(hydroxymethyl) aminomethane, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), phosphoric acid 85%, acetylthiocholine (ATCh), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), dimethyl sulfoxide (DMSO), paraoxon, dimethylformamide, sodium citrate, triton X-100, 4-aminoantipyrine, potassium ferricyanide, sodium bicarbonate, sodium chloride, hydrochloric acid, sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic, sodium hydroxide, malaoxon, methamidophos and fenamiphos were purchased from Sigma-Aldrich Brazil[®] (São Paulo, Brazil). Tubes with sodium heparin for blood collection were purchased from *Vacuplast*[®] (São Paulo, Brazil). For the experiments reported here, mipafox (CAS 371-86-8) and phenyl valerate (CAS 20115-23-5) were donated by Dr Rudy Richardson (Ann Arbor, Michigan, USA), but these chemicals can be obtained from various vendors listed on the PubChem[®] website (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mipafox#section=Chemical-Vendors> and <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/phenylvalerate#section=Chemical-Vendors>). All chemicals used for these experiments were of analytical grade and solutions were prepared with distilled water. Analytical balance, pH meter, thermostatic bath, centrifuge, vortex, and spectrophotometer UV/Visible were necessary to perform the assays.

2.2) Buffers and solutions

Details for preparation of the following solutions are found in Supplementary material for this manuscript.

- 2.2.1) PBS Buffer pH 7.2 at 25°C;
- 2.2.2) Tris Buffer 50 mM – EDTA 0.2 mM, pH 8.0 at 25°C;
- 2.2.3) Citrate buffer - Tris 50 mM pH 6.0 at 25°C;
- 2.2.4) Paraoxon stock and working solutions;
- 2.2.5) Mipafox stock and working solutions;
- 2.2.6) Phenyl valerate (density = 1.04 g/ml; MW = 178.22);
- 2.2.7) 4-aminoantipyrine (4-AAP) 0.02% and sodium dodecyl sulfate (SDS) 5%;
- 2.2.8) Potassium ferricyanide $K_3Fe(CN)_6$ 0.40%;
- 2.2.9) Coomassie Brilliant Blue G-250;
- 2.2.10) Bovine serum albumin (BSA) (500 µg/ml);
- 2.2.11) Saline solution 0.9%;
- 2.2.12) Phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0 and pH 7.0 at 25°C);
- 2.2.13) Di-thionitrobenzoic acid (DTNB) (10.3 mM);
- 2.2.14) Acetylthiocholine (ATCh) (10.7 mM);
- 2.2.15) Solutions of test OP inhibitors.

2.3) Human Blood Sample Collection

This work was approved by the Ethics Committee of Research of the Federal University of Mato Grosso, protocol number 6.249.176, and all research volunteers expressed free and informed consent. For determination of lymphocyte neuropathy target esterase (LNTE) activity, 2.5 ml of blood was collected from the volunteers in vacuum tubes already containing sodium heparin (green tubes). All blood samples used in the present work were collected in heparinized tubes to prevent early hemolysis (Buck and Buck, 2008). Lymphocytes were separated from the blood using Histopaque-1077[®] reagent according to the scheme of Figure 2. The lymphocytes

were diluted in a buffer (50 mM Tris–HCl, 0.2 mM EDTA, pH 8.0, 25°C) and their protein concentrations determined as described in section 2.4. To measure the activity of AChE in human erythrocytes, 1.0 ml of whole blood was extracted, and erythrocytes were separated from the plasma by centrifugation (720 x g, 10 min). These erythrocytes were subsequently washed twice with 3.0 ml (3 times the volume of blood) of isotonic saline solution using the same spin cycle for plasma separation to avoid interference from other plasma esterases. After this step, the erythrocytes were diluted 1/600 in water for further analysis. For the determination of the BChE activity of humans, remaining plasma was used. Plasma was diluted 1/142 in water for further analysis. The procedure to prepare plasma and erythrocyte samples is illustrated in Figure 3.

2.4) Protein determination

Two analytical curves of proteins were prepared using two different buffers (phosphate buffer 0.1 M, pH 8.0 at 25°C and Tris Buffer 50 mM – EDTA 0.2 mM, pH 8.0 at 25°C) and BSA solution (stock solution of 500 µg/ml) as standard, for subsequent comparison with the results obtained with the samples. Table 1 shows the composition each point of the standard curve and Table 2 shows the scheme of sample analysis. Protein determinations are essential because enzyme activities are expressed as µmol/min/mg of protein. Figure 1C shows the principle of the Bradford method (Bradford, 1976) that was used to determine the total amount of protein of blood samples.

2.5) Blood Cholinesterases

After the dilution of the sample (described at section 2.3) the activities of AChE and BChE were determined using the method described by (Ellman et al., 1961). Sample must be added to 1875 μl (or 1650 for IC_{50} determination) of phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0, 25°C) and 75 μl of DTNB (10.3 mM in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.0, 25°C) were added to the cuvette. Two hundred and twenty-five microliters of ATCh (10.7 mM in phosphate buffer 0.1 M, pH 8.0, 25°C) were used to start the reaction. The absorbance (at 37°C, 450 nm) must be monitored four times at intervals of 60 seconds and the average/minute was used to calculate the enzyme activity according to formula (1) (Kaplan and Pesce, 1989).

$$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL} = \frac{A_t \cdot V_{tr} \cdot 10^6 \cdot 1}{\epsilon \cdot V_s} \quad (1)$$

Where: A_t is the absorbance per minute, V_{tr} is the total volume of reaction (mL), V_s is the volume of sample (mL), ϵ is the coefficient of molar extinction between ATCh and DTNB, 10^6 is the transformation factor from mol to μmol , 1 (cm) is the distance covered by light in the cuvette. The concentration of protein was determined as described at section 2.4 and the esterase activity must be expressed as $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein. Table 3 shows the scheme for determination of cholinesterase activity.

2.6) Lymphocyte Neuropathy target esterase

LNTE assay was described in the study of (Schwab and Richardson, 1986) and modified by (Emerick et al., (2010)). From the lymphocytes obtained in section 2.3, 500 μL were added to the tubes (paraoxon and mipafox). Twenty-five μL of paraoxon (1.6 mM in tris buffer) plus 25 μl of tris buffer were added to the paraoxon tube and 25 μl of mipafox (2.0 mM in tris buffer) plus 25 of paraoxon (1.6 mM in tris buffer) were added to the mipafox tube. After incubation for 20 minutes at 37°C, 50 μl of phenyl valerate (2.8 mM diluted in triton-x 0.03% in water) were added and the lymphocytes were

incubated for 30 minutes at 37°C. The hydrolysis of phenyl valerate is stopped by adding 50 µl of SDS solution (0.02% 4-aminoantipyrine and 5% SDS in tris buffer). Finally, an orange color was developed by adding 50 µl of potassium ferricyanide (0.4% in water). For IC₅₀ determination, the same volume of inhibitor (500 µL) in 5 different concentrations was added to the lymphocyte sample instead of water. LNTE activity was calculated based on the difference between the absorbance (510 nm) in the tube with paraoxon and the tube with paraoxon plus mipafox. Esterase activity must be expressed as µmol/min/mg of protein. Figure 4 illustrates this protocol.

2.7) Statistical analysis

The equations of the standard curves were calculated using the method of least squares and the correlation (r) between the predictor variable, x , and the response variable, y , were calculated by the square root ($r = \sqrt{R^2}$) of the regression coefficients in order to verify the linearity of the standard curves (Kasuya, 2019). Unpaired student's T test was used to compare angular coefficients of protein curves assuming equal values as the null hypothesis (H_0). The concentrations of inhibitors able to inhibit 50% of enzymes activity (IC₅₀) were determined based on the nonlinear fit by plotting the % enzyme activity versus the log of the concentration of inhibitor. Differences among the times of enzyme incubation were examined for statistical significance by one way ANOVA (Analysis of Variance) followed by Tukey's test for multiple comparisons (GraphPad Prism Software[®], version 8.0 for Windows). Chemical structures of Figure 1 (A, B and C) were drawn using ChemSketch[®] Freeware version for Windows. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Experiments were repeated three times and performed in triplicates ($n = 3$). Data were expressed as means \pm standard deviation (mean \pm SD).

3) RESULTS

3.1) Protein determination

Two analytical curves (Figure 5) were made in triplicate with the bovine albumin solution (BSA), diluted from a stock solution of 500 µg/mL, following the protocol provided in Table 1. One curve was built using the phosphate buffer pH 8.0 and showed r of 0.9986, while the other curve was built using the tris-EDTA buffer pH 8.0 and showed an r of 0.9978. The slopes of the two lines were compared and showed no statistically significant difference ($p = 0.5833$). Furthermore, the slopes of the two curves were statistically significant different from zero ($p < 0.0001$). After making the curves and verifying that they met the analytical requirements, it was possible to carry out analyzes on the blood samples so that the activity of each enzyme was given per mg of protein. It is important to point out that plasma and erythrocyte samples were analyzed after dilution in distilled water in the proportion of 1/142 for plasma and 1/600 for erythrocytes for the best fit into the linear range of the protein determination method. Lymphocyte samples were resuspended with 1 ml of tris-EDTA buffer pH 8.0 and the amount of protein was determined before dilution so that the analysis of LNTE activity was always performed with the same amount of protein (25 µg). This step was necessary because the separation of human lymphocytes can vary from sample to sample and could cause results of LNTE activity with high coefficient of variation.

3.2) Esterase activities

BChE and AChE activities assays were performed as described in Table 3 and the procedure for preparation of plasma and erythrocyte samples was performed as

described in Figure 3. Plasma and erythrocyte samples were analyzed in the presence or absence of an organophosphate as inhibitor. In the method described by Ellman (Ellman et al., 1961), the analysis of AChE was performed at a wavelength of 412 nm. However, Figure 6 (black line) demonstrates that at this wavelength there is intense light absorption by the erythrocyte sample (3.5072 units of absorbance) that is rich in hemoglobin, so the cholinesterase analyses of the present work were carried out at a wavelength of 450 nm (Figure 6, red line). This gave a much lower background absorbance value of 0.5668 units of absorbance.

In order to compare the IC_{50} of OPs in relation to BChE and AChE enzymes, at least 5 different concentrations of inhibitors (fenamiphos, malaoxon and methamidophos) were used. The three evaluated compounds showed suitable solubility in water and for this reason it was not necessary to use another solvent with lipophilic characteristics. Initially, enzyme activity was evaluated at the time of contact between the inhibitor and the samples containing the enzymes to determine if timing could influence the IC_{50} value. Figure 7 (A) demonstrates that for AChE, no statistical difference was detected for the inhibition induced by 0.025 mM of malaoxon when evaluated at times of 15, 30, 45 and 60 minutes. On the other hand, Figure 7 (B) shows that for BChE a statistical difference was detected for the inhibition induced by 0.1 mM of malaoxon when evaluated at 15, 30, 45 and 60 minutes of contact. The times of 15, 30 and 45 minutes showed statistical differences when compared to the control and among themselves. The 60-minute time was statistically different from the control and the 15- and 30-minute times, but not different from the 45-minute time (Figure 7B).

After making the enzyme inhibition as a function of time, the values of concentrations that reduced 50% of the activities of the AChE and BChE were calculated during 30 minutes of incubation because it induced significant inhibition in

an average time between 0 and 60 minutes. The insecticide malaoxon showed an IC_{50} 12.7 times lower for AChE than for BChE and the curves showed R^2 of 0.9259 for AChE and 0.9872 for BChE (Figure 8A and 8B). The insecticide fenamiphos showed an IC_{50} 4.74 times higher for AChE than for BChE and the curves showed R^2 of 0.9771 for AChE and 0.9416 for BChE (Figure 8C and 8D). The insecticide methamidophos showed an IC_{50} 3.94 times higher for LNTE than for AChE and the curves showed R^2 of 0.9888 for AChE and 0.9793 for LNTE (Figure 8E and 8F).

4) DISCUSSION

In this study we used standardized laboratory techniques for the analysis of proteins in plasma, erythrocytes and lymphocytes. In Brazil, the regulatory agency that establishes acceptance criteria for analytical curves (linearity) is the national health surveillance agency (ANVISA) through the Resolutions 899/2003 and 27/2012 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2012; Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, 2003). There may be divergences among different regulatory agencies around the world and, for this reason, each author must verify to the acceptance criteria of the method according to the intended scope. For the present study, each curve point was prepared in triplicate and each curve was performed on three different days, being accepted when the linear correlation coefficient (r) was greater than 0.980. Thus, the obtained values of 0.9986 and 0.9978 for the protein curves made in phosphate and tris-EDTA buffers, respectively, meet the quality standard established by ANVISA. The linear range for the protein samples evaluated in the present work was established between 5 and 50 μ g of protein (Figure 5). Also, the angular coefficients of the curves made with phosphate buffer pH 8.0 and tris-EDTA pH 8.0 were compared to verify lack of statistical difference between these

coefficients ($p = 0.5833$). This proves that the presence of different buffers did not significantly influence the values of angular coefficients.

The Bradford method for protein determination (Bradford, 1976) was chosen for the analyses of the present work because it is simple (few steps involved), fast (only 5 minutes of reaction), inexpensive, sensitive and had corrected some shortcomings of the Lowry and the biuret methods. These methods (Lowry et al., 1951; Mokrash and McGilvery, 1956) suffer interference from tris and EDTA that are reagents used in the buffer to proceed the assay of evaluation of LNTE activity. Furthermore, the reaction between the protein and the coomassie G250 dye has a high molar extinction coefficient, thus leading to high sensitivity in the analysis of blood proteins (Kruger, 1994). Commercial kits are available to perform this protein method, but laboratories can purchase the reagents and easily make their own solutions (as described in sections 2.2.9 and 2.2.10 of Supplementary Information) and follow the procedure described in the Table 1 or make the proportional conversion for a micro assay. Coomassie G250 dye does not bind to free amino acids and seems to bind more easily to arginyl residues of proteins, a characteristic that can cause variations in the assay response to different proteins, being considered the main disadvantage of this method (Olson, 2016).

Analysis of protein concentration in enzymology is critical since specific enzyme activity is expressed as a function of the amount of protein to obtain a measure of enzyme purity (Olson, 2016). For this reason, errors in protein analysis tend to amplify other errors in analyses that depend on the amount of protein in the samples. In this case, the accuracy of the analyzes becomes crucial and the results of the present work showed that the minimum relative standard error occurred in the first point of the curve (5 μg) being -2.24 for the curve made with tris-EDTA buffer pH 8.0 and -1.12 for the

curve made with phosphate buffer pH 8.0. These errors are below the values established by ANVISA, which are \pm fifteen percent of the nominal value, except for the lower limit of quantification (5 μ g), which are \pm twenty percent of the nominal value.

AChE and BChE are the most used cholinergic biomarkers to evaluate the effects of exposure to AChEI (Dalmolin et al., 2020). According to several protocols of occupational exposure, these blood esterases must be analyzed in each worker before and after the work tasks (Bonache et al., 2023). However, blood cholinesterases have also been applied as biomarkers for many other situations such as detection of cerebral amyloid deposition (Han et al., 2019), evaluation of arsenic-induced neurotoxicity (Patlolla and Tchounwou, 2005), evaluation of the potential of carbamates involved in the treatment of Alzheimer disease (Zhang et al., 2022) and liver cirrhosis (Ramachandran, 2014). There are also many other serine hydrolases (β -type esterases), including carboxylesterases, that receive less attention regarding their possible contribution to AChEI-induced toxicity. Serine hydrolases that act as blood clotting factors and digestive enzymes are also potentially sensitive to anticholinesterase insecticides, but these biomarkers have not become clearly defined candidates to assess OP neurotoxicity (Quistad and Casida, 2000).

Considering the importance of cholinesterase activity evaluation in laboratory practice, it is necessary to discuss the main circumstances that can lead to improvements or even avoid causes of errors in the chosen methods. The wavelength adopted in the original method for cholinesterase activity evaluation was 412 nm (Ellman et al., 1961). However, if erythrocyte lysates are used, this wavelength presents lack of sensitivity in the determination of AChE activity (Worek et al., 2012) since the absorption band of hemoglobin is intense (Figure 6 – black line). For this

reason, the use of 450 nm could be chosen in some works (Alves et al., 2021; Emerick et al., 2012c; Honorato de Oliveira et al., 2002).

Another important fact to be observed is that the rate of inhibition of AChEI could be used in screening of new products more effective against target insects and safe to non-target species. In this context, the concept of the concentration capable of inducing 50% of enzymatic inhibition (IC_{50}) is widely used as a measure of effectiveness in enzymatic inhibition. In other words, large IC_{50} values represent inhibitors that interact less effectively with an enzyme than inhibitors that have low IC_{50} values. It is important to point out that the IC_{50} value depends on the test system, substrate concentration, mathematical model, types of inhibitors (reversible or irreversible) and time of incubation. Irreversible inhibitors usually bind covalently to the enzyme and the degree of inhibition depends on time (Caldwell et al., 2012). Figure 7 (A and B) shows that for AChE the time of incubation was not significantly different, but for BChE was evident the differences between the percentages of inhibition induced by the same concentration of malaoxon, that is characterized as irreversible esterase inhibitor. For this reason, it is important for all laboratories standardize the time of incubation between the enzyme and inhibitor before starting IC_{50} tests. In terms of mathematical model, nonlinear regression analysis of the percentage of enzyme inhibition as function of log of inhibitor concentration has been considered the most accurate way to determine IC_{50} values (Sebaugh, 2011).

The results of the present work also show differences between the IC_{50} values of each compound tested as inhibitor of the esterases evaluated (Figure 8). It is known that AChE and BChE have 65% of amino acids sequence homology (De Boer et al., 2021), a fact that does not guarantee similar IC_{50} value. There are significant differences in the active center comparing both enzymes and BChE has lower

substrate specificity when compared to AChE. BChE is usually overlooked in the toxicological evaluation of anticholinesterase insecticides, but according to (Giacobini, 2004), this esterase represents 20% of total cholinesterase activity in brain and its importance in cholinergic neurotoxicity could be essential.

NTE is a membrane-bound enzyme, with 1327 amino acids, belonging to the esterase group, with a molecular weight of 155 kDa and whose physiological role has not yet been established (Richardson et al., 2013; Sogorb et al., 2016). In a previous study, (Ehrich et al., 1997) showed that the ability of an OP to be neuropathic or not can be elucidated by the IC_{50} ratio in cultured human and rat cells. Later, this issue was reiterated by (Sogorb et al., 2010) who proposed an alternative methodology to predict whether an OP can generate OPIDN or not. It is based on the comparison of the IC_{50} of both enzymes (IC_{50} NTE/ IC_{50} AChE) in human cells. If the ratio IC_{50} NTE/ IC_{50} AChE is greater than 5 the OP is considered non-neuropathic at reachable concentrations. More recent, our research group has shown that in addition to the IC_{50} ratio, it is necessary to evaluate the esterase inhibition data obtained together with the structure of the OP to know if it is chemically defined as phosphate, phosphonate or phosphoramidate (Emerick et al., 2015; Fernandes et al., 2015). Therefore, considering the results of IC_{50} of methamidophos presented in Figure 8. It is possible to calculate the ratio IC_{50} NTE/ IC_{50} AChE and the number obtained is 3.9. As methamidophos is chemically defined as phosphoramidate and the ratio IC_{50} NTE/ IC_{50} AChE is smaller than 5, this OP could be classified as neuropathic for humans, fact that was corroborated in a previous work (McConnell et al., 1999), but not visualized in the animal model (hen) with the racemate methamidophos (Emerick et al., 2012c).

In conclusion, the present work has showed human blood markers (AChE, BChE and LNTE) that can be used to evaluate the cholinergic neurotoxicity induced

by AChEI and the neuropathy induced by some types of OPs. The procedures demonstrated here are simple, fast, inexpensive, sensitive, easy to replicate and suitable to make conclusions about the effects induced by AChEI and neuropathic OPs. It is important to point out that laboratories must standardize the method for total protein determination, the wavelength for cholinesterase activity assay, the time of incubation of the inhibitors and mathematical model for IC₅₀ calculation before starting the analyses with human samples and follow the acceptance criteria of regulatory agencies according to the purpose of the demand.

Abbreviations: ACh: acetylcholine; AChE: acetylcholinesterase; ATCh: acetylthiocholine; 4-AAP: 4-aminoantipyrine; AChEI: anticholinesterase insecticides; BChE: butyrylcholinesterase; BSA: Bovine serum albumin; CB: carbamate; DTNB: 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid); EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; IC₅₀: inhibitory concentration of 50% of enzyme activity; LNTE: lymphocyte neuropathy target esterase; NTE: neuropathy target esterase; OP: organophosphate; OPIDN: organophosphorus-induced delayed neuropathy; K₃Fe(CN)₆: Potassium ferricyanide; SDS: Sodium dodecyl sulfate; SD: standard deviation; Tris: tris(hydroxymethyl) aminomethane;

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding Statement

Financial support for this study was provided by Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Data Availability Statement

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and Supplementary material.

References

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2012. RDC number 27, Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Brazil.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, 2003. Resolution number 899. https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html, Brazil.
- Alves, H.H.F., Silva, A.T., Pavão, J.M.S.J., Matos-Rocha, T.J., Souza, M.A., Costa, J.G., Fonseca, S.A., Pires, L.L.S., Faé, J., Santos, A.F., 2021. The acetylcholinesterase as indicative of intoxication for pesticide in farmers of conventional and organic cultivation. *Brazilian Journal of Biology* 81, 632–641. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.227875>
- Bonache, J.S., Costa, B.F., Hoshino, M.T., Ludwig, L., Barboza de Oliveira, M.A., Emerick, G.L., 2023. Occupational Evaluation of Federal Highway Police Officers Exposed to Cholinesterase-inhibiting Insecticides. *J Occup Environ Med*. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000002937>
- Bradford, 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, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Buck, D.B., Buck, G.A., 2008. Utilizing Diagnostic Studies, in: *Physician Assistant*. Elsevier, pp. 120–145. <https://doi.org/10.1016/B978-141604485-7.50012-3>
- Caldwell, G.W., Yan, Z., Lang, W., Masucci, J.A., 2012. The IC(50) concept revisited. *Curr Top Med Chem* 12, 1282–90. <https://doi.org/10.2174/156802612800672844>

- Dalmolin, S.P., Dreon, D.B., Thiesen, F.V., Dallegrave, E., 2020. Biomarkers of occupational exposure to pesticides: Systematic review of insecticides. *Environ Toxicol Pharmacol* 75, 103304. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103304>
- De Boer, D., Nguyen, N., Mao, J., Moore, J., Sorin, E.J., 2021. A Comprehensive Review of Cholinesterase Modeling and Simulation. *Biomolecules* 11, 580. <https://doi.org/10.3390/biom11040580>
- Ehrich, M., Correll, L., Veronesi, B., 1997. Acetylcholinesterase and neuropathy target esterase inhibitions in neuroblastoma cells to distinguish organophosphorus compounds causing acute and delayed neurotoxicity. *Fundam Appl Toxicol* 38, 55–63. <https://doi.org/10.1006/faat.1997.2330>
- Ehrich, M., Jortner, B.S., 2010. Organophosphorus-Induced Delayed Neuropathy, in: Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. Elsevier, pp. 1479–1504. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00069-0>
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Emerick, G.L., DeOliveira, G.H., dos Santos, A.C., Ehrich, M., 2012a. Mechanisms for consideration for intervention in the development of organophosphorus-induced delayed neuropathy. *Chem Biol Interact* 199, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.07.002>
- Emerick, G.L., DeOliveira, G.H., Oliveira, R. V., Ehrich, M., 2012b. Comparative in vitro study of the inhibition of human and hen esterases by methamidophos enantiomers. *Toxicology* 292, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.12.004>
- Emerick, G.L., Ehrich, M., Jortner, B.S., Oliveira, R. V., DeOliveira, G.H., 2012c. Biochemical, histopathological and clinical evaluation of delayed effects caused by methamidophos isoforms and TOCP in hens: Ameliorative effects using control of calcium homeostasis. *Toxicology* 302, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.08.002>
- Emerick, G.L., Fernandes, L.S., de Paula, E.S., Barbosa, F., dos Santos, N.A.G., dos Santos, A.C., 2015. In vitro study of the neuropathic potential of the organophosphorus compounds fenamiphos and profenofos: Comparison with mipafox and paraoxon. *Toxicology in Vitro* 29, 1079–1087. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.04.009>

- Emerick, G.L., Peccinini, R.G., de Oliveira, G.H., 2010. Organophosphorus-induced delayed neuropathy: A simple and efficient therapeutic strategy. *Toxicol Lett* 192, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.10.032>
- Fernandes, L.S., Emerick, G.L., Santos, N.A.G. dos, de Paula, E.S., Barbosa, F., Santos, A.C. dos, 2015. In vitro study of the neuropathic potential of the organophosphorus compounds trichlorfon and acephate. *Toxicology in Vitro* 29, 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.01.001>
- Ferreira, V.B., Silva, T.T.C. da, Garcia, S.R.M.C., Srur, A.U.O.S., 2018. Estimativa de ingestão de agrotóxicos organofosforados pelo consumo de frutas e hortaliças. *Cad Saude Colet* 26, 216–221. <https://doi.org/10.1590/1414-462x201800020095>
- Giacobini, E., 2004. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol Res* 50, 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2003.11.017>
- Guignet, M., Dhakal, K., Flannery, B.M., Hobson, B.A., Zolkowska, D., Dhir, A., Bruun, D.A., Li, S., Wahab, A., Harvey, D.J., Silverman, J.L., Rogawski, M.A., Lein, P.J., 2020. Persistent behavior deficits, neuroinflammation, and oxidative stress in a rat model of acute organophosphate intoxication. *Neurobiol Dis* 133, 104431. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.03.019>
- Han, S.-H., Park, J.-C., Byun, M.S., Yi, D., Lee, J.H., Lee, D.Y., Mook-Jung, I., 2019. Blood acetylcholinesterase level is a potential biomarker for the early detection of cerebral amyloid deposition in cognitively normal individuals. *Neurobiol Aging* 73, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.09.001>
- Honorato de Oliveira, G., Moreira, V., Ribeiro Goes, S.P., 2002. Organophosphate induced delayed neuropathy in genetically dissimilar chickens: studies with tri-ortho-cresyl phosphate (TOCP) and trichlorfon. *Toxicol Lett* 136, 143–150. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00295-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00295-3)
- Johnson, M.K., 1969. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase. *Biochemical Journal* 114, 711–717. <https://doi.org/10.1042/bj1140711>
- Kaplan, L., Pesce, A. (Eds.), 1989. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*, 2nd ed. Mosby.
- Kasuya, E., 2019. On the use of r and r squared in correlation and regression. *Ecol Res* 34, 235–236. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.1011>

- Kruger, N.J., 1994. The Bradford Method for Protein Quantitation, in: *Basic Protein and Peptide Protocols*. Humana Press, New Jersey, pp. 9–16. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:9>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–75.
- Maroni, M., Bleecker, M.L., 1986. Neuropathy target esterase in human lymphocytes and platelets. *Journal of Applied Toxicology* 6, 1–7. <https://doi.org/10.1002/jat.2550060102>
- McConnell, R., Delgado-Téllez, E., Cuadra, R., Tórrres, E., Keifer, M., Almendárez, J., Miranda, J., El-Fawal, H.A.N., Wolff, M., Simpson, D., Lundberg, I., 1999. Organophosphate neuropathy due to methamidophos: biochemical and neurophysiological markers. *Arch Toxicol* 73, 296–300. <https://doi.org/10.1007/s002040050621>
- Ministério da Saúde, 2018. *Pesticides from the perspective of the Brazilian Public Health System*. Brasília.
- Mokrasch, L.C., McGilvery, R.W., 1956. Purification and Properties of Fructose-1,6-Diphosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 221, 909–917. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65205-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65205-6)
- Olson, B.J.S.C., 2016. Assays for Determination of Protein Concentration. *Curr Protoc Pharmacol* 73. <https://doi.org/10.1002/cpph.3>
- Panis, C., Kawassaki, A.C.B., Crestani, A.P.J., Pascotto, C.R., Bortoloti, D.S., Vicentini, G.E., Lucio, L.C., Ferreira, M.O., Prates, R.T.C., Vieira, V.K., Gaboardi, S.C., Candiotto, L.Z.P., 2022. Evidence on Human Exposure to Pesticides and the Occurrence of Health Hazards in the Brazilian Population: A Systematic Review. *Front Public Health* 9. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.787438>
- Patlolla, A.K., Tchounwou, P.B., 2005. Serum acetyl cholinesterase as a biomarker of arsenic induced neurotoxicity in sprague-dawley rats. *Int J Environ Res Public Health* 2, 80–3. <https://doi.org/10.3390/ijerph2005010080>
- Quistad, G.B., Casida, J.E., 2000. Sensitivity of blood-clotting factors and digestive enzymes to inhibition by organophosphorus pesticides. *J Biochem Mol Toxicol* 14, 51–56. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0461\(2000\)14:1<51::AID-JBT7>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0461(2000)14:1<51::AID-JBT7>3.0.CO;2-W)

- Ramachandran, J., 2014. Serum cholinesterase is an excellent biomarker of liver cirrhosis. *Tropical Gastroenterology* 35, 15–20. <https://doi.org/10.7869/tg.158>
- Richardson, R.J., Hein, N.D., Wijeyesakere, S.J., Fink, J.K., Makhaeva, G.F., 2013. Neuropathy target esterase (NTE): overview and future. *Chem Biol Interact* 203, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.10.024>
- Schwab, B.W., Richardson, R.J., 1986. Lymphocyte and brain neurotoxic esterase: Dose and time dependence of inhibition in the hen examined with three organophosphorus esters. *Toxicol Appl Pharmacol* 83, 1–9. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(86\)90317-0](https://doi.org/10.1016/0041-008X(86)90317-0)
- Sebaugh, J.L., 2011. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm Stat* 10, 128–134. <https://doi.org/10.1002/pst.426>
- Sogorb, M.A., González-González, I., Pamies, D., Vilanova, E., 2010. An alternative in vitro method for detecting neuropathic compounds based on acetylcholinesterase inhibition and on inhibition and aging of neuropathy target esterase (NTE). *Toxicology in Vitro* 24, 942–952. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.01.008>
- Sogorb, M.A., Pamies, D., Estevan, C., Estévez, J., Vilanova, E., 2016. Roles of NTE protein and encoding gene in development and neurodevelopmental toxicity. *Chem Biol Interact* 259, 352–357. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.07.030>
- Tosetto, E.E., Andrioli, A.I., Christoffoli, P.I., 2021. Análises das causas das subnotificações das intoxicações por agrotóxicos na rede de saúde em município do Sul do Brasil. *Cien Saude Colet* 26, 6037–6047. <https://doi.org/10.1590/1413-812320212612.15182021>
- Tsai, Y.-H., Lein, P.J., 2021. Mechanisms of organophosphate neurotoxicity. *Curr Opin Toxicol* 26, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2021.04.002>
- Wilson, B.W., Arrieta, D.E., Henderson, J.D., 2005. Monitoring cholinesterases to detect pesticide exposure. *Chem Biol Interact* 157–158, 253–256. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.043>
- Wilson, B.W., Henderson, J.D., Ramirez, A., O'Malley, M.A., 2002. Standardization of Clinical Cholinesterase Measurements. *Int J Toxicol* 21, 385–388. <https://doi.org/10.1080/10915810290096595>
- Worek, F., Eyer, P., Thiermann, H., 2012. Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: A versatile tool for in vitro research on medical

countermeasures against organophosphate poisoning. *Drug Test Anal* 4, 282–291. <https://doi.org/10.1002/dta.337>

Zhang, H., Wang, Yuying, Wang, Yuqing, Li, X., Wang, S., Wang, Z., 2022. Recent advance on carbamate-based cholinesterase inhibitors as potential multifunctional agents against Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* 240, 114606. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114606>

FIGURE CAPTION

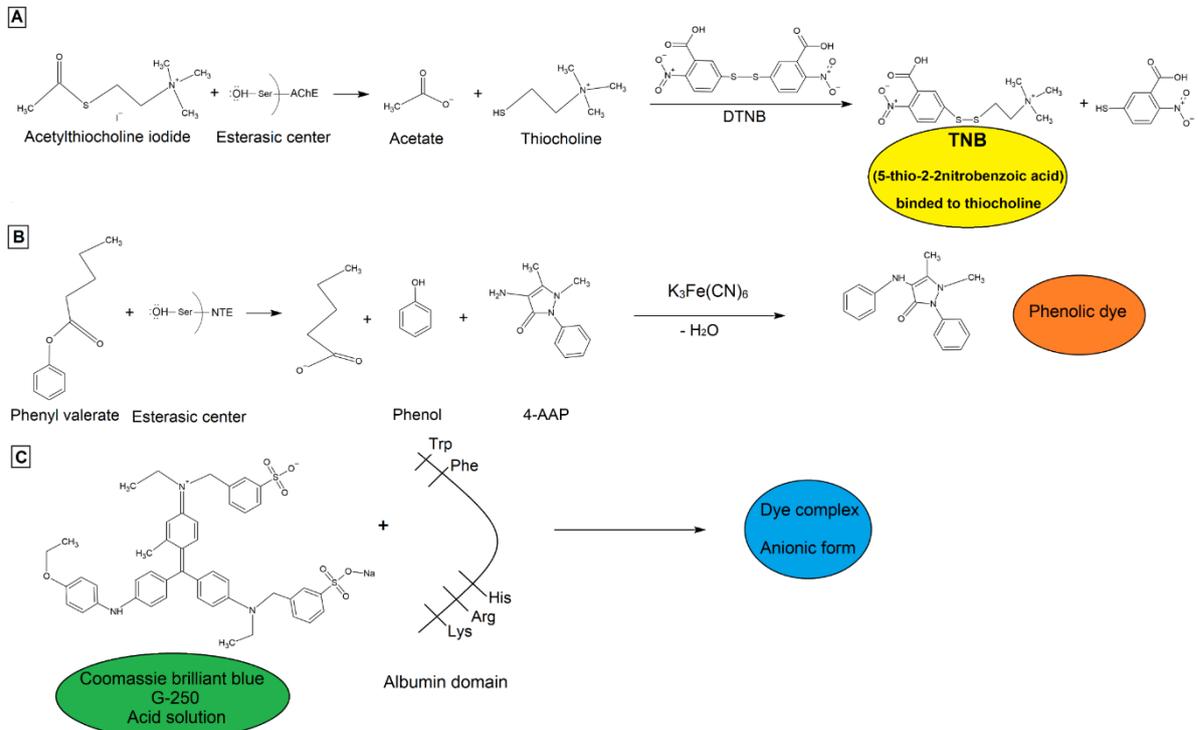


Figure 1. The principle of the methods applied in the present work. Figure 1A is the reaction between acetylthiocholine and blood cholinesterases (Ellman et al., 1961). Figure 1B is the reaction between phenyl valerate and NTE (Maroni and Bleecker, 1986). Figure 1C is the 1A is the reaction between coomassie brilliant blue G-250 in its cationic form and bovine serum albumin (Bradford, 1976).

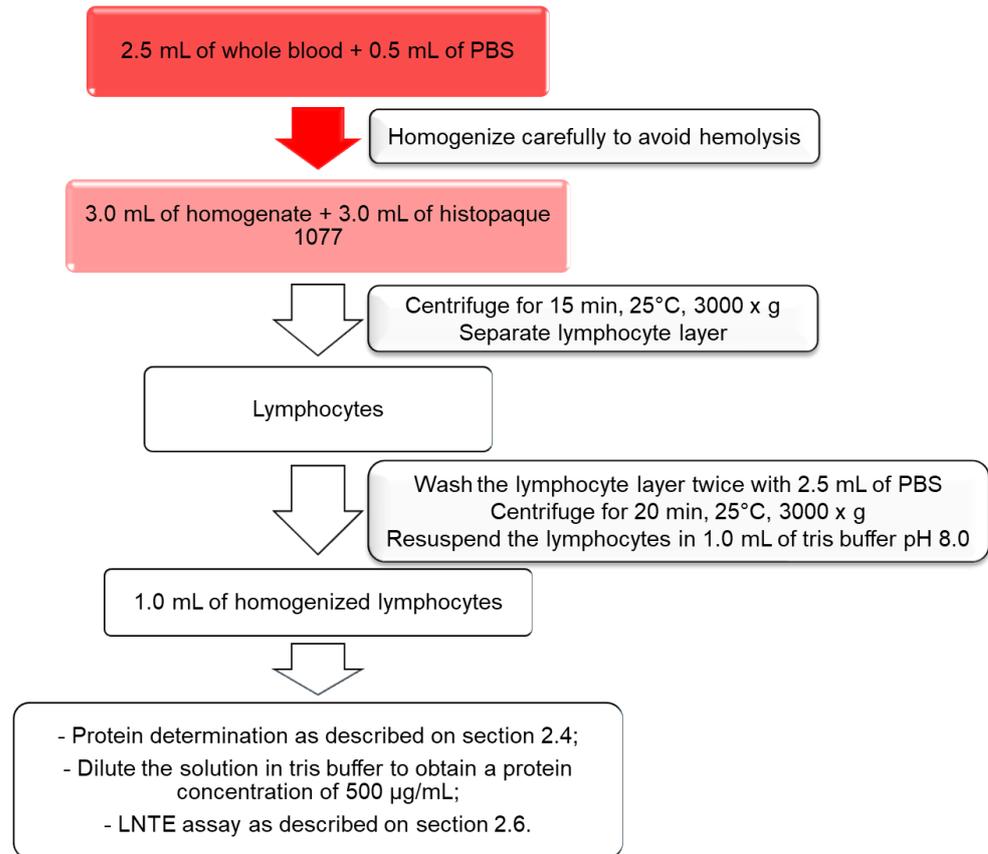


Figure 2. Scheme for the separation of lymphocytes from human blood.

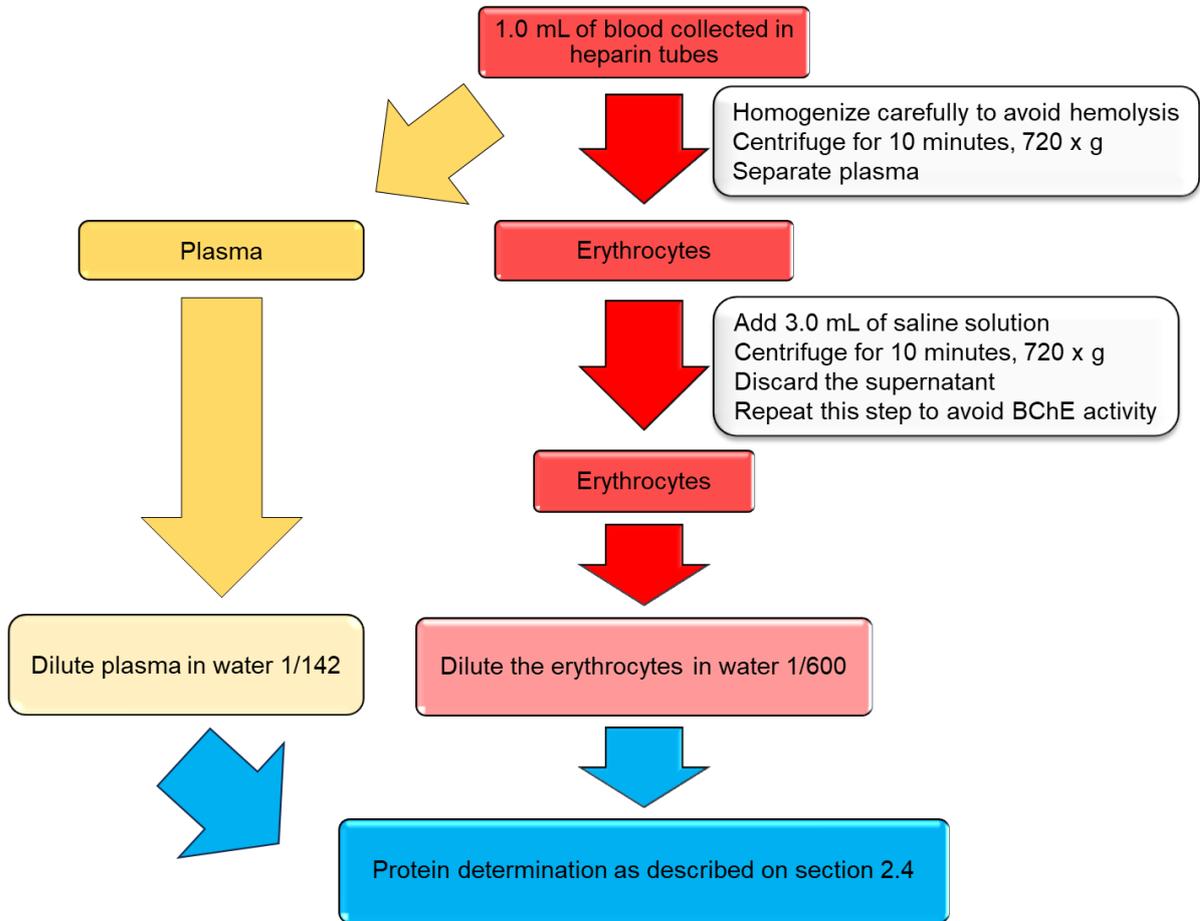


Figure 3. Scheme for preparation of erythrocytes and plasma for analysis of AChE and BChE activity.

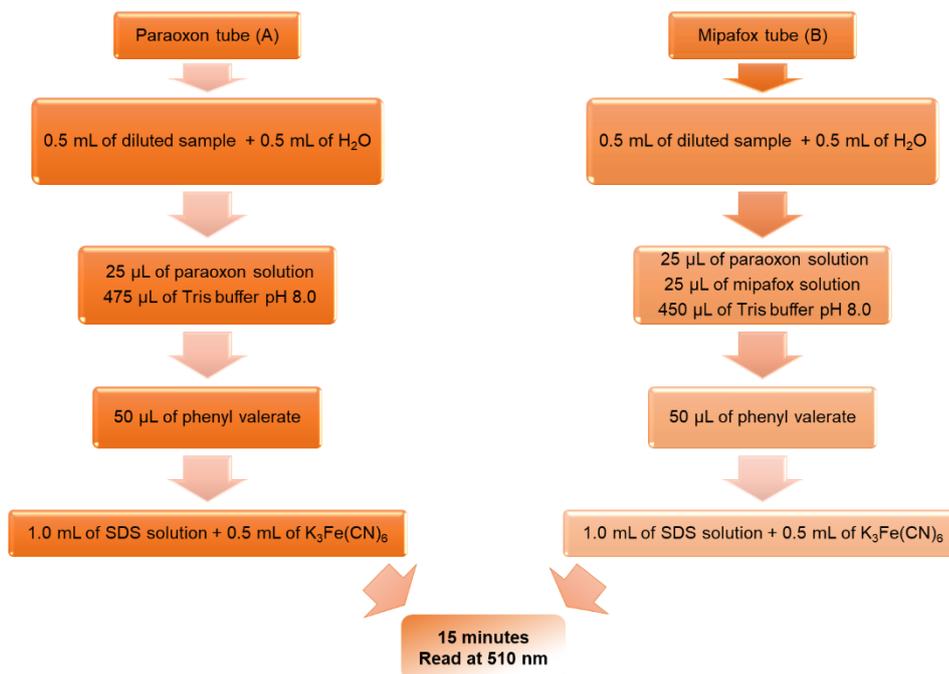


Figure 4. Scheme for analysis of LNTE activity.

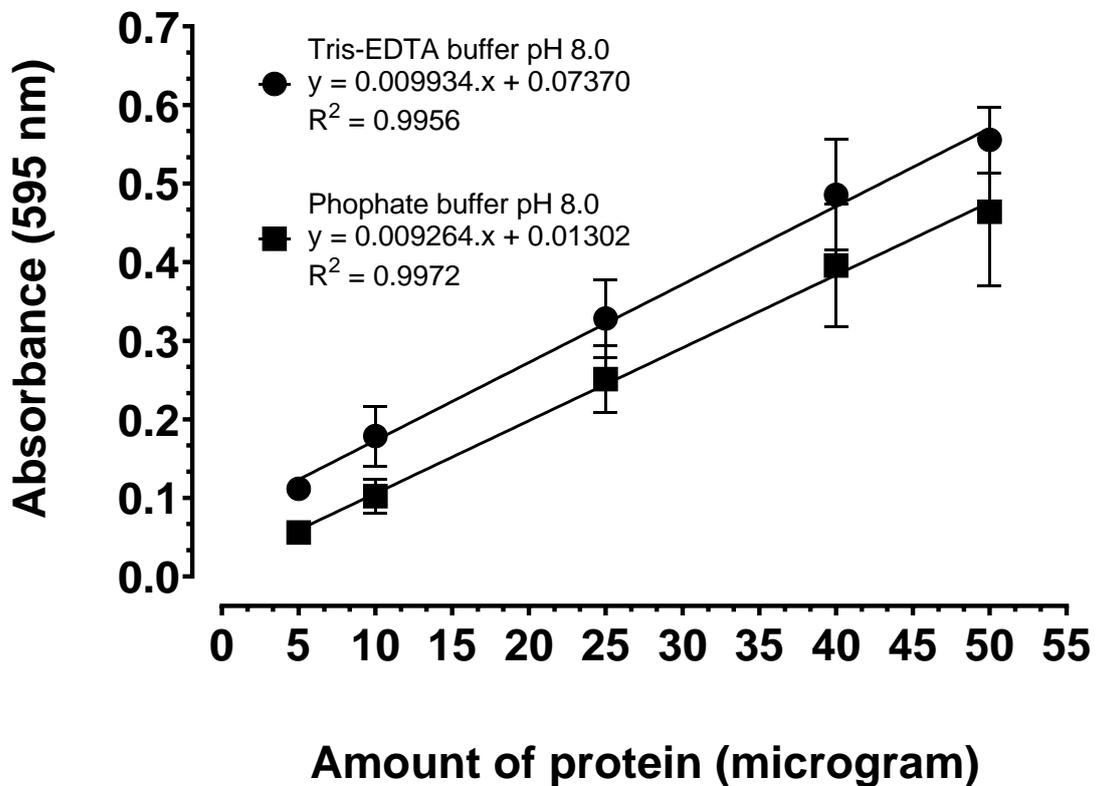


Figure 5. Standard curves of protein made in phosphate buffer pH 8.0 and in tris buffer pH 8.0. Each point was made in triplicate and each curve is the mean of three curves made in different days. The equations of the curves were calculated using the method of least squares. Unpaired student's T test was used to compare angular coefficients of protein curves ($p=0.5833$). Coefficients of correlation (r) are 0.9978 for tris-EDTA buffer and 0.9986 for phosphate buffer. Both coefficients were calculated by the square root ($r = \sqrt{R^2}$).

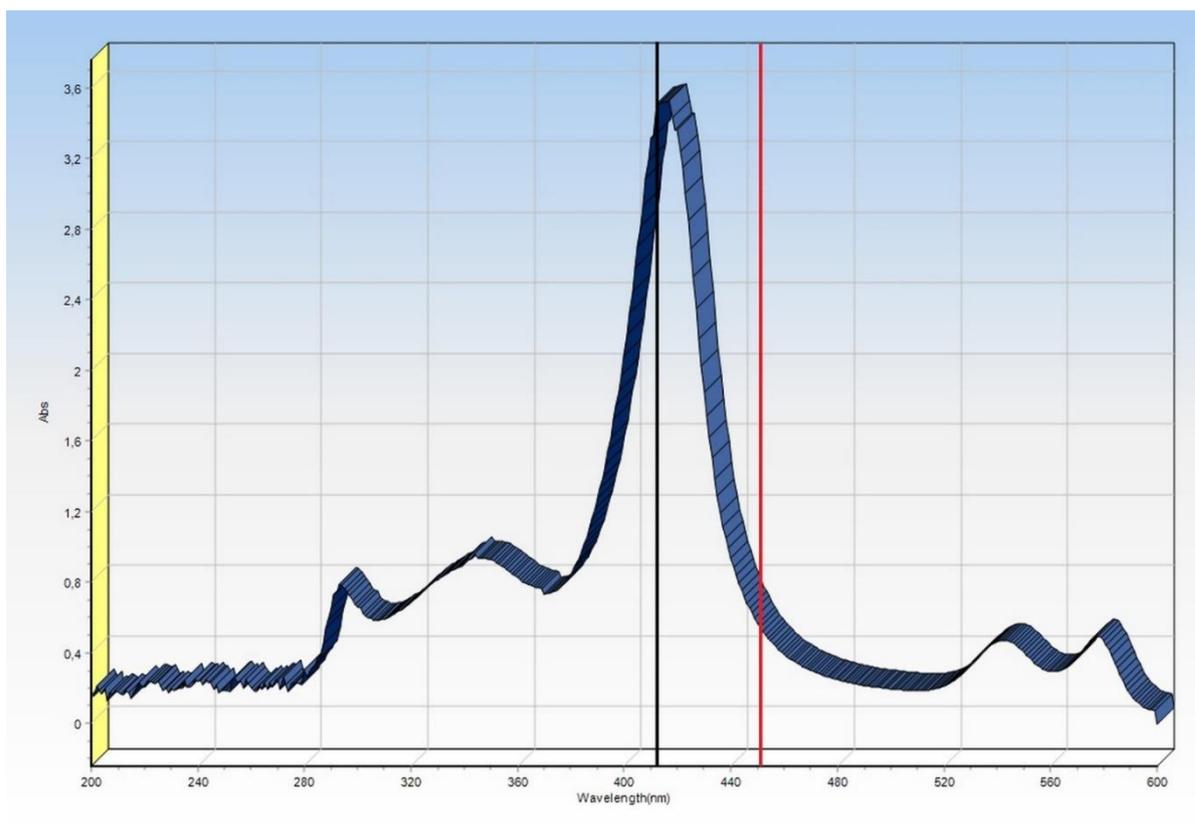


Figure 6. Spectral scan performed between 200 and 600 nm of erythrocyte sample diluted in water (1/600). Black line was drawn at the wavelength of 412 nm and the red line was drawn at the wavelength of 450 nm. Erythrocyte sample was prepared as described in section 2.3, Figure 3.

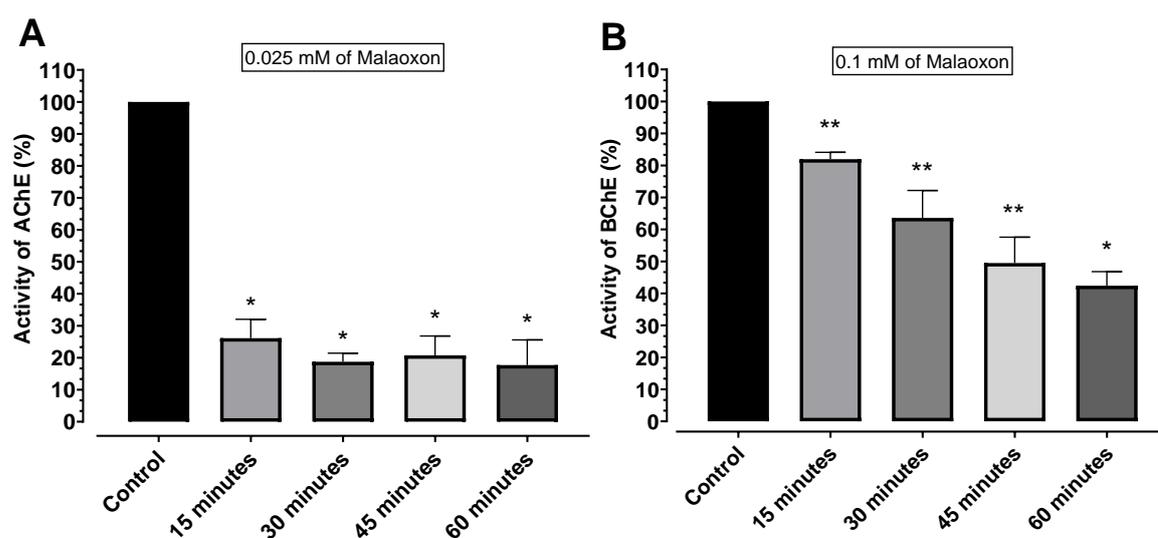


Figure 7. Percentage of activity of (A) AChE and (B) BChE after exposure of malaoxon for 15, 30, 45 and 60 minutes at concentrations of 0.025 and 0.1 mM, respectively. Each time result represents the mean \pm SD of three different samples performed in triplicate. * Statistical difference from control according to ANOVA followed by Tukey for multiple comparisons. ** Statistical difference from control and from adjacent time according to ANOVA followed by Tukey for multiple comparisons.

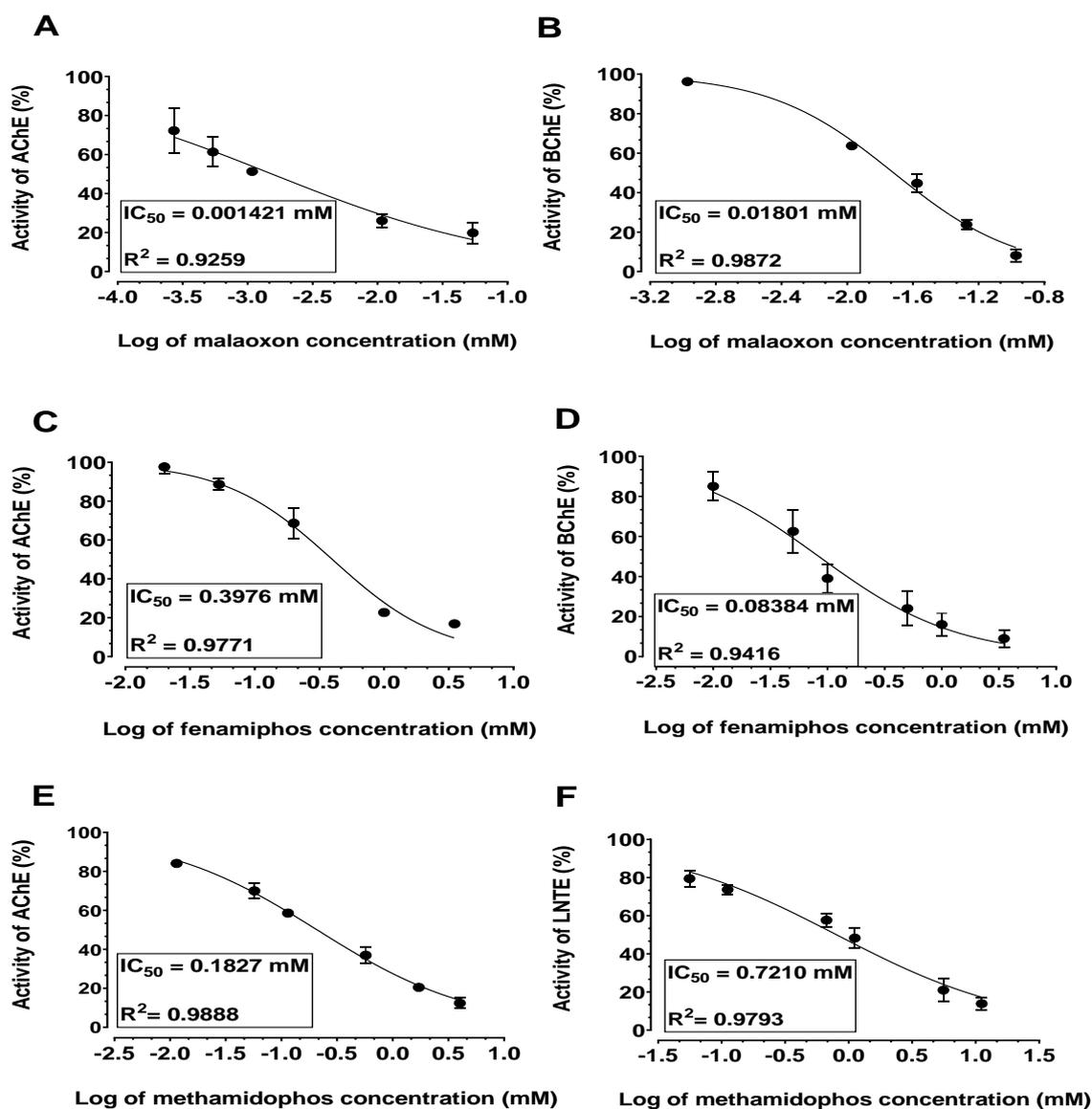


Figure 8. Effects of different concentrations of (A and B) malaoxon and (C and D) fenamiphos on the activity of BChE and AChE in human blood and effects of different concentrations of methamidophos on the activity of LNTE (E) and AChE (F) in human blood. (A, C and F) Activity (%) of AChE versus log of concentrations of OPs. (B and D) Activity (%) of BChE versus log of concentrations of OPs. (E) Activity (%) of LNTE versus log of concentrations of OPs. Each point represents the mean \pm SD of three different samples performed in triplicates. IC_{50} values and R^2 were calculated using nonlinear fit of the log of inhibitor versus percentage of enzyme activity.

TABLES

Table 1. Scheme for preparation of the analytical protein curve.

Point	BSA (500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Buffer	Coomassie Brilliant Blue G-250
Blank	-----	100 μl	4.9 ml
1	10 μl (5 μg)	90 μl	4.9 ml
2	20 μl (10 μg)	80 μl	4.9 ml
3	50 μl (25 μg)	50 μl	4.9 ml
4	80 μl (40 μg)	20 μl	4.9 ml
5	100 μl (50 μg)	0	4.9 ml

The reading was done in triplicate in spectrophotometer UV/VIS at 595 nm after 5 min of reaction. Volumes can be adjusted proportionally according to the final volume of the cuvette or be adapted for microplate.

Table 2. Scheme for analysis of protein in the blood sample.

	BSA (500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Sample	Buffer	Coomassie Brilliant Blue G-250
Blank	-----	-----	100 μl	4.9 ml
Standard	40 μl	-----	60 μl	4.9 ml
Sample	-----	40 μl	60 μl	4.9 ml

The reading was done in triplicate in spectrophotometer UV/VIS at 595 nm after 5 min of reaction. Volumes can be adjusted proportionally according to the final volume of the cuvette or be adapted for microplate.

Table 3. Scheme for determination of cholinesterase activity.

Solution	Volume		
	IC ₅₀	ChE	Blank
Phosphate buffer pH 8.0	1650 µl	1875 µl	1875 µl
DTNB	75 µl	75 µl	75 µl
Diluted sample	225 µl	225 µl	-----
Distilled water	-----	-----	225 µl
Inhibitor	225 µl	-----	-----
ATCh	225 µl	225 µl	225 µl
Total volume	2400 µl	2400 µl	2400 µl

For determination of IC₅₀ value the sample must be added to 225 µl of inhibitor (at least 5 different concentrations). Then it must be 30 min in contact with the sample before beginning the readings. After addition of ATCh, the kinetic program must be started with 4 readings at 450 nm starting at 0 s and 1 min of interval between each reading. Volumes can be adjusted proportionally according to the final volume of the cuvette or be adapted for microplate readers. Inhibitor must be preferentially diluted in distilled water. When water solubility of the inhibitor is low, ethanol or DMSO may be used as vehicle in final concentrations that do not exceed 1% (Emerick et al., 2012b).

8. ANEXOS

8.1 Anexo A - Acesso ao Patrimônio Genético

8.2 Anexo B e C – Certificados do comitê de ética animal

8.3 Anexo D – Parecer Consubstanciado do CEP



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº AB72871

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AB72871**
Usuário: **VALFRAN DA SILVA LIMA**
CPF/CNPJ: **046.346.265-35**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Cnidoscopus urens

Título da Atividade: **AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO DE CNIDOSCOPUS URENS L. (ARTHUR) (EUPHORBIACEAE).**

Equipe

VALFRAN DA SILVA LIMA

Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT

Parceiras Nacionais

33.004.540/0001-00 / Fundação Universidade Federal de Mato Grosso

Data do Cadastro: **13/01/2020 12:39:53**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:56** de **11/05/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**DESPACHO**

Processo nº 23108.021967/2019-41

Interessado: RICARDO DE OLIVEIRA, Comitê de Ética no Uso de Animais - UFMT

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.021967/2019-41 sobre “Avaliação da possível atividade nootrópica do extrato bruto de *Cnidoscopus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE)”, sob a responsabilidade do **Prof. Ricardo de Oliveira**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de 26 de setembro de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.021967/2019-41, entitled “Avaliação da possível atividade nootrópica do extrato bruto de *Cnidoscopus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE)”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on 26th september 2019.

Número de animais experimentados: 120

Number of experimented animals: 120

Cuiabá-MT, 01 de outubro de 2019.

Profa. Dra. Michelle Igarashi Watanabe

Presidente

Prof. Dr. Kledir Anderson Hofstaetter Spohr

Vice-Presidente



Documento assinado eletronicamente por **MICHELLE IGARASHI, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 01/10/2019, às 16:24, 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 **KLEDIR ANDERSON HOFSTAETTER SPOHR, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 01/10/2019, às 17:10, 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 http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1860499** e o código CRC **AB650098**.

Referência: Processo nº 23108.021967/2019-41

SEI nº 1860499

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

DESPACHO

Processo nº 23108.007432/2023-43

Interessado: GUILHERME LUZ EMERICK



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.007432/2023-43 sobre “AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DE *Cnidocolus urens* (L.) ARTHUR EUPHORBIACEAE”, sob a responsabilidade do (a) Guilherme Luz Emerick, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de 23 de fevereiro de 2023.

We certify that the protocol 23108.007432/2023-43, entitled “AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DE *Cnidocolus urens* (L.) ARTHUR EUPHORBIACEAE”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on 23th february.

Número de animais experimentados: 24 camundongos

Number of experimented animals: 24 mices

Validade até 31/12/2025

Cuiabá-MT, 28 de fevereiro de 2023.

PROFA. DRA. MICHELLE IGARASHI WATANABE

PRESIDENTE

PROF. DR. KLEDIR ANDERSON HOFSTAETTER SPOHR

VICE-PRESIDENTE



Documento assinado eletronicamente por **MICHELLE IGARASHI, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 28/02/2023, às 17:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5572556** e o código CRC **EA7F2590**.

Referência: Processo nº 23108.007432/2023-43

SEI nº 5572556

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COLINESTERASES SANGUÍNEAS HUMANAS COMO BIOMARCADORES: ESTUDO COMPARATIVO UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS PARA ANÁLISE.

Pesquisador: Guilherme Emerick

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 70931323.9.0000.8097

Instituição Proponente: Instituto de Ciências da Saúde campus de Sinop

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.249.176

Apresentação do Projeto:

A apresentação do projeto, Hipótese, Critério de inclusão, Critério de exclusão e Número de participantes foram retirados do arquivo Informações Básicas do Projeto (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2149738.pdf, de: 04/08/2023, v.2).

A acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE) são marcadores úteis para avaliar os efeitos de exposição a compostos das classes dos organofosforados (OP) e dos carbamatos (CB). A atividade da AChE é avaliada em amostras de eritrócitos e a atividade da BChE é avaliada em amostra de plasma heparinizado. Atualmente, existem métodos colorimétricos e eletrométricos para avaliar a atividade colinesterásica no sangue humano. Tanto o método colorimétrico como o eletrométrico apresentam vantagens e desvantagens e um trabalho comparativo se mostra importante para que os laboratórios possam escolher o melhor método de acordo com as suas respectivas necessidades. Assim, o objetivo do presente projeto é avaliar a atividade das colinesterases sanguíneas humanas quando expostas, in vitro, a diferentes inibidores através dos métodos colorimétrico e eletrométrico. Para alcançar tal objetivo deverá ser determinado a quantidade de proteínas totais nas amostras de sangue para que a atividade das enzimas seja dada em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. O método desenvolvido por Ellman e colaboradores em 1961 será

Endereço: Alexandre Ferronato, 1200, Bloco16, sala 01

Bairro: Residencial Cidade Jardim

CEP: 78.550-728

UF: MT

Município: SINOP

Telefone: (66)3533-3199

E-mail: cephumanos.cus@ufmt.br

Continuação do Parecer: 6.249.176

aplicado juntamente com o método desenvolvido por Mohammad e colaboradores em 2007 para que se tenha condições de verificar as diferenças das atividades das enzimas quando avaliada por diferentes metodologias na presença de inibidores da classe dos organofosforados e carbamatos. Assim, os resultados do presente trabalho poderão auxiliar laboratórios de biomonitorização no momento da escolha e de aplicação do método que melhor atenda suas respectivas necessidades.

Hipótese:

A escolha do método colorimétrico e eletrométrico para análise das colinesterases sanguíneas pode influenciar no resultado de inibição enzimática causada pelos diferentes inibidores da classe dos organofosforados e carbamatos.

Critério de Inclusão:

12 Homens e 12 mulheres com idade entre 18 e 50 anos.

Critério de Exclusão:

Participantes que relatarem uso frequente de tabaco, etanol e que tenha relatado exposição recente a inseticidas inibidores de colinesterases ou que fazem uso de algum medicamento utilizado para o tratamento cognitivo da doença de Alzheimer.

Número de participantes: 24.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos da Pesquisa foram retirados do arquivo Informações Básicas do Projeto (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2149738.pdf, de: 04/08/2023, v.2).

De acordo com o pesquisador:

Objetivo Primário:

Avaliar a atividade das colinesterases sanguíneas humanas quando expostas, in vitro, a diferentes inibidores através dos métodos colorimétrico e eletrométrico.

Objetivo Secundário:

1. Determinar a quantidade de proteínas no plasma e nos eritrócitos humanos para que a atividade das enzimas seja dada em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína.

Endereço: Alexandre Ferronato, 1200, Bloco16, sala 01

Bairro: Residencial Cidade Jardim

CEP: 78.550-728

UF: MT

Município: SINOP

Telefone: (66)3533-3199

E-mail: cephumanos.cus@ufmt.br

Continuação do Parecer: 6.249.176

2. Padronizar a atividade das enzimas colinesterases em sangue humano de acordo com o método de (Ellman et al., 1961) e (Mohammad, Alias e Ahmed, 2007).
3. Comparar as atividades das enzimas determinadas pelos métodos colorimétrico (Ellman et al., 1961) e eletrométrico (Mohammad, Alias e Ahmed, 2007).
4. Calcular as concentrações capazes de inibir 50% da atividade das colinesterases sanguíneas (IC50) induzida por diferentes compostos de origem natural.
5. Comparar as IC50 das colinesterases sanguíneas determinadas pelos métodos colorimétrico e eletrométrico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os Riscos e Benefícios da Pesquisa foram retirados do arquivo Informações Básicas do Projeto (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2149738.pdf, de: 04/08/2023, v.2).

De acordo com o pesquisador:

Riscos:

(1) Risco de surgir hematoma após a coleta de sangue que será minimizado pelo treinamento da equipe e pela orientação aos voluntários sobre os procedimentos a serem adotados caso o mesmo ocorra, como o uso compressas de gelo, por 15 minutos a cada hora, nas primeiras seis horas.(2) Poderá ocorrer inflamação no local da coleta que será minimizado pelo treinamento da equipe e pela orientação aos voluntários sobre os procedimentos a serem adotados caso o mesmo ocorra, como o uso de compressas de gelo, por 15 minutos a cada hora, nas primeiras seis horas.

Benefícios:

Como benefício, os voluntários terão conhecimento sobre os valores de acetilcolinesterase eritrocitária e butirilcolinesterase plasmática.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se da segunda submissão do presente protocolo de pesquisa que faz parte de um projeto de mestrado onde o proponente é orientador do referido projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- 1- Folha de rosto: Adequado
- 2- Informações básicas na Plataforma Brasil: Adequado
- 3- Projeto de pesquisa: Adequado

Endereço: Alexandre Ferronato, 1200, Bloco16, sala 01

Bairro: Residencial Cidade Jardim

CEP: 78.550-728

UF: MT

Município: SINOP

Telefone: (66)3533-3199

E-mail: cephumanos.cus@ufmt.br

Continuação do Parecer: 6.249.176

- 4- TCLE: Adequado
- 5- TALE: Não se aplica
- 6- Orçamento: Adequado
- 7- Cronograma: Adequado
- 8- Instrumento de coleta de dados: Adequado
- 9- Declaração do local da pesquisa: Adequado
- 10- Protocolo CIES: Não se aplica
- 11- Declaração de infraestrutura: Adequado
- 12- Declaração de recursos próprios: Adequado
- 13- Declaração de que não iniciou a coleta de dados: Adequado
- 14- Declaração do patrocinador: Não se aplica
- 15- Currículo do pesquisador: Atualizado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP/CUS de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 510 de 2016 e Norma Operacional n.º 001 de 2013 manifesta-se pela **APROVAÇÃO** após atendidas as pendências no protocolo de pesquisa. Ressalta-se que deverá encaminhar relatório semestral e final (modelo no site: <https://www.ufmt.br/site/cepsinop>).

Considerações Finais a critério do CEP:

Ressaltam-se as seguintes atribuições do pesquisador:

- 1. Desenvolver o projeto conforme delineado;
- 2. Elaborar relatórios semestrais e final (na forma de notificação na PB), sendo o relatório final submetido até 90 dias após a conclusão da pesquisa;
- 3. Apresentar dados solicitados ao CEP ou CONEP a qualquer momento, se solicitado;
- 4. Manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua responsabilidade, pelo período de cinco anos após o término da pesquisa;
- 5. Encaminhar os resultados da pesquisa para publicação com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico do projeto;
- 6. Justificar, quando for o caso, a interrupção do projeto ou a não publicação dos

Endereço: Alexandre Ferronato, 1200, Bloco16, sala 01

Bairro: Residencial Cidade Jardim

CEP: 78.550-728

UF: MT

Município: SINOP

Telefone: (66)3533-3199

E-mail: cephumanos.cus@ufmt.br

Continuação do Parecer: 6.249.176

resultado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2149738.pdf	04/08/2023 11:08:13		Aceito
Outros	Carta_Resposta_ao_CEP.pdf	04/08/2023 11:05:47	Guilherme Emerick	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO.docx	04/08/2023 11:03:59	Guilherme Emerick	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Modelo_de_projeto_de_pesquisa_PROP EQ_2023.docx	04/08/2023 11:03:28	Guilherme Emerick	Aceito
Outros	Declaracao_de_recursos_propriosassinada.pdf	28/06/2023 16:35:55	Guilherme Emerick	Aceito
Outros	Questionario_aos_voluntarios.docx	28/06/2023 16:06:34	Guilherme Emerick	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Concordancia_Coordenador_LAB_e_NUPADSassinado.pdf	31/05/2023 17:26:29	Guilherme Emerick	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_autor.pdf	31/05/2023 16:55:25	Guilherme Emerick	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	31/05/2023 16:14:27	Guilherme Emerick	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SINOP, 19 de Agosto de 2023

Assinado por:
MAURO ANDRE DRESCH
(Coordenador(a))

Endereço: Alexandre Ferronato, 1200, Bloco16, sala 01

Bairro: Residencial Cidade Jardim

CEP: 78.550-728

UF: MT

Município: SINOP

Telefone: (66)3533-3199

E-mail: cephumanos.cus@ufmt.br