UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos
Área Nutrição Experimental

**Estudo dos efeitos dos flavonóides provenientes do
quiabo (*Abelmoschus esculentum*) em
comportamentos relacionados à ansiedade
em camundongos**

Selma Sanches Dovichi

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador: Prof. Tit. Franco Maria Lajolo
Co-Orientadora: Prof. Tit. Helenice de Souza Spinosa

SÃO PAULO
2009

Selma Sanches Dovichi

**Estudo dos efeitos dos flavonóides provenientes do
quiabo (*Abelmoschus esculentum*) em
comportamentos relacionados à ansiedade
em camundongos**

COMISSÃO JULGADORA DA TESE PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

Prof. Tit. Franco Maria Lajolo
Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 02 de março de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as duas pessoas mais importantes da minha vida:

A João Pedro Sanches Dovichi, meu filho, pelo amor imenso e pelo apoio incondicional, por ter dividido sua mãe com o estudo.

A Josefa Sanches Burgos, minha mãe, pelo incentivo, pela confiança e pela presença constante na elaboração deste trabalho.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Franco Maria Lajolo, orientador deste trabalho que, durante todos estes anos de estudo, muito me ensinou, de muitas maneiras, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

A Dr. Helenice de Souza Spinosa, co-orientadora deste trabalho, pela atenção e apoio durante o processo de definição, elaboração, execução e conclusão deste trabalho.

A Dr. Maria Inés Genovese, pelo apoio e pela contribuição inegável na definição e na elaboração deste trabalho.

A Dr. Beatriz Cordenunsi, pelo apoio e pela discussão no exame de qualificação deste trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Ciências dos Alimentos e a todos os professores que fazem parte do mesmo, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

A todos os colegas pós-graduandos do curso de Ciências dos Alimentos, pela amizade e carinho durante os anos de trabalho.

As técnicas Márcia, Lúcia e Tânia, pela presença constante e pelo auxílio.

Aos professores e colegas do Curso de Nutrição da UFTM, pelo apoio durante a realização e a conclusão deste trabalho.

Aos demais professores e técnicos da UFTM, pelo auxílio e pelas discussões valiosas durante a realização deste estudo.

Ao Dr. Javier Emílio Lazo Chica, da UFTM, por me receber em seu laboratório e propiciar a realização de experimentos e a organização do meu próprio laboratório; seu auxílio foi inestimável.

Aos alunos de graduação dos cursos de Nutrição e Biomedicina da UFTM, Carlos Gustavo Garcia, Geisielli Aparecida Pires Couto, Maria Eugênia Silvestri e Silva, Fábio da Veiga Ued e Laura Debs Procópio, pela ajuda nos experimentos comportamentais.

MUITO OBRIGADA!

“ O Homem deve saber que do cérebro, e apenas do cérebro, emergem nossos prazeres, alegrias, risos e graças, assim como nossos arrependimentos, dores, desgostos e lágrimas. Através dele, em particular, nós pensamos, vemos, ouvimos e distinguimos o feio do belo, o mal do bom, o prazeroso do desagradável...Ele mesmo nos faz maldosos ou delirantes, nos inspira terror ou medo, seja noite ou seja dia, causa insônia, enganos inoportunos, provoca ansiedade, ausência de consciência e atos que são contrários ao habitual. Essas situações de que padecemos provêm todas do cérebro, quando ele não está saudável ou sofre de qualquer outra afecção não natural a qual não está acostumado.”

Hipócrates, século V a.C

RESUMO

DOVICH, S.S. **Estudo dos efeitos dos flavonóides provenientes do quiabo (*Abelmoschus esculentum*) em comportamentos relacionado à ansiedade em camundongos.** 2009. 147 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A ansiedade é uma enfermidade psiquiátrica que acomete milhões de pessoas no mundo todo. Dentre as substâncias que podem ser ligadas ao efeito ansiolítico de ervas medicinais, os flavonóides se destacam porque freqüentemente são detectados nestas ervas. Neste estudo procurou-se avaliar se compostos bioativos da classe dos flavonóides, presentes no quiabo (*Abelmoschus esculentum*), poderiam exercer atividade ansiolítica, empregando-se modelos comportamentais para análise de ansiedade em camundongos. Avaliou-se a quantidade e a qualidade dos flavonóides do quiabo, evidenciando-se que o quiabo liofilizado possui 16mg do flavonóide rutina/100g. Ratos mostraram-se capazes de absorver rutina, quando esta foi perfundida *in situ* no duodeno destes animais. Os comportamentos relacionados à ansiedade foram avaliados no Campo Aberto, no Labirinto em Cruz Elevado e na Placa Perfurada após a ingestão de rações com diferentes concentrações de quiabo (4,5; 7 e 10%) por 7, 14 e 21 dias. Camundongos foram tratados com pentilenotetrazol, droga ansiogênica, e diazepam, droga ansiolítica, para comparar os resultados com aqueles de animais que receberam ração com quiabo. Os resultados obtidos no Campo Aberto mostraram que a suplementação dietética com quiabo aumentou o tempo de permanência na zona interna e também o número de quadros percorridos nesta região, de maneira semelhante ao diazepam, o que evidencia um efeito com perfil ansiolítico. No Labirinto, tanto o tempo de permanência, como o número de entradas nos braços abertos aumentaram em camundongos que consumiram rações suplementadas com quiabo e naqueles tratados com diazepam, corroborando os resultados obtidos no Campo Aberto. Na Placa Perfurada, o tempo de latência para o primeiro mergulho em um dos orifícios diminuiu em camundongos que se alimentaram com ração suplementada com quiabo, de modo similar ou superior ao efeito obtido pelo tratamento com diazepam, e é significativamente menor que o efeito produzido pelo tratamento com pentilenotetrazol. Não foram detectados flavonóides em tecidos biológicos de ratos e camundongos tratados com quiabo ou com rutina. Assim, concluiu-se que a suplementação dietética com o flavonóide rutina, proveniente do quiabo, resultou em efeito ansiolítico em camundongos, mostrando que o enriquecimento da dieta com alimentos ricos em rutina pode contribuir para a prevenção e tratamento do comportamento relacionado à ansiedade em camundongos.

Palavras-chave: flavonóides, rutina, ansiedade, comportamento animal.

ABSTRACT

DOVICH, SS. **Study of the effects of flavonoids from okra (*Abelmoschus esculentum*) in anxiety-related behavior in mice.** 2009. 147 p. Thesis (Ph.D.) - School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

Anxiety is a psychiatric disorder that affects millions of people around the world. Among the substances that may be linked to the anxiolytic effect of medicinal herbs, the flavonoids stand out because they are often found in these herbs. In the present study we sought to evaluate whether the class of bioactive compounds flavonoids, present in okra (*Abelmoschus esculentum*), could exert anxiolytic activity, using models for behavioral analysis of anxiolytic activity in mice. We evaluate the quantity and quality of flavonoids of okra, showing that the okra lyophilisate has 16mg of flavonoid rutin/100g. Rats were shown able of absorb rutin, when it was perfused *in situ* in the duodenum of these animals. Behaviors related to anxiety were evaluated in the Open Field, Elevated Plus Maze and Hole Board after the intake of diets with different concentrations of okra (4.5, 7 and 10%) for 7, 14 and 21 days. Mice were treated with pentilenotetrazol, an ansiogenic drug, and diazepam, an anxiolytic drug, to compare the results with those of animals that received diet with okra. The results obtained in the Open Field showed that dietary supplementation with okra increased the permanence in the inner zone and also the number of tables covered in this region, so similar to diazepam, shows a anxiolytic profile. In the Elevated Plus Maze, the time, as the number of entries in open arms increased in mice that consumed diets supplemented with okra and those treated with diazepam, corroborating the results obtained in the Open Field. In the Hole Board, the latency time to first diving in one of the holes decreased in mice that are treated with diet supplemented with okra, so similar to or greater than the effect obtained by treatment with diazepam and significantly smaller than the effect produced by treatment with pentilenotetrazol. Flavonoids were not detected in biological tissues of rats and mice treated with okra or with rutin. Thus, it was concluded that dietary treatment with the flavonoid rutin, from okra, resulted in anxiolytic effect in mice, showing that the enrichment of the diet with foods rich in rutin can contribute to the prevention and treatment of anxiety-related behavior in mice.

Keywords: flavonoids, rutin, anxiety, animal behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principais vias do metabolismo secundário em vegetais.....	22
Figura 2. Via do ácido chiquímico.....	23
Figura 3. Biossíntese de flavonóides.....	23
Figura 4. Classificação dos polifenólicos dietéticos.....	25
Figura 5. Estrutura dos flavonóides.....	26
Figura 6. Estrutura da benzo- γ -pirona.....	26
Figura 7. Classes de flavonóides.....	27
Figura 8. Padrão de substituição na aglicona do flavonóide.....	29
Figura 9. Glicosilação de um flavonóide.....	30
Figura 10. Estrutura da rutina.....	37
Figura 11. Ilustração esquemática da arena Campo Aberto.....	61
Figura 12. Ilustração esquemática do Labirinto em Cruz Elevado.....	63
Figura 13. Ilustração esquemática da arena Placa Perfurada.....	64
Figura 14. Conteúdo de rutina no perfusato intestinal.....	74
Figura 15. Peso médio corporal de camundongos em tratamento dietético.....	75
Figura 16. Comportamento de camundongos em tratamento dietético por 1 e 7 dias no Campo Aberto.....	81
Figura 17. Comportamento de camundongos em tratamento dietético por 14 dias no Campo Aberto.....	86
Figura 18. Comportamento de camundongos em tratamento dietético por 21 dias no Campo Aberto.....	91
Figura 19. Comportamento de camundongos em tratamento dietético por 1 e 7 dias no Labirinto em Cruz Elevado.....	97
Figura 20. Comportamento de camundongos em tratamento dietético por 14 dias no Labirinto em Cruz Elevado.....	102
Figura 21. Comportamento de camundongos em tratamento dietético por 21 dias no Labirinto em Cruz Elevado.....	107
Figura 22. Comportamento de camundongos em tratamento dietético na Placa Perfurada.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos flavonóides do quiabo liofilizado.....	69
Tabela 2. Composição centesimal do quiabo liofilizado.....	71
Tabela 3. Conteúdo de rutina no perfusato intestinal.....	73
Tabela 4. Balanço nutricional das rações experimentais.....	74
Tabela 5. Comportamento de camundongos em tratamento dietético por 1 e 7 dias no Campo Aberto.....	80
Tabela 6. Comportamento de camundongos em tratamento dietético por 14 dias no Campo Aberto.....	85
Tabela 7. Comportamento de camundongos em tratamento dietético por 21 dias no Campo Aberto.....	90
Tabela 8. Comportamento de camundongos em tratamento dietético por 1 e 7 dias no Labirinto em Cruz Elevado.....	96
Tabela 9. Comportamento de camundongos em tratamento dietético por 14 dias no Labirinto em Cruz Elevado.....	101
Tabela 10. Comportamento de camundongos em tratamento dietético por 21 dias no Labirinto em Cruz Elevado.....	106
Tabela 11. Comportamento de camundongos em tratamento dietético por 1 e 7 dias na Placa Perfurada.....	110
Tabela 12. Comportamento de camundongos em tratamento dietético por 14 dias na Placa Perfurada.....	111
Tabela 13. Comportamento de camundongos em tratamento dietético por 21 dias na Placa Perfurada.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C: graus Centígrados ou Celsius
µg: microgramas
µL: microlitros
µm: micrometros
AIN: *American Institute of Nutrition* – Instituto Americano de Nutrição
AIN-93M: ração purificada proposta pelo AIN em 1993; M: manutenção
b.s.: base seca
b.u.: base úmida
BA: braço aberto do LCE
BCRP: *Breast cancer resistance protein* – Proteína de resistência ao câncer de mama
BDZ: benzodiazepínico
BF: braço fechado do LCE
BHE: barreira hemato-encefálica
C: Carbono
CA: Campo Aberto
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
cm: centímetros
CO₂: gás carbônico
COMT: catecol-O-metil transferase
d.i.: diâmetro interno
DNA: ácido desoxirribonucléico
DZP: diazepam
EUA: Estados Unidos da América
g: gramas
GABA: ácido γ -amino butírico
GABA_A: receptor do ácido γ -amino butírico tipo A
GABA_B: receptor do ácido γ -amino butírico tipo B
GABA_C: receptor do ácido γ -amino butírico tipo C
h: horas
i.p: intraperitoneal
kg: quilogramas
K_i: constante de afinidade do complexo ligante-receptor
LCE: Labirinto em Cruz Elevado
LDL-colesterol: *low density lipoprotein* – lipoproteína de baixa densidade
mg: miligramas
min.: minuto
Mix: mistura
mL: mililitros
mm: milímetros
n.: número de animais
N: Normal
nm: nanômetros
OMS: Organização Mundial da Saúde
PAL: fenilalanina-amônio-liase
P-gp: P-glicoproteína ou transportador multidrogas
PP: Placa Perfurada
PTFE: filtro de poli-tetrafluoretileno
PTZ: pentilenotetrazol

QL: quiabo liofilizado

rpm: rotações por minuto

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Periférico

UDP: *uridine diphosphoglucose* - Uridina di-fosfoglicose

USDA: *United States Department of Agriculture* / Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América

UV: ultra-violeta

v/v: volume/volume

ZE: zona externa

ZI: zona interna

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Flavonóides.....	21
2.1.1 <i>A química dos flavonóides.....</i>	21
2.1.2 <i>Ocorrência de flavonóides na natureza.....</i>	27
2.1.3 <i>Consumo de compostos bioativos e flavonóides dietéticos.....</i>	31
2.1.4 <i>Atividades biológicas dos flavonóides.....</i>	37
2.2 Ansiedade.....	39
2.3 Flavonóides e Sistema Nervoso Central.....	43
2.4 Hipótese.....	50
3 OBJETIVOS.....	51
3.1 Objetivo geral.....	51
3.2 Objetivos específicos.....	51
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 Caracterização nutricional do quiabo.....	53
4.1.1 <i>Amostra.....</i>	53
4.1.2 <i>Identificação e quantificação de flavonóides do quiabo.....</i>	53
4.1.2.1 <i>Preparo do extrato metanólico.....</i>	53
4.1.2.2 <i>Extração em fase sólida.....</i>	54
4.1.2.3 <i>Análise por CLAE.....</i>	54
4.1.3 <i>Análise da composição centesimal do quiabo.....</i>	55
4.2 Formulação das rações experimentais.....	56
4.3 Animais e condições de biotério.....	57
4.3.1 <i>Avaliação neurológica neonatal de camundongos.....</i>	58
4.3.2 <i>Administração de rações experimentais aos camundongos.....</i>	58
4.4 Ensaio em ratos de absorção intestinal <i>in situ</i>.....	59
4.5 Análise do comportamento de camundongos.....	60
4.5.1 <i>Drogas.....</i>	60
4.5.2 <i>Teste do Campo Aberto.....</i>	61
4.5.3 <i>Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....</i>	62
4.5.4 <i>Teste da Placa Perfurada.....</i>	63

4.6 Delineamento experimental.....	64
4.6.1 <i>Experimento 1: Análise do comportamento no Campo Aberto.....</i>	64
4.6.2 <i>Experimento 2: Análise do comportamento no Labirinto em Cruz Elevado</i>	65
4.6.3 <i>Experimento 3: Análise do comportamento na Placa Perfurada.....</i>	65
4.7 Eutanásia dos camundongos.....	65
4.8 Análise de flavonóides em tecidos biológicos.....	66
4.9 Análise estatística.....	67
4.9.1 <i>Ensaio em ratos de absorção intestinal in situ.....</i>	68
4.9.2 <i>Análise de flavonóides em tecidos biológicos.....</i>	68
4.9.3 <i>Testes comportamentais.....</i>	68
5 RESULTADOS.....	69
5.1 Caracterização de compostos bioativos do quiabo.....	69
5.2 Balanço nutricional das rações experimentais.....	72
5.3 Ensaio em ratos de absorção intestinal <i>in situ</i>.....	74
5.4 Análise do peso corporal de camundongos.....	75
5.5 Análise do comportamento de camundongos.....	76
5.5.1 <i>Experimento 1: Análise do comportamento de camundongos no Campo Aberto.....</i>	76
5.5.1.1 Tratamento dietético por 7 dias.....	76
5.5.1.2 Tratamento dietético por 14 dias.....	82
5.5.1.3 Tratamento dietético por 21 dias.....	87
5.5.2 <i>Experimento 2: Análise do comportamento de camundongos no Labirinto em Cruz Elevado.....</i>	92
5.5.2.1 Tratamento dietético por 7 dias.....	92
5.5.2.2 Tratamento dietético por 14 dias.....	98
5.5.2.3 Tratamento dietético por 21 dias.....	103
5.5.3 <i>Experimento 3: Análise do comportamento de camundongos na Placa Perfurada.....</i>	108
5.6 Análise de flavonóides em tecidos biológicos.....	114
6 DISCUSSÃO.....	115
7 CONCLUSÕES.....	134
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135

1 INTRODUÇÃO

O comportamento, como abordado no presente estudo, consiste nos movimentos, com certa finalidade, que um animal ou um ser humano exibem. Esses movimentos podem ser simples, como correr e nadar, ou complexos, como comer e procriar; mas não só esses. Movimentos de pequenas partes do corpo também devem ser considerados, como emissão de sons e expressões faciais. E, sem dúvida, o comportamento também pode consistir em ficar parado e olhando atentamente, ou, talvez, apenas pensando – fazendo internamente alguma atividade que poderá influir no comportamento subsequente. Portanto, pode-se denominar comportamento como o movimento, mudança de movimento ou imobilidade absoluta, fenômenos observáveis em animais e seres humanos. De acordo com essa definição, todos os seres vivos possuem uma gama de comportamentos, alguns com um repertório bastante limitado, outros com uma variedade tão extensa que ainda necessita ser investigada, como o comportamento dos seres humanos. Grande parte do comportamento exibido por animais e seres humanos contribui significativamente para a sobrevivência e esta é a sua importância.

Não é possível abordar a ciência do comportamento sem citar quatro pioneiros desta área, a saber: Charles Darwin, J. Henri Fabre, C. Lloyd Morgan e Ivan Pavlov. Antes que o conceito de seleção natural fosse enunciado por Charles Darwin (1809-1882), muitos cientistas tinham uma atitude primária em face do comportamento e passavam a maior parte do tempo tentando encontrar paralelos entre coisas como a sociedade das formigas e as sociedades humanas. As teorias de Darwin determinaram a compreensão do próprio comportamento como um fenômeno em evolução e um instrumento de sobrevivência. A importância de J. Henri Fabre (1823-1915) consiste no fato de ter sido ele o primeiro a fazer observações detalhadas dos animais no seu habitat e o primeiro a manter registros minuciosos e metódicos do que via; passou 40 anos observando as abelhas e as vespas; assombrou o mundo provando quão complexo é, na realidade, o comportamento dos insetos. Em-

bora C. Lloyd Morgan (1852-1936) tivesse chegado ao auge de sua carreira 50 anos depois de Darwin, os cientistas ainda estavam procurando interpretar o comportamento animal em função de atos e sentimentos humanos. Lloyd Morgan concorreu para que se desse um fim definitivo a esse modo de pensar ao mostrar que se pode quase sempre encontrar um processo mental mais simples para explicar o ato de um animal e que a explicação mais simples pode ser a certa. A carreira de Ivan Pavlov (1849-1936) se concentrou no laboratório. Numa série de experimentos, ele fez com que a boca de um cão salivasse na hora da refeição, usando um estímulo artificial, neste caso o toque de uma campainha. Em pouco tempo descobriu que a boca do cão se enchia de saliva na antecipação do alimento quando uma campainha soava. Nasceu assim o conceito fundamental do reflexo condicionado. Desta época em diante, o ramo da Neurociência que se preocupa com o estudo do comportamento se desenvolveu expressivamente; pesquisadores como Konrad Z. Lorenz, Donald R. Griffin, B. Frederic Skinner, Daniel S. Lehrman, Robert A. Hinde, Harry F. Harlow, entre outros, contribuíram maciçamente para o avanço desta ciência.

No início da ciência do comportamento, duas escolas distintas de pensamento dividiram este ramo dos estudos em animais: a escola européia, que assumiu metodologia “etológica”, concentrada no comportamento instintivo ou inato, observado e testado nos animais em estado selvagem e em seu habitat natural, e a escola americana, com metodologia “psicológica”, mais interessada em analisar o comportamento em condições controladas de laboratório. No presente estudo a metodologia psicológica, ou “behaviorista” foi seguida nos experimentos para avaliação do comportamento de camundongos.

O comportamento social de todos os animais e dos homens pode ser definido como conjuntos de movimentos ou ausência de movimentação de grupos musculares, membros ou de todo o corpo com objetivos específicos (avaliação de risco, esquiva, medo, alimentação, acasalamento, agressão, sono/vigília, entre outros), que tem como efeito final manter a interação entre os animais e seu meio-ambiente, ou com outros animais da mesma espécie

ou de outras espécies, de modo a garantir a preservação da sua sobrevivência individual e da espécie como um todo. O comportamento social é elaborado pela integração entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e Periférico, utilizando aferências (por exemplo, estímulos visuais, tácteis, auditivos), circuitos centrais específicos ou gerais (por exemplo, memória, aprendizado) e eferências (sistema somatomotor, sistema nervoso simpático e parassimpático) para emitir respostas que sejam adequadas à situação e que contribuam para a manutenção da vida do animal.

Todos os comportamentos sociais, afetivos e emocionais exibidos pelos animais são resultado do funcionamento do Sistema Nervoso. O que é chamado comumente de *mente* se refere ao resultado de uma variedade de operações realizadas pelo cérebro (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000). As ações do cérebro possibilitam não apenas comportamentos motores, como caminhar ou comer, mas também todas as complexas ações cognitivas que se acredita representarem a essência humana, como pensar, falar ou criar obras de arte. Estes comportamentos são vitais para a manutenção das espécies por contribuírem com a sobrevivência das mesmas. Conseqüentemente, todos os distúrbios de comportamento que caracterizam as doenças mentais em seres humanos, como distúrbios afetivos, de origem emocional, ou cognitivos, com base funcional, são distúrbios do funcionamento do Sistema Nervoso (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000).

Respostas emocionais normais possuem importantes funções biológicas e variam de euforia à apatia, prazer, surpresa, raiva, ansiedade, desapontamento, tristeza, apreensão, desespero e depressão. Três destas respostas – euforia, depressão e ansiedade – podem se tornar desordenadas e persistentes, dominando o estado emocional do indivíduo e tornando-se doenças (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000).

“Uma mulher é abordada por um estranho em uma rua escura. Seu corpo responde rapidamente. Seus batimentos cardíacos aumentam, ela treme e sua, tem um forte impulso de correr para um lugar seguro. Outra mulher experimenta as mesmas respostas resultantes da ativação do sistema nervo-

so simpático ao sair de casa, a despeito do fato de que ninguém a aborda. Embora os termos “medo” e “ansiedade” sejam utilizados como sinônimos, os seus verdadeiros significados os tornam diferentes. A primeira mulher respondeu com medo, uma reação normal a um estímulo amedrontador real. A segunda mulher respondeu com ansiedade; ela se sentiu em risco, mas a fonte de perigo era desconhecida, incerta ou desproporcional aos sintomas exibidos. A primeira mulher rapidamente se acalmou quando encontrou um refúgio e se afastou do perigo. Mas, como a fonte representante de perigo para a segunda mulher é obscura, seus sintomas persistem e podem se intensificar com o tempo” (FADEM, 2004).

As Síndromes de Ansiedade em seres humanos são caracterizadas por sintomas de medo sem uma causa condizente. A maioria das pessoas experimenta a ansiedade em alguns momentos da vida, mas é preciso distinguir a emoção normal da Síndrome de Ansiedade. Para realizar o diagnóstico desta doença é preciso que seus sintomas físicos e emocionais sejam contínuos por um período mínimo de seis meses, interferindo com a vida normal da pessoa e causando significativo prejuízo à suas relações pessoais e profissionais (FADEM; 2004, McINTYRE; FALLU; KONARSKI, 2006, RYMASZEWSKA et al., 2007).

As Síndromes de Ansiedade estão entre os distúrbios mentais mais prevalentes no mundo (HOFFMAN; POLLACK; OTTO, 2006). Causas psicossociais e biológicas estão relacionadas com a sua etiologia. Fatores psicossociais incluem aprendizados mal adaptativos que resultam em medo ou receio de objetos ou situações de exposição a um estressor extremo incongruente. Fatores biológicos incluem características genéticas e de gênero. A Síndrome de Ansiedade é mais comum em famílias com pelo menos um membro acometido. Mulheres têm duas a três vezes mais propensão a desenvolver Síndrome do Pânico que homens, duas vezes mais chance de desenvolver Estresse Pós-Traumático quando expostas a um estressor extremo e chance aumentada de desenvolver Síndrome de Ansiedade Generalizada, tipos de Síndromes de Ansiedade (FADEM, 2004).

A Síndrome de Ansiedade Generalizada está presente em 3 a 5% da população mundial, sendo com freqüência uma comorbidade da Depressão (ÖNCAZ, UDUZ; ÇÝLLÝ, 2006). Em 50% dos pacientes, o início desta síndrome pode ser localizado na infância ou adolescência. Os sintomas são crônicos e tendem a piorar durante períodos conturbados da vida. O tratamento comumente é em longo prazo, embora alguns pacientes se tornem assintomáticos após alguns anos de tratamento.

A ansiedade é causada, em última instância, pela atividade alterada de neurotransmissores no SNC, especificamente com diminuição da atividade da serotonina e do ácido γ -aminobutírico (GABA), concomitantemente, diminuição da ligação com o sítio benzodiazepínico do receptor GABA e aumento da atividade da norepinefrina (FADEM, 2004). Neuroanatomicamente, o *locus ceruleus*, um núcleo noradrenérgico, os núcleos da rafe, que são serotoninérgicos, o córtex temporal, o córtex frontal e o núcleo caudado estão implicados no desenvolvimento das Síndromes de Ansiedade (FADEM, 2004).

Desde os tempos antigos, a medicina tradicional tem diversas formas de tratar essa doença, a maioria baseada em preparações herbais. Diversos grupos de pesquisa se dedicam a identificar os compostos responsáveis pelo efeito ansiolítico produzido pelo uso de ervas medicinais e vegetais, como é o caso do maracujá (NASSIRI-ASL; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2007). Dentre as substâncias que podem ser ligadas ao efeito ansiolítico de ervas medicinais, os flavonóides se destacam porque freqüentemente são detectados nas ervas conhecidas popularmente como “calmantes” (MEDINA; PALADINI; IZQUIERDO, 1993, PALADINI et al., 1999, GUARALDO et al., 2000, DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2001). Esta classe de composto bioativo é muito prevalente no reino vegetal e era previsível que fizesse parte da dieta de animais e seres humanos, em alimentos como frutas, verduras e legumes.

A dieta humana é constituída por uma variedade de grupos de alimentos, que fornecem nutrientes necessários para a manutenção das funções vitais do organismo. Dentre os tipos de alimentos que compõe a dieta, os vegetais compreendem uma importante fonte de elementos nutritivos. Além dos

nutrientes já conhecidos, os vegetais contêm compostos químicos não nutritivos que exibem propriedades benéficas à saúde, sendo denominados compostos bioativos em alimentos. Alimentos de origem vegetal estão presentes na dieta em qualidade e quantidade variáveis, de acordo com a localidade, a sazonalidade e os hábitos culturais exibidos por diferentes populações.

Em particular, dentre os legumes que fazem parte do repertório alimentar da população brasileira, o quiabo tem presença garantida em todo o país. Este é um legume bem aceito do ponto de vista organoléptico, não é considerado dispendioso e que se presta a muitos tipos de preparações culinárias. Faz parte da culinária tradicional popular, da culinária religiosa e agora ingressa na gastronomia: de caruru ao espetinho de quiabo grelhado, passando por caviar de quiabo, é possível desgutá-lo de muitas maneiras. Segundo a literatura (MOTA et al., 2005), o clima do Brasil é favorável à cultura do quiabo, que predomina na região Sudeste e Nordeste, reunindo características que a tornam interessante sob vários pontos de vista, do econômico ao nutritivo.

Do ponto de vista alimentar, o quiabo é um legume que se presta ao consumo após cocção, não sendo consumido *in natura*. Sua contribuição para a saúde da população é evidente, pois fornece proteínas, vitaminas, sais minerais e fibras alimentares. Além destes nutrientes, o quiabo também contém compostos bioativos da classe dos flavonóides, como demonstrado neste trabalho.

No presente estudo procurou-se avaliar se compostos bioativos da classe dos flavonóides, presentes no quiabo, poderiam acrescentar ao seu conteúdo nutricional os benefícios da possível atividade ansiolítica, empregando-se modelos comportamentais para análise de efeito ansiolítico em camundongos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Flavonóides*

2.1.1 *A química dos flavonóides*

Metabolismo é uma característica comum a todas as células, sendo conceituado como o conjunto de reações químicas que ocorrem no seu interior. Especificamente em células vegetais o metabolismo pode ser dividido em primário e secundário. Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham função essencial no vegetal, tais como fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Portanto, o metabolismo primário está presente em todas as células vegetais. Compostos como aminoácidos, nucleotídeos, lipídios, carboidratos e clorofila são produtos do metabolismo primário. Já o metabolismo secundário é dependente da espécie, originando compostos em diferentes qualidades e quantidades, pois não são necessários em todas as plantas (PERES, 1976).

Como consequência, os produtos do metabolismo secundário podem ser utilizados em taxonomia vegetal. Embora o metabolismo secundário não seja necessariamente essencial para a sobrevivência do vegetal, ele desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente, como por exemplo, propriedades herbicidas, antipatogênicas, atrativas de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microorganismos simbiotes, além de resistência aumentada a mudanças de temperatura, de suprimento de água e luz, exposição à radiação UV e deficiência de nutrientes minerais, os quais garantem vantagem competitiva ao vegetal que o expressa. Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou do ácido mevalônico, como ilustrado na figura 1 (GILBERT; COOKE, 2001).

Figura 1. Principais vias do metabolismo secundário de vegetais e suas interligações. Adaptado de Gilbert e Cooke, 2001.

Compostos secundários são sintetizados a partir de precursores lipídicos e aminoácidos aromáticos. Os compostos fenólicos constituem uma importante porção dos compostos secundários vegetais, responsáveis por uma grande parcela do sabor, aroma e coloração de diversos vegetais utilizados em abundância na alimentação (GILBERT; COOKE, 2001). Como exemplo, são conhecidos popularmente o aldeído cinâmico da canela (*Cinnamomum zeyllanicum*) e a vanilina da baunilha (*Vanilla planifólia*). Acredita-se que os compostos fenólicos tenham sido fundamentais para a conquista do ambiente terrestre pelas plantas, porque a lignina, o composto fenólico mais prevalente nos vegetais, proporcionou o desenvolvimento do sistema vascular, dando rigidez aos vasos e propiciando o desenvolvimento de vegetais superiores vascularizados.

Compostos fenólicos são assim denominados por apresentarem, em sua estrutura química, um ou mais anéis aromáticos nos quais ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. A figura 2 ilustra a via do ácido chiquímico, a principal via de biossíntese de compostos fenólicos.

Figura 2. Via do ácido chiquímico. Adaptado de Simões et al., 2002.

A enzima fenilalanina-amônio-liase (PAL) é a principal enzima da via do ácido chiquímico, sensível a fatores ambientais como nível de nutrição, luz e infecção por fungos, o que explica a grande variação na quantidade de compostos fenólicos em alimentos. Esta enzima catalisa a desaminação da fenilalanina a cinamato. O ácido cumárico é obtido através da inserção de um grupo hidroxila ao anel fenólico no ácido cinâmico, um processo catalisado pela enzima cinamato-4-hidroxilase (uma monooxigenase P450). Este fenilpropanóide é o precursor de estilbenos, flavonóides e furanocumarinas (DANIEL et al., 1999; BRINSKIN, 2000). A figura 3 mostra a biossíntese de flavonóides.

Figura 3. Biossíntese de flavonóides. Adaptado de Winkel-Shirley, 2001.

Os compostos secundários são de ocorrência natural e não nutritivos. A lignina, um complexo polímero de unidades fenilpropano é, quantitativamente, o composto fenólico mais importante nos vegetais, classificada como polifenólico, por conter mais que um anel fenólico. Outros compostos abundantes são flavonóides, estilbenos, cumarinas e poliflavonóides ou taninos condensados (DANIEL et al., 1999; HAVSTEEN, 2002).

A via do ácido chiquímico se expressa em vegetais, fungos e bactérias, mas não em animais. Por essa razão, os aminoácidos triptofano e fenilalanina são considerados essenciais para os animais, diferente da tirosina, que pode ser formada a partir da fenilalanina (GRUSAK; DELLAPENNA, 1999). Isto explica porque os compostos fenólicos não são sintetizados por animais, sendo necessário consumi-los na dieta.

Compostos fenólicos apresentam diversas funções nos vegetais: estabilização estrutural, proteção contra herbívoros, proteção contra radiação ultravioleta, troca de informação com organismos simbiotes, coloração, efeitos antibactericidas e antifúngicos. Depois da morte do vegetal, os compostos fenólicos podem persistir por semanas ou meses e afetar organismos decompositores no solo. Portanto, seus efeitos não se restringem à fisiologia das plantas, mas se estendem ao funcionamento de ecossistemas completos (DANIEL et al., 1999).

Os compostos fenólicos são classificados em dois grandes grupos: o primeiro consiste de um esqueleto C6-C1, enquanto o segundo corresponde a um esqueleto C6-C3. O primeiro grupo compreende compostos químicos como o ácido hidroxibenzóico; no segundo grupo estão os ácidos caféico, ferúlico e isoferúlico (HAVSTEEN, 2002). A figura 4 ilustra as principais classes de compostos polifenólicos em alimentos.

Figura 4. Classificação e estrutura química das principais classes de compostos polifenólicos dietéticos. Adaptado de Spencer et al., 2008.

Dentre os compostos fenólicos, os flavonóides se destacam: são caracterizados por um esqueleto de três unidades, C6-C3-C6, que forma uma estrutura cíclica na maioria dos casos (ilustrada na figura 5). Neste esqueleto, dois anéis aromáticos, referidos como A e B (nas chalconas), podem ser assinalados, e um terceiro anel, o anel C, nos demais flavonóides. Muito estudados por sua atividade benéfica à saúde, os flavonóides se caracterizam por compostos com estrutura química fenilbenzopirano (ilustrada na figura 6). Essa estrutura compreende um esqueleto C15 ligado a um anel cromona (denominado radical benzopirano) que por sua vez se liga a um anel aromático na posição C-2, C-3 ou C-4. O anel benzopirano heterocíclico é conhecido como Anel C; está fundido ao anel aromático, denominado Anel A; o constituinte fenil é nomeado Anel B. O anel A pode ser de dois tipos: floriglicinol, que é *meta*-trihidroxilado, ou resorcinol, *meta*-dihidroxilado. O anel B pode ser monohidroxilado, *orto*-dihidroxilado ou vicinal-

trihidroxilado. O centro heterocíclico, na maioria das vezes, pode se apresentar sob três formas: pirano, pirillium ou γ -pirona.

Figura 5. Estrutura dos flavonóides. Exemplo: quercetina: R=OH; R'=OH. Adaptado de Havsteen, 2002.

Figura 6. Estrutura da benzo- γ -pirona (ou cromona). Notar o número de átomos da estrutura do anel, essencial à nomenclatura dos derivados. Adaptado de Havsteen, 2002.

A posição da ligação cromona-aromático determina a classe de benzo-pirano: 2-fenilbenzopiranos compreendem os flavonóides, 3-fenilbenzopiranos compreendem os isoflavonóides e 4-fenilbenzopiranos caracterizam neoflavonóides, como ilustrado na figura 7. Flavonóides com anel heterocíclico de cinco membros são classificados como auronas (ARON; KENNEDY, 2008). Diferentes flavonóides podem ser classificados de acordo com o grau de oxidação do segmento central. Da menor para a maior oxidação, os flavonóides podem ser denominados catequinas, chalconas, isoflavonas, flavan-3,4-dióis, flavonas, auronas, flavonóis e antocianinas. As diversas estruturas básicas podem mostrar diferentes padrões de substituição. Estas podem incluir hidroxilação, metoxilação e glicosilação (HAVSTEEN, 2002; RUIZ-RODRIGUES et al., 2008).

2-phenylbenzopyran: Flavonoid

3-phenylbenzopyran: Isoflavonoid

4-phenylbenzopyran: Neoflavonoid

Figura 7. Classes de flavonóides. 2-fenilbenzopirano: Flavonóide; 3-fenilbenzopirano: Isoflavonóide; 4-fenilbenzopirano: Neoflavonóide. Adaptado de Aron e Kennedy, 2008.

2.1.2. Ocorrência de flavonóides na natureza

O termo flavonóide é coletivamente aplicado a uma espécie de pigmentos vegetais. Este grande e complexo grupo de substâncias provém cor e sabor aos vegetais aos quais pertence, o que justifica a sua denominação flavonóide, derivada do vocábulo inglês *flavor*. A maioria dos tecidos vegetais é capaz de sintetizar flavonóides (GEE et al., 1998, MARTINEZ-FLOREZ, 2002).

Compostos fenólicos e flavonóides são abundantes no reino vegetal. Eles estão presentes, como elementos-traço, em praticamente todas as partes comestíveis de vegetais que expressam metabolismo da via chiquímica

(RUIZ-RODRIGUEZ et al., 2008). Segundo a tabela USDA (USDA, 2007), considera-se, para efeitos de identificação e quantificação em alimentos e ervas medicinais, as seguintes classes de flavonóides: flavonóis (isohamnetina, caempferol, miricetina e quercetina); flavonas (apigenina e luteolina); flavanonas (eriodictiol, hesperetina e naringenina); flavan-3-óis (catequinas e ésteres de ácido gálico de catequinas, epicatequinas e ésteres de ácido gálico de epicatequinas, teaflavinas e ésteres de ácido gálico de teaflavinas e tearubiginas) e antocianinas (cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina).

Os flavonóides presentes na dieta humana são divididos em seis grupos: flavanóis, que possuem um grupo hidroxila na posição 3 (catequina, epicatequina); flavonóis, que possuem um grupo carbonila na posição 4, um grupo hidroxila na posição 3 e uma ligação dupla entre as posições 2 e 3 (quercetina, rutina, caempferol, quercitagetina); flavonas, que possuem um grupo carbonila na posição 4 e uma ligação dupla entre as posições 2 e 3 (apigenina, luteína); antocianidinas, que possuem um grupo hidroxila na posição 3 e duas ligações duplas, uma entre o átomo de oxigênio e o carbono 2 e outra entre os carbonos 3 e 4 (petunidina, cianidina); isoflavonóides, que possuem um grupo carbonila na posição 4 e o anel B encontra-se ligado ao restante da molécula através do carbono 3 (genisteína, miricetina) e flavononas, que possuem um grupo carbonila na posição quatro (miricetina, hesperidina, naringina) (MARTINEZ-FLOREZ, 2002). Encontram-se na natureza, na maior parte dos alimentos, em forma de glicosídeos, o que promove uma melhor absorção intestinal e uma maior biodisponibilidade destes compostos (YILMAZ; TOLEDO, 2004).

Nos diferentes produtos vegetais, as flavanonas ocorrem em cítricos e seus derivados; as isoflavonas são encontradas em legumes (feijões) e particularmente na soja e derivados de soja; as flavonas são freqüentemente encontradas em grãos e ervas (como, por exemplo, na salsinha); os flavonóis são encontrados em muitos vegetais, sendo que os mais prevalentes são quercetina, rutina, caempferol, isohamnetina e miricetina, presentes em cebo-

la, maçã, bagas como cerejas, amoras, uvas pretas, chá, brócolis, endívias, alho poró, toranja ou *grapefruit*, pêra e milho; as antocianinas estão presentes em vegetais vermelhos ou azuis, como cerejas, morangos, ameixa, berinjela, abóbora, rabanete e vinho tinto; as catequinas, ou flavan-3-óis, presentes como epicatequina, galocatequina e epigallocatequina são encontrados principalmente no chá verde, e em menor quantidade em uvas pretas e vinho tinto (RUIZ-RODRIGUEZ et al., 2008). Diferentes genes controlam a produção de agliconas 4'-hidroxiladas (como, por exemplo, pelargonidina, apigenina e campferol) e agliconas 3',4'-dihidroxiladas (por exemplo, cianidina, luteolina e quercetina).

Os flavonóides são uma classe de produtos naturais que impressionam mais pela grande variedade e número de membros do que pela complexidade estrutural. Considerando as posições de ligação ao núcleo flavonóide características, são originados derivados comumente formados por hidroxilação, metilação, acetilação, glicosilação e isoprenilação, entre outros; é possível, por simples permutação, estimar que seja grande o número de flavonóides individuais que podem ser encontrados na natureza (HAVSTEEN, 2002). Os flavonóides são freqüentemente hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4', 5', como ilustrado na figura 8. Alguns destes grupos hidroxila são metilados, acetilados ou sulfatados. Quando são formados glicosídeos, a ligação glicosídica normalmente se localiza nas posições 3 ou 7, e os carboidratos que comumente se ligam aos flavonóides são L-ramnose, D-glicose, glicoramnose, galactose ou arabinose (KÜHN AU, 1976; HAVSTEEN, 2002).

Figura 8. Numeração dos átomos na aglicona de um flavonóide, nos quais as substituições podem ocorrer. Adaptado de Havsteen, 2002.

De todas as classes de flavonóides, os flavonóis são os compostos fenólicos mais abundantes em alimentos. O flavonol mais prevalente é a quercetina, que pode ser encontrada em pequenas quantidades nas partes comestíveis de muitos vegetais. Como a maioria dos flavonóides, a quercetina nos tecidos vegetais é encontrada em sua forma glicosilada, como, por exemplo, a rutina (DANIEL et al., 1999). Nos vegetais, os carboidratos são ligados a grupos hidroxila, o que preferencialmente ocorre na posição C3, são disponibilizados como monossacarídeos ativados pela UDP (uridina difosfoglicose) no carbono anomérico C1, que é consecutivamente ligado a aglicona, como pode ser observado na figura 9 (HAVSTEEN, 2002).

Figura 9. Glicosilação de um flavonóide pela UDP-glicose, catalisada pela uridil transferase. Adaptado de Havsteen, 2002.

Os flavonóides são qualitativamente e quantitativamente um dos maiores grupos de produtos naturais conhecidos. Praticamente todos os flavonóides são pigmentos, sendo que suas cores são sem dúvida associadas com algumas de suas importantes funções biológicas. A distribuição dos flavonóides em todas as zonas geográficas que possuem áreas de plantio reforça este argumento. Todas as cores do espectro, inclusive ultravioleta (UV), são representadas no espectro dos flavonóides. Suas propriedades

eletrônicas parecem incluir não somente a captura e transferência de energia, mas também seletividade biológica. Isto se deve a atração de polinizadores em potencial, como pássaros e insetos, e também à ativação de genes sensíveis à luminosidade. Embora os flavonóides exibam uma forte absorção de luz e estejam presentes em todas as células vegetais contendo plastídeos, não há comprovações da participação dos flavonóides no processo fotossintético. Evidentemente, os vegetais utilizam a luz não apenas como fonte de energia, mas também para a regulação gênica (HAVSTEEN, 2002).

A análise estrutural e da configuração de um flavonóide presente em alimentos é uma tarefa difícil, que requer a aplicação de técnicas avançadas, como $[^1\text{H}]$ e $[^{13}\text{C}]$ -NMR-espectrometria, $[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -espectrometria correlata, dicroísmo circular, dispersão rotatória óptica, espectrometria de massa e difração de raios-X. No entanto, técnicas modernas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) disponibilizam um modo efetivo e útil para a identificação de flavonóides. A preparação da amostra para análise deve considerar a presença de estruturas polares e não polares; as polares são solúveis em água, enquanto que as não polares, como as agliconas, são solúveis em solventes orgânicos. Metanol é usado com eficácia para extrair a maioria dos flavonóides de tecidos vegetais (HAVSTEEN, 2002).

2.1.3 Consumo de compostos bioativos e flavonóides dietéticos

Em sociedades tradicionais, nutrição e cuidados de saúde são interconectados; diversas plantas são consumidas na forma de alimento especificamente para melhorar a saúde. O valor nutracêutico e a atividade antioxidante de vegetais selvagens, semi-cultivados ou mesmo negligenciados é hoje encarado como uma importante área da pesquisa nutricional e fitoterápica (ANSARI et al., 2005). Dixon e Sumner (2003) ressaltaram que, por oferecer reconhecidos benefícios à saúde, o interesse por produtos naturais passa atualmente por uma fase de renascimento.

Grandes esforços na pesquisa em nutrição estão focalizados nos micronutrientes e compostos não nutritivos: vitaminas, elementos-traço, fitoquímicos (carotenóides, flavonóides, indóis, isotiocianatos, entre outros), zooquímicos (ácidos graxos linoleico-conjugados e ω -3, por exemplo), fungoquímicos e bacterioquímicos (formados durante a fermentação dos alimentos e pela microflora intestinal). No que diz respeito aos fitoquímicos, os polifenóis mais estudados são os flavonóides, que podem ser classificados como fitonutrientes. Segundo Williamson e Holst (2008), com base nas pesquisas atuais, catequinas em frutas e chás, procianidinas em frutas e no cacau e quercetina em vegetais, chás e certas frutas são considerados os mais importantes polifenóis com impacto na saúde humana. No entanto, conforme estes autores, a aceitação das evidências dos efeitos na saúde atribuídos aos flavonóides pela comunidade de nutricionistas é controversa, porque seus efeitos são agudos e esse tipo de composto alimentar não preenche o critério clássico para se tornar substância essencial para o crescimento e desenvolvimento, o que sustenta o fato de não ser denominado nutriente.

Williamson e Holst (2008) discutem o enfoque metodológico das pesquisas sobre fitonutrientes, uma vez que todas as plantas possuem uma variedade de moléculas bioativas, que podem atuar sinérgica ou antagonicamente. Aliado a isso, sabe-se que a biodisponibilidade é influenciada pela natureza da matriz vegetal, que necessita ser estabelecida. Assim, discute-se até que ponto se deve estudar os compostos individuais ao invés do alimento como um todo. Estes autores sugerem que metodologias *in vitro* usando extratos purificados de compostos individuais e seus metabólitos podem fornecer os primeiros indícios de atividade biológica e auxiliam no estabelecimento ou seleção de biomarcadores apropriados. Uma vez este ponto estabelecido, não há como substituir estudos em seres humanos, por longos períodos de intervenção, utilizando biomarcadores. No futuro, os estudos intervencionais podem ser suplementados com técnicas genômicas, proteômicas, metabolômicas e até receptorômicas (ROTH et al., 2004). Também há que se levar em consideração que efeitos reais devem necessariamente considerar a dose ou

concentração, pois alguns dos efeitos já descritos na literatura são obtidos apenas com megadoses *in vitro*.

Marcadores biológicos de exposição a um nutriente são atualmente utilizados para fins científicos. Nesta abordagem, um ou mais radicais são medidos em um fluido ou tecido corporal acessível para prover um índice semi-quantitativo da exposição a componentes alimentares individuais. Para polifenóis, esta parece ser uma abordagem muito atrativa. No entanto, a relação entre o consumo e as concentrações resultantes de biomarcadores em fluidos corporais é altamente complexa. Antes que um componente particular, ou seu metabólito, possa ser usado como um biomarcador sensível e acurado da exposição a um polifenol, uma série de fatores devem ser compreendidos. Em primeiro lugar, é preciso obter o conhecimento completo do metabolismo de polifenóis em seres humanos para selecionar biomarcadores de crédito. Segundo, é importante entender a relação tempo-resposta entre o consumo de polifenóis e o aparecimento dos biomarcadores nos fluidos biológicos. Terceiro, a relação precisa concentração-resposta entre o consumo de polifenóis específicos e o aparecimento de biomarcadores é essencial. Finalmente, é preciso compreender a extensão na qual fatores fisiológicos e de desenvolvimento afetam a via metabólica de polifenóis em seres humanos (SPENCER et al., 2008).

Um desafio considerável à pesquisa neste campo é a dificuldade em compor uma dieta para ser utilizada em longo prazo que seja nutricionalmente suficiente, mas absolutamente isenta de flavonóides. Por este motivo, entre outros, produtos naturais regularmente consumidos em grandes quantidades como componentes da dieta normal dos seres humanos, mas que são pobremente tóxicos tem sido ignorados até o presente (GABOR, 1988). Atualmente sabe-se que alguns indivíduos podem ser sensíveis aos flavonóides, porque foram identificados anticorpos contra estes compostos no sangue de seres humanos. Estima-se que 3 a 5% da população seja alérgica a flavonóides (HASHIMOTO et al., 1988, HEGUI; SUCHY; NAGY, 1990).

De maneira geral, as estimativas de consumo de nutrientes e compostos bioativos em alimentos são realizadas através de inquéritos de consumo alimentar e dados sobre o conteúdo alimentar em tabelas de composição de alimentos, a partir dos quais se calcula a ingestão aparente dos mesmos. Segundo Kühnau (1976), nos Estados Unidos da América (EUA) a estimativa de consumo de flavonóides variava de 500 a 1000mg/dia. As estimativas de consumo variam muito: no Japão, há um estudo, de 1999, que relata o consumo de 70mg de flavonóis e flavonas/dia, enquanto na Finlândia este mesmo consumo foi estimado em 3mg/dia (HOLLMAN; KATAN, 1999). Nos Países Baixos a estimativa realizada através de inquéritos alimentares apontou 23mg de flavonóides por dia (HERTOG et al., 1993). Todas estas estimativas, no entanto, foram baseadas em procedimentos atualmente considerados inadequados (WILLIANSO; HOST, 2008). No Brasil, Arabbi, Genovese e Lajolo (2004) estimaram que a média de consumo de flavonóides pelo brasileiro é de 74,4mg por dia. O flavonol quercetina é o mais predominante flavonóide na dieta humana, sendo que a estimativa de consumo varia de 4 a 64mg/dia, segundo estudos epidemiológicos nos EUA, Europa e Ásia (HERTOG et al., 1993; HERTOG et al., 1995; RIMM et al., 1996; KNEKT et al., 1997).

Ruiz-Rodrigues et al. (2008) afirmam que o processamento culinário de alimentos tem impacto no conteúdo final de compostos fenólicos e flavonóides consumidos. O primeiro passo para a diminuição de compostos bioativos em alimentos se inicia com o descascamento, retirada de sementes, caules e partes não comestíveis. O descarte de até 10% do peso total de um alimento diminui de 44 a 66% o seu conteúdo de compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas. Este pode ser considerado um processo mecânico de retirada de flavonóides. Picar um alimento, por outro lado, o expõe à ação enzimática. Segundo Makris e Rossiter (2001), a magnitude da perda de flavonóides, neste caso, é proporcional ao conteúdo total e a forma do composto (aglicona ou glicosídica): alguns glicosídeos diminuem por ação da glicosidase, enquanto o conteúdo de agliconas aumenta; outros glicosídeos, como a rutina, são degradados sem aumento da aglicona correspondente (MAKRIS; ROSSITER,

2001). Ainda segundo estes autores, o cozimento em água fervente provoca a diminuição de compostos solúveis em água e a degradação dos compostos originais, promovendo o aparecimento de produtos desta degradação. Comparando o cozimento em água fervente com o cozimento em microondas e a fritura, o cozimento em água fervente é o menos favorável à manutenção dos flavonóides. A fritura, por outro lado, não reduz significativamente o conteúdo de flavonóides (CROZIER et al., 1997; BUCHNER et al., 2006). O cozimento à vapor ou sob pressão provoca perdas não significativas de flavonóides (RUIZ-RODRIGUES et al., 2008).

Há relatos que mostraram que flavonóides de ocorrência natural são efetivamente absorvidos pelo trato gastrointestinal de mamíferos e que são encontrados em fluidos corporais e tecidos em concentrações farmacologicamente ativas (HOLLMAN et al., 1995 e 1996, GEE et al., 1998) (PARÉ, 1999; SKIBOLA; SMITH, 2000). O metabolismo dos flavonóides é complexo; pequenas quantidades de flavonóides consumidos são excretadas pela urina, enquanto o restante pode ser excretado via fezes, mas o processo de metabolismo de cada tipo de flavonóide ainda é desconhecido. Uma parte do metabolismo dos flavonóides é hepática, por meio de reações de biotransformação de fase I, nas quais são introduzidos ou expostos grupos polares. A seguir, estes compostos sofrem reações de biotransformação de fase II no cólon, nas quais os microorganismos degradam os flavonóides não absorvidos (RIMM et al., 1996). A respeito da absorção no intestino delgado, a quercetina é metabolizada imediatamente ao chegar à porção inicial do intestino delgado por enzimas das células epiteliais e depois metabolizada no fígado. O grupo catecol da quercetina é metilado nas posições 3' e 4' pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT), resultando na formação de isohamnetina (3'OCH₃-quercetina) ou tamarixetina (4'OCH₃-quercetina). Esses dois metabólitos e a quercetina podem ser conjugados com o ácido glicurônico ou sulfato pelas enzimas UDP-glicuronosiltransferase ou sulfotransferase respectivamente. A meia vida plasmática em seres humanos foi determinada e varia de 17 a 28 horas (HOLLMAN; ARTS, 2000, MANACH; DONOVAN, 2004, VAN DER WOUDE et al., 2004).

O valor nutracêutico atribuído a compostos fenólicos e flavonóides, além da capacidade antioxidante de vegetais tradicionais, tem sido altamente considerado na pesquisa em Nutrição, já que estes são de baixo custo e comumente consumidos por populações de países em desenvolvimento. Sabe-se que comunidades que estão em risco nutricional e de saúde, devido a inúmeros fatores, necessitam de alimentos que forneçam proteção suplementar no sentido de melhorar as defesas orgânicas e prevenir doenças. Dentre os alimentos tradicionalmente consumidos, o quiabo se destaca pela variedade de usos e aplicações culinárias, pelo fácil acesso e por seu elevado consumo em zonas tropicais que abrigam populações em risco nutricional.

O quiabo (*Abelmoschus esculentus*) é um legume de origem africana; acredita-se que chegou ao Brasil por intermédio dos escravos. Este alimento é consumido no mundo todo, mas sua cultura tem preferência pelo clima tropical, sendo considerado um vegetal tradicional em diversas regiões do globo (PIERONI; PRICE, 2005). O quiabo encontra no Brasil excelentes condições para seu cultivo, sendo popularmente cultivado nas regiões Sudeste e Nordeste. A planta apresenta algumas características desejáveis como ciclo rápido, custo de produção viável, resistência a pragas e alto valor nutritivo (MOTA et al., 2005). Os frutos do quiabeiro atingem sua maturidade hortícola entre 4 a 5 dias após a antese, quando os frutos estão com aproximadamente 25% do seu tamanho máximo, o que significa que têm cerca de 2 cm de diâmetro e 5 a 7 cm de comprimento, dependendo da cultivar, com teor de fibras alimentares menor que 6,5% (MOTA et al., 2005).

O quiabo, em particular, tem sido bem estudado, especialmente em tecnologia de alimentos, mas raramente por sua atividade farmacológica. O estudo de Lengsfeld et al. (2004), por exemplo, demonstrou que compostos glicosilados presentes no quiabo são capazes de inibir a adesão da *Helicobacter pylori* à mucosa gástrica humana. Este é um exemplo que chama a atenção para o fato de que os vegetais têm potencial importância para a saúde humana, devendo ser investigados.

A rutina (3,3',4',5,7-pentahidroxiavona-3-ramnoglicosídeo), cuja estrutura química está ilustrada pela figura 9, é um flavonóide do tipo flavonol que está presente no quiabo. É encontrada também em outros vegetais, sendo um componente dietético importante de alimentos e bebidas de origem vegetal. A rutina tem várias propriedades farmacológicas, incluindo as capacidades antioxidante, anticarcinogênica, citoprotetora, anti-plaquetária, antitrombótica e vasoprotetora (KATSUBE et al., 2006). Mais ainda, a rutina foi classificada como um agente neuroprotetor, por ser capaz de melhorar a lesão causada por isquemia-reperfusão no coração e músculo esquelético (NASSIRI-ASL; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2008).

Figura 10. Rutina [3,3',4',5,7-pentahidroxiavona-3-rutinosídeo]. Adaptado de Havsteen, 2002.

2.1.4 Atividades biológicas dos flavonóides

Um número expressivo de estudos epidemiológicos mostra o efeito protetor do consumo de frutas, verduras e legumes, prevenindo o desenvolvimento de doenças. Uma hipótese atrativa, que vem sendo comprovada sistematicamente, é que estes vegetais contenham compostos que tem efeito protetor independente dos nutrientes já conhecidos. Neste sentido, os flavonóides são extensivamente estudados. A presença significativa e a enorme variação química destes metabólitos secundários vêm chamando a atenção de pesquisadores no mundo todo. Assim, estes compostos foram alçados de seu posto de simples metabólitos a uma classe de substâncias com uma miríade de potenciais ou aplicações possíveis na saúde (PARÉ, 1999). Middleton (1998) considera os flavonóides como modificadores dietéticos naturais de respostas biológicas. Atualmente são

classificados como compostos bioativos em alimentos, por serem estruturas às quais se atribui uma ou mais funções benéficas à saúde, ao lado dos derivados de ácidos fenólicos e hidroxicinâmicos, todos compostos fenólicos (NASSIRI-ASL; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2008).

As atividades biológicas dos flavonóides vêm sendo descritas desde a década de 1930; o primeiro relato de atividade biológica foi realizado pelos pesquisadores Rusznyák e Szent-Györgyi (1936), que comentaram a capacidade de restauração da resistência capilar por ação de flavonóides. Nesse período, foi proposta a classificação deste novo grupo de compostos como Vitamina P. Essa nomenclatura, no entanto, se mostrou inadequada e foi abandonada, pois os flavonóides não se adéquam à definição clássica de vitaminas.

Numerosas enzimas são inibidas por flavonóides. Dentre elas, pode-se citar hidrolases, oxirredutases, DNA sintetases, RNA polimerases, fosfatases, fosfocinases, oxigenases e aminoácido-oxidases. Em alguns casos, a inibição exercida é do tipo competitiva, mas na maioria das vezes é alostérica. Do mesmo modo, exemplos de ativação alostérica de flavonóides sobre enzimas são conhecidos. Ainda assim, flavonóides não promovem um desbalanço generalizado no metabolismo; seus efeitos se restringem a vias metabólicas específicas. Esse grau considerável de tolerância a compostos que são, quimicamente, substâncias reativas, estruturalmente muito próximas a vários compostos integrantes da bioquímica dos seres humanos, pode ser explicada em parte por sua pobre solubilidade em água, o que mantém sua concentração baixa, a sua pequena meia-vida e à compartimentalização orgânica em órgãos e suas células (HAVSTEEN, 2002).

Biologicamente, os flavonóides mostram uma variedade de efeitos farmacológicos. Flavonóides podem atuar como hormônios em vegetais e animais (NAGATA et al., 2001). Eles inibem a oxidação da LDL-colesterol (redução de placas ateroscleróticas), inibem a agregação plaquetária (efeito antitrombótico), promovem vasodilatação (efeito anti-hipertensivo e

antiarritmia) e modificam a síntese de eicosanóides, inibem a agregação plaquetária e possuem propriedades antiinflamatórias (COSTA; MARTINEZ, 1997). Quercetina e mirecetina têm efeito antioxidante pronunciado. No entanto, alguns flavonóides são mutagênicos *in vitro* e podem ter potenciais efeitos carcinogênicos (SKIBOLA; SMITH, 2000). São capazes de modular a atividade de enzimas associadas à ativação e detoxificação de carcinógenos, de prevenir o dano oxidativo do DNA, modular a expressão gênica da apoptose e de transformações malignas (GRAF et al., 2004). Em seres humanos, os efeitos benéficos do consumo de flavonóides predominam, o que foi evidenciado por estudos epidemiológicos reportando muitos efeitos positivos da dieta rica em flavonóides (DANIEL et al., 1999).

2.2 Ansiedade

Um estudo da Organização Mundial da Saúde (OMS), abrangendo 14 países, relatou a distribuição de distúrbios mentais no mundo, acometendo de 4,3% e 26,4% da população mundial (DEMYTTENAERE et al., 2004). Acredita-se que as doenças mentais estão entre as maiores causas de incapacidade nos EUA e em outros países. Dentre estas, podem-se citar distúrbios de humor, síndromes de ansiedade como o distúrbio do estresse pós-traumático, síndrome do pânico, distúrbios alimentares, déficit de atenção com ou sem hiperatividade, autismo, depressão, distúrbio bipolar, esquizofrenia e distúrbio obsessivo-compulsivo (LAKHAN; VIEIRA, 2008). Em 2001, um estudo indicou que aproximadamente 1/8 da população mundial era afetada pela ansiedade (DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2001). Em 2003, estimou-se que 15% da população adulta ocidental consome benzodiazepínicos, medicamentos anti-ansiedade, no mínimo uma vez por ano (MEDINA; PALADINI; IZQUIERDO, 1993). A prevalência de desordens de ansiedade aumentou significativamente nos últimos anos (ANDREWS et al., 2000).

No Brasil, os transtornos de ansiedade apresentam uma alta prevalência (9,5 a 17,5%) da população, estando associados a uma elevada demanda potencial estimada (5,5 a 12% de prevalência de casos potencialmente ne-

cessitados de assistência). Esses dados, juntamente com a morbidade e os custos associados a essas enfermidades, indicam que os transtornos de ansiedade constituem um grupo de doenças de grande importância para a saúde individual e pública. Apesar dos avanços observados no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada nos últimos anos, estima-se que no Brasil menos de 50% dos pacientes apresentem uma remissão total da sintomatologia, indicando a necessidade de continuidade da pesquisa pré-clínica e clínica nesse campo (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; ZORZETTO FILHO, 2001).

As manifestações fisiológicas da ansiedade incluem sintomas provenientes da ativação do Sistema Nervoso Simpático: tremor, sudorese, midríase, experiência subjetiva de taquicardia, sintomas gastrointestinais (por exemplo, diarreia), e distúrbios urinários (por exemplo, aumento da frequência de micção). A hiperventilação que acompanha essas respostas simpáticas pode levar a tonturas e desmaios, assim como sensação de formigamento das extremidades e perda da sensação ou formigamento ao redor da boca (KANDEL, SCHWARTZ; JESSELL, 2000). Os sintomas da ansiedade podem ser ligados a determinadas situações ou podem acontecer sem um gatilho emocional, nas situações mais variadas.

Por outro lado, a ansiedade inapropriada ou patológica é uma condição reconhecível e comum, que causa prejuízos consideráveis ao indivíduo que dela sofre, a seus familiares e à sociedade em geral. Quando a ansiedade atinge níveis patológicos, ou seja, quando a resposta comportamental mostra-se mal adaptada ou incongruente com a situação, a pessoa experimenta, além dos sentimentos já citados, alterações de conduta, apreensão, problemas motores, sudorese e hipertensão, de modo contínuo (SANDFORD; ARGYROPOULOS; NUTT, 2000).

Atualmente, os dois principais métodos para diagnóstico e classificação dos distúrbios ansiosos são o *Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais/DSM IV* (Associação Americana de Psiquiatria, 1994) e o *ICD-10 Classificação de Distúrbios Mentais e Comportamentais* (OMS, 1992). De a-

cordo com esses dois métodos, os distúrbios de ansiedade se dividem em: distúrbio do pânico (com ou sem agorafobia), agorafobia, fobia específica, fobia social, distúrbio de ansiedade generalizada (simples ou associado à depressão), distúrbio obsessivo-compulsivo, distúrbio agudo do estresse e distúrbio pós-traumático (com ou sem desajustamento). Segundo Tyrer et al. (1992), no entanto, as várias desordens ansiosas podem ser melhor definidas em uma categoria única, a “síndrome neurótica generalizada”.

As síndromes de ansiedade apresentam variações que, provavelmente, envolvem circuitos neurológicos comuns (SANDFORD; ARGYROPOULOS; NUTT, 2000). A ansiedade varia não somente em tempo e intensidade, mas também em qualidade. A variedade de sintomatologia pode ser atribuída a diferenças fisiológicas (KLEIN, 1993), marcadores biológicos e até por respostas farmacológicas em resposta ao tratamento medicamentoso, o que levou os especialistas a descreverem mais detalhadamente as síndromes de ansiedade, com base nos sintomas individuais (SANDFORD; ARGYROPOULOS; NUTT, 2000).

Independente do tipo ou grau de ansiedade, os circuitos neurológicos envolvidos são os mesmos (SANDFORD; ARGYROPOULOS; NUTT, 2000). Vários sistemas de neurotransmissão estão envolvidos nos mecanismos neurobiológicos regulatórios da ansiedade, promovendo ansiogênese ou ansiólise. Entre outros, pode-se citar a colecistocinina, os aminoácidos excitatórios, a serotonina e a noradrenalina como sistemas ansiogênicos (KALUEFF, 2007). A grande maioria destes sistemas de neurotransmissão é reciprocamente controlada pelo principal sistema inibitório operante no cérebro, o sistema GABAérgico, que é ativado pelo neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA) (PALADINI et al., 1999). O GABA é um neurotransmissor inibitório que regula a excitabilidade de virtualmente todos os neurônios do Sistema Nervoso Central (SNC), com implicações fisiológicas e fisiopatológicas em eventos normais e disfuncionais deste sistema (KALLUEF, 2007). A ansiedade é uma das manifestações na qual o sistema de neurotransmissão GABAérgico está envolvido, particularmente o complexo GABA-receptor benzodiazepí-

nico (WONG; SNEAD, 2001). O neurotransmissor GABA exerce seus efeitos fisiológicos ao se ligar a um dos três diferentes tipos de receptor, na membrana neuronal: GABA_A, GABA_B e GABA_C. O receptor GABA_A, mais especificamente, é uma estrutura pentamérica, ligada a um canal iônico que permite a entrada do íon cloreto nos neurônios sob a influência do GABA. Isso causa hiperpolarização da membrana, o que diminui transitoriamente a possibilidade de geração de impulsos nervosos. Em adição ao sítio ligante de GABA, o receptor GABA_A possui sítios ligantes para compostos que, alostericamente, modificam a ativação deste receptor pelo GABA, como os benzodiazepínicos, as β -carbonilas, os barbituratos e outros esteróides. Drogas benzodiazepínicas se ligam à subunidade α do sítio benzodiazepínico do receptor GABA, potencializando a entrada de cloreto induzida pelo GABA (DEKERMENDJIAN et al., 1999). O pentilenotetrazol é um bloqueador seletivo de canal de cloreto ligado ao complexo do receptor GABA_A, e é o mais popular quimioconvulsivante usado na avaliação de drogas antiepiléticas (NASSIRI-ASL; SHARIATIRAD; ZAMANSOLTANI, 2008). Em doses baixas, é capaz de produzir efeito ansiogênico (WONG; SNEAD, 2001).

Modelos de estudo do comportamento empregando animais de laboratório são úteis para o estudo de enfermidades que acometem o homem e avaliação de drogas que atuam no SNC. Neste sentido, o camundongo apresenta diversas características anatômicas, celulares, bioquímicas e moleculares em comum com os seres humanos. Além disso, o camundongo compartilha com os seres humanos funções cerebrais, exibindo comportamento que se relacionam com ansiedade, fome, ritmo circadiano, agressão, memória, comportamento sexual e outras respostas emocionais, guardadas as devidas proporções. Assim, vários estudos usam modelos em camundongos que se aproximam de respostas comportamentais humanas em condições fisiológicas e patológicas. Os camundongos também são relativamente de baixo custo, facilmente acomodados e de fácil manuseio; alcançam a idade adulta em aproximadamente 3 meses e tem média de vida de 2 anos (MEER; RABER, 2005).

Em animais de laboratório, marcadamente ratos e camundongos, há alguns testes amplamente utilizados e validados do ponto de vista científico para avaliar a reatividade emocional; são eles o Campo Aberto (*Open Field*), o Labirinto em Cruz Elevado (*Elevated Plus Maze*) e a Placa Perfurada (*Hole-board*). Estes testes comportamentais são simples, não invasivos e reprodutíveis, detectando o efeito de drogas e compostos variados com ação no SNC (BOUWKNECHT et al., 2007; PINHEIRO et al., 2002; TAKEDA, TSUJI; MATSUMIYA, 2006).

A literatura da área de comportamento sócio-afetivo-emocional de animais e modulação da ansiedade é em grande parte composta por estudos com uso de roedores, mais especificamente, ratos e camundongos. Isto ocorre porque os modelos experimentais desenvolvidos até o presente são próprios para estes animais. Os labirintos e arenas do Campo Aberto e da Placa Perfurada para análise do comportamento foram validados para animais de pequeno porte, sendo os camundongos considerados ideais para tais estudos. Grupos experimentais com 5 a 10 animais proporcionam dados que podem ser analisados estatisticamente de forma adequada e com alta especificidade e reprodutibilidade (FILE; HIDE, 1979; FILE; PELOW, 1985; FILE; SANGROSSI; ANDREWS, 1993).

2.3 Flavonóides e Sistema Nervoso Central

Segundo Young (2007) os estudos científicos apontam que a prevalência de distúrbios mentais aumentou nos países desenvolvidos em correlação com a deterioração da dieta ocidental (*Western diet*). Assim, foram identificadas deficiências nutricionais que apresentam correlação com distúrbios mentais, como discutido, por exemplo, por Wurtman, O'Rourke e Wurtman (1989) e Young (2002). A dieta ocidental é pobre em vegetais frescos, como frutas, verduras e legumes, o que contribui para a deficiência de vitaminas e sais minerais. Possivelmente, esta dieta também contém baixos níveis de compostos bioativos presentes em vegetais, um fator que pode ter participação no au-

mento da incidência de distúrbios mentais na sociedade atual, pois é possível que compostos bioativos da classe dos flavonóides tenham ação protetora/preventiva de distúrbios do SNC, contribuindo para a manutenção da saúde mental. Produtos naturais da medicina popular contribuem significativamente na descoberta de drogas modernas e podem ser uma fonte alternativa de drogas neuroativas com novas estruturas e melhor segurança e padrão de eficiência (NASSIRI-ASL; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2008).

De acordo com Lakhan e Vieira (2008), depressão, distúrbio bipolar, esquizofrenia e distúrbio obsessivo-compulsivo contam hoje com tratamentos nutricionais com diferentes níveis de evidências de sua efetividade. Os recentes avanços no conhecimento da neurofarmacologia dos flavonóides sugerem que eles têm potencial para tratamento de diversas condições neurológicas e mentais. A ação de moléculas como, por exemplo, a hispidulina, que é capaz de atingir o receptor GABA_A, tem demonstrado importante papel na regulação da ansiedade e epilepsia, enquanto outros flavonóides são úteis em condições de neurodegeneração (JOHNSTON; BEART, 2004). O receptor GABA_A é um alvo para drogas neuroativas, como os benzodiazepínicos, cuja interação media seus efeitos ansiolíticos, hipnóticos e anticonvulsivantes no sítio benzodiazepínico deste receptor (NASSIRI-ASL; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2008).

Diversos estudos sugerem que os flavonóides têm propriedades neuroativas (GUARALDO et al., 2000, WATANABE et al., 2001, DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2001), e também mostram que alguns desses compostos se ligam ao receptor GABA_A no SNC (MEDINA, PALADINI; IZQUIERDO, 1993; PALADINI et al., 1999). Além disso, foi demonstrado que eles agem como moléculas análogas aos benzodiazepínicos. Esses resultados são suportados pela avaliação de seus efeitos comportamentais em modelos animais de ansiedade, sedação e convulsão (NASSIRI-ASL; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2008).

Há varias décadas a indústria farmacêutica se dedica a desenvolver diversas drogas, mais ou menos efetivas, com o propósito de atingir o receptor

GABA_A e promover efeito antiansiedade ou, como denominado mais especificamente, ansiolítico. O sucesso mais notável foi alcançado em 1957 com a síntese de drogas benzodiazepínicas, que ainda são, depois de mais de 40 anos de intensa pesquisa e uso, o melhor tratamento para a ansiedade (PALADINI et al., 1999). Segundo Medina, Paladini e Izquierdo (1993), esses medicamentos são a classe de drogas psicoativas mais prescritas na atualidade. Estes compostos ansiolíticos, hipnóticos e anticonvulsivantes, no entanto, também produzem vários efeitos colaterais, incluindo sedação, relaxamento muscular, estabilização automática, amnésia, potencialização dos efeitos depressivos do álcool e dos barbitúricos no SNC, além de tendência à tolerância e ao vício.

Desde a descoberta do sítio específico para benzodiazepínicos no receptor GABA existe uma discussão, na comunidade científica, a respeito de possíveis ligantes endógenos do sítio benzodiazepínico. Em 1985, Sangameswaran e De Blas detectaram moléculas análogas aos benzodiazepínicos em amostras de cérebro bovino. No entanto, Sangameswaran et al. (1986^a) sugerem que esse achado pode refletir apenas a exposição dos animais aos benzodiazepínicos comerciais, a venda desde o início da década de 1960. Este mesmo grupo de pesquisa (SANGAMESWARAN et al., 1986^b) analisou amostras de cérebros humanos, armazenados em parafina desde 1940, e detectaram imunorreatividade aos benzodiazepínicos. Do mesmo modo, alimentos armazenados desde antes da década de 1960 também acusaram a presença de moléculas análogas ao diazepam, o principal benzodiazepínico. Assim, era pouco provável que todos esses achados fossem resultantes de contaminação industrial. Sangameswaran et al. (1986^b), em sua conclusão, levantaram a hipótese de que os análogos aos benzodiazepínicos localizados nos seus estudos poderiam ter origem microbiológica e/ou vegetal, mas, independente da origem, provavelmente eram ingeridos como componentes da dieta, já que a possibilidade de que os mamíferos possam sintetizar benzodiazepínicos era muito pequena. Segundo esta hipótese, este é um exemplo de modulação funcional de um neurotransmissor, o GABA, por um componente dietéti-

co, que pode interferir na função cerebral e no comportamento. Quando se focalizou a detecção de benzodiazepínicos em plantas, incluindo algumas usadas como tranqüilizantes, foram identificados como princípios ativos determinados flavonóides, que foram caracterizados como sendo capazes de se ligarem ao sítio receptor benzodiazepínico (PALADINI et al., 1999). Emerge deste fato a conclusão de que as moléculas identificadas como análogas aos benzodiazepínicos, no início das pesquisas, e os flavonóides, são os mesmos compostos.

Os estudos de plantas ou ervas medicinais utilizadas popularmente para o tratamento da ansiedade revelam que muitas destas têm como principais fitoconstituintes os flavonóides. Dhawan, Kumar e Sharma (2001) pesquisaram o efeito anti-ansiedade da *Passiflora incarnata*, o maracujá, planta utilizada em todo o mundo como ansiolítica e sedativa desde tempos imemoriais, e apontam que seu extrato é rico nos flavonóides apigenina, luteolina, quercetina e kaempferol, entre outros. Guaraldo et al. (2000), investigando os efeitos da *Davilla rugosa*, conhecida como Cipó-Caboclo, não encontraram relação entre nenhum outro componente do extrato com o efeito ansiolítico produzido por esta erva, exceto com os flavonóides. Segundo estes autores, existem várias evidências mostrando que flavonóides sintéticos e naturais são potentes agentes ansiolíticos, sem efeitos sedativos, miorrelaxantes ou amnésicos. Extratos de plantas medicinais ou de outras fontes naturais podem conter uma variedade de moléculas com potente atividade biológica. Infelizmente, frequentemente não é possível analisar a atividade biológica destes extratos em razão de sua natureza complexa e dos possíveis efeitos sinérgicos de seus componentes. O extrato de *Gingko biloba*, por exemplo, é comercializado como um suplemento dietético/terapêutico indicado para uma variedade de doenças. Esse extrato é sobremaneira indicado para o tratamento de distúrbios neurológicos como o mal de Alzheimer ou outras doenças geriátricas: vertigem, depressão, perda de memória, perda de audição e falta de atenção (WATANABE et al., 2001) Embora os prováveis benefícios terapêuticos desta planta possam residir na sinergia entre todos os seus componentes, foram

detectados constituintes isolados ativos. O extrato de *Gingko biloba* contém 24% de flavonas glicosídicas (quercetina, caempferol e isohamnetina) e 6% de lactonas terpenos, entre outros compostos (WATANABE et al., 2001). Assim, estes autores demonstraram que uma variedade de genes neuronais pode ser induzida no hipocampo e no córtex cerebral através da suplementação dietética com *Gingko biloba*, o que explica os efeitos biológicos obtidos com a sua utilização.

Embora existissem diversos estudos com ervas medicinais que contém flavonóides, muitas das quais tem suas ações terapêuticas atribuídas a estes, até recentemente não se compreendia o modo pelo qual os flavonóides ultrapassavam a Barreira Hemato-Encefálica (BHE) e atingiam os neurônios. Segundo Youdim, Shukit-Hale e Joseph, (2004), o processo de captação de compostos químicos dos mais variados tipos pode ser denominado biodisponibilidade para o SNC. As características especiais da BHE, como a presença de especializações de membrana, mecanismos de transporte de membrana e sistema de captação, além de enzimas metabólicas próprias desta estrutura, fazem desta uma passagem regulatória que limita o trânsito de compostos para o SNC, de forma a protegê-lo de possíveis danos. Em adição, características físico-químicas de substâncias (solubilidade, peso molecular, lipofilicidade, entre outros) influenciam a permeabilidade da BHE aos compostos químicos. Youdim, Shukit-Hale e Joseph, (2004), executaram um estudo *in vitro* e *in situ* para determinar a permeabilidade da BHE a flavonóides, utilizando culturas celulares similares à BHE e um modelo de perfusão cerebral *in situ*, com ratos. Os flavonóides avaliados neste estudo foram a naringerina e a quercetina. Este segundo composto, em específico, mostrou-se capaz de ultrapassar a BHE sem qualquer tipo de metabolismo, *in vitro* e *in vivo*, atingindo regiões cerebrais como cerebelo, córtex, hipocampo, hipotálamo, estriato, colículo superior e medula. O mecanismo de captação de quercetina parece ser co-dependente do transportador P-glicoproteína ou transportador multidrogas (P-gp), embora a interação com o receptor- proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP) não deva ser descartada. Claramente, a quercetina mostrou-se

um substrato para o transporte na BHE. De fato, este estudo fornece evidência precisa de que flavonóides estruturalmente diferentes são capazes de penetrar em diferentes regiões do SNC.

Goutman et al., (2003), relataram que a quercetina, assim como os flavonóides apigenina, morina, crisina e flavona, inibem as correntes iônicas mediadas em receptores GABA_A de oócitos de *Xenopus laevis*. Além disso, a quercetina mostrou ação similar em receptores de serotonina, nicotínicos e AMPA/Kainato. E mais, os efeitos da quercetina e da apigenina nos receptores GABA_A foram insensíveis ao antagonista específico do sítio benzodiazepínico, o flumazenil. Os autores ressaltaram que, embora haja ligação da quercetina e apigenina com receptores GABA_A e GABA_C, a modulação exercida pode ser diferente daquela descrita para os benzodiazepínicos clássicos, o que aventou a hipótese de que os flavonóides tenham efeito ansiolítico sem os evidentes efeitos colaterais descritos com os benzodiazepínicos.

O Kava-kava (*Piper methysticum*) é um fitoterápico com estudo clínico controlado que comprovou sua eficácia no tratamento de sintomas de ansiedade. Seu efeito ansiolítico poderia ser decorrente de uma ação facilitadora da inibição GABAérgica, inibidora da atividade excitatória glutamatérgica, inibidora da atividade dopaminérgica, redutora da concentração de serotonina ou bloqueadora nos canais de sódio voltagem-dependentes (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; ZORZETTO FILHO, 2001). Kumar e Sharma (2005) atribuem o efeito ansiolítico encontrado após a administração de tintura matriz de *Turnera aphrodisiaca* aos seus fitoconstituintes, entre eles flavonóides, alcalóides e esteróides. Este extrato herbal é tradicionalmente utilizado para o tratamento de ansiedade e como afrodisíaco. Por isso, Kumar e Sharma (2006) continuaram as investigações sobre suas propriedades e realizaram o isolamento do constituinte bioativo da *T. aphrodisiaca* usando uma metodologia de fracionamento guiado pela bioatividade; o resultado foi o isolamento da 5,7,4'-trihidroxy-flavona apigenina, assim concluindo que este é o constituinte ativo da *T. aphrodisiaca*, responsável pela atividade ansiolítica exibida pelo extrato. Liao, Hung e Chen (2003) avaliaram os constituintes ativos da *Scutel-*

lariae radix, conhecida na medicina chinesa com “Huangqin”, com diversos efeitos biológicos, inclusive sedação. Um estudo prévio deste grupo (LIAO et al., 1995) evidenciou que ocorrem interações de compostos presentes no extrato herbal e receptores neuronais ou sítios nestes receptores, como o sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A. Foram identificadas três substâncias da classe dos flavonóides: baicalina, oroxilina A e skullcapflavona II. A baicalina, especificamente, foi estudada por ser quantitativamente o maior constituinte ativo da *Scutellaria radix*, com constante de afinidade (K_i) com o sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A proporcionalmente alto; seu metabólito, a baicaleína, também foi avaliado quanto à atividade ansiolítica. Estes autores utilizaram o teste do conflito de Vogel e observaram que ambos os compostos tem efeito com perfil ansiolítico. Utilizando um inibidor específico do sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, foi ainda possível determinar que o efeito ansiolítico se deve à interação específica com este receptor. Como tem sido verificado na literatura (WOLFMAN et al., 1994, VIOLA et al., 1995, SALGUEIRO et al., 1997), os flavonóides de ocorrência natural com atividade ansiolítica não provocam efeitos como sedação, relaxamento muscular ou efeitos amnésicos.

O estudo de Nassiri-Asl, Shariati-Rad e Zamansoltani, (2007), mostrou que o extrato hidroalcoólico de maracujá, utilizando o modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos, na dose de 0,4mg/kg, prolonga o tempo de latência para a convulsão e diminui a duração das mesmas; nessa mesma dose as convulsões e a proteção à mortalidade foram de 100%. Flumazenil e naloxona suprimiram os efeitos anticonvulsivantes do extrato de maracujá. Segundo estes autores, diversas espécies de frutos do gênero *Passiflora* contém compostos que incluem alcalóides, fenóis, flavonóides glicosídicos e compostos cianogênicos.

Medina et al. (1997) demonstraram que flavonóides de ocorrência natural como a crisina e a apigenina são ligantes do sítio benzodiazepínico, tendo efeitos ansiolíticos. Huen et al. (2003) isolaram mais um flavonóide com capacidade de ligação com o sítio benzodiazepínico, a 5,7,2'-trihidrox-

6,8-dimetoxiflavona, denominada K36, que mostrou potencialização de correntes elétricas em experimentos eletrofisiológicos com um recombinante de receptor GABA_A expresso em oócitos de *Xenopus*. Novamente, o efeito biológico encontrado com o uso do flavonóide K36 foi revertido utilizando o antagonista do sítio benzodiazepínico Ro15-1788. Sedação, relaxamento muscular ou falhas de coordenação motora não foram verificadas no estudo do K36. Este autores ainda realizaram um estudo de estrutura-atividade, que evidenciou que em flavonóides sintéticos a substituição de radicais na posição 2' é crítica para a afinidade destes compostos com o sítio benzodiazepínico.

Neste sentido, os estudos descritos evidenciam o potencial dos flavonóides como agentes terapêuticos no tratamento de síndromes de ansiedade ligadas ao sítio receptor benzodiazepínico. Os estudos de Nassiri-Asl, Shariati-Rad e Zamansoltani (2007), Dhawan, Dhawan e Sharma (2004), Coleta et al. (2008), Nassiri-Asl, Shariati-Rad e Zamansoltani (2008), também deixam clara a afinidade de flavonóides de ocorrência natural com o sítio receptor benzodiazepínico e a atividade ansiolítica exercida pelos flavonóides.

2.4 Hipótese

Flavonóides de origem alimentar podem, quando consumidos como parte de uma dieta adequada e que contenha todos os nutrientes em qualidade e quantidade adequadas, ser absorvidos pelo trato gastrointestinal, atingirem o SNC e exibirem atividade biológica na modulação do comportamento, com perfil ansiolítico.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da ingestão do flavonol rutina proveniente do quiabo em modelos comportamentais envolvidos com a ansiedade em camundongos.

3.2 *Objetivos específicos*

- Determinar a quantidade e qualidade de compostos da classe dos flavonóides no quiabo;
- Estabelecer a concentração de flavonóides presentes no quiabo para ser acrescentada na ração a ser administrada aos camundongos, considerando o consumo médio de flavonóides da população brasileira,
- Estabelecer duas concentrações superiores a estimativa de consumo citada acima, para verificar se há relação entre concentração e resposta biológica;
- Estabelecer o tempo de administração de flavonóides provenientes do quiabo para obtenção de resposta biológica;
- Determinar se os flavonóides presentes no quiabo, quando infundidos na porção duodenal do intestino de ratos, são absorvidos;
- Determinar a quantidade de rutina em tecidos biológicos (sangue, urina, cérebro, coração, rim, intestino grosso, estômago e fígado) de animais perfundidos com rutina;
- Determinar a quantidade de rutina no sangue e no cérebro de animais tratados com dieta suplementada com quiabo;
- Comparar os efeitos comportamentais da administração de drogas ansiolítica e ansiogênica com os efeitos da administração de rações suplementadas com quiabo, empregando o campo aberto, o labirinto em cruz elevado e a placa perfurada;

- Comparar os efeitos comportamentais da administração de rações suplementadas com quiabo com os efeitos da administração de ração suplementada com rotina, empregando os modelos comportamentais supracitados;
- Comparar os efeitos comportamentais da administração de ração enriquecida com quiabo ou com rotina aos efeitos obtidos com tratamento com drogas ansiolíticas e ansiogênicas, nos modelos experimentais campo aberto, labirinto em cruz elevado e placa perfurada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização nutricional do quiabo

4.1.1 Amostra

Foram selecionadas amostras de quiabo (*Abelmoschus esculentum*) da cultivar Santa Cruz, em grau de maturação adequado: os frutos apresentavam cerca de 2 cm de diâmetro e de 5 a 7 cm de comprimento, com casca lisa e isenta de marcas de traumas mecânicos, de cor verde própria e uniforme, conforme referido por Mota et al. (2005). Estas amostras foram adquiridas na Central de Abastecimento de São Paulo (CEAGESP). Os frutos foram lavados em água corrente, as partes não comestíveis foram descartadas e os legumes foram cortados em pequenos pedaços, sendo imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Após o congelamento completo de lotes de amostras de quiabo, os frutos foram liofilizados, triturados e armazenados a -20°C. Os diferentes lotes de amostras de quiabo liofilizado (QL) foram homogeneizados para uniformizar a sua composição mantendo-se baixa temperatura com uso de nitrogênio líquido.

4.1.2 Identificação e quantificação de flavonóides do QL

4.1.2.1 Preparo de extrato metanólico

A extração foi realizada de acordo com o método proposto por Price et al. (1999), com pequenas modificações, descritas a seguir. Triplicatas de amostras de quiabo liofilizado sofreram tripla extração em metanol/água (70:30, v/v) em microcissalhador na velocidade 3 por 1 minuto (Homogenizador Brinkmann, Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Sweden) em banho de gelo. O homogenato obtido foi filtrado sob pressão reduzida através de papel-filtro (Whatman nº 06). Os extratos obtidos foram concentrados por eliminação do metanol em um rotaevaporador (Rotavapor RE 120, Büchi, Flawil, Sweden) a 40°C até cerca de 10mL. O extrato concentrado foi acrescido de água Milli-Q até 25mL para posterior aplicação em coluna de fase sólida.

4.1.2.2 Extração em fase sólida

Alíquotas de 6mL do extrato obtido foram aplicadas em coluna de poli-amida SC 6 (Macherey-Nagel GmbH e Co., Duren, Alemanha). A coluna de 1g/6mL foi previamente condicionada com metanol e água Milli-Q. Após a passagem da alíquota de extrato metanólico de QL, a coluna foi lavada com água Milli-Q e procedeu-se a eluição com metanol, seguida de metanol/amônia na concentração 99,5:0,5. Cada eluato foi evaporado por secagem sob pressão reduzida a 40°C em rotaevaporador. Após secagem completa o resíduo foi ressuspensionado em metanol, filtrado através de filtro 0,22µm poly-(tetrafluoroethylene) (PTFE) (Millipore Ltda, Bedford, MA) e armazenado em vial para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.1.2.3 Análise por CLAE

A identificação e a quantificação de flavonóides foram realizadas utilizando-se CLAE de fase reversa em um sistema Hewlett-Packard 1100 com “autosampler” e bomba quaternária acoplada a um arranjo do detector de diodo. Utilizou-se a coluna Prodigy 5/ODS 3 sílica (250mm 4,6mm d.i., Phenomenex Ltda.) e os solventes de eluição foram: solvente A (água/tetra-hidrofurano/ácido trifluoracético na proporção 98:2:0,1, v/v) e solvente B (acetonitrila). O gradiente dos solventes foi o mesmo utilizado por Price et al. (1999). Os eluatos foram monitorados nos comprimentos de onda 270, 370 e 525nm. Cada amostra foi injetada em duplicata, e os flavonóides foram quantificados através do uso dos respectivos padrões externos [rutina (Merck - Darmstadt, Alemanha) e quercetina (Sigma - St. Louis, MO)]. As soluções padrão de flavonóides foram preparadas por dissolução de rutina e quercetina em metanol e armazenadas a -20°C entre as análises. A calibração foi realizada injetando os padrões acima descritos três vezes em seis diferentes concentrações. Os picos de identificação foram detectados por comparação com os tempos de retenção e as características dos arranjos espectrais com os

padrões e a biblioteca de espectros de absorção. Os resultados foram expressos como miligramas de agliconas por 100g de peso seco, como média e desvio-padrão.

4.1.3 *Análise da composição centesimal do quiabo*

O teor de umidade do QL foi determinado utilizando metodologia própria para este fim, descrita pela AOAC (1995). Para a determinação de proteínas, seguiu-se o método Kjeldahl proposto pela AOAC (1995), utilizando o fator 6,25 para conversão do nitrogênio em proteína. A fração lipídica do QL foi determinada pelo método Soxhlet, a partir da metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). A partir de amostras desengorduradas como descrito acima, foi determinada a fração indigerível do QL, identificando também as fibras solúveis, segundo o método proposto por Filisetti-Cozzi e Lajolo (1991) e Proski et al., (1992). O teor de cinzas foi obtido utilizando o método proposto pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Adicionalmente, foram realizadas a identificação de amido nas amostras de QL, seguindo o método proposto por Áreas e Lajolo (1981), e a identificação e quantificação de açúcares solúveis, como descrito por Cordenunsi, Shiga e Lajolo (2008).

Por fim, foram calculadas as estimativas de carboidratos totais e de oligossacarídeos das amostras de QL. Para estimar a quantidade de carboidratos totais, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$100 - [\text{Umidade (g)} + \text{Cinzas (g)} + \text{Proteínas (g)} + \text{Lipídeos (g)}] = \text{Carboidrato total (g)}$$

$$\text{Carboidrato total (g)} - \text{Fibras alimentares (g)} = \text{Carboidrato disponível (g)}$$

Para estimar a quantidade de oligossacarídeos, foi aplicada a seguinte equação:

$$\text{Carboidrato disponível (g)} - \text{Açúcares solúveis (g)} - \text{Amido (g)} = \text{oligossacarídeos (g)}$$

Ambas as estimativas foram realizadas apenas para adequar o valor nutricional da ração experimental no presente estudo, partindo do conhecimento de que a quantidade de amido da amostra foi insignificante.

4.2 Formulação das rações experimentais

O consumo diário de flavonóides e, por consequência, de quiabo liofilizado, foi estipulado a partir de dados relatados por Arabbi, Genovese e Lajolo (2004), que estimaram em 82,5mg/dia o consumo médio de flavonóides da população brasileira. Para calcular a concentração correspondente a este valor para camundongos, calculou-se, considerando o padrão de homem brasileiro com 70kg de peso corporal, um consumo de flavonóides de 1,2mg/kg/dia. Esta foi estipulada como sendo a menor concentração de flavonóides para compor a ração experimental utilizada neste estudo. Assim, para camundongos adultos, com peso de cerca de 30g, 1,2mg/kg/dia equivalem a 0,036mg de flavonóides/dia. Para fornecer essa quantidade de flavonóides foi realizada a quantificação dos mesmos no QL e calculada a quantidade necessária a ser adicionada à ração. Um ensaio prévio apontou que os camundongos adultos consumiram em média 5,5g de ração diariamente. Sabendo que 5,5g de ração deveriam fornecer 0,036mg de flavonóides, calculou-se a quantidade de QL necessária por camundongo e por dia de tratamento. Em seguida, foi calculada a porcentagem de peso, em 1000g de ração, de QL. Foram estipuladas duas concentrações maiores para suplementação dietética, com base na porcentagem de peso de adição de QL. Portanto, foram formulados três tipos de ração adicionada de quiabo: 4,5%, 7% e 10% do peso total da ração foi proveniente de QL, o que corresponde a 1,2mg, 1,9mg e 2,6mg de rutina/kg de peso corporal dos camundongos.

A ração utilizada neste experimento foi a formulação AIN-93M, para roedores adultos em período de manutenção, segundo recomendação do *American Institute of Nutrition* (1993) e de acordo com REEVES (1997), exceto pela exclusão do agente antioxidante, pela adição de QL como fonte de flavonóides ou pela adição de rutina, em lotes selecionados de ração. Os componentes da ração foram os seguintes: amido de milho, amido dextrinizado, caseína, sacarose, mix vitamínico, mix de minerais, bitartarato de colina e L-cistina, que foram adquiridos da empresa Rhoster (Rhoster Ltda., SP); o óleo

de soja foi adquirido no comércio local (Óleo de soja “Soya”®). Com base na composição centesimal do QL foi calculado o balanço nutricional das rações Controle e rações experimentais suplementadas com QL ou com rotina. Para a elaboração das rações todos os componentes secos foram pesados e homogeneizados, mantendo baixa a temperatura com o uso de banho de gelo. Em seguida, foi adicionada água Milli-Q, a mistura foi novamente homogeneizada, foram modelados pellets, que então secaram em temperatura controlada ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e foram imediatamente armazenados a -20°C até o momento do uso.

4.3 Animais e condições de Biotério

Foram empregados camundongos *Mus musculus* da linhagem *Swiss*, machos, adultos (pesando 30g), provenientes do Biotério da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e ratos *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, machos, adultos, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP).

Os camundongos foram alojados em número de 5 por gaiola plástica (medindo 30 x 20 x 13 cm) e os ratos em número de 3 por gaiola plástica (medindo 43 x 23 x 16 cm); os animais permaneceram em sala com temperatura ($21 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 h (luz ligada às 7:00h) controlados, recebendo água e ração peletizada industrial *ad libitum*, exceto durante os procedimentos experimentais. Os camundongos foram encaminhados ao laboratório de análise de comportamento para adaptação às condições ambientais pelo menos 1 hora antes do início dos experimentos. Os testes comportamentais foram realizados durante o período diurno, entre 8:00 e 12:00h.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com os padrões internacionais de cuidados com animais recomendados pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. A manipulação dos animais foi realizada por tratadores treinados e teve como objetivo causar o mínimo desconforto aos animais e reduzir o número de animais usados. Todos os procedimentos

aqui relatados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais local.

4.3.1 Avaliação Neurológica Neonatal de camundongos

Os filhotes de camundongos selecionados para o experimento comportamental foram submetidos a uma bateria de testes cujo objetivo foi verificar, no período neonatal, a ocorrência de malformações visíveis ou funcionais que poderiam prejudicar o desempenho dos animais em testes comportamentais. Sendo assim, todos os camundongos utilizados nos experimentos foram avaliados do ponto de vista neurológico no período neonatal, por volta do 10º dia pós-natal (MEER; RABER, 2005). Os camundongos que não foram aprovados nesta avaliação foram excluídos do experimento. Os parâmetros avaliados foram: conformação craniana, implantação das orelhas, conformação da cauda, inserção dos membros torácicos e pélvicos, região palatina, anal, e urinária, reflexo de preensão palmar, reflexo de endireitamento da postura e padrão adulto de locomoção, além do desenvolvimento físico geral dos filhotes (desdobramento das orelhas, erupção dos dentes incisivos, aparecimento de pêlos corporais, abertura dos olhos e do canal auditivo). Para ser considerado aprovado, o filhote devia apresentar o marco de desenvolvimento no período estipulado como correto pela literatura.

4.3.2 Administração de rações experimentais aos camundongos

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos de 10 animais. A quantidade de ração experimental necessária para cada grupo de animais (5 por caixa) foi pesada diariamente e oferecida nas caixas-moradia. Uma vez ao dia, no final do período claro, os animais foram pesados para acompanhamento do peso e do consumo da ração, através da pesagem das sobras de ração. Todos os grupos experimentais receberam inicialmente ração AIN-93M controle durante 7 dias, para adaptação. Em seguida, os grupos passaram a receber ração controle ou ração suplementada com QL ou com

rutina nas concentrações estipuladas por 7, 14 e 21 dias, ao final dos quais foram realizados os testes comportamentais.

4.4 Ensaio em ratos de absorção intestinal in situ

Este experimento foi realizado com ratos submetidos a jejum alimentar por 12hs anteriores ao início do experimento. Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400mg/kg, i.p.). Depois de anestesiados, foram fixados em mesa própria para procedimentos e foi realizada incisão longitudinal e exposição do conteúdo abdominal, especificamente as alças intestinais. O duodeno proximal foi localizado e, através de uma pequena incisão, foi introduzida e fixada uma cânula de polietileno, com diâmetro igual ao do segmento intestinal. Em seguida foi localizado o jejuno proximal, de modo a isolar toda a extensão do duodeno e o início do jejuno. Neste local, novamente através de pequena incisão, foi introduzida e fixada uma cânula de polietileno. Deste modo, a cânula localizada no duodeno proximal levava uma solução, daqui para frente denominada perfusato, para o intestino, enquanto que a cânula localizada no jejuno proximal recolhia o perfusato. Após a fixação das cânulas e sutura do abdômen, o segmento intestinal foi perfundido com solução fisiológica (NaCl 0,9%) a 25-27°C, em fluxo de 1 mL/min, por 3 minutos, para limpeza. Em seguida, o intestino foi perfundido com solução fisiológica com adição de 40mg de rutina/75mL, em volume total de 100mL, em temperatura de 25-27°C, em fluxo de 1 mL/min, por 75 minutos. Foram coletadas amostras de 1mL do perfusato nos tempos 0, 5, 15, 30, 45, 60 e 75 min. O volume total do perfusato foi monitorado, para detectar vazamentos. As amostras de perfusato foram acondicionadas em eppendorfs identificados e secas totalmente em Speed-vac. Após a secagem, as amostras foram ressuspensas em metanol grau HPLC, para detecção e quantificação de flavonóides por CLAE, como descrito no item 3.2. Amostras de urina, sangue, cérebro, rins e fígado também foram coletadas para análises posteriores.

4.5 Análise do Comportamento de camundongos

Camundongos foram tratados com rações controle e experimentais, suplementadas com QL ou rutina, para a análise do comportamento. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos controle e onze grupos experimentais. Os animais dos grupos experimentais receberam ração AIN-93M contendo 4,5%, 7% e 10% de QL por 7, 14 ou 21 dias e ração suplementada com rutina na concentração 1,2mg/kg/dia por 1 ou 7 dias. Os animais dos grupos controle receberam apenas ração AIN-93M. Após 7, 14 ou 21 dias de tratamento, os camundongos de 3 grupos controle foram distribuídos em três grupos que receberam, por via intraperitoneal, 1,0mg/kg de diazepam, 90mg/kg de pentilenotetrazol ou 1ml/kg de solução salina. Trinta minutos após esses tratamentos, realizaram-se os testes comportamentais. Cada camundongo foi submetido uma única vez ao campo aberto, ao labirinto e à placa perfurada para análise do comportamento.

Os testes de comportamento foram realizados em sala exclusiva para esse fim, com controle de temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e de ruídos. Os aparelhos de observação comportamental foram colocados individualmente em um cubículo de observação com iluminação adequada e com equipamento de filmagem, que captou as imagens e possibilitou a gravação das mesmas em fitas VHS com uso de videocassete. A observação e a análise dos testes foram feitas na parte externa do cubículo, por meio de monitor de televisão.

4.5.1 Drogas

Diazepam (DZP) (Dienpax, Laboratório Sanofi-Winthrop, Brasil) foi diluído em água destilada e administrado na dose 1mg/kg, por via intraperitoneal como medicamento ansiolítico de referência (controle positivo). Pentilenotetrazol (PTZ) (Serva, Brasil) foi diluído em água destilada e administrado na dose 90mg/kg, por via intraperitoneal, como medicamento ansiogênico de referência (controle negativo).

4.5.2 Teste do Campo Aberto

Este modelo foi utilizado para observação de atividade geral dos camundongos. A atividade geral observada no Campo Aberto (CA) ou *open field* pode ser empregada como índice para medir emocionalidade e alterações motoras produzidas por diferentes agentes (BROADHURST, 1960, IVINISKIS, 1970, BERNARDI; PALERMO-NETO, 1980; KELLEY, 1993). Este modelo oferece um ambiente novo ao animal, o que promove a exploração do mesmo. Agentes ansiolíticos em pequenas doses podem aumentar o tempo de locomoção, pelo fato de reduzir a ansiedade; em altas doses podem causar sedação. Deste modo, este modelo é útil como preditor da ansiedade: um tempo de permanência maior na zona externa do CA é indicativo de tendência à ansiedade; ao contrário, um tempo de permanência maior na zona interna do CA é sugestivo de efeito com perfil ansiolítico (RAMOS et al., 1997).

O CA aqui empregado consistiu de uma arena quadrada de acrílico branco leitoso, medindo 25 x 25cm, protegida por quatro paredes laterais de 25cm de altura. O piso da arena foi demarcado em 25 quadros de 10cm x 10cm; o aparato permaneceu sobre suporte elevado a 45cm do chão. Um modelo esquemático do aparelho pode ser visto na Figura 11.

Figura 11. Ilustração esquemática da arena do campo aberto (vista de cima), subdividida em zonas externa, média e interna.

Inicialmente, o CA foi limpo com papel toalha umedecido com solução de álcool etílico a 5%. A seguir, introduziu-se cada camundongo individualmente no centro da arena e procedeu-se a observação por 5 minutos, a qual foi filmada e gravada em fita VHS, para análise posterior. Os seguintes parâmetros foram observados em cada zona da arena do CA: tempo de locomoção e de imobilidade (em segundos), frequência de levantar, frequência de autolimpeza ou *grooming* (movimentos executados com as patas anteriores em direção à boca ou cabeça, podendo haver continuidade destes em direção aos pavilhões auriculares e/ou movimentos de *lamber* dirigidos, principalmente, às porções laterais do corpo e região genital) e número de quadros totais percorridos, com o auxílio de cronômetros e contadores manuais de frequência, em planilha própria. Ao final dos 5 minutos de observação, os animais foram retirados da arena e reconduzidos à caixa-moradia. O CA foi novamente higienizado com álcool a 5% antes da introdução do próximo camundongo. As observações comportamentais foram feitas intercalando animais do grupo controle e experimentais para evitar alterações em razão das variações do comportamento.

4.5.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) ou *elevated plus maze* foi baseado no modelo proposto, para ratos, por Pellow et al. (1985) e validado por Lister (1990) para camundongos. Este labirinto consiste em uma estrutura de acrílico branco leitoso em forma de cruz, com dois braços abertos (30 x 5 x 0,25cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15cm) conectados por uma plataforma central (5 x 5cm) e elevado a 45cm do chão, conforme mostra a Figura 12.

Os parâmetros comportamentais inicialmente registrados no LCE foram a frequência de entradas nos braços (quando as quatro patas ultrapassam o limite do braço aberto ou fechado) e o tempo (em segundos) despendido nos braços abertos e nos braços fechados. Foram também registrados no

labirinto o número de mergulhos ou *head-dipping* (projeção da cabeça para fora do braço aberto), levantamentos ou *rearing* (apoio apenas nas patas posteriores, com as patas anteriores apoiadas ou não em uma parede do braço fechado), estiramentos ou *stretch attend posture* (estiramento do corpo, mantendo as patas posteriores fixas), auto-limpeza ou *grooming* como medidas de comportamentos de avaliação de risco (RODGER; COLE, 1993) e de emocionalidade. Um aumento seletivo nos parâmetros tempo despendido nos braços abertos e número de entradas nos braços abertos indica um efeito com perfil ansiolítico (PELLOW et al., 1985 e 1986). Adicionalmente, foi feita análise de tempo de permanência em zonas dos braços abertos e fechados, para observação mais acurada da atividade ansiolítica (RAMOS et al., 1997).

Figura 12. Ilustração esquemática da arena do Labirinto em Cruz Elevado (vista de cima), com os braços abertos e fechados subdivididos em zonas.

4.5.4 Teste da Placa Perfurada

O teste da Placa Perfurada ou *holeboard* foi introduzido por Boissier e Simon (1962) e atualizada a partir do estudo de Takeda, Tsuji e Matsumiya, (2006). O aparelho empregado foi construído em acrílico branco leitoso, com as mesmas dimensões do CA acima descrito, apenas com uma modificação: no piso da arena foram feitos 4 orifícios de 3 cm de diâmetro, eqüidistantes (vide Ilustração 13). Imediatamente abaixo de cada orifício, a uma distância de 15cm, foram fixados suportes para comedouros com ração. O aparelho permaneceu apoiado em suporte e elevado do chão 45cm.

O teste da placa perfurada baseia-se na exposição do camundongo a um dilema: a luta entre a tendência exploratória de um novo ambiente (reforçada pelo odor da ração) e a tendência à esquiva gerada pelo medo dos perigos potenciais que um novo ambiente carrega. Os parâmetros observados neste aparelho foram: latência para a primeira exploração de um orifício (mergulho de cabeça ou *head dipping* em qualquer orifício do piso da arena) e frequência de mergulhos de cabeça. Cada camundongo foi retirado de sua caixa-moradia, colocado no centro da arena e observado por 5 minutos, depois do que foi novamente encaminhado a caixa-moradia. Neste modelo experimental, altos níveis de ansiedade resultam em diminuição da frequência de mergulhos de cabeça, enquanto drogas ansiolíticas aumentam o número de mergulhos de cabeça (TAKEDA; TSUJI; MATSUMYIA, 2006).

Figura 13. Ilustração esquemática da arena Placa Perfurada (vista de cima), indicando a posição dos 4 orifícios equidistantes entre si.

4.6 Delineamento experimental

4.6.1 Experimento 1 - Análise do comportamento no Campo Aberto

Os camundongos foram distribuídos em três grupos: um grupo controle (n=30) que recebeu ração AIN-93M, por 7 dias (n=15), 14 dias (n=5) e 21 dias (n=5), e onze grupos experimentais (n=10 por grupo) que receberam ração AIN-93M suplementada com quiabo liofilizado (QL) a 4,5% por 7 dias, 4,5% por 14 dias, 4,5% por 21 dias, 7% por 7 dias, 7% por 14 dias, 7% por 21 dias, 10% por 7 dias, 10% por 14 dias e 10% por 21 dias, rotina 1,2mg/kg/dia por 1 dia e por 7 dias. Diariamente os animais foram pesados e foi avaliado o con-

sumo de ração, conforme descrito no item 4.3.2. No 7º dia, 20 animais do grupo controle tratados por 7 dias foram redistribuídos em quatro grupos: um grupo controle 7 dias (n=5); os outros três grupos (n=5 cada) receberam, por via intraperitoneal, 1,0mg/kg de DPZ, 90mg/kg de PTZ ou 1ml/kg de solução salina. Trinta minutos após esses tratamentos, todos os camundongos dos grupos controle e experimentais foram submetidos ao campo aberto, conforme descrito no item 4.5.2.

4.6.2 Experimento 2. Análise do comportamento no Labirinto em Cruz Elevado

Foram empregados os camundongos provenientes do Experimento 1. Imediatamente após o teste do campo aberto, os camundongos foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado e observados, conforme descrito em 4.5.3.

4.6.3 Experimento 3. Análise do comportamento na Placa Perfurada

Foram empregados os camundongos provenientes do Experimento 2. Imediatamente após o teste do labirinto, os camundongos foram submetidos ao teste da placa perfurada, conforme descrito no item 4.5.4.

4.7 Eutanásia dos camundongos

Os camundongos de todos os grupos experimentais, imediatamente após os testes de comportamento, foram pesados, anestesiados por inalação de CO₂ e, em seguida, foram colhidas amostra de sangue, de cada animal, através do plexo oftálmico, para análises posteriores. Imediatamente após a eutanásia por anóxia, seguiu-se a necropsia. O cérebro foi retirado, limpo em papel-filtro e armazenado em freezer -20°C para análises posteriores do conteúdo de flavonóides.

4.8 Análise de flavonóides em tecidos biológicos

Amostras de sangue de camundongos tratados com ração suplementada com QL foram armazenadas em eppendorfs, mantidas sob refrigeração e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, a 4°C. Imediatamente, o plasma foi retirado e acondicionado em eppendorfs identificados, sendo mantidos em freezer a -20°C. As amostras de plasma assim coletadas foram liofilizadas e mantidas em a -20°C até o momento da análise de flavonóides. Amostras de sangue e urina coletadas de ratos que foram submetidos ao ensaio de perfusão intestinal *in situ* também foram submetidas aos mesmos procedimentos para coleta e para identificação de flavonóides, descritos a seguir.

Para a detecção e quantificação de flavonóides, o plasma e a urina liofilizados foram reconstituídos com 1mL de água Milli-Q, sob agitação até dissolução completa. O volume total de plasma/urina obtido foi extraído em fase sólida utilizando-se coluna C-18 com 0,3g, previamente condicionada com metanol e água Milli-Q. Após a passagem do plasma, a coluna foi lavada com água Milli-Q para evitar o acúmulo de contaminantes da amostra. A eluição foi feita com metanol e metanol/amônia (concentração 99,5:0,5), recolhidos em um único balão. O eluato foi evaporado por secagem sob pressão reduzida a 40°C em rotaevaporador. Após secagem completa, o resíduo foi ressuspenso em metanol, filtrado através de filtro 0,22µm poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) e armazenado em vial para análise por CLAE. Esta seguiu o procedimento já descrito para as amostras de QL, sem alterações, utilizando os mesmos padrões externos.

Após a eutanásia dos camundongos deste experimento, todo o cérebro foi retirado, através de incisão na calota craniana e descolamento do tecido, retirando em um único bloco os lobos cerebrais e o cerebelo. O tecido retirado foi congelado a -20°C e liofilizado. Dos ratos que sofreram perfusão intestinal com rutina foram coletados o cérebro, rim, fígado, coração, intestino grosso e estômago, que foram submetidos aos procedimentos descritos a seguir.

Inicialmente, para a identificação e quantificação de flavonóides foi

utilizado o mesmo procedimento analítico aplicado às amostras de QL. Em seguida, um procedimento alternativo foi realizado, baseado nos métodos descritos por Paulke, Schubert-Zsilavecz e Wurglics (2006) e Kalt et al. (2008), especificamente para o tecido cerebral. Imediatamente após a retirada do cérebro, esta amostra foi lavada em solução-tampão TRIS gelado (5mM, pH 7,4), seca em papel-filtro, pesada e triturada em microcislhador (velocidade 3, por 1 minuto) com 1mL de tampão TRIS/100mg de amostra. Em seguida foi realizada a precipitação de proteínas pela adição de 12,5mL de acetona com 0,1% de ácido trifluoracético, com a solução mantida em banho de gelo e em agitação por 10 minutos. A solução obtida foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos, a 4°C, para remoção do precipitado. A terceira etapa consistiu em hidrólise ácida, adicionando metanol e HCl, ambos grau HPLC, e mantendo esta solução em banho-maria a 90°C por 2 horas. Após o resfriamento, a solução foi novamente centrifugada a 3700g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro PTFE, acondicionado em vial e encaminhado para análise por CLAE. Com base na metodologia proposta por Paulke, Schubert-Zsilavecz e Wurglics (2006) foi realizada uma complexação pós-coluna com nitrato de alumínio, incluindo uma nova curva-padrão de quercetina (1 a 30ng/mL e 0,4 a 1 ng/mL, padrões com 20% de HCl e 50% de metanol).

4.9 Análise estatística

Todos os testes estatísticos foram realizados empregando-se o programa de computador Statistica versão 98. A estatística descritiva foi feita a partir da classificação dos dados coletados como paramétricos ou não paramétricos. Os dados paramétricos foram descritos como Média $\pm$ Desvio Padrão da média. Para a estatística inferencial, os procedimentos que foram adotados são descritos a seguir, sendo que o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4.9.1. Ensaio de absorção intestinal in situ

Os resultados obtidos foram expressos como Média $\pm$ Desvio Padrão da média. Para comparação entre as médias, foi aplicada ANOVA (One-way ANOVA) seguida do teste pos-hoc Tukey, comparando os tempos de perfusão com o tempo 0.

4.9.2 Análise de flavonóides em tecidos biológicos

A natureza dos resultados aponta para o caráter paramétrico dos mesmos, razão pela qual podem ser expressos como Média $\pm$ Desvio Padrão da média. Do mesmo modo, a análise estatística inferencial adequada é a ANOVA, seguida do teste pos-hoc Tukey.

4.9.3. Testes comportamentais

Todos os parâmetros observados no campo aberto, no labirinto em cruz elevado e na placa perfurada foram classificados como paramétricos, portanto, para comparação das médias dos vários grupos empregou-se a Análise de Variância ANOVA de uma via, seguida de teste de comparação de Tukey (unequal N HSD). Os resultados foram expressos comparando os grupos experimentais com grupos controle, controle positivo e controle negativo.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização de compostos bioativos do quiabo

Na caracterização dos flavonóides de amostras de quiabo liofilizado foi detectado e quantificado o flavonol Rutina (tabela 1) como o único flavonóide presente neste alimento. Com base na análise realizada, a estimativa do conteúdo de rutina do quiabo liofilizado foi de 16mg/100g, em base seca.

Tabela 1. Caracterização dos flavonóides do quiabo liofilizado.

Amostra	Tipo de flavonóide detectado		Quantidade (mg/100g b.s.)	
	Fração metanol	Fração metanol-amônia	Fração metanol	Fração metanol-amônia
Quiabo liofilizado	Rutina	Rutina	13 ± 0,2	3 ± 0,1

b.s. = base seca.

Para efetuar o balanço nutricional das rações experimentais a composição centesimal do quiabo liofilizado foi verificada. Os resultados obtidos podem ser vistos na Tabela 2. A primeira análise realizada foi a determinação da umidade de amostras frescas de quiabo, que resultou em 90%; este resultado foi útil para estimar a quantidade de amostra fresca necessária para obter quantidade suficiente de quiabo liofilizado para elaborar as rações experimentais. As demais determinações, como proteínas, fração lipídica, cinzas, fibras solúveis e insolúveis, assim como a estimativa de carboidratos disponíveis, estão de acordo com os valores expressos em tabelas de composição de alimentos de origem brasileira (TBCA, TACO, 2007).

Isto demonstra que a matéria-prima utilizada nas rações experimentais foi representativa do alimento que é consumido pela população brasileira. A determinação de amido foi realizada para melhor balancear as rações, uma vez que a maior parte do carboidrato fornecido pela ração AIN-93M é proveniente de amido de milho. Por ser um legume, era esperado que o quiabo contivesse quantidade mínima ou nula de amido, como foi encontrado na análise.

No entanto, do total de carboidratos disponíveis neste alimento, obtido pela diferença entre as quantidades de umidade residual, proteínas, lipídeos, cinzas e fibras totais, foi possível verificar que grande parte destes são monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos. Para estimar qual a proporção entre estes diferentes carboidratos, mais especificamente para diferenciar monossacarídeos/dissacarídeos e oligossacarídeos, foi realizada a quantificação de açúcares solúveis, na forma de glicose, sacarose e frutose. Este procedimento resultou em uma estimativa alta de monossacarídeos/dissacarídeos – 30,1g/100g b.s. – e baixa de oligossacarídeos – 2,9g/100g b.s. Assim, foi possível estimar com maior precisão a contribuição do quiabo liofilizado adicionado às rações experimentais e manter a proporção entre o amido dextrinizado, principal fornecedor de oligossacarídeos na ração, e a sacarose, fonte de dissacarídeos.

A adição de vitaminas e sais minerais foi realizada utilizando um mix pré-fabricado (Rhoster Ltda, SP). Sendo assim, as rações acrescidas de quiabo liofilizado tiveram, em sua composição, a quantidade padrão estipulada na AIN-93M de vitaminas e sais minerais além destes nutrientes naturalmente presentes no quiabo liofilizado.

Tabela 2. Composição centesimal do queijo liofilizado.

Componente	Quantidade
Umidade	90% b.u.
Proteínas totais	15,6 ± 0,7 g/100 g b.s.
Gorduras totais	1,9 ± 0,1 g/100 g b.s.
Cinzas	6,2 ± 0,02 g/100 g b.s.
Carboidratos disponíveis	33 ± 0,01 g /100 g b.s.
Amido	Abaixo do limite de detecção
Açúcares solúveis	3,01 g/100 g b.u. ou 30,1g/100g b.s.*
Glicose	0,93 ± 0,04 g/100 g
Frutose	0,9 ± 0,04 g/100 g
Sacarose	1,18 ± 0,05 g/100g
Oligossacarídeos	2,9/100g b.s.
Fibras solúveis	5,2 ± 0,1 g/100 g b.s.
Fibras insolúveis	25,7 ± 0,4 g/100 g b.s.
Umidade residual liofilizado	12,3 ± 0,05% b.s.

b.u. = base úmida; b.s. = base seca.

* Somatória dos açúcares solúveis quantificados.

5.2 Balanço nutricional das rações experimentais

As rações controle e experimentais suplementadas com QL foram calculadas de modo a resultarem em rações de composição centesimal similar quanto às calorias, proteínas, carboidratos, lipídios e fibras. O conteúdo de vitaminas e minerais não pôde ser adaptado à suplementação com QL, pois as misturas de vitaminas e minerais têm formulação fixa e foram adquiridas já prontas (Mix Minerais e Mix Vitaminas, Rhoster Ltda, SP). No entanto, utilizando como base de cálculo uma variação de 10% do conteúdo de minerais e vitaminas, como sugerido para análise da adequação do consumo de nutrientes (DRI, 2002), além da média de conteúdo de vitaminas e minerais do QL obtida em tabela de composição química dos alimentos (USDA), a diferença de quantidade de minerais e vitaminas nas rações suplementadas com QL não excede 10%, quando foram comparadas as rações controle e as rações suplementadas com quiabo. O balanço nutricional das rações pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 3. Balanço nutricional de ração baseada na fórmula AIN-93M, nas versões controle e experimentais, adicionadas de quiabo liofilizado (QL), para administração a camundongos.

Componente	Qtdd/kg	Quiabo Liofilizado 100g	Ração Controle Qtdd/kg	Ração 4,5% de QL Qtdd/kg	Ração 7% de QL Qtdd/kg	Ração 10% de QL Qtdd/kg
Quiabo Liofilizado (g)	--	--	0	45	--	100
Amido de milho (g)	310,7	0	310,7	0	310,7	0
Caseína (g)	140	2,9	140	1,3	138,7	2,9
Amido dextrinizado (g)	155	2,9	155	1,3	153,7	2,9
Sacarose (g)	100	30,1	100	13,5	86,5	21
Óleo de soja (g)	40	0,4	40	0,2	39,8	0,4
Fibras (g)	50	31	50	13,9	36,1	21,7
Mix minerais (g)	35	0	35	0	35	0
Mix vitaminas (g)	10	0	10	0	10	0
L-cistina (g)	1,8	0	1,8	0	1,8	0
Bitartrato de colina (g)	2,5	0	2,5	0	2,5	0
Água Milli-Q (g)	155	0	155	0	155,2	0
TOTAL	1000g	100g	1000g	1000g	1000g	1000g

Qtdd = quantidade. As colunas coloridas mostram a quantidade de quiabo liofilizado (QL) adicionado à ração, para efeito de balanço nutricional.

5.3 Ensaio em ratos de absorção intestinal *in situ*

A figura 14 e a tabela 4 mostram o conteúdo de rutina no perfusato infundido no duodeno de ratos. A concentração de rutina no perfusato teve redução significativa a partir dos 45 minutos de perfusão. Ao final dos 75 minutos observou-se decréscimo da concentração de rutina no perfusato de 15,3% em relação ao seu conteúdo inicial.

Figura 14. Conteúdo de rutina (µg/ml) no perfusato infundido no duodeno de ratos. As colunas representam a média e as barras verticais representam o desvio-padrão da média (n=3). *p<0,05 e **p<0,01, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação ao tempo zero (controle).

Tabela 4. Conteúdo de rutina (µg/ml) no perfusato infundido no duodeno de ratos (n=3).

Tempo de perfusão (minutos)	Conteúdo de rutina (µg/mL)
0	181 ± 18
5	191 ± 6
15	181 ± 8
30	168 ± 16
45	152 ± 12 **
60	160 ± 24 *
75	153 ± 10 **

*p<0,05 e **p<0,01, ANOVA seguida do teste de Tukey, em relação ao tempo zero (controle).

5.4 Análise do peso corporal de camundongos

A análise estatística do peso corporal inicial e final dos camundongos que receberam, por 7, 14 e 21 dias, ração AIN-93M suplementada ou não (grupo controle) com QL em diferentes concentrações não apontou diferenças entre os grupos, como mostrado na Figura 15.

Figura 15. Peso médio corporal (em g), inicial e final, de camundongos que receberam ração AIN-93M suplementada com quiabo liofilizado (QL) a 4,5%, 7% e 10% ou não (controle), por 7, 14 ou 21 dias (d). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões ($p > 0,05$ ANOVA). $n = 10$ por grupo.

Os camundongos foram pesados diariamente, assim como foi programado pesar também as sobras de ração nas caixas-moradia. Entretanto, as sobras foram insignificantes ou nulas, e por esse motivo não foram relatadas. O fato de não serem encontradas sobras, aliado a manutenção do peso dos camundongos, permite concluir que as rações experimentais foram consumidas pelos animais de modo satisfatório.

5.5 Análises do Comportamento de camundongos

5.5.1 Experimento 1: Análise do comportamento de camundongos no Campo Aberto

5.5.1.1 Tratamento dietético por 7 dias

A tabela 5 e a figura 16 (A a H) mostram o número total de quadros percorridos, o número de quadros percorridos nas zonas interna e externa, o tempo despendido nas zonas interna e externa, o tempo em movimento e em imobilidade, o número de levantamentos e o tempo despendido em autolimpesas de camundongos tratados com ração controle e ração suplementada com 4,5; 7 e 10% de QL por 7 dias, com ração suplementada com rutina na concentração 1,2mg/kg/dia por 1 dia e por 7 dias, bem como injetados com pentilenotetrazol (PTZ – 90mg/kg, i.p.) e diazepam (DZP – 1mg/kg, i.p.).

Foram observadas diferenças entre os grupos quando se considerou o tempo total em movimento (ANOVA, $p=0,00000$). O teste de Tukey mostrou redução deste parâmetro provocada pelos tratamentos com pentilenotetrazol e diazepam (tabela 5 e figura 16E). O tratamento dietético com quiabo, independente da concentração, não alterou o tempo de locomoção dos camundongos, sendo significativamente diferente dos grupos tratados com pentilenotetrazol e diazepam. No entanto, o tratamento com ração enriquecida com rutina aumentou significativamente o tempo de locomoção na arena, sendo superior aos tempos observados em camundongos tratados com pentilenotetrazol ou com diazepam. Neste caso, a diminuição da atividade geral e da locomoção resultante da administração de diazepam evidencia seu efeito sedativo. Já a diminuição deste parâmetro provocada pelo pentilenotetrazol se deve ao aumento da ansiedade e da esquiva, o que leva o animal a se locomover menos, numa tentativa de se proteger de perigos. A suplementação dietética com quiabo ou rutina não mostrou efeito sedativo, sendo que a rutina aumentou a atividade geral dos camundongos, quando consumida por 7 dias.

Efeito similar foi obtido no tempo total de imobilidade (ANOVA, $p=0,0000$) - tabela 5, 16F. Assim, os tratamentos com pentilenotetrazol e diazepam diminuíram o tempo de locomoção e aumentaram o tempo de imobilidade; o tratamento com ração rica em rutina diminuiu significativamente o tempo de imobilidade dos camundongos. Evidenciou-se que o aumento da ansiedade (neste caso, via administração de pentilenotetrazol) diminuiu significativamente a atividade locomotora, enquanto sua redução aumentou a atividade locomotora, um efeito que foi observado não só com o uso de diazepam, mas também com o consumo de dieta rica em rutina.

Quanto ao número de quadros percorridos na zona interna, a análise de variância mostrou diferenças significantes entre os grupos, (ANOVA, $p=0,000$) e o teste de Tukey mostrou aumento significativo deste parâmetro em camundongos do grupo suplementado com rutina por 7 dias, em relação aos animais do grupo controle (tabela 5, figura 16A). Este aumento foi similar ao obtido com o tratamento com diazepam e significativamente diferente da diminuição do tempo de permanência neste setor produzida pelo pentilenotetrazol. Considerando que a zona interna é a mais ansiogênica, animais cuja ansiedade foi induzida (pentilenotetrazol) permaneceram por um tempo menor neste setor; animais com redução da ansiedade (diazepam) permaneceram por tempo significativamente maior na zona interna, efeito que foi repetido pela administração de ração enriquecida com rutina por 7 dias. O tempo de permanência na zona externa da arena (tabela 5, figura 16B) não foi afetado pela suplementação dietética com quiabo ou com rutina, embora com o tratamento com rutina por 1 dia tenha sido significativamente menor, em relação ao grupo controle. Este resultado demonstra que os camundongos não só permaneceram mais tempo na zona interna da arena, como se locomoveram mais neste setor, o que corrobora o efeito ansiolítico da suplementação dietética com um alimento rico em rutina ou a própria rutina.

Em relação ao tempo de permanência na zona interna, a análise de variância mostrou diferenças entre os grupos (ANOVA, $p=0,0000$) e o teste de Tukey revelou aumento significativo deste parâmetro em animais de todos os

grupos suplementados com QL, quando comparados com os camundongos dos grupos controle e pentilenotetrazol (tabela 5, figura 16C). O tratamento por 7 dias com ração enriquecida com rutina também provocou aumento do tempo de permanência na zona interna, significativo em relação ao controle e ao pentilenotetrazol, mas similar ao tratamento com diazepam. Isto indica que o efeito da suplementação da dieta com quiabo ou com rutina, por 7 dias, foi similar ao tratamento com diazepam e contrário ao tratamento com pentilenotetrazol, o que evidencia efeito ansiolítico do tratamento dietético. Por outro lado, quanto ao tempo de permanência na zona externa, a análise de variância mostrou diferenças entre os grupos (ANOVA, $p=0,0000$); o teste de Tukey revelou redução significativa desse parâmetro em animais de todos os grupos suplementados com QL e com rutina, quando comparados aos grupos controle, pentilenotetrazol e diazepam (tabela 5, figura 16D). O tratamento com diazepam ou com pentilenotetrazol não foi capaz de alterar este parâmetro, mas o tratamento dietético sim. A zona externa é considerada a zona menos ansiogênica da arena, portanto, camundongos com diminuição da ansiedade tendem a permanecer menos tempo neste setor e mais tempo na zona interna, como foi observado mediante o tratamento dietético.

Na figura 16G pode ser observado o número de levantamentos exibidos pelos camundongos expostos por 7 dias a diferentes concentrações de QL e de rutina na ração. A análise de variância revelou diferenças entre os grupos (ANOVA, $p=0,0007$). O tratamento com diazepam diminuiu significativamente o número de levantamentos em relação ao controle; os tratamentos com ração controle e ração com QL na concentração 4,5% aumentaram significativamente a frequência deste comportamento quando comparados ao grupo tratado com diazepam. O tratamento com rutina, por 1 ou 7 dias, não provocou alteração no número de levantamentos exibidos pelos camundongos. O levantamento é um comportamento de avaliação de risco com o animal protegido; o aumento da ansiedade tende a diminuir toda a avaliação de risco ou restringi-la a avaliação protegida, como o levantamento. Neste caso, o tratamento ansiogênico com pentilenotetrazol provocou diminuição, embora não

significativa, deste parâmetro. O tratamento com diazepam, por outro lado, provocou diminuição dos levantamentos por seu efeito sedativo. O fato do tratamento com flavonóide na ração não ter reduzido este comportamento evidencia que não há efeito sedativo resultante do tratamento dietético.

A figura 16H ilustra o tempo despendido em auto-limpeza exibido pelos animais com e sem tratamento dietético com ração rica em quiabo ou rutina, ou tratados com pentilenotetrazol e diazepam. A análise de variância não foi capaz de detectar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA, $p=0,09$). Assim, os tratamentos com ração controle, ração suplementada com 4,5; 7 e 10% de QL, ração suplementada com rutina e a administração de pentilenotetrazol e diazepam não alteraram o tempo gasto por camundongos em auto-limpeza na arena do campo aberto.

Tabela 5. Comportamento no campo aberto de camundongos tratados com ração AIN-93M suplementada ou não (controle) com 4,5; 7 e 10% de quibao liofilizado (QL) por 7 dias, suplementada com rutina (RT – 1,2mg/kg/dia) por 1 e 7 dias, bem como de camundongos injetados, por via i.p., com pentilenotetrazol (PTZ - 90mg/kg) e diazepam (DZP - 1mg/kg).

Parâmetro	Área da arena	Controle (n=5)	Ração 4,5% (n=10)	Ração 7% (n=10)	Ração 10% (n=10)	Ração RT 1 dia (n=5)	Ração RT 7 dias (n=5)	PTZ (n=5)	DZP (n=5)
Número de quadros percorridos	Zona interna	4,6 ± 1,1°	8,6 ± 2,4**	8,7 ± 2,0**	9,1 ± 3,2**	4,2 ± 1,9°	12,2 ± 2,7***	2,6 ± 0,54°	11,8 ± 1,9**
	Zona externa	157,4 ± 5,4	129,4 ± 13,4*	118,1 ± 28**	145,4 ± 35,6	102,4 ± 23,3*	152 ± 21,6***	117,2 ± 3,8°	147,2 ± 7,4***
Tempo de permanência (s)	Zona interna	4,6 ± 1,1	14 ± 3,3***	25 ± 4,2***	12,0 ± 3,9**	2,9 ± 1,4°	7,4 ± 1,1	2,8 ± 0,8	6,2 ± 1,5
	Zona externa	270,8 ± 4,9	236 ± 11***	223 ± 5***	230 ± 8,5***	241,8 ± 21,3*	221 ± 13,3***	264 ± 6,8	265,6 ± 6,3
Tempo em movimento (s)	Total	265 ± 6,3***	269,5 ± 6***	269 ± 5,5***	270,5 ± 6***	292 ± 4,5***	286 ± 3***	223,6 ± 12***	134,4 ± 12***
Tempo em imobilidade (s)	Total	34,8 ± 6,3***	30,5 ± 6,2***	29,7 ± 4,9***	29,5 ± 5,9***	8,2 ± 4,5***	13,8 ± 3***	76,4 ± 12***	165,6 ± 12***
Número de levantamentos	Total	54,4 ± 6,7°	58,5 ± 9,8°	50,8 ± 13	44,8 ± 11,3	53,6 ± 8,4	50,4 ± 5,7	39,6 ± 11,8	32,4 ± 5,7*
Tempo de limpeza (s)	Total	3,2 ± 2,0	2,7 ± 0,9	5,9 ± 1,4	6,5 ± 4,2	7 ± 1	8,4 ± 1,1	4,40 ± 2,8	3,40 ± 0,9

Dados expressos como média ± DP, n= número de animais por grupo; s= segundos (*p<0,05 e **p<0,01 em relação ao controle; °p<0,05 e **p<0,01 em relação ao DZP)

Figura 16. A a H. Parâmetros de comportamento exibidos no campo aberto por camundongos tratados com ração AIN-93M suplementada ou não (controle) com 4,5; 7 e 10% de quaiabo liofilizado (QL) por 7 dias, com ração suplementada com rutina (RT-1,2mg/kg/dia) por 1 dia e 7 dias, bem como injetados, por via i.p., com pentilenotetrazol (PTZ-90mg/kg) e diazepam (DZP-1mg/kg). Dados expressos como média $\pm$ DP e analisados por ANOVA seguida do teste de Tukey; $n=10$ por grupo, exceto os grupos controle, RT, PTZ e DZP ($n=5$). A significância está representada por: * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ em relação ao controle; * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ em relação ao DZP.

5.5.1.2 Tratamento dietético por 14 dias

A tabela 6 e a figura 17 (A a H) mostram o número total de quadros percorridos, o número de quadros percorridos nas zonas interna e externa, o tempo despendido nas zonas interna e externa, o tempo em movimento e em imobilidade, o número de levantamentos e o tempo despendido em autolimpesas de camundongos tratados com ração controle e ração suplementada QL nas concentrações de 4,5; 7 e 10% por 14 dias, bem como animais injetados com pentilenotetrazol (PTZ - 90mg/kg) e diazepam (DZP - 1mg/kg).

A análise de variância (ANOVA, $p=0,0000$), seguida do teste Tukey, apontou que a suplementação alimentar com QL foi capaz de aumentar significativamente o número de quadros percorridos na zona interna da arena do campo aberto dos animais do grupo que recebeu a ração na concentração de 10% de QL, em relação ao controle (figura 17A). O tratamento com diazepam aumentou significativamente o número de quadros percorridos neste setor da arena; o tratamento com diferentes concentrações de quiabo na dieta teve efeito semelhante ao diazepam, e significativamente maior que o efeito resultante do tratamento com pentilenotetrazol, o que indica efeito ansiolítico da suplementação dietética com quiabo.

No parâmetro número de quadros percorridos na zona externa (figura 17B), observaram-se alterações significativas entre os grupos (ANOVA, $p=0,0001$); o grupo tratado com ração acrescida de 10% de QL percorreu um número menor de quadros, quando comparado com o grupo controle e com o grupo tratado com pentilenotetrazol. Os tratamentos com pentilenotetrazol e diazepam não alteraram este parâmetro. A suplementação da ração com 4,5% de quiabo por 14 dias aumentou significamente o número de quadros percorridos na zona interna e reduziu na zona externa, mostrando efeito ansiolítico mais evidente que o resultante do tratamento com diazepam.

O tempo de permanência na zona interna do campo aberto diferiu entre os grupos, (figura 17C; ANOVA, $p=0,0000$], sendo observado aumento deste parâmetro nos animais do grupo tratado com 10% de QL, quando comparado

ao controle. Os tratamentos com pentilenotetrazol e diazepam não foram capazes de alterar significativamente este parâmetro, quando comparados ao controle. O aumento da ansiedade provocado pelo uso de pentilenotetrazol diminuiu o tempo de permanência na zona interna, como era esperado. No entanto, o tratamento ansiolítico, instituído com diazepam, não foi capaz de aumentar o tempo dos camundongos neste setor, o que o tratamento com ração acrescida de quiabo na concentração 10% por 14 dias realizou de maneira significativa. Neste sentido, pode-se afirmar que o efeito ansiolítico da suplementação dietética foi maior que o efeito do diazepam.

A figura 17D expressa os resultados obtidos em relação ao tempo de permanência dos camundongos na zona externa da arena do campo aberto. A análise de variância apontou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA, $p=0,0000$). Os grupos tratado com 7 e 10% de quiabo na dieta permaneceram significativamente menor tempo neste setor do que os animais dos grupos controle, pentilenotetrazol e diazepam. Como já citado, este resultado evidencia o efeito ansiolítico da suplementação dietética realizada neste estudo.

A análise de variância (ANOVA, $p=0,0000$) seguida do teste de Tukey mostraram que o tempo despendido pelos camundongos em movimentação pela arena do campo aberto não foi alterado pelo consumo de ração rica em quiabo em relação ao grupo controle, mas sim em comparação aos grupos tratados com pentilenotetrazol e diazepam, como ilustrado na figura 17E. Os tratamentos com pentilenotetrazol e com diazepam diminuíram significativamente o tempo de locomoção em relação ao controle. Esta análise foi útil para esclarecer que a ração enriquecida com quiabo, independente da concentração, não mostrou efeitos sedativos.

O tempo de imobilidade dos camundongos (figura 17F), da mesma maneira, não foi afetado pelas variações no conteúdo de flavonóides nas diferentes rações experimentais, mas sim foi significativamente aumentado pelos tratamentos com pentilenotetrazol e diazepam, como apontado pela análise de variância (ANOVA, $p=0,0000$), seguida pelo teste de Tukey. Assim, pode-se

inferir que a suplementação dietética não foi capaz de aumentar o tempo de imobilidade dos camundongos, seja por aumento da ansiedade, seja por sedação.

Quanto ao número de levantamentos observados na arena do campo aberto (figura 17G), a análise de variância empregada detectou diferenças significantes entre os grupos estudados (ANOVA, $p=0,0080$). Notou-se que nenhum dos grupos experimentais alterou o número de levantamentos em relação ao controle, mas o grupo que recebeu dieta suplementada com 4,5% de quiabo aumentou significativamente o número de levantamentos em comparação com o grupo tratado com diazepam. Novamente, o tratamento com ração suplementada com quiabo não alterou a avaliação de risco protegida de camundongos.

O tempo gasto pelos camundongos com auto-limpeza não foi alterado pela administração de ração rica em quiabo, nem pelos tratamentos com pentilenotetrazol e diazepam (ANOVA, $p=0,0855$).

Tabela 6. Comportamento no campo aberto de camundongos tratados com ração AIN-93M suplementada ou não (controle) com 4,5; 7 e 10% de quiabo liofilizado (QL) por 14 dias, bem como de camundongos injetados, por via i.p., com pentilenotetrazol (PTZ - 90mg/kg) e diazepam (DZP - 1mg/kg).

Parâmetro	Área da arena	Controle (n=5)	Ração 4,5% (n=10)	Ração 7% (n=10)	Ração 10% (n=10)	PTZ (n=5)	DZP (n=5)
Número de quadros percorridos	Zona interna	6,6 ± 0,8°	8,1 ± 3,4°	8,8 ± 2,5**	11, ± 3,3***	2,6 ± 0,5°°	11,8 ± 1,9***
	Zona externa	162,8 ± 9,5	140,7 ± 13,5	133,9 ± 28,9	111 ± 34,8**	117,2 ± 3,8	147,2 ± 7,4
Tempo de permanência (s)	Zona interna	6,4 ± 0,5	13,3 ± 3,0	16,2 ± 5,5°	23 ± 5,8***°°	2,8 ± 0,8	6,20 ± 1,5
	Zona externa	269 ± 4,1	243,6 ± 8,8	230 ± 20***°°	220 ± 17***°°°	264 ± 6,8	265,6 ± 6,3
Tempo em movimento (s)	Total	271 ± 3,0***°°	265 ± 5,2***°°	271 ± 12***°°	273 ± 6,2***°°	224 ± 12***°°	134 ± 12***°°
Tempo de imobilidade (s)	Total	29,2 ± 3***°°	35 ± 5,2***°°	29 ± 11,9***°°	27 ± 6,2***°°	76 ± 1,8***°°	165 ± 12***°°
Número de levantamentos	Total	52,2 ± 4,2	60 ± 11,9°	43,3 ± 12,9	49,5 ± 12,3	39,6 ± 11,8	32,4 ± 5,7
Tempo de limpeza (s)	Total	8,0 ± 2,0	6,1 ± 2,1	4,9 ± 2,3	5,6 ± 3,4	4,40 ± 2,8	3,40 ± 0,9

Dados expressos como média ± DP, n= número de animais por grupo, s= segundos (*p<0,05 e **p<0,01 em relação ao controle; °p<0,05 e °°p<0,01 em relação ao PTZ e °°°p<0,05 e °°°°p<0,01 em relação ao DZP).

Figura 17. Parâmetros de comportamento exibidos no campo aberto por camundongos tratados com ração AIN-93M suplementada ou não (controle) com 4,5; 7 e 10% de quiabo liofilizado (QL) por 14 dias, bem como injetados, por via i.p., com pentilenotetrazol (PTZ – 90mg/kg) e diazepam (DZP – 1mg/kg). Dados expressos como média $\pm$ DP e analisados por ANOVA seguida do teste de Tukey; n=10 por grupo exceto os grupos controle, PTZ e DZP (n=5). A significância está representada por: *p<0,05 e **p<0,01 em relação ao controle; °p<0,05 e °°p<0,01 em relação ao PTZ e °p<0,05 e °°p<0,01 em relação ao DZP.

5.5.1.3 Tratamento dietético por 21 dias

A tabela 7 e a figura 18 (A a H) mostram o número total de quadros percorridos, o número de quadros percorridos nas zonas interna e externa, o tempo despendido nas zonas interna e externa, o tempo em movimento e em imobilidade, o número de levantamentos e o tempo despendido em autolimpesas de camundongos tratados com ração controle e ração suplementada QL nas concentrações de 4,5; 7 e 10% por 21 dias, bem como de animais injetados com pentilenotetrazol (PTZ - 90mg/kg) e diazepam (DZP - 1mg/kg).

A análise de variância revelou diferenças estatisticamente significantes no número de quadros percorridos na zona interna da arena do campo aberto entre os grupos (ANOVA, $p=0,0000$). O teste Tukey apontou que os grupos tratados com ração suplementada com 10% de quiabo e com diazepam aumentaram de modo similar e significativo o número de quadros percorridos na zona interna. Em contrapartida, o tratamento com pentilenotetrazol provocou diminuição significativa deste parâmetro. Todos os grupos tratados com ração rica em quiabo percorreram significativamente mais quadros na zona interna do que os camundongos tratados com pentilenotetrazol (figura 18A). Portanto, o efeito da suplementação dietética, neste parâmetro, foi similar ao tratamento com diazepam e antagônico ao tratamento com pentilenotetrazol, o que contribui para a conclusão de que a suplementação dietética com quiabo tenha efeito ansiolítico.

Também ocorreram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados quando se observou o número de quadros percorridos na zona externa (ANOVA, $p=0,0000$) (figura 18B). Em relação ao controle, os grupos tratados com 4,5% e 10% apresentaram redução significativa do tempo na zona externa, de modo mais evidente do que o tratamento com diazepam. Os tratamentos com pentilenotetrazol e diazepam não alteraram significativamente este parâmetro. Este resultado demonstra que, embora os camundongos mostrassem condições de percorrer qualquer setor da arena e não estivessem sedados, os animais tratados com quiabo nas concentrações

4,5 e 10%, por 21 dias escolheram se locomover menos na zona externa, o que corrobora o efeito ansiolítico já visto em outros parâmetros.

O tempo de permanência na zona interna da arena do campo aberto sofreu influência significativa dos tratamentos experimentais efetuados (ANOVA, $p=0,0000$). Assim, foi possível observar que camundongos tratados com ração suplementada com a maior concentração de quiabo permaneceram por tempo significativamente maior na zona interna do que os camundongos controle (figura 18C). Os tratamentos com pentilenotetrazol e diazepam não foram capazes de modificar este parâmetro. Como já observado nos tratamentos com ração suplementada com quiabo por 7 e 14 dias, o tratamento por 21 dias também foi mais eficaz no aumento da capacidade de um camundongo permanecer em um setor ansiogênico da arena que o tratamento medicamentoso a base de diazepam.

A figura 18D mostra o tempo de permanência na zona externa da arena do campo aberto; a análise de variância feita com esses dados mostrou diferenças entre os grupos (ANOVA, $p=0,0000$). Quando aplicado o teste Tukey, foi possível perceber que os grupos tratados com concentrações de 4,5% e 10% de quiabo na ração permaneceram significativamente menos tempo na zona externa, quando comparados com o controle. Em relação ao grupo tratado com pentilenotetrazol, observou-se redução desse parâmetro nos grupos 4,5 e 10% de QL. Em relação ao grupo diazepam, observou-se também redução desse parâmetro em todas as concentrações de QL empregadas.

O parâmetro tempo de locomoção na arena do campo aberto não foi afetado pelo tratamento com ração suplementada com QL, mas sim pelos tratamentos com pentilenotetrazol e diazepam (ANOVA, $p=0,0000$, figura 18E). Ambos os tratamentos medicamentosos reduziram significativamente o tempo de locomoção na arena do campo aberto, em relação ao controle. O tempo de imobilidade também não foi afetado pelo tratamento dietético com quiabo, mas sim pelos medicamentos pentilenotetrazol e diazepam, em comparação com o controle (ANOVA, $p=0,0000$, figura 18F). No primeiro parâmetro, o tratamento dietético foi capaz de aumentar significativamente o tempo de loco-

moção, em comparação com os grupos tratados com pentilenotetrazol e diazepam, enquanto no segundo parâmetro, isto é, o tempo de imobilidade, observou-se efeito oposto.

O número de levantamentos na arena do campo aberto foi significativamente alterado pelos tratamentos realizados (ANOVA, $p=0,0000$), como pode ser observado na figura 18G. Os grupos que consumiram ração suplementada com 4,5 e 7% de quiabo tiveram aumento significativo do número de levantamentos. Os tratamentos com pentilenotetrazol e diazepam não alteram o padrão de levantamentos observado, exceto o grupo 4,5% de QL no qual observou-se um aumento desta avaliação de risco protegida em relação ao grupo diazepam.

A análise de variância do tempo gasto em auto-limpeza dos camundongos demonstrou que não houve modificação mediante o consumo de ração com e sem quiabo, tratamentos com pentilenotetrazol e diazepam (ANOVA, $p=0,235$, figura 18H).

Tabela 7. Comportamento no campo aberto de camundongos tratados com ração AIN-93M suplementada ou não (controle) com 4,5; 7 e 10% de quiabo liofilizado (QL) por 21 dias, bem como de camundongos injetados, por via i.p., com pentilenotetrazol (PTZ - 90mg/kg) e diazepam (DZP - 1mg/kg).

Parâmetro	Área da arena	Controle (n=5)	Ração 4,5% (n=10)	Ração 7% (n=10)	Ração 10% (n=10)	PTZ (n=5)	DZP (n=5)
Número de quadros percorridos	Zona interna	6,8 ± 2,3*	10,8 ± 1,5**	7,0 ± 3,2*	15 ± 1,6***	2,6 ± 0,5	11,8 ± 1,9**
	Zona externa	157,2 ± 30,3	117,7 ± 16**	143,7 ± 24,3	118 ± 17,8**	117,2 ± 3,8	147,2 ± 7,4
Tempo de permanência (s)	Zona interna	6,4 ± 1,8	14,0 ± 1,5	15,5 ± 4,9	35,8 ± 6***	2,8 ± 0,8	6,20 ± 1,5
	Zona externa	263,8 ± 10,4	236,6 ± 8**	239 ± 18,4°	210 ± 16***	264 ± 6,8	265,6 ± 6,3
Tempo em movimento (s)	Total	276,6 ± 5***	265 ± 17***	270,8 ± 7***	268 ± 16***	223,6 ± 12°	134 ± 11,9**
Tempo em imobilidade (s)	Total	24,8 ± 5***	28,4 ± 5***	29 ± 7,3***	31,8 ± 16***	76 ± 11,8***	166 ± 12***
Número de levantamentos	Total	31,0 ± 8,9	57,6 ± 10***	50,5 ± 8,6*	39,6 ± 11,1	39,6 ± 11,8	32,4 ± 5,7
Tempo de limpeza (s)	Total	5,6 ± 3,6	5,9 ± 1,6	3,7 ± 2,4	5,2 ± 2,4	4,40 ± 2,8	3,40 ± 0,9

Dados expressos como média ± DP, n= número de animais por grupo, s=segundos (*p<0,05 e **p<0,01 em relação ao controle; °p<0,05 e ***p<0,01 em relação ao PTZ e °p<0,05 e °°p<0,01 em relação ao DZP).

Figura 18. Parâmetros de comportamento exibidos no campo aberto por camundongos tratados ou não (controle) com ração AIN-93M suplementada com 4,5; 7 e 10% de QL por 21 dias, bem como injetados, por via i.p., com pentilenotetrazol (PTZ) e diazepam (DZP). Dados expressos como média $\pm$ DP e analisados por ANOVA seguida do teste de Tukey; $n=10$ por grupo, exceto os grupos controle, PTZ e DZP ($n=5$). A significância está representada por: * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ em relação ao controle; ° $p<0,05$ e °° $p<0,01$ em relação ao PTZ e ° $p<0,05$ e °° $p<0,01$ em relação ao DZP.

5.5.2 Experimento 2: Análise do comportamento de camundongos no Labirinto em Cruz Elevado

5.5.2.1 Tratamento dietético por 7 dias

A tabela 8 e a figura 19 (A a I) mostram o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados, o tempo de permanência na zona externa do braço aberto, o número de levantamentos, mergulhos, estiramentos e auto-limpezas de camundongos tratados com ração controle e ração suplementada QL nas concentrações 4,5; 7 e 10% por 7 dias, com ração suplementada com rutina na concentração 1,2mg/kg/dia por 1 dia e por 7 dias, bem como daqueles injetados com pentilenotetrazol (PTZ) e diazepam (DZP).

A análise de variância mostrou diferenças entre os grupos no que se refere ao tempo de permanência nos braços abertos do LCE (ANOVA, $p=0,0000$) (figura 19A). O teste Tukey apontou que o grupo tratado com ração acrescida de 10% de QL promoveu aumento significativo deste parâmetro, quando comparado com os dados do grupo controle. De forma similar, o tratamento com diazepam também promoveu aumento significativo do tempo de permanência nos braços abertos, como era esperado de um medicamento ansiolítico como este. O tratamento com pentilenotetrazol diminuiu significativamente este parâmetro, quando comparado ao grupo diazepam. O tratamento com ração suplementada com rutina aumentou significativamente o tempo de permanência nos braços abertos em ambos os tempos de tratamento, 1 e 7 dias, em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com pentilenotetrazol. Uma vez que o aumento do tempo de permanência nos ambientes mais expostos do labirinto é indicativo de diminuição da ansiedade, pode-se afirmar que os tratamentos com 10% de quiabo na ração e com rutina por 1 e 7 dias mostraram efeito ansiolítico similar ao efeito do diazepam e significativamente contrário ao efeito do pentilenotetrazol.

O tempo de permanência nos braços fechados, assim como visto nos braços abertos, foi significativamente afetado pelos tratamentos efetuados

(ANOVA, $p=0,0000$) (figura 19B). Foi observado aumento do tempo de permanência nos braços fechados pelos camundongos que receberam ração com 7% de quiabo, pentilenotetrazol e diazepam, em relação ao controle, o que pode indicar efeito ansiogênico. Os tratamentos com ração acrescida de quiabo na concentração 4,5% e 10% reduziram significativamente este parâmetro, quando comparados aos grupos tratados com pentilenotetrazol e diazepam. O tratamento com rotina por 7 dias reduziu significativamente este parâmetro, sugerindo efeito ansiolítico.

O tempo de permanência na zona externa do braço aberto foi afetado de modo significativo pelos tratamentos dietético e medicamentoso (ANOVA, $p=0,0000$). Todos os grupos tratados com ração suplementada com quiabo mostraram significativo aumento de tempo de permanência neste setor do labirinto em cruz elevado, em relação ao controle (figura 19C). O tratamento com pentilenotetrazol aboliu completamente a permanência dos camundongos na zona externa dos braços abertos; o tratamento com diazepam provocou aumento significativo deste parâmetro, em relação ao controle e ao tratamento com pentilenotetrazol. Os efeitos produzidos pelo consumo de ração suplementada com quiabo em diferentes concentrações e com rotina, por 1 e 7 dias, foram semelhantes ou até significativamente maiores que o efeito produzido pelo tratamento com diazepam.

A análise de variância seguida de teste *pos hoc* mostrou aumento no número de entradas nos braços abertos produzido pelo consumo de ração suplementada com quiabo e com rotina por 7 dias ($p=0,0000$) (figura 19D). Com exceção do grupo que recebeu ração suplementada com 4,5% de quiabo liofilizado, os demais grupos tratados com suplementação dietética com quiabo aumentaram de maneira significativa o número de entradas em relação ao controle, assim como o grupo tratado com rotina por 7 dias. De maneira similar, o tratamento com diazepam também aumentou o número de entradas nos braços abertos, em comparação com o controle. O tratamento com pentilenotetrazol provocou uma diminuição significativa da entrada nos braços abertos, quando comparado com o tratamento com diazepam (figura 19D).

O número de entradas nos braços fechados foi aumentado pelo tratamento com pentilenotetrazol, em relação ao controle (ANOVA, $p=0,0001$) (figura 19E). O tratamento com diazepam não alterou este parâmetro, assim como o tratamento dietético com quiabo em diferentes concentrações foi capaz de manter os mesmos níveis deste parâmetro exibidos por camundongos controle, significativamente menores que o número de entradas realizado por animais que foram tratados com pentilenotetrazol. Especificamente, o pentilenotetrazol, como agente ansiogênico, aumenta o tempo de permanência nos braços fechados mas não provoca efeito sedativo, o que justifica o aumento do número de entradas nos braços fechados observado neste estudo.

O número de levantamentos exibidos pelos camundongos foi significativamente aumentado nos grupos que consumiram ração acrescida de 4,5% de quiabo liofilizado (ANOVA, $p=0,0000$, seguida de Tukey, $p<0,01$) (figura 19F), em comparação com o grupo controle. Os demais tratamentos dietéticos, inclusive a suplementação com rutina, não surtiram efeito algum neste parâmetro, do mesmo modo que os tratamentos com pentilenotetrazol e diazepam.

Mediante análise de variância, o número de mergulhos observados no labirinto em cruz elevado foi significativamente alterado pelos tratamentos instituídos neste experimento (ANOVA, $p=0,0000$) (figura 19G). O grupo tratado com pentilenotetrazol diminuiu significativamente o número de mergulhos, em relação ao controle; o tratamento com diazepam aumentou significativamente o número de mergulhos, em comparação ao efeito obtido pelo tratamento com pentilenotetrazol, de modo semelhante aos grupos tratados com ração suplementada com quiabo e com rutina por 7 dias. Este é um parâmetro que aumenta em relação direta com a diminuição da ansiedade. Deste modo, foi possível perceber que a suplementação dietética com quiabo e com rutina aumentou a frequência da avaliação de risco desprotegida dos camundongos.

A figura 19H ilustra o aumento significativo observado no número de estiramentos entre os grupos controle e tratados (ANOVA, $p=0,0000$, seguida de Tukey, $p<0,01$). O tratamento com pentilenotetrazol aumentou significati-

vamente o número de estiramentos em relação ao controle e ao tratamento com diazepam, que por sua vez diminuiu significativamente este parâmetro. Os grupos em tratamento com ração adicionada de quiabo e rutina por 7 dias mostraram aumento do número de estiramentos em relação ao tratamento com diazepam, e similar ao exibido por animais tratados com pentilenotetrazol. Isto indica que a suplementação dietética com quiabo e rutina, por 7 dias, aumentou a exibição do comportamento de avaliação de risco protegida dos camundongos.

O tempo gasto pelos camundongos em auto-limpeza de acordo com os tratamentos a que foram submetidos foi apontado como diferente pela análise de variância (ANOVA, $p=0,011$). O consumo de ração suplementada com quiabo e com rutina não alterou este parâmetro. O tratamento com pentilenotetrazol aumentou o tempo de auto-limpeza quando comparado ao grupo tratado com diazepam; o tratamento com diazepam diminuiu o tempo de auto-limpeza quando comparado grupo tratado com pentilenotetrazol (figura 19I).

Tabela 8. Comportamento no labirinto em cruz elevado de camundongos tratados com ração AIN-93M suplementada ou não (controle) com 4,5; 7 e 10% de quibo liofilizado (QL) por 7 dias, ração suplementada com rutina na concentração 1,2mg/kg (RT-1 e 7 dias), bem como de camundongos injetados, por via i.p., com pentilenotetrazol (PTZ - 90mg/kg) e diazepam (DZP - 1mg/kg).

Parâmetro	Área da arena	Controle (n=5)	Ração 4,5% (n=10)	Ração 7% (n=10)	Ração 10% (n=10)	Ração RT 1 dia (n=5)	Ração RT 7 dias (n=5)	PTZ (n=5)	DZP (n=5)
Tempo de permanência (s)	Braços abertos	65,4 ± 5,9***	81,8 ± 9,9°	92,7 ± 20,5***	123,4 ± 23***	124 ± 30,3***	152,6 ± 6,4***	35 ± 5,6°	100,6 ± 29,5***
	Braços fechados	144,2 ± 11***	136,3 ± 8,0***	191,7 ± 21***	120,9 ± 24***	119,8 ± 25,6***	76,6 ± 9,3***	239,8 ± 12,9***	150,3 ± 37***
Número de entradas	Braços abertos	2,6 ± 1,5°	7,7 ± 1,8	13,4 ± 2,9***	14,6 ± 4,5**	7,4 ± 2,3	13 ± 2,4***	2,4 ± 0,5°	11,74 ± 5,4***
	Braços fechados	9,6 ± 4,7**	11,7 ± 3,3	8,60 ± 2,1**	10,7 ± 3,1*	8,4 ± 3,5**	7,2 ± 0,83**	17,8 ± 2,4**	10,7 ± 3,4
Tempo de permanência (s)	Zona externa do Braço aberto	3,0 ± 1,0°	23,6 ± 3,3***	31,8 ± 12**	49,2 ± 7,6°	61,2 ± 15,8***	73,2 ± 11,7***	0 ± 0°	38,4 ± 22,4***
Número de levantamentos	Total	13,0 ± 2,8	31,0 ± 6,0***	17,0 ± 8,1	12,2 ± 4,4	16 ± 5,9	13,8 ± 2,2	13,8 ± 5,9	18,6 ± 9
Número de mergulhos	Total	42,8 ± 3,2**	56,2 ± 5,4**	43,0 ± 14,9**	61,5 ± 13,8**	37,8 ± 11,1	63,4 ± 2,1**	10 ± 1,6***	46 ± 16,6**
Número de estiramentos	Total	43,6 ± 5,0	59,5 ± 6,1°	51,1 ± 14,4°	68,2 ± 17,1°	43,4 ± 4,5	56,6 ± 7,8°	46,2 ± 9°	18,8 ± 2,6***
Tempo de limpeza (s)	Total	1,4 ± 0,5	2,70 ± 1,1	2,60 ± 2,3	1,8 ± 1,4	2,2 ± 0,84	3,4 ± 0,54	3,4 ± 1,1	2 ± 1,3

Dados expressos como média ± DP, n= número de animais por grupo, s= segundos (*p<0,05 e **p<0,01 em relação ao controle; ° p<0,05 e °° p<0,01 em relação ao PTZ e °°° p<0,05 e °°°° p<0,01 em relação em DZP).

Figura 19. A a I. Parâmetros de comportamento exibidos no labirinto em cruz elevado por camundongos tratados com ração AIN-93M suplementada ou não (controle) com 4,5; 7 e 10% de quibao liofilizado (QL) por 7 dias, com ração suplementada com rutina (RT-1,2mg/kg/dia) por 1 dia e 7 dias, bem como injetados, por via i.p., com pentilenotetrazol (PTZ-90mg/kg) e diazepam (DZP-1mg/kg). Dados expressos como média $\pm$ DP e analisados por ANOVA seguida do teste de Tukey; n=10 por grupo, exceto os grupos controle, RT, PTZ e DZP (n=5). A significância está representada por: *p<0,05 e **p<0,01 em relação ao controle; °p<0,05 e °°p<0,01 em relação ao PTZ e °°°p<0,01 em relação ao DZP.

5.5.2.2 Tratamento dietético por 14 dias

A tabela 09 e a figura 20 (A a H) mostram o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados, o tempo de permanência na zona externa do braço aberto, o número de levantamentos, mergulhos, estiramentos e auto-limpezas de camundongos tratados com ração controle e ração suplementada com quiabo liofilizado (QL) nas doses 4,5, 7 e 10% por 14 dias, pentilenotetrazol (PTZ) e diazepam (DZP) no labirinto em cruz elevado.

A figura 20A mostra o tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, que foi alterado pelos tratamentos realizados (ANOVA, $p=0,0000$). Nota-se um aumento significativo no tempo de permanência nos braços abertos exibido pelos camundongos que consumiram rações suplementadas com 4,5% e 10% de quiabo. O tratamento com pentilenotetrazol diminuiu significativamente o tempo despendido nos braços abertos, enquanto que o diazepam aumentou este parâmetro, à semelhança do efeito que foi observado com o tratamento dietético.

O tempo de permanência nos braços fechados, por outro lado, foi significativamente alterado pelos tratamentos aos quais os camundongos foram submetidos (ANOVA, $p=0,0000$). Todas as concentrações de quiabo na ração foram capazes de diminuir o tempo gasto nos braços fechados do labirinto em cruz elevado de modo muito significativo em relação ao controle, ao grupo tratado com diazepam e ao grupo tratado com pentilenotetrazol, como pode ser observado na figura 20B. O tratamento com pentilenotetrazol aumentou significativamente o tempo de permanência nos braços fechados, quando comparado ao diazepam; este último diminuiu significativamente o tempo de permanência neste setor do labirinto em cruz elevado, quando comparado ao pentilenotetrazol.

Todos os grupos de animais que receberam ração acrescida de quiabo, independente da concentração, mostraram aumento significativo do tempo de permanência na zona externa dos braços abertos do labirinto em cruz eleva-

do (ANOVA, $p=0,0000$). Quando comparados, os grupos tratados com ração rica em quiabo mostraram aumento significativo em relação ao controle. O tratamento com diazepam provocou aumento significativo deste parâmetro quando comparado ao grupo tratado com pentilenotetrazol. Como pode ser observado na figura 20C, o aumento provocado pelo tratamento dietético é significativamente maior que o aumento provocado pelo diazepam.

O número de entradas nos braços abertos foi afetado pelo tratamento alimentar de modo significativo, como aponta a análise de variância realizada (ANOVA, $p=0,0000$). O teste Tukey indicou que todos os grupos suplementados com quiabo entraram significativamente mais vezes nos braços abertos do que o grupo controle. O grupo que foi tratado com diazepam também mostrou aumento significativo neste parâmetro. Por outro lado, o tratamento com pentilenotetrazol diminuiu significativamente o número de entradas nos braços abertos, em comparação com o grupo tratado com diazepam e os grupos tratados com ração suplementada com quiabo (figura 20D).

O número de entradas nos braços fechados exibido pelos grupos experimentais foi influenciado pelo tratamento (ANOVA, $p=0,0000$). A administração de pentilenotetrazol foi capaz de aumentar significativamente este parâmetro, em comparação com o controle; o tratamento com diazepam ou com ração acrescida de quiabo, independente da concentração, diminuiu o número de entradas nos braços fechados (figura 20E).

O número de estiramentos exibidos pelos camundongos neste estudo foi significativamente afetado pelo tratamento efetuado (ANOVA, $p=0,0000$), como ilustrado na figura 20F. Mais especificamente, o tratamento com pentilenotetrazol aumentou o número de estiramentos em relação ao tratamento com diazepam; o tratamento com diazepam diminuiu este parâmetro em relação ao tratamento com pentilenotetrazol. Os grupos tratados com ração suplementada com 7% e 10% de quiabo aumentaram significativamente o número de estiramentos, quando seus efeitos foram comparados aos efeitos do diazepam.

No parâmetro número de levantamentos, foram notadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais (ANOVA, $p=0,0000$), como mostra a figura 20G. O grupo tratado com ração na concentração de 4,5% de quiabo aumentou significativamente o número de levantamentos quando comparado aos tratamentos controle, pentilenotetrazol e diazepam. Os grupos tratados com 7% e 10% de adição de quiabo à ração diminuíram este parâmetro, em comparação com o tratamento com diazepam.

A figura 20H demonstra o número de mergulhos exibidos pelos camundongos durante o período de teste no labirinto em cruz elevado. O tratamento dietético com ração rica em quiabo provocou alterações neste parâmetro (ANOVA, $p=0,0000$). O tratamento com pentilenotetrazol provocou diminuição significativa do número de mergulhos realizados em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com diazepam. Os grupos tratados com quiabo adicionado na ração, de modo similar ao diazepam, aumentaram o número de mergulhos de forma significativa, quando comparados ao tratamento com pentilenotetrazol.

O tempo despendido pelos camundongos em auto-limpeza sofreu efeito significativo dos tratamentos empregados neste estudo (ANOVA, $p=0,0004$) (figura 20I). O tratamento com pentilenotetrazol aumentou significativamente o tempo de auto-limpeza, quando comparado ao tratamento com diazepam; o tratamento com diazepam, por sua vez, diminuiu significativamente o tempo de auto-limpeza, em relação ao tratamento com pentilenotetrazol. O tratamento com ração suplementada com 10% de quiabo aumentou este parâmetro de forma similar ao pentilenotetrazol e significativa em relação ao diazepam.

Tabela 9. Comportamento no labirinto em cruz elevado de camundongos tratados com ração AIN-93M suplementada ou não (controle) com 4,5; 7 e 10% de quíabio liofilizado (QL) por 14 dias, bem como camundongos injetados, por via i.p., com pentilenotetrazol (PTZ – 90mg/kg) e diazepam (DZP – 1mg/kg).

Parâmetro	Área da arena	Controle (n=5)	Ração 4,5% (n=10)	Ração 7% (n=10)	Ração 10% (n=10)	PTZ (n=5)	DZP (n=5)
Tempo de permanência (s)	Braços abertos	78,2 ± 3,3	117,6 ± 7,6*	113,2 ± 25,7	134,7 ± 26**	35,0 ± 5,6**	101 ± 29,5**
	Braços fechados	204,6 ± 7,6	145 ± 15,5**	138 ± 23,3**	103 ± 24,5**	239,8 ± 2,9	150,3 ± 37,0
Número de entradas	Braços abertos	2,6 ± 1,1	11,1 ± 3,1**	13,5 ± 3,4**	15,7 ± 2,3**	2,4 ± 0,5	11,7 ± 5,4**
	Braços fechados	10 ± 4,1	11,3 ± 2,6	9,1 ± 3,8	9,2 ± 1,9	17,8 ± 2,4**	10,7 ± 3,4
Tempo de permanência (s)	Zona externa do Braço aberto	4,6 ± 1,1	61,8 ± 1,7**	48 ± 13,5**	60,6 ± 13**	0 ± 0	38,4 ± 22,4
Número de levantamentos	Total	13,8 ± 5,9	32,4 ± 8,5**	15,1 ± 3,3	16,4 ± 4,0	13,8 ± 5,9	18,6 ± 9,0
Número de mergulhos	Total	46,2 ± 8,0	36,1 ± 12,6	51,5 ± 11,3	52,8 ± 20,7	10,0 ± 1,6**	46,0 ± 16,6
Número de estiramentos	Total	41,8 ± 5,80	42,6 ± 8,44	58,5 ± 8,73	66,3 ± 5,95	46,2 ± 9,0	18,8 ± 2,6
Tempo de limpeza (s)	Total	1,6 ± 1,1	1,6 ± 0,8	1,8 ± 0,9	2,2 ± 1,1	3,4 ± 1,1	2,0 ± 1,3

Dados expressos como média ± DP, n= número de animais por grupo, s= segundos (*p<0,05 e **p<0,01 em relação ao controle; * p<0,05 e **p<0,01 em relação ao PTZ e °p<0,05 e °°p<0,01 em relação em DZP).

Figura 20. Parâmetros de comportamento exibidos no labirinto em cruz elevado por camundongos tratados com ração AIN-93M suplementada com 4,5; 7 e 10% de quibabo liofilizado (QL) por 14 dias, pentilenotetrazol (PTZ) e diazepam (DZP). CTL: Controle. Dados expressos como média $\pm$ DP e analisados por ANOVA seguida do teste de Tukey; $n=10$ por grupo exceto o grupo controle ($n=5$). A significância está representada por: * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ em relação ao controle; * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ em relação ao PTZ e ° $p<0,05$ e °° $p<0,01$ em relação ao DZP.

5.5.2.3 Tratamento dietético por 21 dias

A tabela 10 e a figura 21 (A a I) mostram o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados, o tempo de permanência na zona externa do braço aberto, o número de levantamentos, mergulhos, estiramentos e auto-limpezas de camundongos tratados com ração controle e ração suplementada com quiabo liofilizado (QL) nas doses 4,5; 7 e 10% por 21 dias, pentilenotetrazol (PTZ) e diazepam (DZP) no labirinto em cruz elevado.

A figura 21A mostra o tempo de permanência dos camundongos tratados ou não com ração rica em quiabo, com pentilenotetrazol e com diazepam nos braços abertos da arena do labirinto em cruz elevado. A análise de variância foi capaz de detectar diferenças significantes entre estes grupos (ANOVA, $p=0,0000$). Em comparação ao controle, foram apontados como significativamente aumentados os grupos tratados com ração 4,5% e 7% de quiabo. O grupo tratado com pentilenotetrazol permaneceu significativamente menos tempo nos braços abertos, em comparação com o controle. Por outro lado, o grupo tratado com diazepam permaneceu por tempo mais longo neste setor da arena, quando comparado ao grupo controle. Ambos os grupos são diferentes entre si. Os grupos tratados com suplementação dietética com quiabo foram estatisticamente diferentes quando comparados aos tratamentos com diazepam e com pentilenotetrazol.

Quando se analisou o parâmetro tempo de permanência nos braços fechados, notou-se que os grupos diferiram entre si (ANOVA, $p=0,0000$) (figura 21B). O tratamento com pentilenotetrazol foi capaz de aumentar significativamente o tempo de permanência nos braços fechados, em comparação com o controle; o tratamento com diazepam diminuiu significativamente este parâmetro. Os grupos tratados com diferentes concentrações de quiabo na ração também diminuíram o tempo de permanência nos braços fechados, de forma significativa em relação ao pentilenotetrazol e ao diazepam.

O tempo de permanência na zona externa dos braços abertos foi significativamente aumentado por alguns dos tratamentos realizados e diminuído por outros (ANOVA, $p=0,0000$, seguida do teste de Tukey, $p<0,01$). O consumo de ração suplementada com quiabo, independente da concentração, foi capaz de aumentar o tempo de permanência neste setor do labirinto em cruz elevado, assim como o diazepam, em comparação ao controle e ao grupo tratado com pentilenotetrazol. Este último permaneceu significativamente menos tempo na zona externa do braço aberto, de modo similar ao controle (figura 21C).

O número de entradas nos braços abertos foi afetado pelos tratamentos realizados neste experimento (ANOVA, $p=0,0000$). Todos os grupos que consumiram ração suplementada com quiabo tiveram aumento significativo do número de entradas neste setor do LCE em relação ao controle e de modo semelhante ao diazepam (figura 21D). O tratamento com pentilenotetrazol diminuiu significativamente este parâmetro, sendo que os grupos tratados com ração adicionada de quiabo e diazepam foram estatisticamente diferentes do grupo que recebeu pentilenotetrazol, responsável pelo aumento da ansiedade.

A figura 21E mostra o número de entradas nos braços fechados observado nos grupos experimentais. A análise de variância aplicada detectou diferenças significantes entre os grupos (ANOVA, $p=0,0001$). O grupo tratado com pentilenotetrazol teve aumento significativo deste parâmetro; todos os demais grupos entraram significativamente menos vezes nos braços fechados.

O número de levantamentos sofreu efeito com o tratamento aqui proposto, como apontado pela análise de variância (ANOVA, $p=0,0000$). Os grupos tratados com quiabo na ração experimental mostraram um aumento significativo na exibição deste comportamento em relação ao grupo tratado com pentilenotetrazol e diminuição em relação ao grupo tratado com diazepam (figura 21F).

A Figura 21G mostra a variação do número de mergulhos efetuados pelos camundongos tratados pela dieta; a comparação de todos os grupos por análise de variância apontou diferenças significantes (ANOVA, $p=0,0000$). Embora nenhum dos tratamentos tenha sido diferente do controle na exibição deste comportamento, notou-se que os tratamentos com pentilenotetrazol e com diazepam são diferentes, sendo que o uso de pentilenotetrazol diminuiu o número de mergulhos e o uso de diazepam aumentou este parâmetro. Os grupos tratados com ração rica em quiabo exibiram um padrão de aumento do número de mergulhos similar ao diazepam e significativamente diferente do pentilenotetrazol.

O número de estiramentos, mostrado na figura 21H, foi mais um parâmetro que sofreu interferência dos tratamentos instituídos (ANOVA, $p=0,0000$). Assim, foi possível notar que nenhum grupo tratado com ração suplementada com quiabo diferiu do controle; no entanto, o grupo que foi tratado com diazepam diminuiu significativamente o número de estiramentos realizados. O tratamento com pentilenotetrazol teve como efeito aumento do número de estiramentos em relação ao diazepam, mas não ao controle. Os grupos tratados com quiabo na ração mostraram aumento neste parâmetro, que foi significativamente distinto dos efeitos provocados pelo pentilenotetrazol e pelo diazepam.

A figura 21I demonstra os dados obtidos através da observação do tempo gasto pelos camundongos em auto-limpeza. Foram encontrados efeitos dos tratamentos empregados no tempo de auto-limpeza (ANOVA, $p=0,0001$). O grupo tratado com pentilenotetrazol permaneceu por tempo maior em auto-limpeza do que os grupos controle e tratado com diazepam; o tratamento com diazepam diminuiu o tempo de auto-limpeza em comparação com o efeito resultante do tratamento com pentilenotetrazol. Os grupos tratados com ração com adição de quiabo tiveram aumento deste parâmetro similar ao que ocorreu no grupo tratado com pentilenotetrazol e significativamente diferente do que foi observado no grupo tratado com diazepam.

Tabela 10. Comportamento no labirinto em cruz elevado de camundongos tratados com ração AIN-93M suplementada ou não (controle) com 4,5; 7 e 10% de quíabio liofilizado (QL) por 21 dias, bem como de camundongos injetados, por via i.p., com pentilenotetrazol (PTZ - 90mg/kg) e diazepam (DZP - 1mg/kg).

Parâmetro	Área da arena	Controle (n=5)	Ração 4,5% (n=10)	Ração 7% (n=10)	Ração 10% (n=10)	PTZ (n=5)	DZP (n=5)
Tempo de permanência (s)	Braços abertos	70 ± 3,32	103,9 ± 9,6*	100 ± 20,6*	95,2 ± 19,21	35,0 ± 5,6**	101 ± 29,5**
	Braços fechados	154,8 ± 15,5	165,2 ± 16,3	132,2 ± 20,5	130,4 ± 14,4	239,8 ± 13**	150,3 ± 37*
Número de entradas	Braços abertos	3 ± 0,7	2,6 ± 1,14**	15,8 ± 2,2**	16,4 ± 2,17**	2,4 ± 0,5	11,7 ± 5,4**
	Braços fechados	12,4 ± 3,50	10,5 ± 3,34	9,1 ± 2,51	11,8 ± 2,25	17,8 ± 2,4*	10,7 ± 3,4
Tempo de permanência (s)	Zona externa do Braço aberto	1,8 ± 1,79	53,8 ± 7,0**	59 ± 10,7**	40,1 ± 4,0**	0 ± 0	38,4 ± 22,4**
Número de levantamentos	Total	12,8 ± 4,21	23 ± 5,72	19,7 ± 6,58	18,2 ± 5,87	13,8 ± 5,9	18,6 ± 9,0
Número de mergulhos	Total	33 ± 6,40	47 ± 11,94	35,9 ± 14,14	52,8 ± 18,2	10,0 ± 1,6	46,0 ± 16,6
Número de estiramentos	Total	46,2 ± 9,0	42,1 ± 5,42	58,8 ± 16,94	60,8 ± 6,77	46,2 ± 9,0	18,8 ± 2,6**
Tempo de limpeza (s)	Total	1,2 ± 1,3	2,4 ± 0,84	2,20 ± 0,79	2,2 ± 1,03	3,4 ± 1,1**	2,0 ± 1,3

Dados expressos como média ± DP, n= número de animais por grupo, s= segundos (*p<0,05 e **p<0,01 em relação ao controle; * p<0,05 e **p<0,01 em relação ao PTZ e °p<0,05 e °°p<0,01 em relação em DZP).

Figura 21. Parâmetros de comportamento exibidos no labirinto em cruz elevado por camundongos tratados com ração AIN-93M suplementada com 4,5; 7 e 10% de quibao liofilizado (QL) por 21 dias, pentilenotetrazol (PTZ) e diazepam (DZP). CTL: Controle. Dados expressos como média $\pm$ DP e analisados por ANOVA seguida do teste de Tukey; $n=10$ por grupo exceto o grupo controle ($n=5$). A significância está representada por: * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ em relação ao controle; ° $p<0,05$ e °° $p<0,01$ em relação ao PTZ e °° $p<0,05$ e °°° $p<0,01$ em relação ao DZP.

5.5.3 Análise do comportamento de camundongos na Placa Perfurada

As tabelas 11, 12, 13 e a figura 22 (A a F) mostram os dados referentes à análise do comportamento de camundongos que foram tratados com ração controle, ração suplementada com quiabo em três diferentes concentrações por 7, 14 e 21 dias, com rotina na concentração de 1,2mg/kg de peso corporal, pentilenotetrazol e diazepam, na Placa Perfurada.

O tempo de latência foi afetado pelos tratamentos instituídos nesta pesquisa (ANOVA, $p=0,0000$) (figura 22A). O tratamento com pentilenotetrazol aumentou significativamente o tempo de latência, enquanto que o tratamento com diazepam diminuiu esse parâmetro, em comparação com o grupo controle. Os tratamentos dietéticos com 7% e 10% de quiabo na ração por 7 dias foram capazes de diminuir significativamente o tempo de latência, de modo similar ao efeito obtido pelo tratamento com diazepam, e diferente do efeito provocado pela administração de pentilenotetrazol. O mesmo efeito foi observado quando o tratamento dietético se prolongou por 14 dias (ANOVA, $p=0,0000$), com a diferença que o grupo tratado com 4,5% de quiabo na ração também diminuiu significativamente o tempo de latência (figura 22C). Com a continuação do tratamento dietético por 21 dias, o efeito foi mantido (ANOVA, $p=0,0000$), sendo que a ração com 7% de quiabo foi capaz diminuir significativamente o tempo de latência para o primeiro mergulho de modo diferente dos grupos controle e pentilenotetrazol, porém semelhante ao diazepam (figura 22E). O tratamento com ração com acréscimo de rutina diminuiu significativamente o tempo de latência para a primeira exploração de orifício na placa perfurada apenas quando a ração foi consumida por 7 dias, sendo similar ao efeito produzido pelo diazepam e pelo consumo de ração com 7% e 10% de quiabo (figura 22A).

O número de mergulhos nos orifícios também foi alterado pelas modificações dietéticas aplicadas (ANOVA, $p=0,0000$, figura 22B) mediante tratamentos dietético com quiabo por 7 dias. O grupo tratado com pentilenotetrazol exibiu um número significativamente menor de mergulhos que o grupo contro-

le; o grupo tratado com diazepam exibiu efeito oposto. Os grupos que consumiram ração com 7% e 10% de quiabo aumentaram o número de mergulhos de forma semelhante ao efeito induzido pelo diazepam e diferente do efeito produzido pelo pentilenotetrazol. O tratamento alimentar por 14 dias também alterou significativamente o número de mergulhos nos orifícios (ANOVA, $p=0,0000$) (figura 22D). Todos os grupos tratados com ração suplementada com quiabo, independente da concentração, aumentaram o número de mergulhos de modo similar ao grupo tratado com diazepam e significativamente diferente do grupo tratado com pentilenotetrazol. Quando foram analisados camundongos tratados por 21 dias com ração rica em quiabo, o mesmo efeito observado com os tratamentos dietéticos por 7 e por 14 dias foi observado, como pode ser visto na figura 22F. O consumo de ração enriquecida com rutina por 1 e 7 dias não alterou o número de mergulhos exibidos pelos camundongos na placa perfurada (figura 22B).

Tabela 11. Comportamento na placa perfurada de camundongos tratados com ração AIN-93M suplementada ou não (controle) com 4,5; 7 e 10% de quíabo liofilizado (QL) por 7 dias, ração suplementada com rutina (RT – 1,2mg/kg) por 1 e 7 dias, bem como de camundongos injetados, por via i.p., com pentilenotetrazol (PTZ - 90mg/kg) e diazepam (DZP – 1mg/kg).

Parâmetro	Controle (n=5)	Ração 4,5% (n=10)	Ração 7% (n=10)	Ração 10% (n=10)	Ração RT 1 Dia (n=5)	Ração RT 7 Dias (n=5)	PTZ (n=5)	DZP (n=5)
Tempo de latência para o primeiro mergulho (s)	19,4 ± 3,6 ^{***}	40,3 ± 3,5 ^{°°}	6,8 ± 4,3 ^{***}	5,6 ± 3,4 ^{***}	11,2 ± 2,8	2,2 ± 0,5 ^{**}	47,8 ± 6,9 ^{***°°}	6 ± 3,2 ^{***°°}
Número de mergulhos	45,6 ± 7,4 ^{°°}	49,7 ± 5,8 ^{**}	63,1 ± 10,8 ^{***°°}	57,5 ± 15,5 ^{***°°}	53,2 ± 1,5 ^{***°°}	55,4 ± 12,5 ^{***°°}	18,8 ± 2,9 ^{**}	74,2 ± 8,1 ^{***°°}

Dados expressos como média ± DP, n= número de animais por grupo, s= segundos (*p<0,05 e **p<0,01 em relação ao controle; [°] p<0,05 e ^{°°} p<0,01 em relação ao PTZ e ^{°°} p<0,05 e ^{°°°} p<0,01 em relação em DZP).

Tabela 12. Comportamento na placa perfurada de camundongos tratados com ração AIN-93M suplementada ou não (controle) com 4,5; 7 e 10% de quiabo liofilizado (QL) por 14 dias, bem como de camundongos injetados, por via i.p., com pentilenotetrazol (PTZ - 90mg/kg) e diazepam (DZP - 1mg/kg).

Parâmetro	Controle (n=5)	Ração 4,5% (n=10)	Ração 7% (n=10)	Ração 10% (n=10)	PTZ (n=5)	DZP (n=5)
Tempo de latência para o primeiro mergulho (s)	30,8 ± 6,6 ^{***}	7,6 ± 5,1 ^{***}	2,1 ± 1,1 ^{***}	5,6 ± 3,4 ^{***}	47,8 ± 6,9 ^{***}	6 ± 3,2 ^{***}
Número de mergulhos	47,8 ± 2,9 ^{***}	47,7 ± 11,8 ^{***}	70,1 ± 7,7 ^{**}	57,5 ± 15,5 ^{**}	18,8 ± 2,9 ^{***}	74,2 ± 8,1 ^{***}

Dados expressos como média ± DP, n= número de animais por grupo, s= segundos (*p<0,05 e **p<0,01 em relação ao controle; * p<0,05 e **p<0,01 em relação ao PTZ e °p<0,05 e °°p<0,01 em relação em DZP).

Tabela 13. Comportamento na placa perfurada de camundongos tratados com ração AIN-93M suplementada ou não (controle) com 4,5; 7 e 10% de quiabo liofilizado (QL) por 21 dias, bem como de camundongos injetados, por via i.p., com pentilenotetrazol (PTZ - 90mg/kg) e diazepam (DZP - 1mg/kg).

Parâmetro	Controle (n=5)	Ração 4,5% (n=10)	Ração 7% (n=10)	Ração 10% (n=10)	PTZ (n=5)	DZP (n=5)
Tempo de latência para o primeiro mergulho (s)	15,2 ± 5,5 ^{***}	10,2 ± 4,8 ^{**}	3,7 ± 3,1 ^{***}	12,6 ± 4,6 ^{**}	47,8 ± 6,9 ^{***}	6 ± 3,2 ^{***}
Número de mergulhos	43 ± 6,4 ^{***}	61,6 ± 10,8 ^{**}	53,3 ± 16,7 ^{**}	62 ± 14,2 ^{**}	18,8 ± 2,9 ^{***}	74,2 ± 8,1 ^{***}

Dados expressos como média ± DP, n= número de animais por grupo, s= segundos (*p<0,05 e **p<0,01 em relação ao controle; * p<0,05 e **p<0,01 em relação ao PTZ e °p<0,05 e °°p<0,01 em relação em DZP).

Figura 22. Parâmetros de comportamento exibidos na placa perfurada por camundongos tratados com ração AIN-93M suplementada com 4,5; 7 e 10% de quiabo liofilizado (QL) por 7, 14 e 21 dias, com rotina (RT – 1,2mg/kg) por 1 e 7 dias, pentilenotetrazol (PTZ) e diazepam (DZP). CTL: Controle. Dados expressos como média $\pm$ DP e analisados por ANOVA seguida do teste de Tukey; $n=10$ por grupo exceto o grupo controle ($n=5$). A significância está representada por: * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ em relação ao controle; ° $p<0,05$ e °° $p<0,01$ em relação ao PTZ e ° $p<0,05$ e °° $p<0,01$ em relação ao DZP.

5.6. Análise de flavonóides em tecidos biológicos

Após o ensaio de perfusão intestinal *in situ* utilizando ratos, foram coletadas amostras de diversos tecidos biológicos (urina, sangue, cérebro, rins e fígado), não sendo detectados os flavonóides rutina e quercetina nos tecidos analisados.

Após o tratamento dietético e análise do comportamento de camundongos, destes também foram coletadas amostras de sangue e cérebro, para detecção e quantificação de flavonóides. Novamente, os procedimentos analíticos realizados não foram capazes de possibilitar a detecção dos flavonóides rutina e quercetina nas amostras selecionadas.

6 DISCUSSÃO

Suplementos nutricionais e alimentos funcionais, ricos em compostos bioativos como os flavonóides, estão recebendo correntemente reconhecimento internacional como tendo potenciais efeitos benéficos na saúde quando consumidos como parte de uma dieta variada, em base regular e em níveis efetivos (MANDEL et al., 2005). A rutina é um glicosídeo de quercetina, mais especificamente, quercetina-3-ramnosilglicosídeo, que foi detectada no quiabo, na quantidade de 16 mg/100g de QL, correspondente a 1,6mg/100g em base úmida. Arabbi, Genovese e Lajolo (2004), analisando alimentos de origem brasileira quanto ao teor de flavonóides, encontraram 2,2mg/100g, b.u., de flavonóides totais no tomate salada, 2,6mg/100g, b.u, no tomate caqui e 8,2mg/100g no tomate cereja, entre outros alimentos. Considerando estas quantificações de flavonóides em legumes, o quiabo está levemente abaixo da média de conteúdo deste composto bioativo, em comparação com outros legumes cultivados no Brasil.

Sakakibara et al. (2003) relataram a detecção de glicosídeos de flavonóides neste legume cultivado no Japão, apontando valores entre 65 e 114 μ mol/100g, em b.u.; a variação dos valores pode ser resultante da diferença de cultivar, considerando que Sakakibara et al. (2003) não citaram a cultivar de quiabo que pesquisaram, bem como utilizaram amostras de quiabo provenientes de mercados locais em diferentes épocas do ano, o processo de extração não foi o mesmo da extração utilizada no presente estudo e o processo de CLAE também não, com diferenças nos solventes de eluição e na coluna.

Segundo Ross e Kassum (2002) não existe consenso na literatura a respeito dos métodos de quantificação de flavonóides e, como consequência disto, as informações disponíveis sobre o conteúdo destes compostos bioativos são incompletas e contraditórias, na maioria das vezes. Spencer et al. (2008) afirmam que são poucas as metodologias para caracterizar e quantificar flavonóides em alimentos utilizando métodos analíticos

padronizados. Em adição, grande parte das informações disponíveis até hoje foi obtida através de fontes heterogêneas, nas quais a descrição dos métodos de amostragem são incertos, a variedade do vegetal não é levada em consideração, assim como não são considerados e descritos o nível de maturação no momento da coleta de amostras, fatores ambientais como clima e estação do ano, assim como condições de armazenamento e processamento. Todos estes fatores de interferência dificultam a quantificação acurada de polifenóis e flavonóides, o que, por sua vez, contribui com a limitação das tabelas de composição de alimentos que os incluem. Estes fatos evidenciam que é necessário investigar e padronizar métodos apropriados para detecção e quantificação de flavonóides em alimentos, o que vai aumentar a confiabilidade de tabelas de composição de alimentos, incluindo compostos bioativos da classe dos flavonóides, que, por sua vez, vão melhorar as estimativas de consumo e os estudos epidemiológicos que tem por objetivo verificar a correlação entre o consumo de compostos bioativos e efeitos na saúde.

A importância fisiológica dos flavonóides dietéticos depende de sua disponibilidade para absorção e subsequente interação com tecidos-alvo. Zhang, Zuo e Lin (2007) ressaltaram que, devido à complexidade da absorção, metabolismo e disposição natural de vários flavonóides, a maior parte dos dados sobre este aspecto foi obtida por estudos farmacológicos, farmacocinéticos e biofarmacêuticos e, embora alguns resultados sejam controversos, pode-se concluir que os efeitos gerais no organismo são dependentes da maneira como circulam o flavonóide consumido ou seus metabólitos, fato esse que permanece, em grande parte, desconhecido.

Em geral, os flavonóides sofrem extenso metabolismo após serem consumidos. No trato gastrointestinal superior, os flavonóides são substrato para uma série de enzimas que produzem grandes diferenças na proporção em que os flavonóides são absorvidos. Existem fortes evidências de que flavonóides glicosilados (HOLLMAN et al., 1995, PAGANGA; RICE-EVANS, 1997, HOLLMAN et al., 1999) e agliconas de flavonóides (WALGREN;

WALLE; WALLE, 1998, MANACH et al., 1998) podem ser absorvidos pelo intestino dos mamíferos. Durante a passagem pelo jejuno e íleo, estes compostos bioativos são metabolizados por enzimas de fase I, incluindo citocromo P450 e glicosidases, e em seguida por enzimas de fase II, com o objetivo de conjugação e detoxificação (SPENCER et al. 1999, SPENCER et al., 2001, SPENCER et al, 2003). Por fim, as agliconas, que não sofrem metabolismo no intestino delgado, estão sujeitas ao metabolismo por enzimas de fase I e II no fígado, por meio da circulação portal. Participam deste processo enzimas como UDP-glicuronídeo transferase, que produz O-glicuronídeos; sulfotransferases, que geram O-sulfatos e catecol-O-metil transferases, que produzem metabólitos O-metilados. Mesmo com todo esse arsenal metabólico para o aproveitamento dos flavonóides alimentares, determinada quantidade destes compostos não é absorvida pelo trato gastrointestinal, incluindo aqueles que são excretados novamente para a luz intestinal pela bile. Estes flavonóides que não metabolizados anteriormente alcançam o intestino grosso, onde podem sofrer ação da microbiota. Sabe-se que o metabolismo de flavonóides pela microbiota intestinal produz metabólitos que podem ser absorvidos pela mucosa do intestino grosso (SPENCER et al., 2008).

Hollman et al. (1995, 1996) realizaram estudos em seres humanos e obtiveram evidências da absorção de glicosídeos intactos de quercetina pelo intestino delgado. Para explicar este resultado, sugeriu-se que o transportador intestinal de glicose SGLT1 poderia ser capaz de transportar quercetina glicosilada quando esta alcança o intestino delgado de mamíferos. Posteriormente, Gee et al. (1998) confirmaram a hipótese de que glicosídeos de quercetina de ocorrência natural em alimentos interagem com receptores intestinais do tipo SGLT1 na membrana dos enterócitos do intestino delgado e são, efetivamente, absorvidos por mamíferos. Felgines et al. (2000) estudaram a biodisponibilidade do flavonóide naringerina e seus glicosídeos correspondentes, naringerina-7-ramnoglicosídeo e naringerina-7-glicosídeo, em ratos. Estes autores observaram que tanto a aglicona como as formas glicosiladas foram eficien-

temente absorvidas pelo trato gastrointestinal dos roedores, embora a biodisponibilidade varie em função do radical glicosídico ligado ao flavonóide. De acordo com Manach et al. (1998), a partir de um estudo *in vivo*, determinou-se que nem glicosídeos de flavonóides nem agliconas podem ser detectadas na circulação sanguínea sistêmica após o consumo de dieta enriquecida com glicosídeos de quercetina, embora metabólitos de fase II da quercetina fossem detectados. Este mesmo aspecto foi observado por Morand et al. (2000) e Sesink et al., 2001.

No presente estudo, a perfusão intestinal de ratos com rutina foi esclarecedora no sentido de estabelecer que cerca de 15% deste flavonóide, quando na porção duodenal do intestino, foi absorvido. Hollman et al. (1995) relatam que a rutina administrada por via oral foi absorvida por seres humanos ileostomizados, na proporção de 17%, valor muito próximo ao que foi determinado no presente estudo. De acordo com as informações disponíveis na literatura, esta quantidade absorvida, provavelmente, é resultante da interação do glicosídeo de quercetina com o receptor SGLT1, uma vez que a ação enzimática para desconjugação do glicosídeo só ocorrerá nas regiões do jejuno e íleo. Assim, foi possível estabelecer que a rutina é um flavonóide biodisponível e que, portanto, pode ser acrescentado em uma ração para efeitos de suplementação alimentar. É possível também afirmar que este modelo de perfusão intestinal, embora simplificado, foi sensível às variações de flavonóides no perfusato e que, portanto, pode ser aprimorado e aplicado para análise da biodisponibilidade de compostos bioativos da classe dos flavonóides. Entretanto, é importante salientar que estudos a respeito da biodisponibilidade de flavonóides presentes em alimentos e inseridos em dietas mistas, isto é, dietas nas quais todos os nutrientes estejam presentes, são necessários.

Do mesmo modo que já foi citado na literatura, no presente estudo também não foram detectados flavonóides em sua forma aglicona, a quercetina, ou glicosídeo da quercetina, a rutina, no plasma e no cérebro de ratos que foram perfundidos com rutina. Como o volume do perfusato foi controlado durante o experimento, pode-se inferir que a diminuição do conteúdo de rutina

no mesmo realmente foi resultante da absorção intestinal. Contudo, deve ser ressaltado que tratou-se de testar a extração de flavonóides destas amostras biológicas de modo muito próximo, com pequenas adaptações, ao que é realizado para amostras de alimentos. A partir deste ensaio, pode-se perceber que esta não foi uma metodologia adequada para a investigação de flavonóides em amostras biológicas, uma vez que nenhum composto desta classe foi identificado. A seguir, testou-se uma metodologia proposta na literatura, específica para amostras biológicas, que incluía um nível de detecção muito eficiente, da ordem de nanogramas (PAULKE; SCHUBERT-ZSILAVECZ; WURGLICS, 2006, KALT et al., 2008). O processo de hidrólise do extrato metanólico pode ter sido o responsável pela diminuição do conteúdo de flavonóides, que o levou a níveis abaixo do limite de detecção, como sugerido por Hertog et al. (1992). Muito embora tenham sido feitas as adaptações em termos de equipamentos, no presente estudo, não foi possível reproduzir a metodologia proposta, e por esse motivo esta metodologia também não foi efetiva para a detecção de flavonóides no plasma e no cérebro após a perfusão intestinal. Vale ressaltar que mesmo as soluções-padrão de quercetina e rutina utilizadas neste experimento não foram identificadas, o que demonstra a inadequação da metodologia utilizada.

Quando esta mesma análise foi realizada com amostras de sangue e cérebro de camundongos tratados com ração enriquecida com quiabo e com rutina, os resultados foram os mesmos: não foi possível identificar os flavonóides rutina e quercetina nas amostras. Além dos motivos já citados, um aspecto que deve ser considerado para explicar o ocorrido reside no fato de que, durante o metabolismo da rutina, esta foi convertida a metabólitos glicuronídeos, sulfatados e metoxilados que não são totalmente conhecidos, para os quais não estavam disponíveis padrões para comparação. Além disso, a análise por CLAE não apontou nenhum pico de absorbância nas amostras, o que leva a crer que a quantidade de flavonóides recuperada na extração foi inferior ao limite de detecção.

Os relatos da existência de glicosídeos de flavonóides na circulação sanguínea podem ser resultado de metodologia analítica inadequada, que não distingue as diferenças entre radicais glicosídicos de flavonóides glicosídeos e de flavonóides glicuronídeos, denominados conjugados de fase II de flavonóides (ZHANG; ZHONG; LIN, 2007).

Diversas variedades de quiabo possuem conteúdos variáveis de mucilagem. A investigação da composição da mucilagem do quiabo, realizada por Bhat e Tharanathan (1986), mostrou que esta é composta predominantemente por carboidratos; a hidrólise da mucilagem resultou na detecção dos sacarídeos ramnose, galactose e glicose como carboidratos monossacarídeos neutros, além de ácido galacturônico como único ácido urônico presente. A mucilagem é insolúvel em água, razão pela qual preparações como sucos e suspensões aquosas não são adequadas para a administração deste alimento. A ramnose detectada na mucilagem provavelmente é o carboidrato ligado à rutina, por isso não é indicado nenhum procedimento para remoção da mucilagem do quiabo, porque isto poderia acarretar também a remoção do flavonóide.

O preparo de quiabo liofilizado para constituir as rações experimentais utilizadas neste estudo foi dificultado pelo fato deste alimento exibir uma quantidade expressiva de carboidratos do tipo mono, di e oligossacarídeos, popularmente denominados “açúcares simples”, pois alimentos com este perfil mostram maior capacidade de absorção de água após a liofilização (TEUNOU; FITZPATRICK, 1999), como observado quando se determinou a umidade residual do quiabo liofilizado. Considerando este fato, procurou-se utilizar o quiabo liofilizado e as rações produzidas com este alimento o mais brevemente possível, diminuindo o tempo de permanência do mesmo em armazenamento e assim minimizando a probabilidade de prejuízos à sua composição nutricional e bioativa como um todo.

A quantidade de flavonóides consumida pelos seres humanos é variável; cada população mostra um padrão de consumo, que varia dependendo da disponibilidade de alimentos e da cultura alimentar de cada região. Em es-

tudo realizado no Brasil por Arabbi, Genovese e Lajolo, (2004), o consumo total de flavonóides para uma família brasileira composta de 4 membros foi determinada, em média, em 79mg por dia para mulheres e 86mg por dia para homens, o que resulta em 82,5mg por pessoa por dia. As principais fontes de flavonóides para o brasileiro são laranja, alface, cebola e tomate, além de rúcula, embora esta não tenha presença freqüente na mesa do brasileiro. Esta quantidade de composto bioativo consumida é muito maior do que as quantidades apontadas por estudos em países da Europa (HERTOG; HOLLMAN; KATAN, 1992, HERTOOG et al, 1993, HERTOOG et al., 1995). Embora a população brasileira consuma uma menor quantidade de chá e vinho, o consumo de frutas, verduras e legumes, potenciais fontes de flavonóides, é maior do que o consumo de vegetais por populações européias, devido à fácil disponibilidade e baixo custo.

Neste estudo, foi empregada a ração AIN-93M para os camundongos, sendo suplementada com diferentes concentrações de quiabo liofilizado. Dietas ou rações próprias para animais de laboratório foram desenvolvidas para reduzir a variabilidade na composição e discrepâncias resultantes na oferta nutricional e, conseqüentemente, nos resultados dos experimentos. Nesse sentido, o desenvolvimento de uma formulação com ingredientes purificados, como caseína, sacarose e amido de milho, tem a vantagem de possibilitar a manutenção da composição nutricional da alimentação oferecida aos animais, com pequena variação em diferentes lotes de ração produzida (RUTTEN; GROOT, 1992). O Instituto Americano de Nutrição desenvolveu a primeira formulação de ração purificada, a AIN-76A. Reeves, Nielsen e Fahey (1993) reportaram as alterações necessárias nesta formulação e denominaram a nova ração como AIN-93, nas versões G (para roedores em período de gestação, lactação e crescimento) e M (roedores adultos). Em 1997, Reeves publicou um artigo no qual discute cada componente da ração AIN-93G e M e aponta como deve ser a preparação da mesma. A preparação da ração utilizada neste estudo foi baseada nestas recomendações. Cada lote de ração, a saber, ração controle, ração com adição de 4,5%, 7% e 10% de quiabo foi

preparado em separado; as quantidades necessárias para todo o experimento foram calculadas e toda a ração foi preparada, de modo a evitar variações entre lotes diferentes. A concentração 4,5% equivale ao consumo médio de flavonóides pelos brasileiros, estimado por Arabbi, Genovese e Lajolo (2004). Considerando que a oferta de rutina dietética seja proveniente apenas de quiabo, seriam necessários 5,3kg deste legume para atingir a dose mínima proposta neste estudo, 1,2mg/kg. No entanto, é necessário ponderar que a oferta de flavonóides em geral e de rutina, em particular, deve ser proveniente de uma variedade de alimentos; é possível consumir esta quantidade de flavonóides, como provado por Arabbi, Genovese e Lajolo (2004), a partir de uma alimentação rica em frutas, verduras e legumes.

Na atualidade, o conhecimento de que os alimentos podem influenciar na estrutura e função do SNC, incluindo cognição e intelecto, é conhecida e relativamente aceita. Recentemente, Bourre (2006^a), em artigo de revisão, comenta sobre os efeitos dos nutrientes presentes nos alimentos, em particular, macronutrientes, e funções do SNC, ressaltando o efeito benéfico dos ácidos graxos poliinsaturados omega-3 na estrutura, bioquímica e fisiologia do cérebro. Nesse contexto, o ácido docosahexanóico é uma das principais estruturas da membrana fosfolipídica de células do tecido cerebral (estimadas em 100 bilhões de neurônios e 1 trilhão de células da glia), sendo absolutamente necessário para a função cerebral. Já deficiência de ácido α -linolênico altera o desenvolvimento cerebral, provoca discrepâncias na composição das membranas de células nervosas e de estruturas subcelulares, como mielina, terminações nervosas e mitocôndrias, com conseqüências na bioquímica e fisiologia que resultam em distúrbios neurosensoriais e comportamentais. Os ácidos graxos ômega-3 também estão envolvidos na prevenção de diversos aspectos de doenças cardiovasculares e cerebrais isquêmicas, assim como nos distúrbios neuropsiquiátricos depressão, demência e doença de Alzheimer. Bourre (2006^a) comenta que as implicações dos ácidos graxos ômega-3 na depressão e na desordem bipolar (ou distúrbio maníaco-depressivo) estão sendo avaliados. Já dietas pobres em gorduras têm efeitos adversos no hu-

mor. A natureza da composição de aminoácidos das proteínas dietéticas contribui na função cerebral: o triptofano tem papel especial neste sentido. De fato, certos aminoácidos indispensáveis presentes em proteínas dietéticas participam da elaboração de neurotransmissores e neuromoduladores. A regulação da glicemia, por sua vez, melhora a qualidade e duração do desempenho intelectual. A presença de fibras alimentares está associada a maiores taxas de atenção e diminuição da sensibilidade ao estresse. Assim, este autor apresentou numerosas evidências que mostraram que fatores dietéticos desempenham um papel importante na determinação do quanto o cérebro envelhece e experimenta desordens neurodegenerativas.

Muitos micronutrientes, como vitaminas e elementos-traço, também mostraram correlação direta com uma série de funções cerebrais. Em uma continuação de sua revisão neste tema, Bourre (2006^b) relata que a vitamina B₆ é considerada útil no tratamento da depressão pré-menstrual; as vitaminas B₆ e B₁₂ estão diretamente envolvidas com a síntese de diversos neurotransmissores; a vitamina B₁₂, particularmente, é capaz de retardar o aparecimento de sintomas de demência quando administrada preventivamente, melhorando funções cognitivas em idosos, por melhorar o funcionamento do lobo frontal, assim como a função da linguagem em idosos com desordens cognitivas; em adolescentes, a deficiência de vitamina B₁₂ provoca o desenvolvimento de sintomas de deficiências cognitivas. Este autor ressalta que, depois da glândula suprarrenal, as terminações nervosas cerebrais contêm a maior concentração de vitamina C do corpo humano. Já a vitamina D e seus análogos contribuem na prevenção de enfermidades neurodegenerativas e neuroimunes. O α -tocoferol é ativamente captado pelo cérebro e está envolvido na proteção da membrana das células do tecido nervoso. A vitamina K está envolvida na manutenção da bioquímica do SNC. O Ferro promove correta oxigenação e produção de energia no parênquima cerebral, via citocromo oxidase, além de contribuir na síntese de neurotransmissores e mielina; a carência de Ferro pode ser encontrada em crianças com Síndrome de Hiperatividade com déficit de atenção. Este mineral é importante durante o desenvolvimento fetal, além

de estar relacionado com o quociente de inteligência em crianças; a anemia infantil ferropriva acarreta em perturbações no desenvolvimento de funções cognitivas. Mulheres também estão expostas à anemia com deficiência de Ferro, o que está associado à depressão, apatia e fadiga. O Magnésio tem papel importante no metabolismo como um todo, além de função na oxidação/redução e na regulação iônica. O Zinco participa da percepção de sabores, vital para manutenção da ingestão alimentar. Desequilíbrios na homeostase de Cobre por deficiências dietéticas podem estar ligados ao desenvolvimento da doença de Alzheimer. A deficiência de Iodo durante a gestação induz disfunções cerebrais e provoca cretinismo. Por diversos mecanismos, Manganês, Cobre e Zinco participam de mecanismos enzimáticos de proteção aos radicais livres e espécies reativas de oxigênio. O potencial genético pleno de uma criança para o crescimento físico e o desenvolvimento mental pode ser comprometido por deficiências nutricionais de micronutrientes. Crianças e adolescentes com estado nutricional carencial estão expostos a alterações mentais e comportamentais que podem ser corrigidas, ao menos em parte, por adequações dietéticas. Do mesmo modo, os idosos também têm propensão maior a sofrer doenças que acometem o SNC por deficiências nutricionais, por falhas dos mecanismos de defesa e da capacidade antioxidante.

A quantidade de ração administrada durante o experimento foi fixada após estudo prévio do consumo de ração pelos camundongos, de modo que todos os animais receberam a mesma oferta de ração e de princípio ativo diariamente. O peso dos camundongos foi monitorado diariamente, sendo que não foi detectada nenhuma variação no ganho de peso, o que demonstra que a ração foi efetivamente consumida. Os animais dos grupos controles foram também pesados diariamente, para que sofressem o mesmo tipo de manipulação e não houvesse interferência da manipulação nos experimentos comportamentais, já que o desempenho comportamental é influenciado por fatores genéticos e ambientais. Estes fatores devem ser cuidadosamente considerados em experimentos comportamentais. A habilidade para controlar ao máximo as condições é a maior vantagem da pesquisa comportamental envolven-

do animais em comparação com a pesquisa comportamental envolvendo seres humanos. Em seres humanos, efeitos ambientais com dieta, ciclo de sono e níveis de estresse são muito mais difíceis de controlar (MEER; RABER, 2005, BELZUNG; PHILIPPOT, 2007).

Um fator limitante na pesquisa envolvendo o estudo da ansiedade é a ausência de análogos quando se emprega o animal, como sujeito experimental. Em decorrência de a ansiedade ser um conceito que descreve um estado subjetivo, ela é considerada uma característica humana. Por isso ela pode apenas ser modelada e não reproduzida em animais. Modelos animais úteis para avaliação da ansiedade devem reproduzir características comportamentais e patológicas da síndrome de ansiedade; permitir investigação dos mecanismos neurobiológicos que não são facilmente estudados no homem e permitir avaliação confiável de agentes ansiolíticos, assim como identificar agentes ansiogênicos, de drogas e de toxinas (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; ZORZETO FILHO, 2001).

Uma grande variedade de modelos animais para o estudo da ansiedade foi validada farmacologicamente, usando os ansiolíticos clássicos benzodiazepínicos, como o diazepam (MARTIN, 1998); esses agentes tem sido usados como padrão de comparação com novos agentes propostos como efetivos para o controle da ansiedade. Em todos os modelos animais de ansiedade (condicionados ou não-condicionados) os benzodiazepínicos apresentam perfil ansiolítico (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; ZORZETTO FILHO, 2001).

Os benzodiazepínicos exercem seu efeito farmacológico potencializando o efeito do neurotransmissor GABA. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório no SNC, essencial para o balanço geral da excitação e inibição neuronal através da interação com receptores específicos de membrana (WONG; SNEAD, 2001). Membro de uma superfamília de canais iônicos ligantes-dependentes de ação rápida, o receptor GABA_A mostra similaridades estruturais e funcionais com os receptores nicotínicos de acetilcolina, de glicina e de serotonina (5-HT₃); inclui uma estrutura pentamérica pseudosimétrica

trans-membranar com um poro iônico central (WONG; SNEAD, 2001). Os receptores GABA_A estão principalmente localizados no elemento pós-sináptico, mediando a maior parte da transmissão sináptica inibitória no SNC e servindo como alvo das mais importantes drogas neuroativas, incluindo benzodiazepínicos, barbituratos, esteróides, anestésicos gerais e, provavelmente, álcool (WONG; SNEAD, 2001). O sítio receptor benzodiazepínico localizado no receptor GABA teve sua localização proposta na interface entre as subunidades α e γ . Após o reconhecimento dos ligantes, a afinidade do sítio ligante principal do receptor GABA a seu substrato é modificada para resultar em uma regulação diferencial do fluxo de cloreto através do canal iônico situado no centro do arranjo. Farmacologicamente, os benzodiazepínicos são potentes drogas ansiolíticas, sedativas, relaxantes musculares e anticonvulsivantes. Entretanto, por demonstrar efeitos adversos ou colaterais, incluindo potencialização dos efeitos do etanol, e amnésia, que geralmente acompanham o tratamento com benzodiazepínicos, houve um estímulo à pesquisa de alternativas aos benzodiazepínicos convencionais (HUEN et al., 2003). O emprego dos benzodiazepínicos tem sido muito criticado em face de seus riscos associados, como utilização abusiva, dependência e tolerância, recomendando-se seu uso no menor período possível com a dose mínima necessária (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; ZORZETTO FILHO, 2001).

O complexo supramolecular receptor benzodiazepínico/receptor GABA_A/Canal de Cl⁻ apresenta uma série de sítios de ligação (GABA, barbitúricos, picrotoxina, benzodiazepínicos, entre outros) que estão inter-relacionados de tal maneira que a ligação de um sítio altera alostericamente a cinética de ligação dos outros sítios. O desenvolvimento de agonistas parciais deste complexo é útil porque, mesmo ao se ligarem ao sítio receptor benzodiazepínico, sua ação máxima sempre será inferior à dos agonistas totais (por exemplo: diazepam, lorazepam) e, desse modo, não apresentarão sedação ou amnésia, com menor probabilidade para o desenvolvimento de abuso ou dependência (LADER, 1998).

Recentemente foi postulada uma ligação entre estresse oxidativo e ansiedade. Segundo Hovatta et al. (2005) há uma estreita relação entre a expressão de dois genes cerebrais que protegem as células de danos oxidativos e fenótipos comportamentais relacionados à ansiedade em seis linhagens de camundongos. A hipótese que esses autores formularam versava que as enzimas glioxalase 1 e glutathione redutase 1 regulam a ansiedade em camundongos. A super-expressão local dos dois genes responsáveis pela síntese destas enzimas no cérebro de animais resultaria em aumento de comportamentos relacionados à ansiedade, enquanto que a inibição da expressão de glutathione redutase 1 produziria camundongos com baixos níveis de ansiedade. Entretanto, a relação entre o estado ansioso e o estado de oxidação central é mais complexa, considerando que a enzima glioxalase 1 é expressa em maiores concentrações em camundongos com baixo nível de ansiedade, comparados com camundongos ansiosos. A mesma relação entre estresse oxidativo e ansiedade foi proposta por outros autores (KULOGLU et al., 2002^a; KULOGLU et al., 2002^b). Investigando esta hipótese, Bouayed et al. (2007) investigaram o efeito do polifenol ácido clorogênico, naturalmente presente em frutas e com atividade antioxidante já constatada. Os resultados obtidos por estes autores evidenciaram que diazepam e ácido clorogênico causam um espectro de alterações comportamentais reduzindo estados ansiosos em camundongos. Os resultados mostram claramente que os efeitos anti-ansiedade do ácido clorogênico foram bloqueados pelo flumazenil (antagonista benzodiazepínico), apontando que este polifenol reduz a ansiedade por ativar o receptor benzodiazepínico, abolindo a hipótese de que o ácido clorogênico age na ansiedade pelo seu potencial antioxidante. Não há evidências que sustentem a hipótese de que a redução da ansiedade por polifenóis seja resultante da sua atividade antioxidante.

O Labirinto em Cruz Elevado para roedores é o modelo experimental mais utilizado para a avaliação da atividade ansiolítica de formulações herbais, em conjunto com o teste do Campo Aberto, o teste de Conflito de Vogel, o teste da Interação Social e a câmara de Claro/Escuro. No presente trabalho

foram empregados o Campo Aberto, o Labirinto em Cruz Elevado e a Placa Perfurada; esta última vem sendo introduzida, mais recentemente, em estudos para avaliação de níveis de ansiedade em roedores. No mesmo sentido, os benzodiazepínicos clássicos como diazepam e lorazepam são incluídos na maioria dos estudos comportamentais como controles (ZHANG, 2004). Neste sentido, além do diazepam (DZP) incluído como padrão ou controle positivo, empregou-se também o pentilenotetrazol (PTZ) como controle negativo.

A preferência espacial pela zona interna ou central no Campo Aberto, assim como pelo compartimento iluminado da câmara de Claro/Escuro e pelos braços abertos no Labirinto em Cruz Elevado, são considerados medidas de avaliação de ansiedade; quanto mais ansioso o animal se encontra, maior a esquia à esses setores dos aparelhos. Esses parâmetros são medidos através do número de entradas, quadros percorridos e tempo de permanência nessas determinadas regiões. O Campo Aberto é um modelo válido para determinar a preferência espacial de roedores. Este é um teste amplamente utilizado em estudos neurobiológicos. Um camundongo é colocado no centro de uma arena iluminada, circundada por paredes altas o suficiente para impedir a fuga. A combinação de um ambiente não familiar e desprotegido e exposição à luz forçam o animal a permanecer perto das paredes ou mesmo absolutamente parado. Ao mesmo tempo, a motivação para a exploração faz o animal deixar a proteção da zona externa, próxima das paredes, e explorar a zona média e a zona interna da arena. O número de quadros percorridos e o tempo de permanência nesta zona refletem o conflito entre o medo e a exploração e, deste modo, servem como dois índices para ansiedade (RAMOS et al., 1997, KALLUEF et al., 2007, KULIKOV; TIKHONOVA; KULIKOV, 2008). Verificou-se que a suplementação dietética com quiabo aumentou o tempo de permanência na zona interna e também o número de quadros percorridos (ou entradas) nesta região, o que sugere que a motivação para a exploração superou o medo do desconhecido, fazendo com que os animais se dirigissem ao centro da arena e se locomovessem mais livremente neste setor, o que evidencia um efeito com perfil ansiolítico.

Ainda no modelo Campo Aberto, constatou-se que nenhuma concentração de quiabo na ração, em nenhum tempo de tratamento, foi capaz de diminuir o tempo de locomoção e aumentar o tempo de imobilidade dos camundongos. No entanto, o tratamento com diazepam provocou esse efeito, o que é indicativo de efeito sedativo, já conhecido com o uso desta droga (HUEN et al., 2003) e este está ligado à ativação dos sítios receptores benzodiazepínicos pelo agonista.

Moduladores positivos do receptor GABA_A (como os agonistas do GABA, barbituratos, benzodiazepínicos, esteróides e etanol), são compostos que melhoram a neurotransmissão GABAérgica e portanto melhoram a inibição nervosa em determinados núcleos cerebrais, o que controla a ansiedade (KALLUEFF, 2007). No presente estudo, o efeito com perfil ansiolítico exibido pela suplementação dietética com quiabo e com rutina sugerem que alimentos ricos em rutina tenham atividade modulatória positiva sobre o receptor GABAérgico, como agonista parcial do sítio benzodiazepínico. Isto explica porque nem todos os efeitos adversos observados com o uso de benzodiazepínicos, como, por exemplo, a sedação, foram repetidos com o tratamento com quiabo ou rutina.

Para confirmar os efeitos anti-ansiedade da suplementação dietética com quiabo liofilizado, um segundo modelo de ansiedade foi utilizado, o Labirinto em Cruz Elevado. Drogas ansiolíticas aumentam o tempo e as entradas de roedores nos braços abertos deste labirinto (PELLOW et al, 1985, FILE et al., 2004). Essas medidas são usadas como índices de atividade ansiolítica desde que o teste do Labirinto em Cruz Elevado é baseado na aversão natural dos roedores a espaços abertos e altos (MEER; RABER, 2005). O tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos foram aumentados nos camundongos que consumiram rações suplementadas com quiabo em diferentes concentrações, nos três períodos de tratamento. Estes resultados, neste modelo de avaliação de comportamento, em particular, significam que os níveis de ansiedade do animal foram diminuídos. Assim, o teste do Labirinto em Cruz Elevado indicou que o perfil farmacológico da suplementação

com quiabo foi próximo daquele induzido pelo diazepam, droga reconhecida como agonista benzodiazepínico. O tempo gasto pelos animais explorando a zona externa do braço aberto foi aumentado nos grupos que consumiram ração acrescida de quiabo. Esta região do Labirinto em Cruz Elevado é considerada a mais ansiogênica e, portanto, tem sido usada em estudos para investigação de atividade ansiolítica (PINHEIRO et al., 2002). A suplementação dietética com quiabo não afetou a atividade locomotora no labirinto, uma vez que não ocorreram diferenças estatísticas significantes no número de entradas nos braços abertos ou fechados em comparação com o controle, corroborando os resultados observados no Campo Aberto.

Segundo OGNIBENE et al. (2008), em modelos experimentais que tem como objetivo avaliar o comportamento, existem parâmetros comportamentais que podem ser exibidos e são indicativos de efeitos centrais como: a atividade locomotora ou a imobilidade, que refletem possíveis efeitos sedativos; atividades de avaliação de risco, como o farejamento, o mergulho e o estiramento, que são exploratórias; ou ainda comportamentos estereotipados, como a autolimpeza, que apontam efeitos de altos índices de ansiedade. No estudo dos efeitos da suplementação dietética com quiabo, foram detectados aumentos em parâmetros comportamentais que dizem respeito à atividade exploratória, como levantamentos, mergulhos e estiramentos. O levantamento pode ser compreendido como uma exploração protegida, uma vez que sua maior frequência de exibição é no interior do braço aberto, aonde o camundongo pode apoiar as patas dianteiras na parede (KARL; PABST; VON HÖRSTEN, 2003). O estiramento é também um comportamento de avaliação de risco, que pode ser exibido tanto nos braços abertos quanto nos fechados (KARL; PABST; VON HÖRSTEN, 2003). Este parâmetro foi aumentado como efeito da ração enriquecida com quiabo e com rotina. O número de mergulhos também foi aumentado nos grupos em tratamento dietético com rotina ou quiabo para valores iguais aos do grupo tratado com diazepam. Ao contrário do levantamento, o mergulho, caracterizado como a projeção da cabeça do camundongo para além do limite do braço aberto, é um comportamento de avaliação de risco

desprotegido (KARL; PABST; VON HÖRSTEN, 2003). Assim, seu aumento está inversamente relacionado com a ansiedade: quanto maior o número de mergulhos exibidos, menor o nível de ansiedade. O tempo gasto em auto-limpeza não foi alterado pelo tratamento dietético. O tratamento ansiogênico, com administração de pentilenotetrazol em camundongos, diminuiu o número de levantamentos e de mergulhos, aumentando o número de estiramentos e o tempo em auto-limpeza. Os resultados aqui expressos corroboram os obtidos no campo aberto e indicam um perfil ansiolítico da suplementação dietética com quiabo e com rutina.

O terceiro teste comportamental empregado neste experimento foi o teste da Placa Perfurada. A exposição a este novo ambiente provoca nos animais um conflito: ao mesmo tempo em que há uma motivação para se manter em segurança junto às paredes da arena, a presença de orifícios e o cheiro da ração posicionada imediatamente abaixo de cada orifício motiva o comportamento exploratório, exibido na forma de mergulhos de cabeça nos orifícios. Nesta situação, animais com baixos níveis de ansiedade manifestarão um aumento no número de mergulhos (MONTGOMERY, 1955, TAKEDA; TSUJI; MATSUMIYA, 1998). Além do número de mergulhos, também foi verificada a latência para o primeiro mergulho, com base no procedimento utilizado por Takeda, Tsuji e Matsumiya (2006) em seu estudo. O tempo de latência para o primeiro mergulho em um dos orifícios da placa perfurada foi diminuído nos camundongos que se alimentaram com ração suplementada com quiabo e com rutina, de modo similar ou superior ao efeito obtido pelo tratamento com diazepam e significativamente menor que o efeito produzido pelo tratamento com pentilenotetrazol. Os resultados obtidos com o tratamento dietético se aproximam ou superam os resultados obtidos com o uso de diazepam, o que confirma o efeito com perfil ansiolítico encontrado nos testes do Campo Aberto e do Labirinto em Cruz Elevado. O número de mergulhos não foi alterado pela adição de quiabo como fonte do flavonóide rutina na ração experimental. Isso demonstra que não houve aumento da atividade exploratória neste modelo de análise de comportamento.

No presente estudo, foi possível mostrar que a concentração de flavonóides consumida pela população brasileira, baseada em um alimento contendo rutina, exibiu efeitos com perfil ansiolítico, prevenindo o aparecimento da ansiedade, quando em comparação com camundongos recebendo dieta isenta de quiabo, ou auxiliando no controle da ansiedade, em comparação com camundongos nos quais a ansiedade foi induzida com o uso de pentile-notetrazol. O papel da rutina no efeito ansiolítico observado foi evidenciado quando a dieta foi suplementada com o composto em si, em substituição ao quiabo, sendo mantidos os mesmos parâmetros nutricionais das rações experimentais. Assim, a presença ou ausência de quiabo ou rutina na dieta foi mais determinante na resposta ansiolítica do que sua concentração crescente ou administração prolongada. É pouco provável que as concentrações de rutina, proveniente do quiabo ou não, utilizadas neste estudo, tenham atingido o patamar máximo de concentração-resposta ou mesmo de absorção, com base no estudo de biodisponibilidade por perfusão intestinal *in situ* realizado anteriormente com concentração 30 vezes maior do que as concentrações oferecidas nas rações experimentais.

Finalizando, vale comentar que em seres humanos, é possível postular que as atividades farmacológicas exibidas pelo princípio ativo do quiabo, o flavonóide rutina, ofereça vantagens na promoção da saúde, através dos possíveis efeitos benéficos na prevenção e tratamento de síndromes de ansiedade, responsáveis por um importante prejuízo na qualidade de vida no mundo atual, e causa de agravos à saúde que podem conduzir ao afastamento das atividades normais e saudáveis para os seres humanos, como interação social com familiares e amigos, trabalho, e até mesmo levar à morte. Assim, a presente pesquisa contribuiu para mostrar que a administração de um flavonóide por via dietética, utilizando um alimento na sua forma integral como fonte de princípio ativo, e ainda oferecendo este alimento como parte de uma dieta normal, tem atividade biológica significativa no sentido de prevenir ou auxiliar no tratamento da ansiedade. Estudos envolvendo dieta rica em flavonóides e rutina devem ser realizados em seres humanos, a fim de verificar se os

efeitos anti-ansiedade observados neste estudo se repetem. Os resultados obtidos reforçam as recomendações dietéticas atuais que mostram a importância de estimular o consumo de uma alimentação saudável, rica em vegetais como frutas, verduras e legumes; além dos diversos efeitos benéficos à saúde já amplamente evidenciados, sugere-se que pode ser possível agregar a estes o valor preventivo e auxiliar no tratamento de distúrbios de ansiedade como resultado de uma dieta equilibrada e rica em vegetais.

7 CONCLUSÕES

- A rutina é o único flavonóide presente no quiabo maduro da cultivar Santa Cruz, disponível para comercialização no Brasil;
- A rutina perfundida no intestino de ratos, embora tenha sido absorvida, não foi detectada em tecidos desses animais, na forma de rutina ou quercetina, em quantidades suficientes para alcançar o patamar de detecção destes compostos;
- A administração de quiabo na dieta de camundongos não provocou o aparecimento de rutina ou quercetina no sangue ou cérebro desses animais, em formas ou quantidades suficientes para alcançar o patamar de detecção destes compostos;
- A suplementação dietética com quiabo ou rutina, na concentração 4,5% de QL/kg de ração e 1,2mg de rutina/kg de peso corporal/camundongo, respectivamente, equivalente a estimativa de consumo de flavonóides pela população brasileira, exibiu efeito com perfil ansiolítico em camundongos;
- A suplementação dietética com 7% e 10% de quiabo liofilizado adicionado na ração purificada também exerceu efeito com perfil ansiolítico em camundongos;
- Foram observados efeitos ansiolíticos em todos os períodos de tratamento com ração suplementada com quiabo e rutina;
- A presença ou ausência de quiabo ou rutina na dieta foi mais determinante na resposta ansiolítica do que sua concentração crescente ou administração prolongada;
- O efeito ansiolítico exercido pela suplementação com quiabo e com rutina foi similar ou maior que o efeito do ansiolítico diazepam e contrário ao efeito do ansiogênico pentilenotetrazol, em camundongos, nos modelos experimentais campo aberto, labirinto em cruz elevado e placa perfurada;
- Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que o quiabo pode fornecer flavonóides, os quais são biodisponíveis e que, quando consumidos como parte de uma dieta composta por todos os nutrientes essenciais, tem efeito com perfil ansiolítico em camundongos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 4 ed. Washington, DC: American Psychiatry Press (DSM-IV). 1994.
- ANDREATINI,R.; BOERNGEN-LACERDA,R.; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 23, n. 4, p. 233-242, 2001.
- ANDREWS,G; SANDERSON,K.; SLADE,T.; ISSAKIDIS. Why does the burden of disease persist? Relating the burden of anxiety and depression to effectiveness of treatment. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 78, n.4, Genebra, 2000.
- ANSARI, N.M.;HOULIHAN, L.;HUSSAIN,B.;PIERONI,A. Antioxidant activity of five vegetables traditionally consumed by South-Asian migrants in Bradford, Yorkshire, UK. *Phytotherapy Research*, v.19, p. 907-911, 2005.
- ARABBI,P.R.;GENOVESE,M.I.;LAJOLO,F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the brazilian population. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, v. 52, p. 1124-1131, 2004.
- ÂREAS, J.A.G., LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening. 1. The phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. *Journal of Food Biochemistry*, v. 5 , n. 1, p. 19-37, 1981.
- ARON, P.M., KENNEDY, J.A. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 52, p. 79-104, 2008.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis*. 16 ed. Washington, DC; 1995.
- BELZUNG, C.; PHILIPPOT, P. Anxiety from a phylogenetic perspective: is there a qualitative difference between human and animal anxiety? *Neural Plasticity*, v. 2007, 17 p., 2007.
- BERNARDI, M.M.; PALERMO-NETO. Atividade Geral: Conceito e medida. *Psicologia*, v. 6, p. 43-55, 1980.
- BHAT, U.R., THARANATHAN, R.N. Fractionation of okra mucilage and structural investigation of an acidic polysaccharide. *Carbohydrate Research*, v. 148, p. 143-147, 1986.
- BOISSIER, J.R.; SIMON, P. La reaction d'exploration chez la souris. *Therapies*, v. 17, p. 1225-1232, 1962.
- BOUAYED,J.;RAMMAL,H.;DICKO,A. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 262, p. 77-84, 2007.
- BOURRE, J.M. Effects of nutrients (in foods) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements for brains. Part 2: macronutrients. *Journal of Nutrition & Aging*, v. 10, n. 5, p. 386-399, 2006a.

BOURRE, J.M. Effects of nutrients (in foods) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements for brain. Part 1: micronutrients. *Journal of Nutrition & Aging*, v. 10, n. 5, p. 377-385, 2006b.

BOUWKNECHT, J.A.; OLIVIER, B.; PAYLOR, R.E. The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: a review of pharmacological and genetic studies in the mouse. *Neuroscience & Biobehavioural Reviews*, v. 31, p. 41-59, 2007.

BRISKIN, D. P. Medical plants and phytomedicines: linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*, v. 124, p. 507-514, 2000.

BROADHURST, P.L. Experiments in psychogenetics. In: Eisenk, H.J. Experiments in Personality. London, Routledge & Kegan Paul, 31-71, 1960.

BUCHNER, N.; KRUMBEIN, A.; ROHN, S.; KROH, L.W. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetina. *Rapid Communications Mass*, sp 20, p. 3229-3235, 2006.

COLETA, M.; CAMPOS, M.G.; COTRIM, M.D.; LIMA, T.C.M.; CUNHA, A.P. Assessment of luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) neuropharmacological activity. *Behavioural Brain Research*, v. 189, p. 75-82, 2008.

CORDENUNSI, B.R.; SHIGA, T.M.; LAJOLO, F. Non-starch polysaccharide composition of two cultivars of banana (*Musa acuminata* L.: cvs Mysore and Nanicão). *Carbohydrate Polymers*, v. 71, p. 26-31, 2008.

COSTA, R. P.; MARTINEZ, T. L. R. Terapia Nutricional na Hipercolesterolemia. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*: SP, v. 7, n. 4, 1997.

CROZIER, A.; LEAN, M.E.J.; MCDONALD, M.S.; BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, v. 45, p. 590-595, 1997.

DANIEL, O.; MEIER, M.S.; SCHLATER, J.; FRISCHKNECHT, P. Selected phenolics compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications and modulation by pesticides. *Environmental Health Perspectives*, v. 107, n.1, p. 109-114, 1999.

DAY, A.J.; BAO, Y.; MORGAN, M.R.A.; WILLIAMSON, G. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 29, n. 12, p. 1234-1243, 2000.

DE BLAS, A.L.; SANGAMESWARAN, L. Demonstration and purification of an endogenous benzodiazepine from the mammalian brain with a monoclonal antibody to benzodiazepines. *Adv. Biochem. Psychopharmacology*, v.42, p.57-67, 1986.

DE BLAS, A.L.; SANGAMESWARAN, L. Purification of an endogenous benzodiazepine-like substances from the mammalian brain. *Advanced Biochemical and Psychopharmacology*, v. 42, p. 57-67, 1986b.

DE VRIES, J.H.; JANSSEN, P.L.; HOLLMAN, P.C.; VAN STAVEREN, W.A.; KATAN, M.B. Consumption of quercetin and kaempferol in free-living subjects eating a variety of diets. *Cancer Letters*, v. 114, p. 141-144, 1997.

DEKERMENDJIAN, *et al.* Structure-activity relationships and molecular modeling analysis of flavonoids binding to the benzodiazepine site of rat brain GABA_A receptor complex. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, p. 4343-4350, 1999.

DEMYTTENAERE, K.; BRUFFAERTS, R.; POSADA-VILLA, J.; GASQUET, I.; KOVESS, V.; LEPINE, J.P.; ANGERMEYER, M.C.; BERNERT, S.; DE GIROLAMO, G.; MORISINI, P.; POLIDORI, G.; KIKKAWA, T.; KAWAKAMI, N.; ONO, Y.; TAKESHIMA, T.; UDA, H.; KARAM, E.G.; FAYYAD, J.A.; KARAM, A.N.; MNEIMNEH, Z.N.; MEDINA-MORA, M.E.; BORGES, G.; LARA, C.; DE GRAAF, R.; ORMEL, J.; GUREJE, O.; SHEN, Y.; HUANG, Y.; ZHANG, M.; ALONSO, J.; HARO, J.M.; VILAGUT, G.; BROMET, E.J.; GLUZMAN, S.; WEBB, C.; KESSLER, R.C.; MERIKANGAS, K.R.; ANTHONY, J.C.; VON KORFF, M.R.; WANG, P.S.; BRUGHA, T.S.; AGUILAR-GAXIOLA, S.; LEE, S.; HEERINGA, S.; PENNELL, B.E.; ZASLAVSKI, A.M.; USTUN, T.B.; CHATTERJI, S. WHO: World Mental Health Survey Consortium: Prevalence, severity, and unmet need for treatment of mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *JAMA*, v. 291, n. 21, p. 2581-2590, 2004.

DHAWAN, K., KUMAR, S., SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. *J. Ethnopharmacol.*, v. 78, p. 165-170, 2001.

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

Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride. Washington: National Academic Press, 1997.

Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline. Washington: National Academic Press, 1998.

Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Washington: National Academic Press, 2000.

Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride and sulfate. Washington: National Academic Press, 2004.

DIXON, R.A.; SUMNER, L.W. Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal care. *Plant Physiology*, v. 131, p. 878-885, 2003.

FADEM, B. Behavioural sciences in medicine. London: Lippincott Williams & Williams, 2004.

FELGINES, C.; TEXIER, O.; MORAND, C.; MANACH, C.; SCALBERT, A, *et al.* Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *American Journal of Physiology Gastrointestinal & Liver Physiology*, v. 279, p. 1148-54, 2000.

FILE, S. E.; HYDE, J. R. G. A test of anxiety that distinguishes between the actions of benzodiazepines and those of minor tranquilizers and stimulants. *Pharmaceutical & Biochemistry Behavioral*, v. 11, p. 65-69, 1979.

FILE, S.E.; LIPPA, A.S.; BEER, B.; LIPPA, M.T. Animal tests of anxiety. *Current protocols in Neuroscience*, capítulo 8, unidade 8.3, 2004.

FILE, S.E.; PELOW, S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. *British Journal of Pharmacology*, v. 86, p. 729-735, 1985.

FILE, S.E.; ZANGROSSI, JR. , H.; ANDREWS, N. Social interaction and plus-maze tests: changes in release and uptake of 5-HT and GABA. *Neuropharmacology*, v. 32, p. 217-221, 1993.

FILISETI-COZZI, T.M.C.C., LAJOLO, F.M. Fibra alimentar insolúvel e solúvel em alimentos brasileiros. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, v. 27, n. 1, p. 83-99, 1991.

GABOR, M. Szent-Györgyi and the bioflavonoids: new results and perspectives of pharmacological research into benzo-pyrone derivatives. In: CODY, V.; HARBORNE, J.B.; BERETZ, A. (Eds.). *Plant flavonoids in biology and medicine. II. biochemical, cellular and medical properties*, Progress in clinical and biological research (p. 1-15). New York: A.R Liss, 1988.

GEE, J.M., *et al.* Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Rad. Biol. Med.*, 25 (1): 19-25, 1998.

GILBERT, K. G. ; COOKE, D. T. Dyes from plants: past usage, present understanding and potential. *Plant Growth Regulation*, v. 34, p. 57-69, 2001.

GOUTMAN, *et al.* Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA_A AND GABA_C receptors. *European Journal of Pharmacology*, v. 461, p. 79-87, 2003.

GRAF,B.A.; MILBURY,P.E.; BLUMBERG,J.B. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *Journal of Medicinal Food*, v. 8, n. 3, p. 281-290, 2004.

GRUSAK, M. A.; DELLAPENNA, D. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, V. 50, p.133-161, 1999.

GUARALDO, *et al.* Hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* poiret: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behavior. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72: 61-67, 2000.

HASHIMOTO. T., TORI, M., ASAKAWA, Y., WOLLENWEBER, E. The synthesis of two allergenic constituents of propolis and poplar bud excretion. *Z Naturforsch*, v. 43, p. 470-472, 1988.

HAVSTEEN,B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 96, p. 67-202, 2002.

HEGUI, E.; SUCHY, Y.; NAGY, M. Propolis allergy. *Hausarzt*, v. 41, p. 675-679, 1990.

HERTOG, M.G., HOLLMAN, P.C., KATAN, M.B. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutritional Cancer*, v. 20, n. 1, p. 21-29, 1993.

HERTOG, M.G.L., *et al.* Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Archives International Medicine*, v. 155, p. 381, 1995.

HERTOG, M.G.L., HOLLMAN, P.C.H., KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, v. 40, p. 2379, 1992.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VENEMA, D.P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetable and fruits. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, v. 40, p. 1591-1598, 1992.

HOFFMAN, S.G.; POLLACK, M.H.; OTTO, M.W. Augmentation treatment of psychotherapy for anxiety disorders with D-cycloserine. *CNS Drug Reviews*, v. 12, p. 208-217, 2006.

HOLLMAN, P.C.; BIJSMAN, M.N.; VAN GAMEREN, Y.; CNOSSEN, E.P.; DE VRIES, J.H.; KATAN, M.B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research*, v. 31, p. 569-573, 1999.

HOLLMAN, P.C.H.; ARTS, C.W. Flavonols, flavones and flavanols- nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*, v. 80, p. 1081-1093, 2000.

HOLLMAN, P.C.H.; DE VRIES, J.H.; VAN LEEUWEN, S.D.; MENGELERS, M.J.; KATAN, M.B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 62, p. 1276-1282, 1995.

HOLLMAN, P.C.H.; HERTOG, M.G.L.; KATAN, M.B. Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 24: 1996.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chemistry & Toxicology*, v. 37, p. 937-942, 1999.

HOVATTA, L.; TENNANT, R.S.; HELTON, R.; MARR, R.A.; SINGER, O.; REDWINE, J.M. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature*, v. 438, p. 662-666, 2005.

HUEN, M.S.Y.; HUI, K.M.; LEUNG, J.W.C.; SIGEL, E.; BAUR, R.; WONG, T.F.; XUE, H. Naturally occurring 2'-hydroxyl-substituted flavonoids as high-affinity benzodiazepine site ligands. *Biochemical Pharmacology*, v. 66, p. 2397-2407, 2003.

IOKU, K.; PONGPIRIYADACHA, Y.; KONISHI, Y.; TAKEI, Y.; NAKATANI, N.; TERAOKA, J. B-glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 62, n. 7, p. 1428-1431, 1998.

IVINISKIS, A. A study of vality of open-field mesures. Australian Journal of Physiology, 22: 175-183, 1970.

JOHNSTON, G.A.R.;BEART, P.M. Flavonoids: some of the wisdom of sage? British Journal of Nutrition, v. 142, p. 809-810, 2004.

KALT, W.; BLUMBERG, J.B.; MCDONALD, J.E.; VINQVIST-TYMCHUK, M.R.; FILL-MORE, S.A.; GRAF, B.A.; O'LEARY, J.M.; MILBURY, P.E. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. Journal of Agricultural & Food Chemistry, v. 56, n. 3, p. 705-712, 2008.

KALUEFF, A.V. Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behavior. Neural Plasticity, v. 2007, p. 12, 2007.

KANDEL, E.R.; SCHWÄRTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Principles of neural science. 4 ed. New York: McGraw-Hill, 2000. 1414p.

KARL,T.; PABST, R.; VON HÖRSTEN, S. Behavioural phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. Experimental & Toxicological Pathology, v. 55, n. 1, p. 69-83, 2003.

KATSUBE,T.;IMAKAWA,N.;KAWANO,Y.;YAMAZAKI,Y.;SHIWAKU,K.;YAMANE,Y. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. Food Chemistry, v. 97, p. 25-31, 2006.

KELLEY, A.E. Locomotor activity and exploration. In: Haaren, F., ed. Methods in behavioral pharmacology. New York: Elsevier. p. 499-516,1993.

KLEIN,D.N.;RISO,L.P. Psychiatric Disorders: problems of boundaries and comordity. In: COSTELLO,C.G. Basic issues in psychopatology, United Kingdom: Glilford Press, 1993. 465 p.

KNEKT, P., JARVINEN, R., REVNANEN, A., MOATELA, J. Flavonoid intake and coronary mostality in Finland: a cohort study. BMJ, 312-478, 1997.

KÜHNAU, J. The flavonoids, a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. World Rev. Nutr. Diet., 24: 117, 1976.

KULIKOV,A.V.; TIKHONOVA,M.; KULIKOV,V.A. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting. Journal of Neuroscience Methods, v. 170, p. 345-351, 2008.

KULOGLU,M.; ATMACA,M.; TEZCAN,E.; GECICI,O.; TUNCKOL,H.; USTANDAG,B. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive-compulsive disorder. Neuropsychobiology, v. 46, p. 27-32, 2002a.

KULOGLU,M; ATMACA,M.; TEZCAN,E.; GECICI,O.; USTANDAG,B.; BULUT,S. Anti-oxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. Neuropsychobiology, v. 46, p. 186-189, 2002b.

KUMAR, S.;SHARMA,A. Anti-anxiety activity studies on homoeopathic formulations of *Turnera aphrodisiaca* ward. eCAM, v. 2, n. 1, p. 117-119, 2005.

KUMAR,S.;SHARMA,A. Apigenin: the anxiolytic constituent of *Turnera aphrodisiaca*. Pharmaceutical Biology, v. 44, n. 2, p. 84-90, 2006.

LADER,M.H. The nature and duration of treatment for GAD. Acta Psychiatrica Scandinavica, v. 98, n. s393, p. 109-117, 1998.

LAKHAN,S.E., VIEIRA,K.F. Nutritional therapies for mental disorders. Nutrition Journal. v. 7, n. 2, 2008.

LENGSFELD, C. et al. Glycosilated compounds from okra inhibit adhesion of *Helicobacter pilori* to human gastric mucosa. Journal of Agricultural & Food Chemistry. v 52. p. 1495-1503, 2004.

LIAO, J.F.; JAN, Y.M.; HUANG, S.Y.; WANG, H.H.; YU, L.L.; CHEN, C.F. Evaluation with receptor binding assay on the water extracts of ten CNS-active Chinese herbal drugs. Proceedings of the National Science Council of Republic China B, v. 19, n. 3, p. 151-158, 1995.

LIAO,J.F.;HUNG,W.Y.;CHEN,C.F. Ansiolytic-like effects of baicalein and baicalin in the Vogel conflict test in mice. European Journal of Pharmacology, v. 464, p. 141-146, 2003.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal model of anxiety disorders. Pharmacol. Ther., 46: 321-340, 1990.

MAKRIS,D.P.; ROSSITER,J.T. Domestic processing of onion bulbs (*Allium cepa*) and Asparagus spears (*Asparagus officinalis*): effect on flavonol content and antioxidant status. Journal of Agricultural & Food Chemistry, v. 49, p. 3216-3222, 2001.

MANACH, C.; DONOVAN, J.L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. Free Radical Research, v. 38, p. 771-785, 2004.

MANACH, C.; MORAND, C.; CRESPIY, V.; DEMIGNE, C.; TEXIER, O.; REGERAT, F.; REMESY, C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives wich retain antioxidant properties. FEBS Letters, v. 426, p. 331-336, 1998.

MANACH,C.; MORAND,C.; TEXIER,O.; FAVIER,M.L.; AGULLO,G.; DEMIGNE,C.; REGERAT,F.; REMESY,C. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. Journal of Agricultural & Food Chemistry, v.53, n.1, p. 158-163, 2005.

MANDEL,S.; PACKER,L.; YODIM,M.B.H.; WEINREB,O. Proceedings from the "Third International Conference on Mechanism of Action of Nutraceuticals". Journal of Nutritional Biochemistry, v. 16, p. 513-520, 2005.

Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais/DSM IV (Associação Americana de Psiquiatria, 1994.

MARTIN, P. Animal models sensitive to anti-anxiety agents. Acta Psychiatric Scandinavian, v. 98, sup. 393, p. 74-80, 1998.

- MARTINEZ-FLORES, S.;GONZÁLEZ-GALLEGO, J.;CULEBRAS, J.M.;TUÑÓN, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, v. XVII, n. 6, p. 271-278, 2002.
- McINTYRE,R.S.;FALLU,A.;KONARSKI, J.Z. Measurable outcomes in psychiatric disorders: remission as a marker of wellness. *Clinical Therapeutics*, v. 28, n. 11, p. 1882-1891, 2006.
- MEDINA, J.H., PALADINI, A.C., IZQUIERDO, I. Naturally occurring benzodiazepines and benzodiazepines-like molecules in brain. *Behavioral Brain Res.*, 58: 1-8, 1993.
- MEDINA, J.H.;VIOLA,H.;WOLFMAN,C. Overview – flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. *Neurochemical Research*, v. 22, p. 419-425, 1997.
- MEER,P.V.; RABER,J. Mouse behavioural analysis in systems biology. *Biochemistry Journal*, v. 389, p. 593-610, 2005.
- MIDDLETON, E.J. Effect of plant flavonoids on immune and antiinflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, v. 439, p.175-182, 1998.
- MONTGOMERY, KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, v. 48, p. 254-260, 1955.
- MORAND, C.; MANACH, C.; CRESPIY, V.; REMESY, C. Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetina forms and is not present in rat plasma. *Free Radical Research*, v. 33, p. 667-676, 2000.
- MOTA, W.F.;FINGER, F.L.;SILVA, D.J.H.;CORRÊA, P.C.;FIRME, L.P.;NEVES, L.L.M. Caracterização físico-química de frutos de quatro cultivares de quiabo. *Horticultura Brasileira*, v. 23, p. 722-725, 2005.
- NAGATA, C.; TAKATSUKA, N.; KAWAKAMI, N.; SHIMIZU, H. Soy product intake and hot flashes in Japanese women: results from a community-based prospective study. *American Journal of Epidemiology*, v. 153, p. 790-793, 2001.
- NASSIRI-ASL,M.;SHARIATI-RAD, S.;ZAMANSOLTANI, Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. *Progress in Neuro-Phychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 32, p. 989-993, 2008.
- NASSIRI-ASL,M.;SHARIATI-RAD,S.;ZAMANSOLTANI,F. Anticonvulsivant effects of aerial parts of *Passiflora incarnata* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opiod receptors. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 7, p. 26, 2007.
- OGNIBENE, E.;BOVICELLI, P.;ADRIANI, W.;SASO,L.;LAVIOLA,G. Behavioral effects of 6-bromoflavanone and 5-methoxy-6,8-dibromoflavanone as anxiolytic compounds. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 32, p. 128-134, 2008.

2. ÖZCAN, M.; UDZ, F.; ÇÝLLÝ, A.S. The prevalence of generalized anxiety disorder and comorbidity among psychiatric outpatients. *Turkish Journal of Psychiatry*. V. 17 (4), 2006.
- PAGANGA, G.; RICE-EVANS, C.A. The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Letters*, v. 401, p. 78-82, 1997.
- PALADINI, A.C.; MARDER, M.; VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; WASOWSKI, C.; MEDINA, J.H. Flavonoids and the Central Nervous System: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. *Journal of Pharmaceutics & Pharmacology*, v. 51, p. 519-526, 1999.
- PARÉ, P. Biological activity and future directions for flavonoids. In: 2000 years of natural products research – *past, present and future*. Proceedings of the congress held July 26-30, The Netherlands: Amsterdam, Phytoconsult, 1999.
- PAULKE, A.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; WURGLICS, M. Determination of St. John's wort flavonoid-metabolites in rat brain through high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. v. 832. p. 109-113, 2006.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validations of open-close arm entries in an elevated plus-maze as measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. v. 14, p. 149-167, 1985.
- PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drugs effects on exploratory activity in as elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacological & Biochemical Behavior*. v. 24, p. 525-29, 1986.
- PERES, E.P. Metabolismo Secundário. In: RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. *Botânica econômica brasileira*. São Paulo, EPU, EDUSP, 1976. 119 p.
- PIERONI, A.; PRICE, L.L. *Eating and healing: traditional foods as medicine*. Hawoth Press: Binghamton, New York, 2005.
- PINHEIRO, G.A.; ALVES, S.H.S.; MURCE, P.P.; CRUZ, A.P.M. Envolvimento dos receptores 5-HT₂ da amígdala nos níveis de ansiedade induzidos pela exposição de ratos ao labirinto em cruz elevado. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, v. 18, n.3, p. 329-335, 2002.
- PRICE, K.R.; PROSSER, T.; RICHETIN, A.M.F.; RHODES, M.J.C. A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples: distribution within the fruit and effect of juicing. *Food Chem*. v. 66, p. 489-494, 1999.
- PROSKY, L.; ASP, N.G.; SCHNEIZER, T.F.; DEVRIES, J.W.; FURDA, I. Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and products: collaborative study. *Journal of Association Off Analitical Chemistry*. v. 75, n. 2. p. 360-367, 1992.
- RAMOS, A.; BERTON, O.; ORMEDE, P.; CHAOULOFF, F. A multiple-test study of anxiety related behaviours in six inbred rat strains. *Behavioral Brain Research*, v. 85, p. 57-69, 1997.

- REEVES, P.G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. Symposium: Animal diets for nutritional and toxicological research. *Journal of Nutrition*. v. 127. p. 838S-841S, 1997.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diet for laboratory rodents: final report of the american institute of nutrition writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*, v. 123, p. 1939-1951, 1993.
- RIMM, E.B., et al. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann. Intern. Med.*, 12: 384, 1996.
- RODGERS, R.J. & COLE, J.C., Influence of social isolation, gender, strain and prior novelty on plus-maze behavior in mice. *Physiological Behavior*, v. 53, p. 383, 1993.
- RODRIGUES, H.G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L.A.; ALMEIDA, J.A.; FERNANDES, A.A.H.; NOVELLI, S.S. Nutritional supplementation with natural antioxidants: effect of rutin on HDL-cholesterol concentration. *Revista de Nutrição*, v. 13, n. 3. p. 315-320, 2003.
- ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Annual Reviews of Nutrition*, v. 22, p. 19-34, 2002.
- ROTH, B.L.; LOPEZ, E.; BEISCHEL, S.; WESTKAEMPER, R.B.; EVANS, J.M. Screening the receptorome to discover the molecular targets for plant-derived psychoactive compounds: a novel approach for CNS drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 102, p. 99-110, 2004.
- RUIZ-RODRIGUES, A.; MARÍN, F.R.; OCAÑA, A.; SOLER-RIVAS, C. Effect of domestic processing on bioactive compounds. *Phytotherapy Research*, v. 7. p. 345- 384, 2008.
- RUSZNYÁK, ST.; SZENT-GYÖRGYI, A. Vitamin P: flavonoids as vitamins. *Nature*, v. 138, p. 27, 1936.
- RUTTEN, A.A.J.J.L.; GROOT, A.P. Comparison of cereal-based diet with purified diet by short-term feeding studies in rats, mice and hamsters, with emphasis on toxicity characteristics. *Food Chemistry & Toxicology*, v. 30, p. 601-610, 1992.
- RYMASZEWSKA, J.; DZIELAK, K.; KIEJNA, A. Incapacity for work and disability pensions in persons with mental disorders. *Psychiatria Polska*, v. 41, n. 2, p. 171-180, 2007.
- SAKAKIBARA, H.; HONDA, Y.; NAKAGAWA, S.; ASHIDA, H.; KANAZAWA, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Food & Agricultural Chemistry*, v. 51, n. 3, p. 571-581, 2003.
- SALGUEIRO, J.B.; ARDENGUI, P.; DIAS, M.; FERREIRA, M.B.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. *Pharmacological Biochemical Behavior*, v. 58, n. 4, p. 887-891, 1997.

SANDFORD, J.J.; ARGYROPOULOS, S.V.; NUTT, D.J. The psychobiology of anxiolytic drugs Part I: basic neurobiology. *Pharmacol. & Therapeutics*, v. 88, p. 197-212, 2000.

SANGAMESWARAN, L.; DE BLAS, A.L. Demonstration of benzodiazepine-like molecules in the mammalian brain with a monoclonal antibody to benzodiazepines. *Proceedings National Academic Science U.S.A.*, v. 82, n. 16, p. 5560-5564, 1985.

SANGAMESWARAN, L.; FALES, H.M.; FRIEDRICH, P.; DE BLAS, A.L. Purification of a benzodiazepine from bovine brain and detection of benzodiazepine-like immunoreactivity in human brain. *Proceedings National Academic Sciences U.S.A.*, v. 83, n. 23, p. 9236-9240, 1986a.

SESINK, A.L.A.; OLEARY, K.A.; HOLLMAN, P.C.H. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetina-3-glucoside or quercetina-4-2-glucoside. *Journal of Nutrition*, v. 131, p. 1938, 1941, 2001.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia. Da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da UFSC/ Editora da Universidade UFRGS. 2002, 833p.

SKIBOLA, C.F.; SMITH, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology & Medicine*, v.29, n. 3-4, p. 375-383, 2000.

SPENCER, J.P.E. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *Journal of Nutrition*, v. 133, p. 3255-3261, 2003.

SPENCER, J.P.E.; CHOWRIMOOTOO, G.; CHOUDHURY, R.; DEBNAM, E.S.; SRAI, S.K.; RICE-EVANS, C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Letters*, v. 458, p. 224-230, 1999.

SPENCER, J.P.E.; SCHROETER, H.; RECHNER, A.R.; RICE-EVANS, C. Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. *Antioxidant Redox Signal*, v. 3, p. 1023-1039, 2001.

SPENCER, J.P.E.; MOHSEN, M.M.A.E.; MINIHANE, A.M.; MATHERS, J.C. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*, v. 99, p. 12-22, 2008.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos/USP. Disponível em: www.fcf.usp.br/tabela/

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. v. , p. 21-29, 1998.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic states in mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 102, p. 377-386, 2006.

TEUNOU,E.; FITZPATRICK,J.J. Characterization of food powder flowability. Journal of Food Engineering, v. 39, n. 1, p. 31-37, 1999.

TYRER,P.; SEIVEWRIGHT,N.; FERGUSON,B.; TYRER,J. The general neurotic syndrome: a coaxial diagnosis of anxiety, depression and personality disorder. Acta Psychiatrica Scandinavica, v. 85, n. 3, p. 201-206, 1992.

USDA Nutrient Database. Disponível em: www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search.

VAN DER WOUDE,H.; BOERSMA,M.G.; VERVOORT,J.; RIETJENS,I.M.C.M. Identification of 14 quercetin phase II mono- and mixed conjugates and their formation by rat and human phase II in vitro model systems. Chemical Research in Toxicology, v. 17, n. 11, p. 1520-1530, 2004.

VIOLA,H.; WASOWSKI,C.; LEVI DE STEIN,M.; WOLFMAN,C.; SILVEIRA,R.; DAJAS,F.; MEDINA,J.H.; PALADINI,A.C. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. Planta Medica, v. 61, p. 213-216, 1995.

WALGREN, R.A.; WALLE, U.K.; WALLE, T. Transport of quercetina and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. Biochemistry & Pharmacology, v. 55, p. 1721-1727, 1998.

WALLE,T.; OTAKE,Y.; WALLE,U.K.; WILSON,F.A. Quercetin glucosides are completely hydrolysed in ileostomy patients before absorption. The Journal of Nutrition, v. 130, p. 2658-2661, 2000.

WATANABE,C.M.H.; WOLFRAM,S.; ADER,P.; RIMBACH,G.; PACKER,L.; MAGUIRE,J.J.; ACHULTZ,P.G.; GOHIL,K. The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine *Ginkgo biloba*. PNAS, v. 98, n. 12, p. 6577-6580, 2001.

WILLIAMSON, G.; HOLST, B. Dietary reference intakes (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? British Journal of Nutrition, v. 99, n. 3, p. S55-S58, 2008.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. Plant Physiology, v. 126, p. 485-493, 2001.

WOLFMAN,C.;VIOLA,H.;PALADINI,A.;DAJAS,F.;MEDINA,J.H. Possible anxiolytic effects of chrisin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. Pharmacological & Biochemical Behavior, v. 47, p. 1-4, 1994.

WONG, C.G.T.; SNEAD III, O.C. The GABA_A receptor: subunit-dependent functions and absence seizures. Epilepsy Currents, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The tenth revision of the international classifications of disease and related health problems (ICD-10). Geneva: World Health Organization, 1992.

- WURTMAN,R.; O'ROURKE,D.; WURTMAN,J.J. Nutrient imbalances in depressive disorders: possible brain mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* v. 575. P. 75-82,1989.
- YILMAZ,Y.; TOLEDO,R.T. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, v. 52, n. 2, p. 255-260, 2004.
- YOU DIM,K.A.; SHUKITT-HALE,B.; JOSEPH,J.A. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the Central Nervous System. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 37, p. 1683-1693, 2004.
- YOUNG,S.N. Clinical nutrition: 3. The fuzzy boundary between nutrition and psychopharmacology. *CMAJ.* v. 166, n.2, p. 205-209, 2002.
- YOUNG,S.N. Folate and depression – a neglected problem. *Journal of Psychiatry Neuroscience.* v. 32, n.2, p. 80-82, 2007.
- ZHANG,A.J. Therapeutics effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sciences*, v. 75, p. 1659-1699, 2004.
- ZHANG,L.; ZUO,Z.; LIN,G. Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids. *Molecular Pharmaceutics*, v. 4, n. 6, p.833-845, 2007.