



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE MEDICINA

**BRUNA SILVA DE MELO  
DIENIFER NEGRÃO MARQUES**

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, ELETROMIOGRÁFICAS E  
ELETROENCEFALOGRÁFICAS EM RATOS WISTAR CAUSADAS PELA  
INJEÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *NERIUM OLEANDER LINN*: uma nova  
descrição**

BELÉM-PA  
2019

BRUNA SILVA DE MELO  
DIENIFER NEGRÃO MARQUES

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, ELETROMIOGRÁFICAS E  
ELETROENCEFALOGRÁFICAS EM RATOS WISTAR CAUSADAS PELA  
INJEÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *NERIUM OLEANDER LINN*: uma nova  
descrição**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de  
Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará para  
obtenção de grau de Bacharel em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Moisés Hamoy

BELÉM  
2019

BRUNA SILVA DE MELO  
DIENIFER NEGRÃO MARQUES

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, ELETROMIOGRÁFICAS E  
ELETROENCEFALOGRÁFICAS EM RATOS WISTAR CAUSADAS PELA  
INJEÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *NERIUM OLEANDER LINN*: uma nova  
descrição**

**Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Instituto de Ciências da Saúde da  
Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção de grau de  
Bacharel em Medicina.**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Moisés Hamoy  
Universidade Federal do Pará – UFPA  
Orientador

---

Profa. Dra. Vanessa Joia de Mello  
Universidade Federal do Pará - UFPA  
Examinadora Interna

---

Profa. Msc. Rômulo Augusto Feio Farias  
Universidade Federal do Pará - UFPA  
Examinador Interno

---

Profa. Dra. Márcia Cristina Freitas da Silva  
Universidade Federal do Pará - UFPA  
Examinador Interno

**Aprovado em:** 13/05/2019

**Conceito:** Excelente

Dedico aos meus familiares: Maria Izabel, Andreia Cardoso, Vitor Cardoso, Delbanor Campos, Paula Borges, Andrey Gabriel, Maria Eduarda e Cristiane Lopes.

Bruna Silva de Melo.

Dedico a Deus, minha fortaleza. Aos meus pais e razão da minha vida, Antonia de Jesus Negrão e Dulcivaldo da Conceição Marques. Aos meus avós paternos, Irene da Conceição Marques e Dorival dos Passos Marques (in memorian), aos meus avós maternos, Maria da Conceição Cardoso Negrão e Antonio Amorim Negrão (in memorian).

Dienifer Negrão Marques.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por ser essencial em nossas vidas e por ter nos concedido a bênção de realizar esta graduação. Ele nos proporcionou a força e a coragem diária para enfrentar todos os desafios.

Agradecemos a nossa família e as pessoas que de forma direta contribuíram com o apoio e sustento ao longo desta caminhada.

Agradecemos ao professor e orientador, Dr. Moisés Hamoy, um grande exemplo de profissional. Obrigada pela compreensão, dedicação e empenho em desenvolver conosco este trabalho.

A todos os colaboradores que participaram na execução deste trabalho.

Aos docentes da faculdade que estiveram presentes ao longo da nossa formação acadêmica partilhando seus conhecimentos e valores.

À Faculdade de Medicina e a Universidade Federal do Pará

“O método natural de ensino começa com o paciente, continua com o paciente e termina com o paciente, usando livros e aulas como ferramentas para este fim”.

(WILLIAM OSLER)

## RESUMO

*Nerium oleander* Linn é um arbusto Apocynaceae - está entre as plantas ornamentais mais tóxicas, especialmente para crianças e animais - potencialmente capaz de levar à morte se ingerido. Há poucos estudos relacionando ao *N. oleander* e alterações neurais e comportamentais na literatura atual. O presente estudo tem como objetivo descrever novos efeitos do extrato etanólico de *N. oleander* (EENO). A oleandrina foi separada e confirmada por extração líquido-líquido e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), em coluna de fase reversa C18 e empregando água-acetonitrila (63:37) (v/v) como uma fase móvel. O EENO foi injetado por uma dose: 150 mg / kg i.p para um total de 63 ratos wistar divididos em grupos de 9 animais. O teste comportamental demonstrou duas fases da atividade do SNC, fase I de miorelaxamento e depressão e a fase II com excitabilidade, as duas fases foram verificadas por eletroencefalograma (EEG) e eletromiograma (EMG) dos animais. O surto de convulsões causado pelo extrato indica a possibilidade de inclusão no protocolo terapêutico de anticonvulsivantes, como o diazepam, principalmente em pessoas mais suscetíveis como nos pacientes epiléticos.

**Palavras-chave:** *Nerium oleander*. Eletroencefalograma. Eletromiograma. Toxicidade. Sistema Nervoso Central.

## ABSTRACT

*Nerium oleander* Linn is a *Apocynaceae* shrub – it is among the most toxic ornamental plants, especially for children and animals – potentially able to lead to death if ingested. There are few studies relating *N.oleander* to neural and behavioral alterations in the current literature. The present study aim to describe novel effects of the Ethanolic Extract of *N.oleander* (EENO). *Oleandrin* was separated and confirmed by liquid-liquid extraction and analyzed by high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD), on a reversed phase C<sub>18</sub> column and employing water-acetonitrile (63:37) (v/v) as a mobile phase. The EENO was injected by a dose: 150mg/kg i.p. to a total of 63 wistar rats divided into groups of 9 animals. The behavioral test demonstrated two phases of CNS activity, I-phase of myorelaxation and depression and the phase II with excitability, the two phases were verified by Electroencephalogram (EEG) and Electromyogram (EMG) of the animals. The outbreak of convulsions caused by the extract indicates the possibility of inclusion in the therapeutic protocol of anticonvulsive drugs such as diazepam, especially in people who are more susceptible as in epileptic patients.

**Key Words:** *Nerium oleander*. Electroencephalogram. Electromyogram. Toxicity. Central Nervous System.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Imagem capturada da <i>Nerium oleander L.</i> , a qual evidencia as características da planta, na cidade de Belém-PA.....	15
Figura 2 – Estrutura química da Escopolamina.....	20
Figura 3 – Estrutura química do Fenobarbital .....	21
Figura 4 – Estrutura química do Diazepam.....	22
Figura 5 – Estrutura química do Fenitoína .....	24
Figura 6 – Imagem capturada da <i>Nerium oleander L.</i> na cidade de Belém – PA .....	25
Figura 7 – Cromatograma de HPLC para identificação de Oleandrina a partir de extrato de Folha. (a) Ápice de absorvância de 271 nm, (b) Tempo de retenção de 6,963 min. ....	27
Figura 8 – Demonstração do eletromiograma obtido a partir do músculo masseter. Observar o padrão de contração muscular sugestivo de convulsão (A); Ampliação da imagem A (B) Espectrograma de distribuição de energia durante o registro de contração muscular (B). (n = 9).....	32
Figura 9 – Traçado eletrocorticográfico de um animal no estado basal (A); Eletrocorticograma de animais após a aplicação da Fase EENO - I (B), característica do traçado do animal em convulsão (Fase - II) (C). ....	33
Figura 10 – Registro eletrocorticográfico obtido após a aplicação da EENO verificada duas fases (A); Espectrograma demonstrando a diferença entre a distribuição de forças entre 1 e 50 Hz para as fases I e II (B); meio de amplitude de potência distribuído a cada fase de frequência I, II e registro basal (C); Gráfico mostrando a amplitude em escala linear na frequência de 1 a 50 Hz (D). (n = 9).....	34
Figura 11 – Registro eletroencefalográfico obtido na fase II após a aplicação do fármaco na tentativa de controlar a fase -II. Demonstração do padrão de rastreamento encontrado para escopolamina (SCP) (A), fenobarbital (PBT) (B), Diazepam (BDZ) (C) e fenitoína (PHT) (D). Gráfico mostrando a atividade no controle de convulsões observado na fase II (E), onde $p < 0,05$ .....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gráfico Comportamental Analisado .....	28
Tabela 2 – Caracterização comportamental do quadro induzido após a aplicação do extrato etanólico da <i>Nerium oleander L.</i> e latência para ocorrência dos comportamentos.	
Observação feita durante 120 minutos (n=9) .....	31

## LISTA DE SIGLAS

BDT	Diazepam
CA	Califórnia
CEPAE	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais
ECoG	Eletrocorticográfico
EEG	Eletroencefalografia
EENO	Extrato Etanólico de <i>Nerium Oleander</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMG	Eletromiografia
EUA	Estados Unidos das Américas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	Receptor Tipo A do Ácido gama-aminobutírico
ILAE	International League Against Epilepsy
I.P	Intraperitoneal
LFTPN	Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais
MS	Ministério da Saúde
N	<i>Nerium</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBT	Phenobarbital
PEPS	Potencial Elétrico Excitatório Pós-Sináptico
PHT	Phenytoin
PIPS	Potencial Inibitório Pós-Sináptico
SCP	Scopolamine
SNC	Sistema Nervoso Central
UFPA	Universidade Federal do Pará
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

Na <sup>+</sup>	Sódio
K <sup>+</sup>	Potássio
pH	Potencial Hidrogênico
G	Gramma
°C	Grau Celsius
°	Grau
'	Longitude
"	Latitude
mg	Miligramma
mL	Mililitro
Kg	Quilogramma
®	Marca Registrada
µm	Micrometro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
µL	Microlitro
kHz	Quilohertz
Hz	Hertz
mV	Milivolt

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b><i>NERIUM OLEANDER LINN</i>: caracterização e efeitos tóxicos no Sistema Nervoso Central (SNC).....</b>	<b>15</b>
2.1.	CRISES CONVULSIVAS.....	16
2.2.	ELETROENCEFALOGRAMA .....	17
2.3.	ELETROMIOGRAFIA .....	18
2.4.	ESCOPOLAMINA .....	19
2.5.	FENOBARBITAL.....	21
2.6.	DIAZEPAM.....	22
2.7.	FENITOÍNA .....	23
<b>3.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>25</b>
3.1.	ANIMAIS .....	25
3.2.	EXTRAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	25
3.3.	PRODUTOS QUÍMICOS E REAGENTES.....	26
3.4.	INSTRUMENTAÇÃO .....	27
3.5.	CONDIÇÕES HPLC-DAD .....	27
3.6.	DESCRIÇÃO COMPORTAMENTAL.....	28
3.7.	ANÁLISE DO ELETROENCEFALOGRAMA DOS ANIMAIS .....	28
<b>3.7.1.</b>	<b>Cirurgia para Colocação de Eletrodos.....</b>	<b>29</b>
<b>3.7.2.</b>	<b>Registros Eletroencefalográficos .....</b>	<b>29</b>
<b>3.7.3.</b>	<b>Registros Eletromiográficos.....</b>	<b>30</b>
3.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>
	<b>APÊNDICE A - ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO NA REVISTA ETNOPHARMACOLOGICAL .....</b>	<b>50</b>
	<b>ANEXO A – FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXO B – LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA .....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo Nascimento et al. (2018), o número de plantas tóxicas existentes no Brasil, atualmente, é de 131 espécies pertencente a 79 gêneros. Essas plantas são, geralmente, utilizadas para fins ornamentais e dentre as principais, encontra-se a *Nerium oleander* (TENEDINI; MAFRA; ANJOS, 2016; FIOCRUZ/SINITOX, 2019). A *Nerium oleander* é um arbusto da família *Apocynaceae* presente na África do Sul, Estados Unidos, Malawii, regiões tropicais e subtropicais (BIONDI et al., 2008). Conhecida popularmente como espiroleira ou oleander, esse arbusto é vastamente utilizado na medicina popular no tratamento de diversas doenças que acometem humanos e animais (TANNU et al., 2011; KALAYOU et al., 2012).

A *Nerium oleander*<sup>1</sup> possui efeito anti-inflamatório e emoliente, seus componentes químicos são utilizados no tratamento de doenças como o câncer, a epilepsia, doenças dermatológicas, oftalmológicas, hanseníase, asma e cardiopatias (TANNU et al., 2011; GUPTA; MITTAL, 2010). É também utilizada para fins abortivos, alucinógenos e em quadros de suicídio (BOCHNER, 2006; EDDLESTON et al., 1998; PIETSCH et al., 2005).

Apesar da sua grande aplicabilidade em fins medicinais, a *N. oleander* também é conhecida por seu caráter altamente tóxico, podendo levar a óbito se ingerida em quantidades significativas (LORENZI; SOUZA, 2001; VASCONCELOS et al., 2009). A alta toxicidade da *N. oleander* deve-se a presença de glicosídeos cardíacos, que estão presentes em todas as partes da planta, tais como folhas, flores, rama, raízes e seivas, onde é mais concentrada (ZIBBU; BATRA, 2010).

Esses componentes são estruturalmente semelhantes à digoxina, agem inibindo a bomba sódio e potássio ATPase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase), resultando na depleção de potássio e aumento do sódio intracelular, essas alterações têm como consequência o acúmulo do cálcio citoplasmático (BELLODI; SOCHA; HATAYDE, 2014). Tal fato induz o aumento da força de contração cardíaca (efeito inotrópico positivo), assim como reduz a frequência cardíaca (efeito cronotrópico negativo) e promove hipercalemia (VITAL, 2002; BANDARA et al., 2010).

Estudos anteriores já demonstraram que intoxicação por *N. oleander* provoca fibrilação atrial e ventricular, bloqueios de condução atrioventriculares, arritmias ventriculares, alterações em eletrocardiogramas, bradicardia e taquicardia (EDDLESTON;

---

<sup>1</sup> Pontua-se que nas citações utilizadas no decorrer desta pesquisa a nomenclatura binomial “*Nerium oleander* LINN” não foi empregada pelos autores.

PHILLIPS, 2004; BANDARA et al., 2010). Além dos danos cardiovasculares, os glicosídeos cardíacos são irritantes gastrointestinais e neurológicos sobre os quais têm como sinais clínicos: dor abdominal, diarreia, sialorreia, náuseas, vômitos e em relação aos efeitos no Sistema Nervoso Central (SNC) apresenta nervosismo, fraqueza neuromuscular e convulsões (HUGHES; DART; HODGSON, 2002; TENEDINI; MAFRA; ANJOS, 2016).

Diante da contextualização, esta pesquisa tem como propósito: quais os efeitos nocivos à saúde são provocados pelo Extrato Etanólico de *Nerium Oleander* (EENO)? Sobre o qual pressupõem-se como hipóteses que o extrato da planta possui substâncias que influenciam nos componentes responsáveis pela atividade regulatória do coração e a ingestão de quantidades inadequadas da *Nerium oleander* pode provocar depressão do sistema nervoso central, que levará a quadros convulsivos.

Dessa forma, objetiva-se estudar os efeitos do quadro de intoxicação provocado pelo Extrato Etanólico de *Nerium Oleander* (EENO) sobre o organismo animal. E como objetivos específicos, apresentam-se: avaliar os níveis de depressão do sistema nervoso central por intermédio do quadro comportamental associados a alterações do eletroencefalograma quando submetido aos componentes do extrato de *Nerium oleander* e identificar as atividades convulsivas observadas na ativação da musculatura por meio dos dados de eletromiografia.

Nesta pesquisa, utiliza-se como procedimento metodológico a pesquisa experimental. Com isso, afirma-se que, esta pesquisa justifica-se pela necessidade da compreensão dos efeitos deletérios que a intoxicação pelo *Nerium oleander* pode provocar no organismo a fim de utilizar suas substâncias de forma cautelosa e ter segurança nos métodos terapêuticos ao realizar o tratamento das intoxicações pelos seus compostos.

Este trabalho encontra-se sistematizado em seis seções. Na introdução, apresenta-se o estudo, o problema de pesquisa, as hipóteses, os objetivos e o método de pesquisa utilizado. A segunda seção é composta pelo referencial teórico, no qual aborda-se o conceito, caracterização e efeitos tóxicos no Sistema Nervoso Central (SNC) pela *Nerium oleander*. Na terceira seção, apresenta-se de forma minuciosa a metodologia da pesquisa. Por conseguinte, evidencia-se os resultados almejados nesta pesquisa. Na quinta seção, discute-se os resultados apresentados. E por último apresenta-se a conclusão da pesquisa.

## 2. *NERIUM OLEANDER* LINN: caracterização e efeitos tóxicos no Sistema Nervoso Central (SNC)

A *Nerium oleander* é uma espécie de planta originária do Mediterrâneo, pertencente à família *Apocynaceae*, popularmente conhecida como espiroleira ou oleandro (PIVETTA et al., 2012). É um arbusto de ampla distribuição mundial, encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais, e no Brasil está presente em todo território nacional (BELLONDI; SOCHA; HATAYDE, 2014; NASCIMENTO et al., 2018). O oleandro é uma importante espécie arbórea, frequentemente usada como planta ornamental e muito encontrada no meio urbano, em especial, na arborização de ruas, parques, canteiros, jardins e até mesmo em pátios escolares (BELLONDI; SOCHA; HATAYDE, 2014; PIVETTA et al., 2012; VASCONCELOS; VIEIRA, J.; VIEIRA, E., 2009).

Segundo Bellondi, Socha e Hatayde (2014), Lacerda et al. (2011) e Pivetta et al. (2012), a *Nerium oleander* caracteriza-se como um arbusto perene, lactescente, ramificado e pode apresentar até 5 metros de altura (Figura 1). Além disso, possui flores simples ou dobradas, de cores brancas, rosas ou vermelhas, as quais se formam na primavera e verão, suas folhas são lanceoladas, dispostas em espiral, que variam do amarelo ao verde escuro e seus frutos contêm sementes revestidas de pelos.

**Figura 1** – Imagem capturada da *Nerium oleander* L., a qual evidencia as características da planta, na cidade de Belém-PA.



Fonte: Elaborada pelas autoras do trabalho (2019).

Conforme Alves et al. (2016, p.79) as “plantas ornamentais são muito utilizadas na arquitetura, não obstante, sabe-se que muitas delas também são tóxicas. De cada dez caso de intoxicação no Brasil, seis são de crianças menores de nove anos [...]”. Diante disso, evidencia-se que a *Nerium oleander* é responsável por inúmeros casos de intoxicações em humanos e animais. A sua toxicidade se deve a presença de mais de 30 tipos de glicosídeos cardíacos, tais como: as folínerinas, digitoxigeninas e, sobretudo, a oleandrina, que é presente em todas as partes da planta (BELLONDI; SOCHA; HATAYDE, 2014; PEDROZA et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2018).

Além disso, Lacerda et al. (2011) também pontua a existência de elevada toxicidade no extrato bruto etanólico da espirradeira que causam efeitos cardíacos e neurológicos. Em continuidade as afirmativas, Lacerda et al. (2011, p.353) aponta que “[...] a intoxicação pode ocorrer por ingestão de parte do vegetal ou por água contaminada com flores ou folhas [...]”. De acordo com Nascimento et al. (2018, p.1245) “os sinais clínicos de intoxicação por *N. oleander* são observados entre 1 a 24 horas após a ingestão das folhas” e consistem em vômitos, náuseas, sialorréia, tremores musculares generalizados, dificuldade de locomoção, queda brusca ao chão, decúbito lateral, movimento de pedalagem, taquicardia e taquipneia (BELLONDI; SOCHA; HATAYDE, 2014; NASCIMENTO et al., 2018). Ressalta-se ainda que mediante ao estudo experimental realizado, Pedroso et al. (2009, p. 406) salienta que, 30 minutos antes da morte, o animal apresenta os seguintes sintomas: “relutância em caminhar, queda, decúbito lateral, movimentos de pedalagem, tremores musculares generalizados, mugidos e morte”.

## 2.1. CRISES CONVULSIVAS

Os conhecimentos acerca das crises epiléticas e epilepsia obtiveram importantes avanços nas últimas décadas por meio dos estudos funcionais e estruturais do sistema nervoso, tomografia por emissão de pósitrons ou fótons únicos, ressonância magnética, videoeletroencefalografia e técnicas genéticas (YACUBIAN; KOCHEN, 2014).

Segundo a Portaria Conjunta nº 17 (2018, p. 2), “uma crise epilética é a ocorrência transitória de sinais ou sintomas clínicos secundários a uma atividade neuronal anormal excessiva ou sincrônica”. Ainda sobre essa afirmativa, Thurman et al. (2011) complementa os sinais e sintomas da seguinte forma: são fenômenos transitórios e de início súbito que incluem alterações da consciência ou eventos motores, autônomos, sensoriais ou psíquicos involuntários identificados pelo próprio paciente ou outras pessoas.

De acordo com a biblioteca virtual do Ministério da Saúde (MS) (2015, s/p), as convulsões ou crises epiléticas ocorrem quando a camada mais externa do cérebro é excitada e suas principais causas são: hemorragia, intoxicação por produtos químicos, anóxia, efeitos colaterais de medicamento e patologias como tétanos, meningite, epilepsia e tumores cerebrais.

As crises epiléticas são de 4 tipos: as crises focais que se instituem de maneira localizada e limitadas a uma parte do cérebro; as crises generalizadas que têm origem em um ponto, sobre o qual é capaz de atingir a rede de neurônios bilateralmente; as crises de início desconhecido e as crises não classificáveis ou inclassificáveis, entendidas como aquelas que não se encaixam em outras categorias (YACUBIAN; KOCHEN, 2014; PORTARIA CONJUNTA Nº17, 2018).

Em 2017, a International League Against Epilepsy (ILAE) atualizou a classificação das crises epilética, que se constituiu da seguinte forma: as crises generalizadas motoras dos subtipos tônicas, clônicas, mioclônicas, atônicas, tônico-clônicas, mioclônico-tônico-clônicas, mioclônico-atônicas e espasmos epiléticos; e as não motoras, as quais são representadas pelas crises de ausência “[...] que se subdividem ainda em típicas, atípicas, mioclônicas e ausências com mioclonias palpebrais” (PORTARIA CONJUNTA Nº 17, 2018, p.3).

Ainda conforme a Portaria Nº 17, as crises focais classificadas em motoras e não motoras são representadas respectivamente por: crises tônicas, crises clônicas, crises atônicas, crises mioclônicas, crises hipercinéticas, automatismos, espasmos epiléticos e as crises autonômicas, parada comportamental, sensoriais, emocionais e cognitivas, finalmente a denominada crise focal com evolução para crise tônico-clônica bilateral.

O diagnóstico da crise epilética, na maioria dos casos, é feito clinicamente através de uma anamnese detalhada, exame físico geral, com foco neurológico e psiquiátrico. Frequentemente, o auxílio de uma testemunha ocular é essencial para descrever a crise de maneira minuciosa, exames complementares são solicitados a partir da história clínica e exame físico, sendo o eletroencefalograma o principal exame utilizado (PORTARIA CONJUNTA Nº 17, 2018).

## 2.2. ELETROENCEFALOGRAMA

Na história do eletroencefalograma (EEG) existem dois nomes pioneiros: Richard Caton (1842-1926) e Hans Berger (1873-1941). Caton realizou a eletroencefalografia em

gatos, coelhos e macacos, que através de um galvanômetro de espelho registrou existência de corrente elétrica nos cérebros expostos. Berger, por sua vez, registrou atividade elétrica cerebral contínua e espontânea em cérebro de pacientes com defeitos no crânio e posteriormente em indivíduos sadios (GOMES, 2015).

O eletroencefalograma é um registro gráfico da atividade elétrica gerada de maneira espontânea por neurônios presentes no córtex cerebral. O mesmo é obtido através de um exame não invasivo chamado eletroencefalografia, que consiste em posicionar eletrodos em regiões específicas do crânio (LEITE; ARIAS, 2013). Ainda segundo Leite e Arias (2013) o exame tem importante valor na prática clínica da medicina humana, pois auxilia no diagnóstico de diversas patologias, sendo elas: epilepsia, acidentes vasculares encefálicos, encefalites e distúrbio do sono. É também utilizado na avaliação da atividade elétrica em pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI), na comprovação da morte encefálica e em estudos da doença de Alzheimer.

Em relação ao funcionamento do eletroencefalograma, Yacubian e Koche (2014) pontuam no geral que, em uma crise epilética, a rede de neurônios indica oscilações típicas, as quais se propagam através do cérebro, envolvendo-o progressivamente e são observadas no eletroencefalograma. De forma mais aprofundada, Leite e Arias (2013) dispõem que o potencial elétrico neural é alterado gerando um Potencial Elétrico Excitatório Pós-sináptico (PEPS) ou originando um Potencial Inibitório Pós-sináptico (PIPS), sobre o qual a soma desses potenciais gera diferença de potencial entre os eletrodos e, com isso, formam ondas elétricas captadas pelo eletroencefalograma. Acrescenta-se ainda que o traçado do EEG é analisado conforme a amplitude e frequências de suas ondas.

O EEG não é obrigatório para o diagnóstico das crises epiléticas, entretanto, quando alterado, é possível identificar o tipo e a localização da atividade epileptiforme, classificar as síndromes epiléticas e orientar a escolha do antiepilético (PORTARIA CONJUNTA Nº 17, 2018).

### 2.3. ELETROMIOGRAFIA

Em 1780, durante uma aula de fisiologia animal, Luigi Galvani observou pela primeira vez os sinais eletromiográficos, no entanto, na época, denominou essa força como eletricidade animal (SOUZA, 2018). No que se refere ao conceito de sinal o mioelétrico ou eletromiográfico (EMG), Sousa, Souza e Romero (2006) evidenciam que é composto pela soma dos inúmeros potenciais de ações musculares. Além disso, entende-se como potencial

de ação, a despolarização que ocorre no momento em no qual o axônio conduz impulso para todas as fibras musculares, sendo esse registrado graficamente pelo eletromiograma (MALTA et al., 2006). O autor ainda complementa que “na eletromiografia, pode-se registrar os potenciais de ação que ocorrem através da ativação voluntária do músculo ou através da resposta deste, frente a uma estimulação elétrica” (MALTA et al., 2006, p.107).

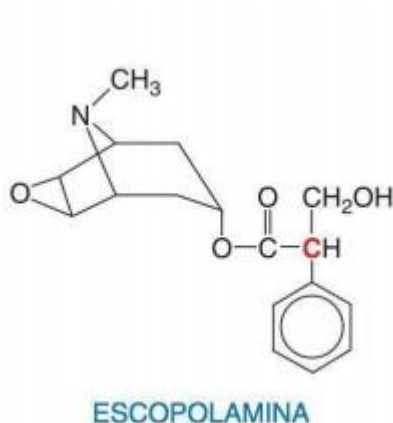
Diante disso, Resende et al. (2011, p. 293) define a eletromiografia como “o registro extracelular da atividade bioelétrica gerada pelas fibras musculares [...]”. Os potenciais elétricos podem ser captados por dois tipos de eletrodos: os eletrodos de superfície que consistem em pequenos discos metálicos de prata-cloreto de prata colocados sobre a pele, são mais cômodos para o clínico e mais aceitos pelos pacientes, pois trata-se de um método não invasivo. Em relação aos eletrodos de profundidade são dois filamentos de arame revestidos, introduzidos no músculo através de uma agulha, que capta atividade elétrica de poucas unidades motoras, é menos utilizado por ser um método invasivo (MALTA et al., 2006; RESENDE et al., 2011).

Vale ressaltar que Malta et al., (2006) pontua que há mais de 40 anos, a eletromiografia tem auxiliado no diagnóstico clínico de diversas patologias. Inicialmente, foi utilizada pela neurofisiologia a fim de registrar os potenciais de ações das fibras musculares de pacientes saudáveis e patológicos. É essencial para o conhecimento da fisiologia muscular, no monitoramento de possíveis problemas e no diagnóstico diferencial de diversas doenças. Atualmente, é empregada na avaliação de doença neuromuscular, traumatismo e como um instrumento para o conhecimento da função muscular.

#### 2.4. ESCOPOLAMINA

A Escopolamina é uma droga pertencente ao grupo dos antagonistas dos receptores muscarínicos (PAPPANO, 2017). Em sua estrutura química (Figura 2), observa-se um éster formado pela combinação de um ácido aromático (ácido trópico) com bases orgânicas complexas (BROWN; LAIKEN, 2012). Já para Richetti (2010), a escopolamina é considerada um antagonista colinérgico. E seu mecanismo de ação dá-se ao produzir a inibição dos receptores muscarínicos para o neurotransmissor da acetilcolina (WOLLMANN, 2011). Na literatura, é descrito que o aumento da concentração do neurotransmissor acetilcolina pode ser capaz de reverter o mecanismo citado (BROWN; LAIKEN, 2012).

**Figura 2** – Estrutura química da Escopolamina.



Fonte: BROWN; LAIKEN (2012).

Ainda segundo Brown e Laiken (2012) são medicações empregadas para inibir os efeitos parassimpáticos no sistema respiratório, sistema urinário, trato gastrointestinal, nos olhos e coração. Acerca interação no sistema nervoso central, pontua-se que a mesma resultou no emprego da droga para o tratamento da doença de Parkinson, no controle das reações adversas extrapiramidais de medicamentos antipsicóticos e no controle das náuseas por movimento. Os efeitos provocados pela atropina, que é o modelo representante dos antagonistas muscarínicos, variam conforme as doses aplicadas e podem gerar a redução da salivação e sudorese, dilatação pupilar, aumento da frequência cardíaca por inibição dos efeitos vagais e depressão do sistema nervoso central.

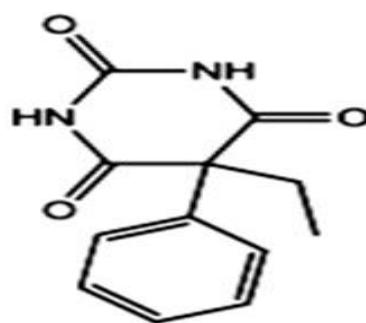
A escopolamina apresenta uma biodisponibilidade limitada quando é ingerida por via oral e a concentração máxima é alcançada em média 0,5 horas após a ingestão, com meia vida reduzida no plasma. Os efeitos adversos podem ocorrer de modo dose-dependente no organismo e a excreção ocorre através da urina (RENNER; OERTEL; KIRCH, 2005).

Dentre os sintomas indesejáveis que podem ocorrer devido aos efeitos adversos do medicamento encontram-se: o surgimento de boca seca, aumento da frequência cardíaca, opacidade visual e delírios (PAPPANO, 2017; RUSSOMANO et al., 2005). Diante disso, Brown e Laiken (2012) salientam que a toxicidade por este fármaco pode provocar grande excitação, inquietação, alucinações e delírios.

## 2.5. FENOBARBITAL

O ácido barbitúrico é a 2,4,6-trioxoexaidropirimidina, um composto que adquire atividades de sedação e hipnose quando possuem grupos alquila e arila na posição 5 (Figura 3). O fenobarbital é um integrante da classe dos barbitúricos e possui sua máxima atividade anticonvulsivante quando um grupo fenila substitui o carbono da posição 5 em sua estrutura química (MCNAMARA, 2012).

**Figura 3** – Estrutura química do Fenobarbital.



**Fenobarbital**

Fonte: ALMEIDA (2012).

Conforme Nojosa, Lima e Carvalho (2016), o fenobarbital é utilizado para o controle de crises convulsivas. Em relação ao seu mecanismo, González (2016) evidencia que o mecanismo de ação dos barbitúricos ocorre pela potencialização da inibição sináptica por ação no receptor  $GABA_A$ , causando bloqueio da atividade convulsiva. E com níveis mais altos das concentrações terapêuticas, podem diminuir as deflagrações repetitivas persistentes. E quanto aos locais de inibição, podem ser tanto pós-sinápticos (células piramidais cerebelares e corticais, núcleo cuneado, substância negra) ou pré-sinápticos (medula espinal) (MIHIC; HARRIS, 2012).

A absorção do fenobarbital ocorre de forma quase completa e essa atividade pode variar dependendo da idade do paciente, sendo mais rápida em adultos, quando comparados com crianças. Quanto ao tempo, poderá alcançar a concentração plasmática máxima do medicamento é de 4 a 10 horas após a dose ingerida. A metabolização ocorre no fígado e pode interferir no efeito de outras medicações caso as mesmas sejam realizadas ao mesmo tempo (BURTIS; BRUNS, 2016).

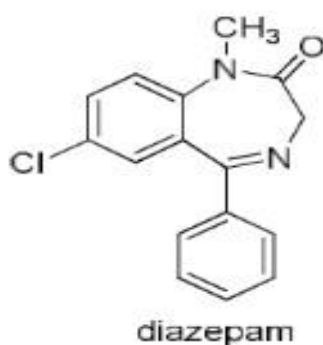
Alguns efeitos sedativos ocorrem logo no início do tratamento em quase a totalidade dos pacientes que fazem uso da medicação, esses efeitos melhoram mediante uso crônico. Além disso, é possível ainda surgir os seguintes sintomas: irritabilidade e

hiperatividade em crianças, inquietação e confusão mental em idosos. Em razão dos efeitos adversos atribuídos ao seu uso, o fenobarbital deixou de ser utilizado como primeira opção terapêutica no tratamento (MCNAMARA, 2012).

## 2.6. DIAZEPAM

O benzodiazepínico é caracterizado estruturalmente pela formação do anel benzeno, que está ligado a um anel diazepínico de sete membros (Figura 4). Quando existe uma substituição na posição 7 do anel benzeno por um halogênio ou grupo nitro, confere a ele propriedades sedativas e hipnóticas da medicação (RANG et al., 2004).

**Figura 4** – Estrutura química do Diazepam.



Fonte: ANDRADE; TROSSINI; FERREIRA (2010).

Dentre as ações desse medicamento, pode-se incluir o relaxamento do músculo esquelético e o grande potencial de inibir convulsões (NICHOLSON, 2018; AUCHEWSKIA, et al. 2004). No tratamento das crises convulsivas, o diazepam age aumentando a potência da transmissão inibitória do neurotransmissor GABA e aumentando a hiperpolarização neuronal (RANG et al., 2004). Em continuação ao supracitado, Nicholson (2018) afirma que seu mecanismo de ação se baseia na potencialização da afinidade do neurotransmissor GABA pelos receptores tipo A do ácido gama-aminobutírico (GABA<sub>A</sub>), sobre o qual Rang et al. (2004) complementa que isso culmina com uma resposta sináptica inibitória no sistema nervoso central através da internalização de íons cloreto pelos canais ativado pelo GABA nas células nervosas.

E dependendo da quantidade da dose administrada, o diazepam pode, inclusive, levar a depressão do sistema nervoso central. Entretanto, o efeito depressor não tem a mesma intensidade quando comparado ao produzido pelos barbitúricos e anestésicos voláteis. Os benzodiazepínicos não produzem uma verdadeira anestesia geral, pois em sua

aplicação não é alcançada a imobilidade e a perda da consciência necessárias para realizar o ato cirúrgico. Sendo assim, os estágios de hipnose e estupor são alcançados a partir do aumento progressivo da dose do fármaco (MIHIC; HARRIS, 2012).

Os benzodiazepínicos possuem a capacidade de iniciar rapidamente seus efeitos no organismo após a sua administração (NUNES; BASTOS, 2016). Eles são bem absorvidos quando ingeridos por via oral e podem alcançar concentração plasmática máxima em 60 minutos. Além disso, exercem forte ligação com as proteínas plasmáticas devido à alta lipossolubidade, posto que acumulam-se nos lipídeos do organismo (RANG et al., 2004). O tempo necessário para o fármaco converter-se em metabólitos ativos leva em média de 24 a 72 horas, enquanto a metabolização ocorre no fígado e origina os compostos desmetildiazepane e oxazepam (MACIEL; LIMA; SOUSA, 2015).

A utilização desapropriada dos benzodiazepínicos podem desencadear diversos efeitos colaterais no organismo (NUNES; BASTOS, 2016). Os sintomas atribuídos envolvem a sedação, miorelaxamento, perda do controle muscular durante movimentos involuntários, perda de memória e a dependência (GALDINO, 2011). Por conta disso, alguns fármacos devem ser usados com cautela em idosos por conta dos mesmos possuírem maiores riscos de intoxicações e efeitos adversos (BALDONI et al., 2010; SOUTO et al., 2017; BARRETO; MASSABKI, 2010).

Em razão da capacidade dos benzodiazepínicos em atravessar a barreira placentária durante a gestação, os riscos de surgimento de patologias congênitas e complicações neonatais existem. Além disso, os efeitos dos medicamentos podem, inclusive, provocar sedação em bebês através da amamentação (AUSTIN; MITCHELL, 1998).

## 2.7. FENITOÍNA

A fenitoína foi desenvolvida em 1908 por Biltz. Todavia, descobriu-se o potencial anticonvulsivante somente em 1938, enquanto realizavam-se estudos em busca de medicações que tivessem efeito no controle de crises convulsivas por indução de eletrochoques em animais de laboratório. Dessa forma, a fenitoína foi introduzida neste mesmo período no mercado com a finalidade de atuar nos tratamentos epiléticos. É através da fenitoína que pôde-se observar que os fármacos anticonvulsivantes não necessariamente causam sonolência e por isso incentivou-se investimentos em mais pesquisas a fim de descobrir medicamentos com ação mais seletiva para este tratamento (MCNAMARA, 2012) (Figura 5).

**Figura 5** – Estrutura química do Fenitoína.



Fonte: MCNAMARA (2012).

Sendo também denominada como 5,5-difenil-hidantoína, a fenitoína é um anticonvulsivante do grupo das hidantoínas, utilizado no mundo todo como o tratamento de escolha das crises epilépticas, especificamente de convulsões parciais e tônico-clônicas, com exceção das crises de ausência (OLIVEIRA, S., et al., 2008). Pereira (2009) e Oliveira, F., (2013) afirmam que a mesma é considerada um fármaco com ação eficaz no tratamento de convulsões sem gerar efeito depressor no SNC. Ainda segundo o que foi pontuado, Hofstatter (1995), salienta que a fenitoína possui maior desempenho em controlar a fase tônica das convulsões generalizadas tônico-clônicas sobre a fase clônica. E acerca do mecanismo de ação Oliveira, S. (2008) ratifica que a atividade antiepilética ocorre com o bloqueio dos canais de sódio.

A fenitoína é utilizada em forma de sal sódico e sua absorção está relacionada ao pH do meio. Liga-se intensamente às proteínas séricas e possui meia vida plasmática, que alcança em média de 6 a 24 horas, com valores que podem elevar-se quando existir aumento da concentração plasmática e sua metabolização ocorre via hepática. (MCNAMARA, 2012). Quando se trata dos efeitos adversos, os mesmos estão relacionados com problemas oculares e cerebrotvestibular, movimentos involuntários dos olhos, perda do controle muscular em movimentos involuntários, distúrbios na articulação da fala, fadiga e confusões mentais. Os tratamentos com doses elevadas podem ocasionar encefalopatia com déficit mental e alterações das emoções. As pessoas que fazem uso crônico da medicação podem desenvolver hipertrofia gengival durante o tratamento (JORGE, 2014). E quando as concentrações alcançam doses tóxicas, pode-se ocasionar ainda a excitação e rigidez de descerebração (MCNAMARA, 2012).

### 3. METODOLOGIA

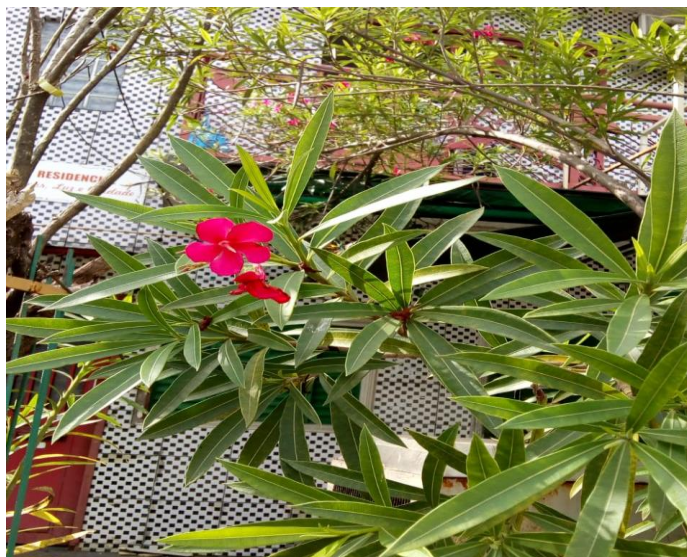
#### 3.1. ANIMAIS

Para o estudo proposto, foram utilizados 63 ratos Wistar machos adultos - peso entre 200 e 250g. Todos os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Pará (UFPA) e mantidos no biotério de experimentos localizados no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais (LFTPN). A temperatura foi ajustada entre 25-28°C e a luminosidade regulada artificialmente - 12h de luz e 12h de escuridão. Cada gaiola continha no máximo 3 animais. Comida e água estavam disponíveis livremente durante o experimento. O modelo experimental segue o Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais da Universidade Federal do Pará (CEPAE - UFPA) sob o número de protocolo 11/2015.

#### 3.2. EXTRAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Amostras de *Nerium oleander* foram coletadas na cidade de Belém - PA – Brasil (Figura 6), onde é facilmente encontrada e imediatamente encaminhada para o processo de identificação no Laboratório de Identificação Botânica do Laboratório de Botânica - Herbário da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) da Amazônia oriental. Lá, as amostras foram comparadas com exsicatas na coleção do laboratório para a classificação correta, sexo e nome científico, respectivamente, como segue: *Apocynaceae*, *Nerium* e *Nerium oleander* L., número IAN 197195.

**Figura 6** – Imagem capturada da *Nerium oleander* L. na cidade de Belém – PA.



Fonte: Elaborado pelas autoras do trabalho (2019).

O extrato foi obtido a partir de folhas dessa planta por pesquisadores da LFTPN - localizados na UFPA - de acordo com as diretrizes internacionais sugeridas pela Organização Mundial da Saúde (OMS). As folhas foram coletadas em maio, com temperatura média de 32,4 ° C, em Belém- Pará-Brasil, latitude 01° 27'21" S, longitude 48° 30'16" W.

As folhas foram processadas em etanol absoluto (Sigma) deixado em contato com as folhas por 48 horas sob agitação constante, extraíndo substâncias polares e apolares contidas nas folhas, posteriormente o álcool foi filtrado e evaporado a uma temperatura de 50 ° C. O extrato seco foi ressuspenso em solução fisiológica a 0,9% contendo Tween 20 (Sigma - Aldrich) a 0,05%, na concentração de 10 mg/ mL. Os dados de nossos estudos anteriores realizados na LFTPN-UFPA mostraram que a ED50 (dose efetiva) para obter crises convulsivas com perda do reflexo postural foi de 150 mg/kg via intraperitoneal. Durante a extração do material vegetal, o rendimento obtido para cada quilograma de folhas foi de 10,3 g de extrato de *N. oleandro*.

O extrato seco remanescente foi mantido congelado a -20 ° C e liofilizado sob baixa pressão por 24h para secar a água restante. E 100 mg do extrato liofilizado foram recuperados com 10 mL de mistura água-acetonitrila (8.2) (v/v). O extrato recuperado foi diluído para 1/5 em uma mistura de metanol-acetonitrila (1.1) (v/v), para uma proporção final de mistura de acetonitrila-metanol-água (44.40.16) (v/v/v), então filtrada através de HPLC PVDF acrodiscs (porosidade 0,45 µm) e injetado no aparelho de HPLC (adaptado de NADJI et al. 2017).

### 3.3. PRODUTOS QUÍMICOS E REAGENTES

O acetonitrilo e o metanol do grau de HPLC foram obtidos no CRQ (São Paulo, Brasil). Água ultra pura foi produzida usando um sistema Direct Q3 (Millipore, Molsheim, França).

O anestésico cetamina foi adquirido da König (Santana de Parnaíba, SP) e xilazina de Vallée (Montes Claros, MG), enquanto o anestésico local lidocaína foi obtido de Hipolabor (Sabará, MG, Brasil). Compostos anticonvulsivantes fenobarbital (Aventis-Pharma, Ribeirão Preto, SP, Brasil); fenitoína, diazepam e escopolamina (União Química, Embu-Guaçu, SP, Brasil); também foram comprados.

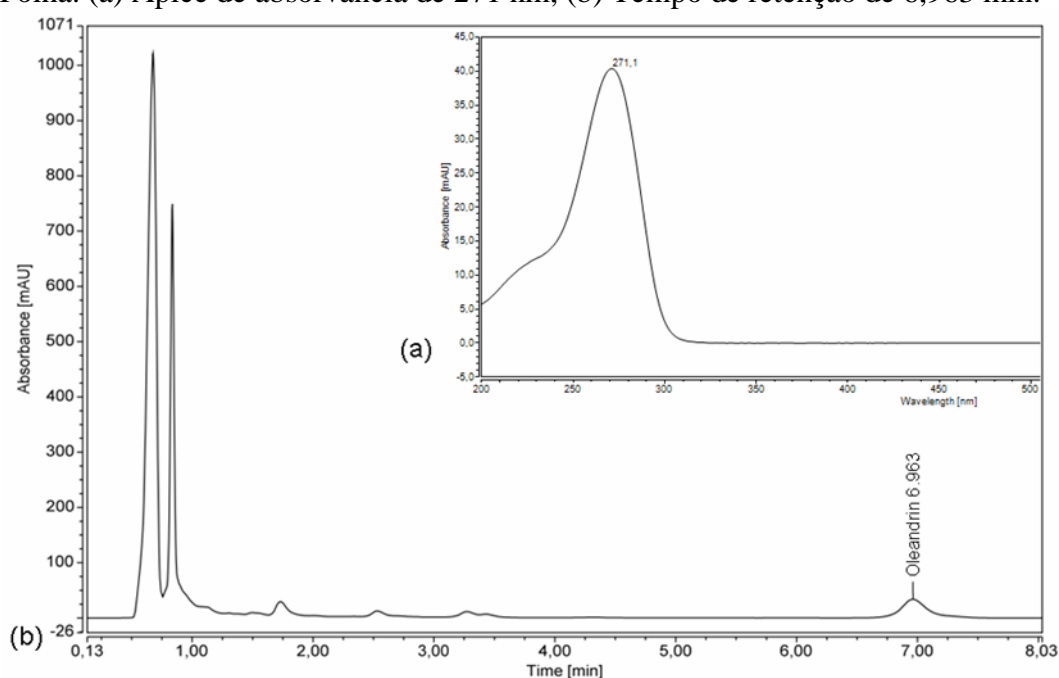
### 3.4. INSTRUMENTAÇÃO

A análise por HPLC foi realizada utilizando um sistema de HPLC Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EUA) equipado com a bomba UltiMate 3000 RS, o compartimento da coluna de amostragem automática UltiMate 3000 e o detector de fotodíodos UltiMate 3000. A aquisição de dados foi realizada com o software Chromeleon (Sunnyvale, CA, EUA).

### 3.5. CONDIÇÕES HPLC-DAD

A separação cromatográfica foi realizada numa coluna HPLC Kinetex® C18 100A (2,6  $\mu\text{m}$ , 100 x 4, 6 mm) com a temperatura da coluna ajustada a 30 ° C. A fase móvel consistiu em acetonitrilo-água (37/63 v/v) a uma taxa de fluxo de 1,3 mL / min. O detector DAD registrou espectros de UV no intervalo de 190 a 400 nm e o comprimento de onda monitorizado foi estabelecido a 280 nm. O volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$ . O tempo de análise foi de 8 min. e a absorção de oleandrina foi de 271 nm. O tempo de retenção foi de 6,963 min (Figura 7).

**Figura 7** - Cromatograma de HPLC para identificação de Oleandrina a partir de extrato de Folha. (a) Ápice de absorvância de 271 nm, (b) Tempo de retenção de 6,963 min.



Fonte: Hamoy (2018).

### 3.6. DESCRIÇÃO COMPORTAMENTAL

Nove animais foram submetidos a uma injeção intraperitoneal (i.p.)<sup>2</sup> de EENO na dose de 150 mg / kg, e observados quanto ao comportamento manifestado após esta injeção por um período de duas horas. Neste momento, registramos o período de latência para o aparecimento das principais manifestações causadas pelo extrato.

**Tabela 1** - Gráfico Comportamental Analisado

Estágio	Comportamento
<b>Depressão do SNC (FASE-I)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Imobilidade</li> <li>2. Relaxamento sem perda do reflexo de postura.</li> <li>3. Relaxamento muscular com perda do reflexo de postura.</li> </ol>
<b>Excitação do SNC (FASE-II)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Calda embandeirada</li> <li>2. Taquipnéia</li> <li>3. Tremores de cabeça e pescoço, eriçamento de vibríssias e salivação</li> <li>4. Convulsão tônica</li> <li>5. Convulsão tônico-clônica</li> <li>6. Tremor de membros anteriores intercalado com convulsão tônico-clônicas</li> </ol>

Fonte: Hamoy (2017).

### 3.7. ANÁLISE DO ELETROENCEFALOGRAMA DOS ANIMAIS

Os efeitos das substâncias apresentadas no extrato sobre o sistema nervoso central confirmaram todas as observações capturadas no teste comportamental, os eletrodos foram implantados no nível do duramater de 54 animais - esses animais foram divididos em seis grupos com 9 animais cada: Controle ( solução salina 0,9%) (n = 9); grupo tratado com EENO (150 mg / kg i.p.) (n = 9); para diminuir as convulsões observadas na fase -2: EENO (150 mg / kg i.p.) + Escopolamina (10 mg / kg i.p.) (n = 9); EENO (150 mg / kg i.p.) +

<sup>2</sup> Pontua-se que, para este estudo, a via intraperitoneal foi eleita como tentativa de minimizar os demais sintomas, ligados a outros sistemas do organismo, como por exemplo, o digestório, que pode agravar o quadro tóxico (BANDARA et al., 2010). Segundo Bafor e Igbinuwen (2009), estudos anteriores envolvendo utilização de extratos de plantas também demonstram a viabilidade desta via na realização de seus experimentos, sendo esta uma das vias mais utilizadas na experimentação animal.

Fenobarbital (10 mg / kg i.p.) (n = 9); EENO (150 mg / kg i.p.) + Diazepam (10 mg / kg i.p.) (n = 9); EENO (150 mg / kg i.p.) + Fenitoína (10 mg / kg i.p.) (n = 9).

### **3.7.1. Cirurgia para Colocação de Eletrodos**

Os animais foram anestesiados com cetamina (50 mg / kg i.p.) e xilazina (10 mg / kg i.p.). Após a abolição do reflexo corneano, os animais foram posicionados em aparelho estereotáxico. Após procedimentos cirúrgicos para expor o crânio, foram realizados dois orifícios bilaterais no crânio do rato com broca odontológica. Eletrodos de aço inoxidável (com ponta de 1,0 mm de diâmetro) foram colocados no duramater acima do córtex frontal nas coordenadas de bregma - 0,96 mm e  $\pm$  1,0 mm lateral (Paxinos & Watson, 2005). Um parafuso foi fixado na região do crânio occipital, e os eletrodos foram fixados com cimento acrílico dental utilizando o parafuso como base e solo para os eletrodos.

### **3.7.2. Registros Eletroencefalográficos**

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais. Sete dias após a cirurgia, os eletrodos foram conectados a um sistema digital de aquisição de dados composto por um amplificador de alta impedância (Grass Technologies, P511), um osciloscópio (Protek, 6510) e uma placa para aquisição e digitalização de dados (National Instruments, Austin, TX). Os dados foram continuamente amostrados a 1 kHz em baixa passagem de 0,3 kHz e alta passagem de 0,3 Hz.

As gravações seguiram um protocolo padrão: 10 min de acomodação em animais cuidadosamente imobilizados para evitar interferência de registros. Registramos a atividade eletroencefalográfica do controle por 5 min, que foi usada como controle nas análises de EEG. Em seguida, EENO (150 mg/kg i.p.) foi administrado e a actividade electrocorticográfica foi ainda registada durante 3000 segundos. Para a avaliação do controle das crises por anticonvulsivantes, os animais foram tratados ao mesmo tempo com EENO e anticonvulsivantes para verificar sua eficácia na fase II.

Para a análise dos sinais adquiridos, foi construída uma ferramenta utilizando a linguagem de programação Python versão 2.7. As bibliotecas Numpy e Scipy foram usadas para processamento matemático e a biblioteca Matplotlib para gráficos. A interface gráfica foi desenvolvida usando a biblioteca PyQt4.

### **3.7.3. Registros Eletromiográficos**

Para demonstrar a atividade muscular após a aplicação de EENO, eletrodos conjugados foram implantados no músculo Masseter. O registro foi amplificado 2000X os dados foram processados semelhante ao eletroencefalograma.

### **3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os valores dos resultados foram descritos como média e desvio padrão. As comparações de potência foram realizadas utilizando ANOVA e teste de Tukey usando o software GraphPadPrism ®. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

#### 4. RESULTADOS

A identificação da oleandrina mostrou a absorvância de comprimento de onda máxima de 271 nm e tempo de retenção de 6,963 min. Resultados semelhantes foram referidos pela detecção de resíduos de cardenólídeos de *Nerium oleander* em amostras de autópsias e pela determinação dos níveis de oleandrina por HLPC-DAD (PRAVEEN et al., 2012, NADJI et al., 2017) (Figura 7).

A análise da condição de intoxicação causada pelo extrato etanólico de *Nerium oleander* (EENO) foi caracterizada pela ocorrência de duas etapas na tabela comportamental (Tabela 2). Na primeira fase, os animais apresentaram sintomatologia clássica relacionada à depressão do SNC, como imobilidade e relaxamento muscular sem perda do reflexo postural seguida de relaxamento muscular seguido de perda do reflexo postural - Essa fase apresentou média de latência de  $5,23 \pm 1,89$  minutos. Na segunda fase, notou-se a cauda embandeirada; taquipneia; arrepios na cabeça e no pescoço; ereção das vibrissas; salivação; convulsão tônica; convulsão tônico-clônica; Calafrios na cabeça, pescoço e membros anteriores intercalados por convulsões tônico-clônicas. Este estágio teve média de latência média de  $15,75 \pm 2,59$  minutos. Ambos os estágios comportamentais foram comprovados pelo eletromiograma do músculo masseter (Figura 8) e registro eletrocorticográfico do grupo basal e tratado (Figura 9 e 10).

**TABELA 2** - Caracterização comportamental do quadro induzido após a aplicação do extrato etanólico da *Nerium oleander* e latência para ocorrência dos comportamentos. Observação feita durante 120 minutos (n=9).

Fase	Comportamento	Latência (Minutos)
<b>Fase –I</b> <b>(Depressão do SNC)</b>	1. Imobilidade	5.23 $\pm$ 1.89
	2. Relaxamento sem perda do reflexo de postura.	10.45 $\pm$ 2.52
	3. Relaxamento muscular com perda do reflexo de postura.	12.07 $\pm$ 3.38
<b>Fase –II</b> <b>(Excitabilidade do SNC)</b>	1. Cauda embandeirada	15.75 $\pm$ 2.59
	2. Taquipnéia	17.43 $\pm$ 2.22
	3. Tremores de cabeça e pescoço, eriçamento de vibríssias e salivação.	19.90 $\pm$ 2.76
	4. Convulsão tônica	23.66 $\pm$ 5.54
	5. Convulsão tônico-clônica	25.37 $\pm$ 6.02

**TABELA 2** - Caracterização comportamental do quadro induzido após a aplicação do extrato etanólico da *Nerium oleander* e latência para ocorrência dos comportamentos. Observação feita durante 120 minutos (n=9)

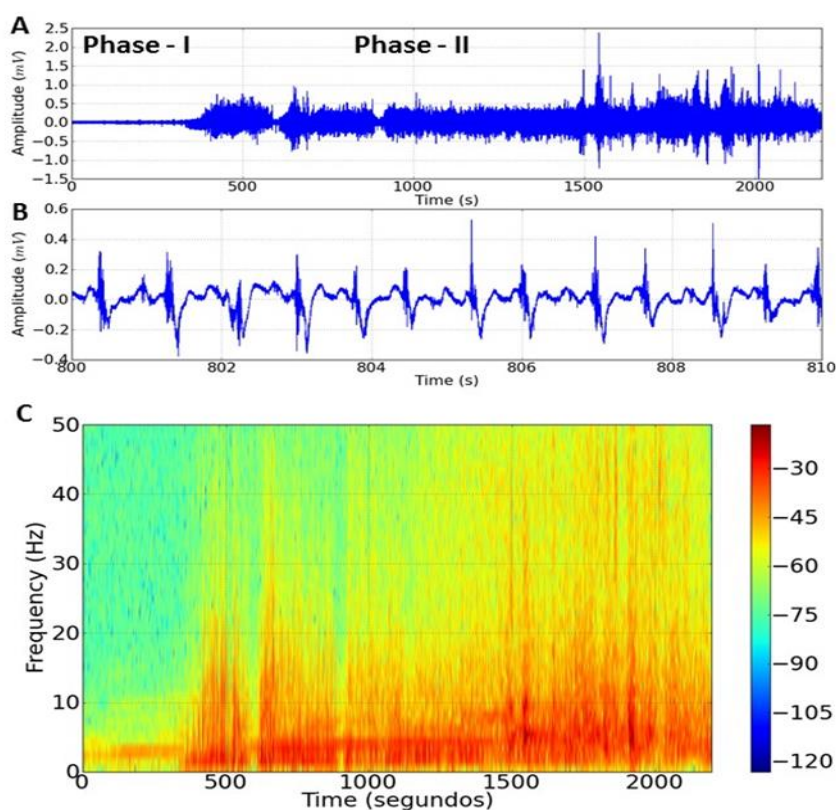
(continuação)

6. Tremor de membros anteriores intercalados com convulsões tônico-clônicas	29.37±4.84
---	------------

Fonte: Hamoy (2017).

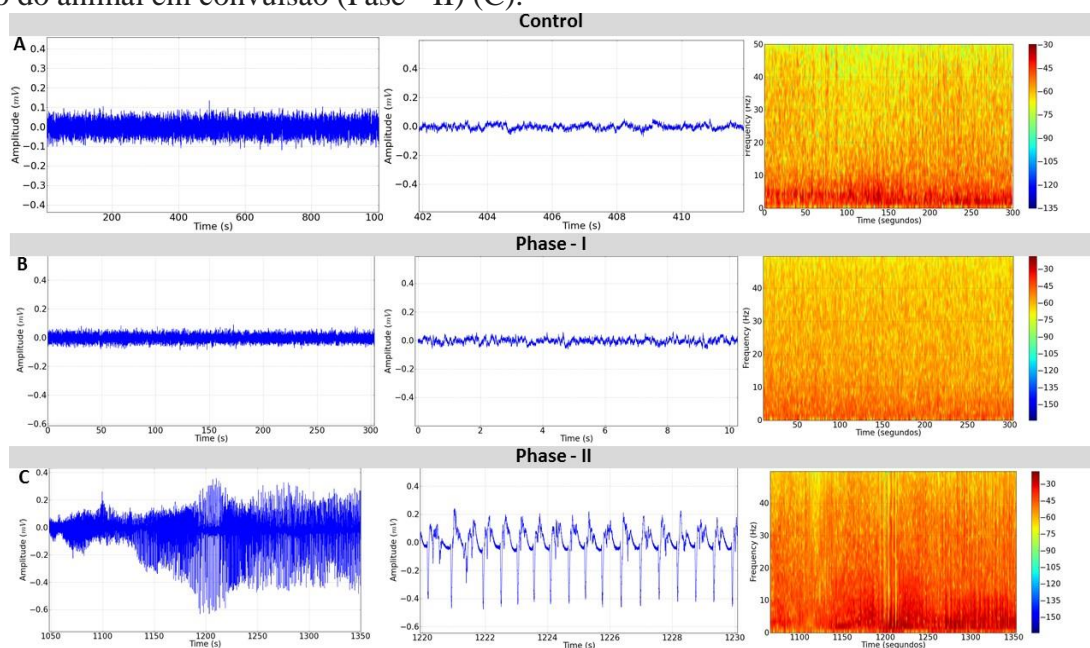
Os registros eletromiográficos do músculo masseter mostraram condições repetitivas de contração muscular compatíveis com convulsões. Os primeiros 400 segundos não apresentaram alterações de amplitude, registrando apenas uma linha contínua sem flutuações (Figura 8A) e distribuição de energia menor que 10Hz (Figura 8B) indicando ausência de atividade muscular (relaxamento muscular) Fase -I. A partir deste momento, é registrada uma grande variação nos registros de amplitude (Figura 8A) e distribuição de energia variando de 1 a 50 Hz (Figura 8B) mostrando um aumento na contração muscular (fase -II).

**Figura 8** - Demonstração do eletromiograma obtido a partir do músculo masseter. Observar o padrão de contração muscular sugestivo de convulsão (A); Ampliação da imagem A (B); Espectrograma de distribuição de energia durante o registro de contração muscular (C). (n = 9).



Fonte: Hamoy (2017).

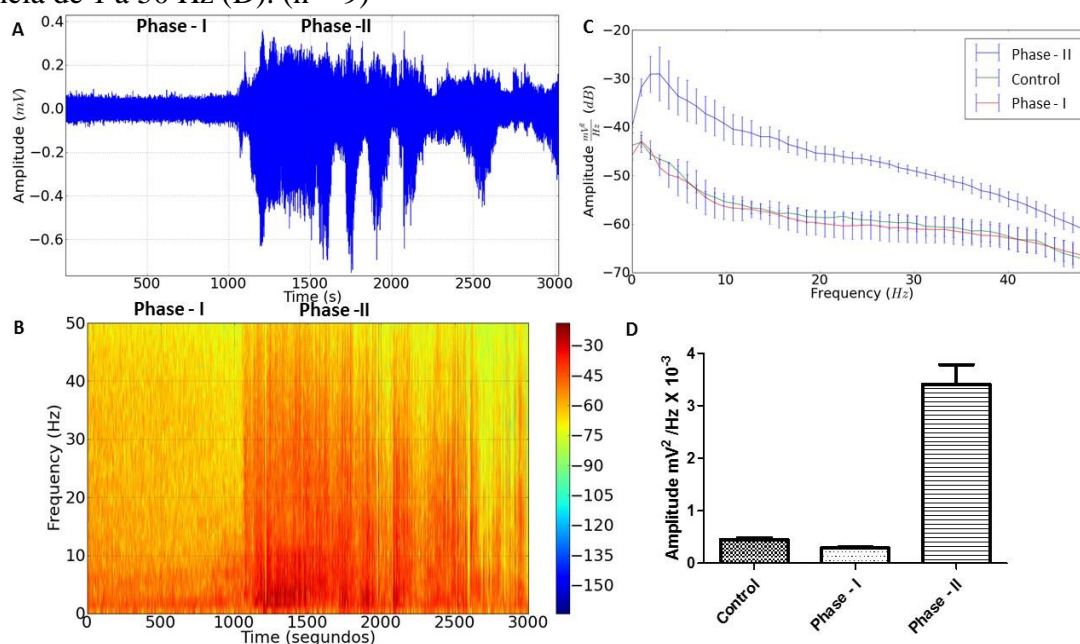
**Figura 9** - Traçado eletrocorticográfico de um animal no estado basal (A); Eletrocorticograma de animais após a aplicação da Fase EENO - I (B), característica do traçado do animal em convulsão (Fase - II) (C).



Fonte: Hamoy (2017).

A característica comportamental pode ser elucidada a partir da análise do traçado eletrocorticográfico. O animal no controle percorria normalmente, apresentando um traçado que revela um espectrograma que possui uma maior concentração de energia menor que 10Hz (Figura 9A). Durante a fase I, que ocorre logo após a aplicação da EENO, observa-se relaxamento muscular no comportamento. Quando analisado no eletrocorticográfico (ECoG), pode-se observar uma menor irregularidade no traçado e uma suave redução do nível de energia em relação ao espectrograma de controle. Assim, a maior energia mantém-se abaixo de 10Hz - semelhante ao controle ECoG (Figura 9B). A Fase II começa com uma distribuição maior de energia de frequência, conforme revelada no espectrograma - devido a uma excitabilidade cerebral, que contrasta com a fase -I (Figura 9C).

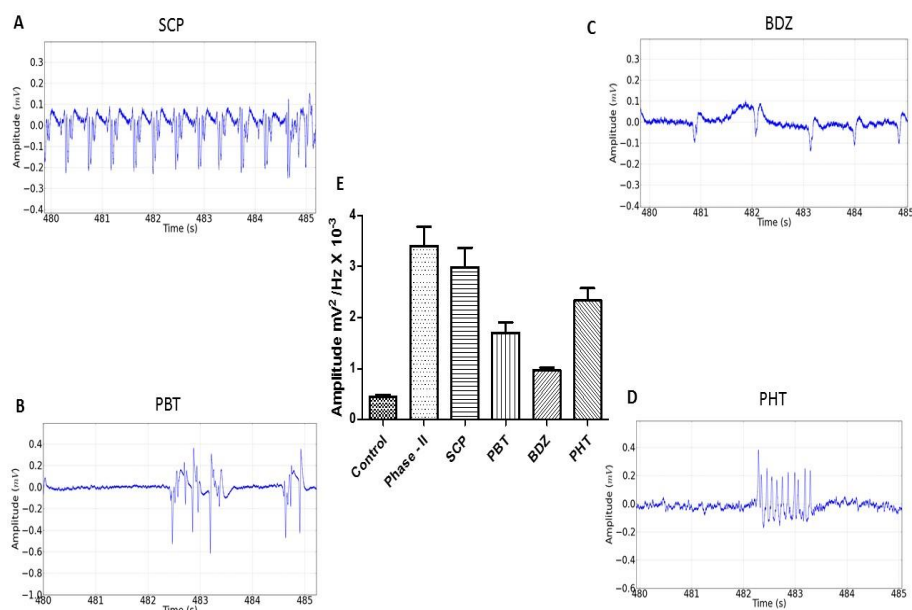
**Figura 10** - Registro eletrocorticográfico obtido após a aplicação da EENO verificada duas fases (A); Espectrograma demonstrando a diferença entre a distribuição de forças entre 1 e 50 Hz para as fases I e II (B); meio de amplitude de potência distribuído a cada fase de frequência I, II e registro basal (C); Gráfico mostrando a amplitude em escala linear na frequência de 1 a 50 Hz (D). (n = 9)



Fonte: Hamoy (2017).

De acordo com a análise comportamental observada após a injeção da EENO, foram estabelecidas duas fases distintas no sistema nervoso central (SNC) que podem ser comprovadas a partir da análise de EcoG (Figura 10). No espectrograma pode-se notar uma maior concentração de frequências menor que 10Hz na fase - I, seguida de maior distribuição de energia na fase - II, indicando maior atividade cerebral, compatível com uma convulsão (Figura 10A e 10B). O gráfico de amplitude descrito em uma escala logarítmica (Figura 10C), mostrou que não houve diferença estatística entre a média da amplitude média obtida na fase I e o registro de controle. A fase II mostrou que durante a condição de aumento da excitabilidade cerebral o nível de amplitude aumentou mais em comparação ao controle e fase II. A avaliação da escala linear de amplitude em frequência até 50Hz obtida no controle com amplitude média de  $0,453 \pm 0,0807 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$  não foi estatisticamente relevante quando comparada com a média de potência na fase - I ( $0,293 \pm 0,0381 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$ ). Na fase II a média da amplitude média foi de  $3.406 \pm 0.9947 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$ , mostrando diferença significativa em relação ao controle e fase I (Figura 10D).

**Figura 11** - Registro eletroencefalográfico obtido na fase II após a aplicação do fármaco na tentativa de controlar a fase -II. Demonstração do padrão de rastreamento encontrado para escopolamina (SCP) (A), fenobarbital (PBT) (B), Diazepam (BDZ) (C) e fenitoína (PHT) (D). Gráfico mostrando a atividade no controle de convulsões observado na fase II (E), onde  $p < 0,05$



Fonte: Hamoy (2017).

Para controlar a condição de convulsão observada no estágio II, foram utilizados medicamentos como escopolamina (10mg / kg); fenobarbital (10mg / kg), Diazepam (10 mg / kg) e fenitoína (10mg / kg). O registro do controle exibe uma média de amplitude média de  $0,453 \pm 0,08 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$  na fase - II a condição de convulsão desencadeou um aumento de amplitude de  $3,406 \pm 0,994 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$ . Após o uso da escopolamina (PCS), todos os animais apresentaram média de  $2,99 \pm 1,023 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$ , o que não representou diferença estatística em relação à condição de crise causada pela EENO. Para o manejo da crise, obtiveram-se resultados mais eficientes utilizando fenobarbital (PBT) (amplitude média  $1,705 \pm 0,53 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$ ), diazepam (BDZ) (amplitude média  $0,974 \pm 0,122 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$ ) e fenitoína (amplitude média  $2,33 \pm 0,636 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$ ). De todos esses medicamentos, o mais eficiente para o controle adequado das crises foi o diazepam (Figura 11).

## 5. DISCUSSÃO

Atualmente, sabe-se que compostos isolados extraídos de diversos tipos vegetais possuem a capacidade de interagir nos sistemas de neurotransmissão do SNC, estudos desse tipo fornecem base para avaliação de alterações neuroquímicas envolvidas em diversas patologias (BARBOSA-FILHO et al., 2006; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2008; SOUSA et al., 2008). Os compostos contidos no extrato etanólico de *Nerium oleander* têm características que permitem a sua passagem através da barreira hematoencefálica que, ao alcançar o SNC, causa, inicialmente, a diminuição da atividade motora (miorrelaxamento) e subsequentemente a excitabilidade.

Nesse contexto, o EENO promove alterações no sistema de neurotransmissão GABAérgico devido ao aumento da concentração desse neurotransmissor no SNC (NAGARJUN; SOUDARIN; KUMARESAN, 2003), isso induz a redução da atividade motora por depressão do sistema nervoso central, conferindo a esse extrato atividade sedativa e hipnótica que altera o comportamento de ratos (ZIA et al., 1995; LEEWANICH et al., 1996). O eletroencefalograma tem sido amplamente utilizado no diagnóstico e acompanhamento de patologias neurológicas. Assim, para provar os efeitos convulsivos do EENO no SNC, realizou-se o EEG, o qual demonstrou as fases de depressão e aumento da excitabilidade no comportamento. Sendo denominadas neste estudo como fase I e fase II, respectivamente.

Os padrões de comportamento da depressão do sistema nervoso demonstrados pela fase I, apresentaram miorrelaxamento inicial, o que corrobora com o aumento da atividade da neurotransmissão GABAérgico. Conforme a revisão de literatura realizada nesta pesquisa, observou-se que esse padrão comportamental foi pouco visualizado em outros experimentos, isso pode ter como causa o fato da *Nerium oleander* ser uma planta tóxica com diversos princípios ativos, que podem variar de acordo com a dose e concentração dos seus componentes. Já, a excitabilidade foi observada com o início do quadro convulsivo nos animais e caracterizou a fase II.

Diferentemente da depressão do SNC, a sua excitabilidade no envenenamento por *N. oleander* foi citada em vários artigos, fato que é confirmado por Langford e Boor (1996) que encontraram sialorréia e tremores musculares em seres humanos. Enquanto isso, Aslani et al. (2004) observou a vocalização, convulsões e tremores musculares em ovinos. Em contrapartida, Pedroso et al. (2009) realizou uma experiência com *N. oleander* em bovinos, onde vinte e nove minutos depois da ingestão os animais apresentaram sialorreia, taquicardia

intensa, seguido de micção frequente, ranger de dentes, regurgitação do conteúdo do rúmen, houve dificuldade na locomoção, queda abrupta do animal ao chão, decúbito lateral, tremores musculares generalizados, movimentos de pedalagem, mugindo e o desfecho foi a morte do animal aos sessenta e dois minutos.

Todas essas alterações comportamentais indicadas anteriormente ocorrem quando há intoxicação pela espirradeira, que foram observadas em várias espécies, tais como as exemplificadas. Os sintomas como tremores musculares e convulsões indicam excitabilidade do SNC, corroborando com fase II, já a fase I também apontada no presente estudo observou-se que a depressão do sistema nervoso central caracterizou-se por imobilidade e miorelaxamento sem e com perda do reflexo de postura. Essas fases foram comprovadas a partir da análise de registros eletroencefalográficas e eletromiográficas, sobre as quais o EMG demonstrou contração muscular compatível com quadro convulsivo de longa duração, que esteve de acordo o EEG, sendo ambos os registros descritos pela primeira vez.

Os cardenolídeos estão presentes em toxinas de plantas que atuam principalmente no coração. A morte ocorre por fibrilação ventricular ou taquicardia. Uma vasta gama de tratamentos têm sido utilizados, o mais comum, incluindo carvão ativado, atropina, agonistas  $\beta$ -adrenoceptores, temporário de estimulação, anti-digoxina de Fab e de magnésio, e mais novos agentes incluem frutose-1,6-difosfato, ensaio clínico em progresso, e anticalin. No entanto, mesmo no caso dos tratamentos que têm sido utilizados há décadas, existe um debate em relação à eficácia, as indicações e dosagem que otimizam os resultados. Isso contribui para a variabilidade do uso em todo o mundo (ROBERTS; BRUCKEY, 2006; ROBERTS et al., 2016).

A base para o mecanismo de ação da intoxicação dos cardenolídeos da *oleander* é semelhante ao apresentado por digitálicos clássicos e se dá pela inibição da bomba de sódio e potássio ATPase ( $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPase) presentes nas membranas plasmáticas. A inibição da bomba, além de provocar distúrbios eletrolíticos que afetam a condutibilidade do coração, promovem o desencadeamento de convulsões observadas durante a intoxicação, o que caracteriza a fase II. A  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPase diminuiu significativamente após convulsões induzidas por PTZ (60 mg/kg). Uma correlação positiva significativa entre  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPase e a latência para mioclonias e crises generalizadas foi encontrado (LANGFORD; BOOR, 1996; MARQUEAN et al., 2013).

No cérebro a  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPase contribui para a manutenção dos gradientes eletroquímicos subjacentes neuronais de repouso e de potencial ação, bem como a absorção

e a libertação de neurotransmissores. Em conformidade, um decréscimo de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$  aumenta a excitabilidade neuronal e pode predispor ao aparecimento de atividade convulsiva (FUNCK et al., 2015).

Ainda em relação a contribuição da  $\text{Na}^+\text{k}^+$  ATPase na epilepsia Grisar, Guillaume e Delgado-Escueta (1992), supuseram que este mecanismo teria um papel importante na remoção de  $\text{K}^+$  liberado no espaço extracelular durante o disparo neural. Resultados que foram investigados em gatos com lesões por congelamentos, mais especificamente em lesões epileptogênicas agudas e crônicas, onde observou-se que dentro do foco primário e secundário a ativação de  $\text{K}^+$  da bomba de  $\text{Na}^+\text{k}^+$  ATPase glia diminui consideravelmente quando comparado aos animais de controle.

Assim, os pacientes com baixo limiar convulsivo podem ser mais susceptíveis a convulsões causadas por intoxicação de *Nerium oleander*. As convulsões são de longa duração e têm características tônico-clônicas de difícil controle. Neste estudo, utilizou-se diferentes anticonvulsivantes, tais como SCP, PBT, BDT e PHT. Em um modelo epiléptico provocado por pilocarpina Cruz (2012) afirma que o uso de escopolamina reduz convulsão. No entanto, em intoxicação por *Nerium oleander*, a mesma não obteve efeito sobre o controle das crises como constata-se na figura 5 deste estudo. Tal resultado é ratificado por Hamoy (2011, p. 87) em relação a convulsão induzidas pelo cunaniol e acetato de cunaniol, pois “a utilização da escopolamina na dose 10 mg/kg por via intraperitoneal, demonstrou baixa seletividade no controle das convulsões [...]”.

O fenobarbital apresentou um bom resultado no manejo da crise convulsiva nesta pesquisa, fato também observado por Hamoy (2011), no qual o fenobarbital, ao agir diretamente nos receptores do neurotransmissor GABA, promove a abertura dos ionóforos de cloro, permitindo a hiperpolarização da membrana neural e, com isso, proporciona o controle das convulsões. O resultado favorável com fenobarbital também demonstrou Zimath et al. (2017) em um modelo de estudo onde o pentilenotetrazol era um agente indutor de convulsões, a aplicação dessa droga mostrou-se eficaz para cessar o quadro convulsivo. Praticamente na mesma linha de pesquisa Fleck (2015) apontou, em um estudo desenvolvido mostrando os efeitos do uso de montelucaste associado ao fenobarbital com objetivo de avaliar a redução das crises convulsivas em animais abrasados, que a combinação de ambas as drogas obteve atuação positiva para aumentar a latência das crises convulsivas tônico-clônicas que foram estimuladas pelo pentilenotetrazol aplicados em camundongos.

Neste estudo demonstrou-se, experimentalmente, que o diazepam foi o fármaco que apresentou maior resultado na eficácia do controle das crises convulsivas, que foram induzidas pela aplicação do extrato etanólico de *Nerium oleander* (Figura 11). E resultados semelhantes foram observados em Portela et al. (2015), sobre o qual também demonstrou os efeitos anticonvulsionantes do diazepam no tratamento de crises epiléticas em um grupo de crianças admitidas na emergência pediátrica. E ao comparar os efeitos do diazepam endovenoso com o midazolam intramuscular, o autor observou que 87,5% de um total de 16 crianças que pertenciam a esse grupo de análise tiveram as crises epiléticas controladas com o uso do diazepam em apenas uma dose que foi aplicada. Entre os efeitos adversos relatados com o uso do diazepam, foram verificados sinais de hiperatividade ou vômito em algumas crianças analisadas deste grupo.

Em uma meta-análise realizada por McMullan et al. (2010), comprovou-se a efetividade do diazepam e do midazolam no controle de convulsões de crianças e adultos jovens. De igual modo, constataram-se em outras literaturas muitas respostas positivas com a administração do diazepam, quando tiveram seus efeitos testados com intuito de diminuir a severidade das crises convulsivas induzidas por pentilenotetrazol (VIEIRA, 2015). O pentilenotetrazol é uma substância capaz de induzir convulsões e muito utilizada em modelos de animais para o estudo das crises convulsivas (MUSSULINI, 2013).

Ainda segundo Mussulini (2013), no modelo de convulsão induzida por pentilenotetrazol em zebrafish adulto o tratamento inicial realizado em imersão por um tempo de 40 minutos em solução contendo diazepam, para posteriormente serem imersos em outra solução com pentilenotetrazol, favoreceu a diminuição da severidade das convulsões, porém, não o tempo necessário para o retorno ao comportamento habitual dos animais.

Resultados positivos com diazepam também ocorreram em Hamoy (2011), no qual um estudo caracterizando os quadros convulsivos desencadeados em ratos Wistar pela injeção do extrato de cunaniol extraídos de plantas do gênero *Clibadium sylvestre*, atestou-se que a administração do diazepam (5 mg/kg), no intervalo de 30 minutos antes da aplicação do cunaniol, tiveram os resultados satisfatórios para o controle dos espasmos tônicos, crises clônicas generalizadas com perda do reflexo de postura e crises tônico-clônicas. Em um estudo posterior do mesmo autor (2018), ao analisar as características dos quadros convulsivos desenvolvidas pelo uso do cunaniol, demonstrou-se, positivamente, a eficácia do fenobarbital e do diazepam como fármacos anticonvulsivantes detentores de grande resultado para controle dos quadros de convulsão em animais. Ambos os resultados

compararam-se ao deste estudo, no qual as convulsões tônicas e convulsões tônico-clônicas observadas no estágio II, que foram induzidas pela injeção do extrato etanólico de *Nerium oleander* em ratos Wistar, apresentaram efeito positivo com a utilização de 10 mg/kg de diazepam por via intraperitoneal.

Já Sperling et al. (2014) mediante um estudo acerca dos efeitos do diazepam em sua administração intranasal, o avaliou como sendo uma formulação eficaz para controlar os episódios de convulsões tônico clônicas que foram desenvolvidas em homens e mulheres adultos no momento em que foram submetidos a terapêutica do fármaco nas doses equivalentes a 0,2 mg/kg.

E no estudo realizado por Nogueira (2000), avaliou-se que o pré-tratamento com 10 mg/kg de diazepam teve uma boa atuação na estabilização dos quadros convulsivos desencadeados pela injeção de 9 mg/kg da substância Marinobufogenina (que é conhecido por ser um veneno<sup>3</sup> extraído das glândulas parótidas de sapos *Bufo paracnemis*), em 83,3% de ratos Wistar. Todavia, quando aplicou-se o fenobarbital na dose de 50 mg/kg por via intraperitoneal, não foi eficaz para interromper as convulsões. Na observação dos efeitos da fenitoína, conclui-se que ela teve resultado satisfatório para controlar as convulsões tônico-clônicas generalizadas nos integrantes do grupo de animais. Já no presente estudo, tanto o diazepam e o fenobarbital quanto a fenitoína controlaram os quadros convulsivos induzidos nos animais pela injeção de 150 mg/kg por via intraperitoneal do extrato etanólico de *Nerium oleander*.

O fenobarbital apresentou neste estudo ser um fármaco eficiente no controle das crises convulsivas com a administração de 10 mg/kg da dose por via intraperitoneal, mostrando ser a segunda melhor droga anticonvulsivante utilizada neste experimento. Quando aplicou-se a fenitoína na dose de 10 mg/kg por via intraperitoneal, sua amplitude média no limiar convulsivo foi registrado nos valores de  $2.33 \pm 0.636 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ , evidenciando ser uma droga que controla as convulsões, porém, não de modo eficiente quanto ao diazepam e o fenobarbital. Esse resultado concorda com a meta-análise realizada por Campos (2017), que ao comparar os fármacos com ação antiepilépticas com o fármaco valproato, o resultado mais desfavorável no desfecho das remissões de crises epiléticas foi da fenitoína.

---

<sup>3</sup> As bufotoxinas, que são encontradas na espécie *Bufo*, exercem a capacidade de inibir a bomba  $\text{N}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ , atuando como vasoconstritor em artérias de ratos e humanos (BAGROV et al. 1998, 1995).

Assim, também concordou-se com um estudo realizado por Damasceno (2017), que avaliou a eficiência das drogas no controle de convulsões em neonatos que foram atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), e obteve o seguinte resultado: o fenobarbital e a fenitoína não mostraram benefícios no controle das crises convulsivas, pois apresentou uma falha terapêutica em 33,3% das crianças. A fenitoína não chegou ao limiar terapêutico necessário e por isso foi substituída pelo tratamento com vigabatrina. O fenobarbital alcançou níveis tóxicos na maior parte dos pacientes e não controlou as crises.

Na revisão de literatura desenvolvida por Ferraz (2015), avaliou-se que o traumatismo cranioencefálico grave aumenta a probabilidade de desencadear convulsões, principalmente quando existe hemorragia intraparenquimatosa, fato que complica os casos. E por intermédio destas pesquisas, observou-se que o uso da fenitoína é importante para prevenção de crises convulsivas precoces que podem ser originadas por este trauma.

## 6. CONCLUSÃO

Nesta pesquisa, estudou-se a toxicidade do EENO sob o organismo do animal, obtendo-se como resultado a ocorrência de duas fases, denominadas como fase I e fase II.

Na fase I, observou-se a depressão do SNC, a qual caracterizou-se por imobilidade, relaxamento muscular sem perda do reflexo de postura e relaxamento muscular com perda do reflexo de postura.

Já na fase II, constatou-se a excitabilidade do sistema nervoso central, sobre o qual os animais apresentaram cauda embandeirada, taquipnéia, tremores de cabeça e pescoço, eriçamento de vibríssias, salivação, convulsão tônica e convulsão tônico-clônica. Ambas as fases foram comprovadas através da análise do eletroencefalograma e eletromiograma. Sendo ambos os registros descritos pela primeira vez, evidenciando-se, assim, o ineditismo deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. M. **Redistribuição postmortem de barbitúricos em tecidos biológicos humanos**. 2012. 129f. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 2012.

ALVES, R. B. S. et al. Plantas ornamentais x plantas tóxicas: prevenção de acidentes com crianças. **Revista Ciência em Extensão**, São Paulo, v.12, n.3, p.79-87, 2016.

ANDRADE, C. H.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I. Modelagem molecular no ensino de química farmacêutica. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.7, n.1, p.1-23, 2010.

ASLANI, M. R. et al. Clinical and pathological aspects of experimental oleander (*Nerium oleander*) toxicosis in sheep. **Veterinary Research Communications**, v. 28, n. 7, p. 609-616, 2004.

AUSTIN, M. P.; MITCHELL, P. B. Psychotropic medications in pregnant women: treatment dilemmas. **The Medical Journal of Australia**, v. 169, n. 8, p. 428-431, 1998.

BAFOR, E. E.; IGBINUWEN, O. Acute toxicity of the leaf extract of *Ficus exasperate* on hematological parameters, body weight and body temperature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 302-307. 2009.

BAGROV, A. Y. et al. Characterization of a urinary bufodienolide Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction. **American Journal of Hypertension**, v.31, n.5, p.1097-1103, 1998.

\_\_\_\_\_, et al. Effects of two endogenous Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibitors, marinobufagenin and ouabain, on isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 274, n. 1-3, p. 151-158, fev., 1995.

BALDONI, A. O. Elderly and drugs: risks and necessity of rational use. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 4, out./dez., 2010.

BANDARA, V. et al. A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. **Toxicon**, v. 56, n. 3, p. 273-281, 2010.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 258-285, 2006.

BARRETO, B. C. S.; MASSABKI, P. S. Efeitos adversos no sistema nervoso central dos fármacos antiepiléticos em idosos. **Revista Clínica Médica**, v. 8, n. 4, p. 344-349, 2010.

BELLODI, C.; SOCHA, J.J.M.; HATAYDE, M.R. Intoxicação experimental de cães com folhas verdes de *Nerium oleander* e uso da frutose 1,6 difosfato e da glicose como tratamentos. **PUBVET**, Londrina, v. 8, n. 5, mar. 2014.

BIONDI, D.; LEAL, L.; SCHAFFER, M. Aspectos importantes das plantas ornamentais em escolas públicas estaduais da cidade de Curitiba, PR. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 3, n. 3, p. 267-275, 2008.

BOCHNER, R. Perfil das intoxicações em adolescentes no Brasil no período de 1999 a 2001. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 587-595, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasília, DF, 2018. **Portaria Conjunta Nº17**. Disponível em: < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/junho/28/Portaria-Conjunta.pdf>>. Acesso em: 24 fev., 2019.

BROWN, J. H.; LAIKEN, N. Agonistas e antagonistas dos receptores muscarínicos. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2012, p.219-237.

BURTIS, C. A.; BRUNS, D. E. **Tietz fundamentos de química clínica e diagnóstico molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

CAMPOS, M. S. A. **Comparação da eficácia e tolerabilidade dos fármacos antiepilépticos: revisão sistemática com meta-análises**. 2017. 171f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Assistência Farmacêutica) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

CRUZ, G. M. P. **Estudo dos mecanismos neuroprotetores da piperina nas convulsões induzidas pela pilocarpina em camundongos**. 2012. 200f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Neurologia/Neurociência) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2012.

DAMASCENO, P. G. **O uso da vigabatrina como droga de adição no controle de crises epiléticas neonatais**. 2017. 87f. Dissertação (Mestrado em Neurologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2017.

EDDLESTON, M.; SHERIFF, M. H.; HAWTON, K. Deliberate self harm in Sri Lanka: an overlooked tragedy in the developing world. **BMJ**, v.317, p. 133-135 1998.

\_\_\_\_\_, M.; PHILLIPS, M. R. Self poisoning with pesticides. **BMJ**, v. 328, p. 42-44. 2004.

FERRAZ, V. R. et al. Uso de anticonvulsivantes no traumatismo cranioencefálico. **Neurociênc**, v. 25, n. 1, p. 150-153, 2015.

FIOCRUZ. SINITOX. **Galeria: plantas tóxicas**. Disponível em: < <https://sinitox.icict.fiocruz.br/plantas-toxicas>>. Acesso em: 10 fev. 2019

FLECK, J. **Montelucaste diminui as crises convulsivas em animais abrasados e potencializa o efeito anticonvulsivante do fenobarbital**. 2015. 99f. Tese (Programa de Pós-graduação em Farmacologia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul, 2015.

FUNCK, V. R. et al. Contrasting effects of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activation on seizure activity in acute versus chronic models. **Neuroscience**. n. 9, p. 171-271, jul., 2015.

GALDINO, P. M. **Avaliação da atividade tipo ansiolítica do óleo essencial das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. ST. HIL. – possível mecanismo envolvido**. 2011. 102f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiânia, Goiânia, 2011.

GOMES, M. M. Bases fisiológicas do eletroencefalograma. **Revista Brasileira de Neurologia**, Rio de Janeiro, v.51, n.1, p.12-17, jan./fev./mar. 2015.

GONZÁLEZ, R. L. Epilepsia, tratamiento farmacológico y su monitoreo. **Revista Cúpula**, v. 30, n. 2, p. 44-53, 2016.

GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO-ESCUETA, A. V. Contribution of Na<sup>+</sup>,K(+)-ATPase to focal epilepsy: a brief review. **Epilepsy**. v. 12, n. 2, p. 9-141, 1992.

GUPTA, V.; MITTAL, P. Phytochemical and pharmacological potential of *Nerium oleander*: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 3, p. 21-27, 2010.

HAMOY, M. **Caracterização comportamental e eletroencefalográfica das convulsões induzidas pelo cunaniol e acetato de cunaniol extraídos das folhas de *clibadium sylvestre*, um modelo de convulsão generalizada experimental em ratos (Wistar)**. 2011. 148f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

\_\_\_\_\_, M. et al. Cunaniol-elicited seizures: Behavior characterization and eletroencefalografic analyses. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 360, p. 193-200, dez., 2018.

HOFSTATTER, E. A. **Estudo das respostas farmacogenéticas à carbamazepina e à fenitoína**. 1995. 77f. Tese (Departamento de Genética e Evolução) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1995.

HUGHES, K. J.; DART, A. J; HODGSON, D. R. Suspected *Nerium oleander* (Oleander) poisoning in a horse. **Australian Veterinary Journal**, v. 80. n. 7, p. 412-415, 2002.

JORGE, C. L. Fenitoína: explorando a estrutura molecular dos barbitúricos. In: YACUBIAN, E. M. T.; CONTRERAS-CAICEDO, G.; RÍOS-POHL, L. **Tratamento medicamentoso das epilepsias**. São Paulo: Leitura Médica Ltda., 2014.

KALAYOU, S. et al. In-vitro antimicrobial activity screening of some ethnoveterinary medicinal plants traditionally used against mastitis, wound and gastrointestinal tract complication in Tigray Region, Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 512-522, 2012.

LACERDA, A. M et al. Screening de plantas com potencial fitotóxico. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 4, p. 352-355, 2011.

LANGFORD, S.; BOOR, P. Oleander toxicity: An examination of human and pet toxic exposures. **Elsevier Science**, v. 109, p. 1-13, 1996.

LEEWANICH, P. et al. Behavioural studies on alkaloids extracted from leaves of *Hunteria zeylanica*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, p. 394-399, 1996.

LEITE, K. M.; ARIAS, M. V. B. Eletroencefalografia na Medicina Veterinária - revisão de literatura. **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 11, n. 38, p. 1-13, 2013.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais do Brasil** (arbustivas herbáceas e trepadeiras). 3 Ed. São Paulo: Ed. Plantarum, 2001, 1088 p.

MACIEL, C. F. L.; LIMA, M. H. A.; SOUSA, J. A. Estudo comparativo entre os ansiolíticos Diazepam e Buspirona. **Revista Saúde em foco**, Teresina, v. 2, n. 1, p. 1-11, jan./jul., 2015.

MALTA, J et al. Eletromiografia aplicada aos músculos da mastigação. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, n. 2, p 106-107, 2006.

MARQUEZAN, B.P. et al. Pentylentetrazol-induced seizures are associated with Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity decrease and alpha subunit phosphorylation state in the mice cerebral cortex. **Epilepsy**, v. 105, n. 3, p. 396-400, 2013.

MCMULLAN, J. et al. Midazolam versus diazepam for the treatment of status epilepticus in children and young adults: a metaanalysis. **Academic Emergency Medicine**, v.17, n.6, p. 575-582, jun., 2010.

MCNAMARA, J. O. Farmacoterapia das epilepsias. In: In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12 ed. Porto Alegre: AMGG, 2012, p. 583-607.

MIHIC, S. J.; HARRIS, R. A. Hipnóticos e sedativos. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12 ed. Porto Alegre: AMGG, 2012, p. 457-479.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Biblioteca Virtual em Saúde: convulsão**. 2015. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/dicas-em-saude/2050-convulsao>>. Acesso em: 24 fev., 2019.

MUSSULINI, B. H. M. **Caracterização comportamental do modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol em zebrafish adulto**. 2013. 45f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Março. 2013.

NAGARJUN, N. S.; SOUNDARI, P. G.; KUMARESAN, P. T. CNS depressant activity of *Dalbergia malabérica*. **Indian Drugs**, v. 40, p. 716-717, 2003.

NASCIMENTO, N. C. F. et al. Plantas cardiotoxícas para ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7. p. 1239-1249, 2018.

NICHOLSON, M.W et al. Diazepam-induced loss of inhibitory synapses mediated by PLC $\delta$ / Ca<sup>2+</sup>/calcineurin signalling downstream of GABAA receptors. **Molecular Psychiatry**, n. 23, p. 1851–1867, 2018.

NOGUEIRA, R. M. D. **Status epilepticus induzido por marinobufogenina, uma substância isolada das glândulas parótidas do *Bufo paracnemis* Lutz 1925**. 2000. 151f. Tese (Programa de Pós-graduação em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

NOJOSA, A. K. B.; LIMA, J. E. S.; CARVALHO, T. M. J. P. Determinação quantitativa de fenobarbital em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Intertox de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade**, v. 9, n. 2, p. 68-78, jun., 2016.

NUNES, B. S.; BASTOS, F. M. Efeitos colaterais atribuídos ao uso indevido e prolongado de benzodiazepínicos. **SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO – Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 3, n. 1, Ago./Dez., 2016.

OLIVEIRA, F. G. F. et al. Determinação simplificada de carbamazepina, fenitoína, fenobarbital e lamotrigina em plasma e monitoração terapêutica por HPLC/PDA. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 519-526, 2013.

OLIVEIRA, S. M et al. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 614-622, 2008.

PAPPANO, A. J. Fármacos bloqueadores de colinoreceptores. In: KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 13 ed. Porto Alegre: AMGH, 2017, p. 121-132.

PEDROSO, P. M. O. et al. Intoxicação natural e experimental por *Nerium oleander* (Apocynaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 404-408, maio, 2009.

PEDROZA, H. P. et al. Concentrações de oleandrina nas folhas de *Nerium oleander* de diferentes cores da floração. **Ciência Rural**, v. 45, n.5, p. 864-866, maio, 2015.

PEREIRA, C. A. Z. **Avaliação do efeito da fenitoína (5,5-difenil-2-4-imidazolidione, sódio) na cicatrização cutânea da excisão de nevos melanocíticos na face e no dorso do tórax**. 2009. 152f. Tese (Programa de Pós-graduação em Ciência Cirúrgica Interdisciplinar) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

PIVETTA, K. F. L. et al. Época de coleta e ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de espiroleira (*nerium oleander* L.). **Revista Árvore**, v. 36, n.1, p. 17-23, 2012.

PIETSCH, J. et al. non-fatal oleander poisoning. **International Journal of Legal Medicine**. v. 119, p. 236-240, 2005.

PORTELA, J. L. et al. Intramuscular midazolam versus intravenous diazepam for treatment of seizures in the pediatric emergency department: A randomized clinical trial. **Revista Medicina Intensiva**, v. 39, n. 3, p. 160-166, 2015.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; et al. Plants with anticonvulsant properties - a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 798-819, 2008.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RENNER, U. D.; OERTEL, R.; KIRCH, W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical use of scopolamine. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, n. 5, p. 655-665, out., 2005.

RESENDE, A. P. M. et al. Eletromiografia de superfície para avaliação dos músculos do assoalho pélvico feminino: revisão de literatura. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 18, n 3, p 292-297, jul./set., 2011.

RICHETTI, S. K. **Avaliação dos efeitos de compostos polifenólicos em parâmetros bioquímicos e no tratamento de déficits cognitivos associados à administração de escopolamina em peixe zebra (*Danio rerio*)**. 2010. 167f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Biociência, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

RUSSOMANO, T. et al. O efeito da escopolamina na performance mental durante simulação de microgravidade. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 15, n. 2, abr./jun., 2005.

SOUSA, V. R; SOUZA, M. A. S; ROMERO, J. F. A. Circuito de condicionamento de sinais eletromiográficos. **Anais do 12º Encontro de Iniciação Científica e Pós-Graduação do ITA – XII ENCITA**. São José dos Campos: SP, out., 2006.

SOUSA, F. C. F.; et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 642-654, 2008.

SOUTO, S. M. T. et al. Qualidade de vida de idosos usuários de benzodiazepínicos. **Revista de Atenção à Saúde**, São Caetano do Sul, v. 15, n. 52, p. 96-101, abr./jun., 2017.

SOUZA, G.C.M. **Técnicas para o reconhecimento de padrões no sinal mioelétrico**. 2018. 91f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia da Computação) - Universidade Federal de Itajubá, Minas Gerais, 2018.

SPERLING et al. Dosing feasibility and tolerability of intranasal diazepam in adults with epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 10, p. 1544–1550, 2014.

TENEDINI, V.; MAFRA, J. R.; ANJOS, B. L. PLANTAS ORNAMENTAIS TÓXICAS PARA CÃES E GATOS. **Anais do VII Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão – Universidade Federal do Pampa**, 2016. Disponível em:

<<http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/download/15030/4656>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

TANNU, G. et al. Anti-microbial activity of *Nerium oleander* stem extract. **International Journal of Pharma Professional's Research**, v. 2, n. 1, p. 210-211, 2011.

THURMAN, D.J. et al. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. **Epilepsia**, v. 52, n. 7, p. 2-26, 2011.

VASCONCELOS, J.; VIEIRA, J.G.P.; VIEIRA, E.P.P. Plantas Tóxicas: Conhecer para Prevenir. **Revista Científica da UFPA**. v. 7, n. 1, p. 1-10, 2009.

VIEIRA, V. **Efeito do diclofenaco de sódio na severidade das crises convulsivas e marcadores inflamatórios no modelo animal de kindling induzido por pentilenotetrazol**. 2015. 78f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 78f, 2015.

VITAL, M. A. B. F. Agonistas e antagonistas colinérgicos. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**, 3 Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 59-71.

WOLLMANN, C. T. **Efeitos da agmatina nos prejuízos de aprendizagem e memória induzidos pela escopolamina e envelhecimento em ratos**. 2011. 60f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Farmacologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

YACUBIAN, E. M. T; KOCHEN, S. **Crises epilépticas**. São Paulo: Leitura Médica, 2014.

ZIA, A. et al. Studies on the constituents of leaves of *Nerium oleander* on behavior pattern in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, n. 1, p. 33-39, 1995.

ZIBBU, G.; BATRA, A. A. Review on Chemistry and Pharmacological activity of *Nerium oleander* L. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 2. n. 6. p 351-358, 2010.

ZIMATH. P. L. et al. Avaliação psicofarmacológica do óleo essencial de *Piper amplum*. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 119-249, 2017.

**APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO NA REVISTA  
ETNOPHARMACOLOGICAL**

**BEHAVIORAL, ELECTROMYOGRAPHIC AND ELECTROENCEPHALOGRAPHIC  
ALTERATIONS IN WISTAR RATS CAUSED BY *NERIUM OLEANDER LINN*  
ETHANOLIC EXTRACT INJECTION: A NOVEL DESCRIPTION.**

1-BRUNA SILVA DE MELO<sup>a</sup>, 2- ELIANE PACHECO RODRIGUES<sup>b</sup>, 3-VANIZA SHEILA DE SOUZA FERREIRA SÁ<sup>b</sup>, 4- FILIPE DANTAS LOURINHO<sup>a</sup>, 5-INGRID PERPETUO SOCORRO PINHEIRO TODA<sup>B</sup>, 6- GIULIANA THAISSA MODESTO CARDOSO<sup>b</sup>, 7-DIENIFER NEGRÃO MARQUES<sup>a</sup>, 8-LUIZ ANDRE BARBAS<sup>b</sup>, 9-VANESSA JOIA DE MELO<sup>c</sup>, 10 - NILTON AKIO MUTO<sup>d</sup> 11 – MOISES HAMOY<sup>c</sup>.

- a- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Pará
- b- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.
- c- Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Universidade Federal do Pará.
- d- Centro de Valorização de Compostos Bioativos da Amazônia (CVACBA), Universidade Federal do Pará.

**ABSTRACT**

*Nerium oleander Linn* is a *Apocynaceae* shrub – it is among the most toxic ornamental plants, especially for children and animals – potentially able to lead to death if ingested. There are few studies relating *N.oleander* to neural and behavioral alterations in the current literature. The present study aim to describe novel effects of the Ethanolic Extract of *N.oleander* (EENO). Oleandrin was separated and confirmed by liquid-liquid extraction and analyzed by high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD), on a reversed phase C<sub>18</sub> column and employing water-acetonitrile (63:37) (v/v) as a mobile phase. The EENO was injected by a dose: 150mg/kg i.p. to a total of 63 wistar rats divided into groups of 9 animals. The behavioral test demonstrated two phases of CNS activity, I-phase of myorelaxation and depression and the phase II with excitability, the two phases were verified by Electroencephalogram (EEG) and Electromyogram (EMG) of the animals. The outbreak of convulsions caused by the extract indicates the possibility of inclusion in the therapeutic protocol of anticonvulsive drugs such as diazepam, especially in people who are more susceptible as in epileptic patients.

**Key Words:** *Nerium oleander*, Wistar rats, Electroencephalogram, Electromyogram, Toxicity, Central Nervous System.

## **1 – INTRODUCTION**

The oleander is an hardy shrub that thrives in tropical and subtropical regions. The common pink oleander, *Nerium oleander*, is the principle oleander representatives of the family Apocynaceae (Langford & Boor, 1996). Toxic exposures of humans and animals to *Nerium oleander* occur with regularity throughout geographic regions where these plants grow. The human mortality associated with oleander ingestion is generally very low, even in cases of intentional consumption (suicide attempts) (Langford & Boor, 1996).

Poisoning by that plant is a common toxicological emergency in tropical and subtropical parts of the world. All parts of these plants are toxic, and contain a variety of cardiac glycosides. Ingestion of either oleander results in nausea, vomiting, abdominal pain, diarrhoea, dysrhythmias, and hyperkalemia. In most cases, clinical management of poisoning by either *N. oleander* involves administration of activated charcoal and supportive care. Digoxin specific Fab fragment is an effective treatment of acute intoxication (Zhao et al. 2007; Bandara et al. 2010).

The basis for the physiological action of the oleander cardenolides is similar to that of the classic digitalis glycosides, i.e. inhibition of plasmalemma  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ ATPase. The data reviewed here indicate that children are at increased risk of oleander poisoning. (Akhtar et al. 2014). Recently six new cardenolides, including three 14-hydroxylated cardenolides and three 14-carbonylated cardenolides were isolated from the dried aerial parts of *Nerium oleander*, in addition to twenty-seven known compounds (Cao et al. 2018) .

The toxic effects of *N. oleander* have long been known, but the effect on the central nervous system has never been characterized. The intention of the present study was to determine the electroencephalographic and behavioral alterations after the administration of the ethanolic extract of the leaves of *N. Oleander* in wistar rats.

## **2 - METODOLOGY**

### **2.1 - ANIMALS**

For the study propose, 63 male adults wistar rats were used – weight between 200 and 250g. All the animals were obtained from the central animal Bioterium of the Universidade Federal do Pará (UFPA) and kept into the bioterium of experiments located at the Lab of Natural Products' Pharmacology and Toxicology (LFTPN). The temperature were set between 25-28°C and the luminosity were artificially regulated – 12h of light and

12h of darkness. Each cage contained 3 animals at most. Free food and water were available during the experiment. The experimental model follows the Ethics Committee on Research with Experimental Animals of the Federal University of Pará (CEPAE - UFPA) under the protocol number 11/2015.

## 2.2 - EXTRACTION OF BOTANICAL MATERIAL

*Nerium oleander* samples were collected in the city of Belém – PA –Brazil, where it is easily found and immediately forward to the identification process at the Laboratory of Botanical Identification of the Botany Laboratory - Herbarium of the Brazilian Agricultural Research Company (Embrapa) of East Amazon. There, the samples were compared with exsiccates in the in the lab collection for the correct classification, gender and Scientific name, respectively as follow: Apocynaceae, Nerium and *Nerium oleander* L., IAN number 197195.

The extract were obtained from leafs of this plant by researchers of LFTPN – located at UFPA – according to internacional guidelines suggested by World Health Organization (WHO). The leaves were collected in May, mean temperature of 32.4°C, in Belém - Pará - Brazil, latitude 01° 27'21”S, longitude 48° 30'16” W.

The leaves were processed into ethanol absolute (Sigma) left in contact with the leaves for 48 hours under constant agitation, extracting polar and apolar substances contained in the leaves, subsequently the alcohol was filtered and evaporated at a temperature of 50°C. The dried extract was resuspended in 0.9% physiological solution containing Tween 20 (Sigma - Aldrich) 0.05%, at a concentration of 10 mg / mL. The data of our previous studies performed at LFTPN-UFPA showed that ED50 (Effective dose) to achieve seizure crises with loss of postural reflex was 150 mg/kg via intraperitoneal. During the extraction of the vegetal material, the yield obtained for each kilogram of leaves was of 10,3 g of *N. oleander* extract.

The remained dried extract was kept frozen at -20°C and liofilized under low pressure for 24h to dry the remained water. 100 mg of the liofilized extract was recovered with 10 mL of water-acetonitrile mixture (8.2) (v/v). The recovered extract was diluted to 1/5 in a methanol-acetonitrile mixture (1.1) (v/v), to a final ratio of acetonitrile-methanol-water mixture (44.40.16) (v/v/v), then filtered through HPLC PVDF acrodiscs (porosity 0.45 µm) and injected into the HPLC apparatus (adapted from Nadji et al. 2017).

### 2.3 - CHEMICALS AND REAGENTS

Acetonitrile and methanol of HPLC grade were obtained from CRQ (São Paulo, Brazil). Ultra pure water was produced using a Direct Q3 system (Millipore, Molsheim, France).

The anesthetic ketamine was purchased from König (Santana de Parnaíba, SP, Brazil) and xylazine from Vallée (Montes Claros, MG, Brazil) while the local anesthetic lidocaine was obtained from Hipolabor (Sabará, MG, Brazil). Anticonvulsant compounds phenobarbital (Aventis-Pharma, Ribeirão Preto, SP, Brazil); phenytoin, diazepam and scopolamine (União Química, Embu-Guaçu, SP, Brazil); were also purchased .

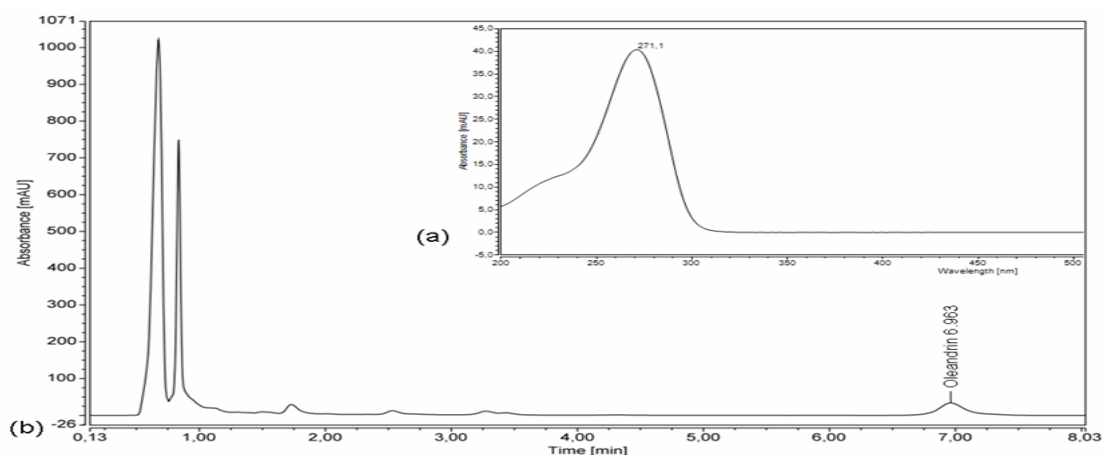
### 2.4 – INSTRUMENTATION

HPLC analysis was carried out using a Dionex UltiMate 3000 HPLC system (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) equipped with UltiMate 3000 RS pump, UltiMate 3000 autosampler column compartment and UltiMate 3000 photodiode array detector. Data acquisition was performed with Chromeleon software (Sunnyvale, CA, USA).

### 2.5 - HPLC-DAD conditions

The chromatographic separation was performed on a Kinetex® C<sub>18</sub> 100A HPLC column (2,6 µm, 100x4,6 mm) with the column temperature set at 30°C. The mobile phase consisted of acetonitrile-water (37/63 v/v) at a flow rate of 1.3 mL/min. The DAD detector recorded UV spectra in the range from 190 to 400 nm and the monitored wavelength was set at 280 nm. The injection volume was 20 µL. Analysis time was 8 min and the absorption of oleandrin was 271 nm. The retention time was 6.963 min (Figure 1).

**Figure 1.** HPLC chromatogram for identification of Oleandrin from Leaf extract. (a) Apex of absorbance of 271 nm, (b) Retention time of 6.963 min.



## 2.6 – BEHAVIORAL DESCRIPTION

Nine animals underwent an intraperitoneal injection (i.p.) of EENO at the dose of 150 mg/kg, and the behavior manifested after this injection was observed for a period of two hours. At this time, we recorded the latency period for the appearance of the main manifestations caused by the extract.

**TABLE 1.** Analyzed Behavioral Chart.

Phase	Behavior
CNS depression (Phase –I)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Imobility</li> <li>2. Relaxation without loss of posture reflex.</li> <li>3. Muscle relaxation with loss of posture reflex.</li> </ol>
CNS excitation (Phase –II)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Flagged Tail</li> <li>2. Tachypnea</li> <li>3. Head and neck shudder, vibrissae erection and salivation.</li> <li>4. Tonic Seizure</li> <li>5. Tonic–clonic seizure</li> <li>6. Anterior limb shudder interspersed by tonic-clonic seizures.</li> </ol>

## 2.5 – ANIMALS' ELECTROENCEPHALOGRAM ANALYSIS

Effects of the substances presented in the extract on the central nervous system confirmed all the observations caught in the behavioral test, electrodes were implanted at the level of the duramater of 54 animals – those animals were divided in six groups with 9 animals each: Control (saline solution 0,9%) (n = 9); treated group with EENO (150 mg/kg i.p.) (n = 9); to decrease the seizures observed in phase -2: EENO (150 mg/kg i.p.) + Scopolamine (10 mg/kg i.p.) (n = 9); EENO (150 mg/kg i.p.) + Phenobarbital (10 mg/kg i.p.) (n = 9); EENO (150 mg/kg i.p.) + Diazepam (10 mg/kg i.p.) (n = 9); EENO (150 mg/kg i.p.) + Phenytoin (10 mg/kg i.p.) (n = 9).

Animals were anesthetized by ketamine (50 mg/kg i.p.) and xylazine (10 mg/kg i.p.). After abolishment of their corneal reflex, the animals were positioned in a stereotaxic apparatus. After surgical procedures to expose the skull, two bilateral holes were drilled in

the rat skull with a dental drill. Stainless steel electrodes (tip exposure 1.0 mm diameter) were placed on the duramater above the frontal cortex at coordinates of bregma – 0.96 mm and  $\pm$  1.0 mm lateral (Paxinos & Watson, 2005). A screw was fixed in the occipital skull region, and the electrodes were fixed with dental acrylic cement using the screw as a base and ground for the electrodes.

### 2.5.2 - ELECTROENCEPHALOGRAPHIC RECORDS

After surgery, animals were kept in individual cages. Seven days after surgery, the electrodes were connected to a digital data-acquisition system composed by a high impedance amplifier (Grass Technologies, P511), an oscilloscope (Protek, 6510) and a board for data acquisition and digitalization (National Instruments, Austin, TX). Data were continuously sampled at 1kHz at a low pass of 0.3 kHz and a high pass of 0.3 Hz.

The recordings followed a standard protocol: 10 min of accommodation in carefully immobilized animal to avoid records interference. We recorded control electroencephalographic activity for 5 min which was used as a control in EEG analyses. Thereafter, EENO (150 mg/kg i.p.) was administered, and electrocorticographic activity was further recorded for 3000 seconds. For the evaluation of the seizure control by anticonvulsants, animals were treated at the same time with EENO and anticonvulsants to verify its effectiveness in phase - II.

For the analysis of acquired signals, a tool was built using the Python programming language version 2.7. The Numpy and Scipy libraries were used for mathematical processing and the Matplotlib library for graphics. The graphical interface was developed using the PyQt4 library.

### 2.5.3.ELECTROMYOGRAPHIC RECORDS

To demonstrate muscle activity after EENO application, conjugated electrodes were implanted in the Masseter muscle. The record was amplified 2000X the data were processed similar the electroencephalogram.

## 2.6 - STATISTICAL ANALYSIS.

The values of the results were described as mean and standard deviation. Potency comparisons were performed using ANOVA and Tukey test using GraphPadPrism ® software. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

### 3 - RESULTS

The identification of oleandrin showed the maximum wavelength absorbance of 271 nm and retention time of 6.963 min. Similar results were referred by detection of residues of cardenolides of *Nerium oleander* in autopsy samples and by determination of oleandrin levels by HPLC-DAD (Praveen et al., 2012, Nadji et al., 2017) (Figure 1).

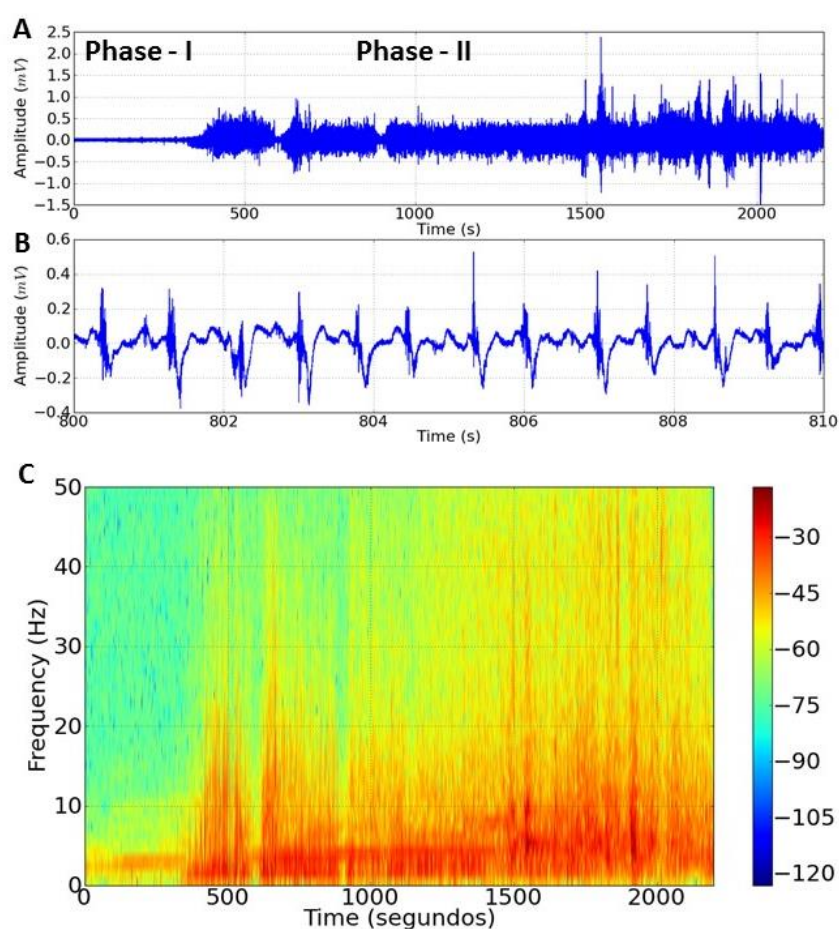
The analysis of the poisoning condition caused by the Ethanoic Extract of *Nerium oleander* (EENO) was characterized by the occurrence of two stages into the behavioral table (Table 2). In the first phase, the animals presented classic symptomatology related to depression of CNS, as immobility and muscle relaxation without loss of postural reflex followed by muscle relaxation followed by loss of postural reflex – That phase had a latency mean average of  $5.23 \pm 1.89$  minutes. In the second phase, it was noticed the flagged tail; tachypnea; head and neck shivers; vibrissae erection; salivation; tonic seizure; tonic-clonic seizure; Head, neck and anterior limb shivers interspersed by tonic-clonic seizures. This stage had a latency mean average of  $15.75 \pm 2.59$  minutes. Both behavioral stages were proven by masseter muscle electromyogram (FIGURE 2) and electrocorticographic record of basal group and treated (FIGURE 3 and 4).

**TABLE 2.** Behavioral characterization of the induced condition after the application of the ethanolic extract of *Nerium oleander* and latency for the occurrence of the behaviors. Observation performed in 120 minutes (n = 9).

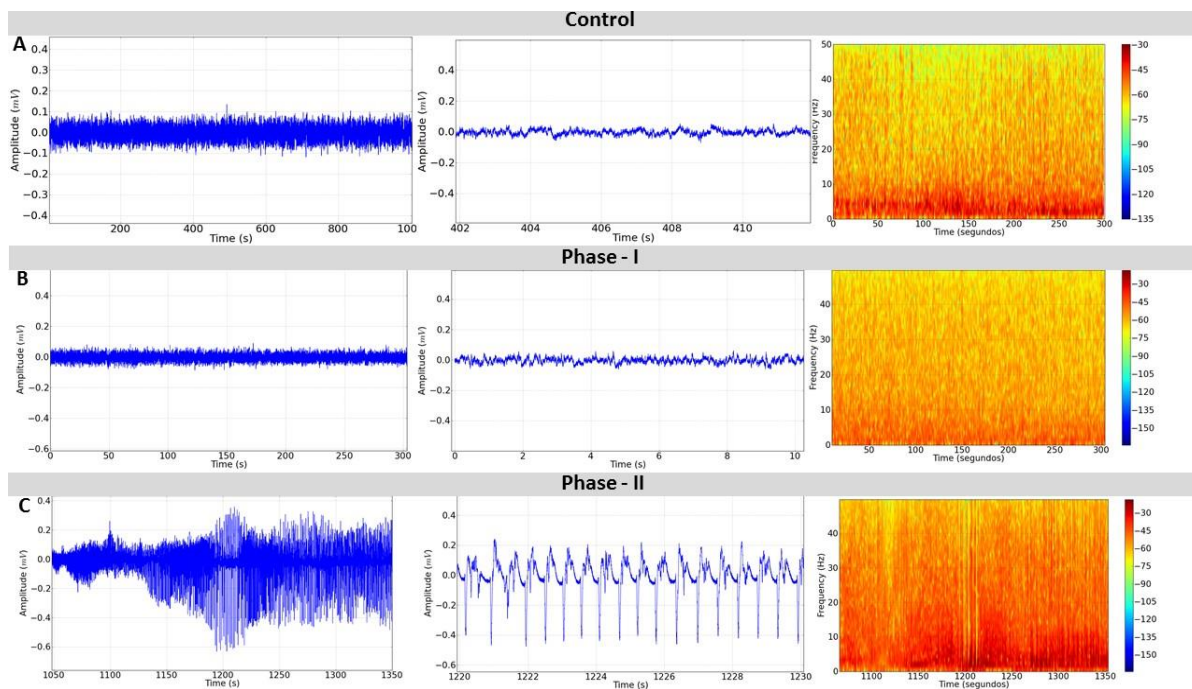
Phase	Behavior	Latency (Minutes)
<b>Phase –I</b> <b>(Depression of CNS)</b>	1.Imobility	5.24 ± 1.89
	2.Relaxation without loss of posture reflex.	10.46 ± 2.52
	3.Muscle relaxation with loss of posture reflex.	12.07 ± 3.38
<b>Phase –II</b> <b>(Excitability of CNS)</b>	1.Flagged Tail	15.75 ± 2.59
	2.Tachypnea	17.43 ± 2.22
	3.Head and neck shudder, vibrissae erection and salivation.	19.90 ± 2.76
	4.Tonic Seizure	23.66 ± 5.54
	5.Tonic-clonic seizure	25.37 ± 6.02
	6.Anterior limb shudder interspersed by tonic-clonic seizures.	29.37 ± 4.84

The electromyographic records of masseter muscle has shown repetitive conditions of muscular contraction compatible with seizures. The first 400 seconds didn't show amplitude changes, it had being recorded only one continuous line without fluctuations (FIGURE 2A) and energy distribution lower than 10Hz (FIGURE 2B) indicating lack of muscular activity (muscle relaxation) Phase -I. From this moment, it is recorded a large variation on the amplitude records (FIGURE 2A) and energy distribution ranging from 1 to 50 Hz (FIGURE 2B) showing an increase on the muscular contraction (phase -II).

**Figure 2.** Demonstration of the electromyogram obtained from the masseter muscle. Observe the pattern of muscular contraction suggestive of seizure (A); Energy distribution spectrogram during muscle contraction recording (B). (n = 9)

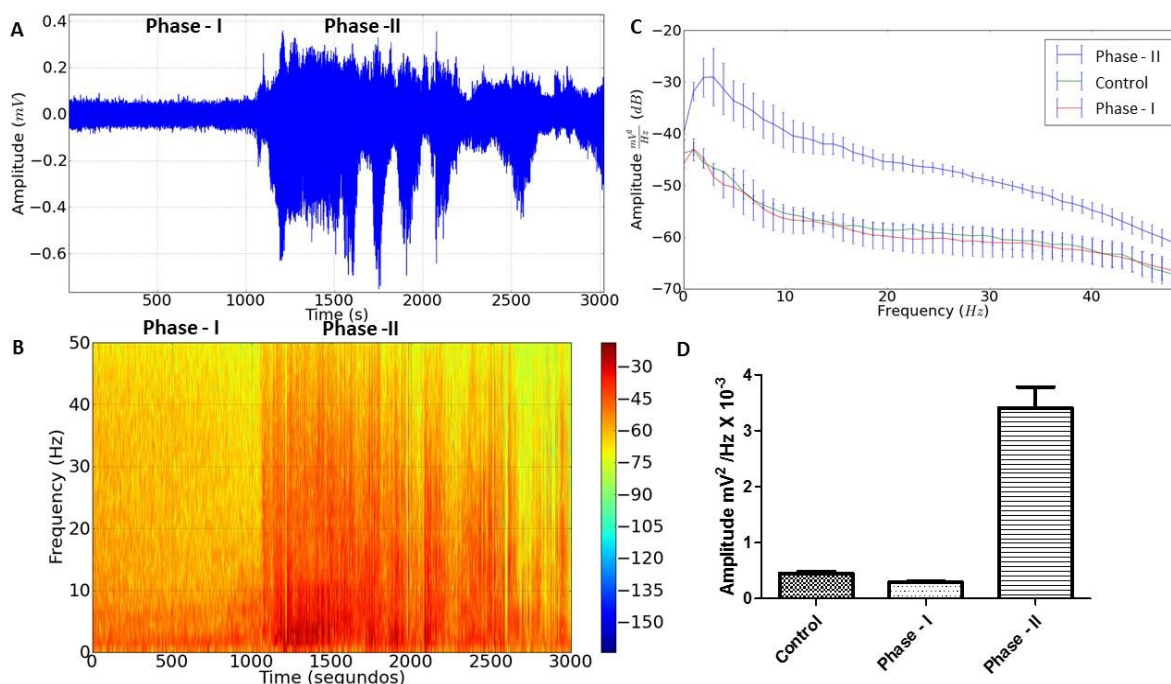


**Figure 3.** Electrocardiographic tracing of an animal in the basal state (A); Electrocardiogram of animals after the application of EENO Phase - I (B), characteristic of the tracing of the animal in seizure (Phase - II) (C).



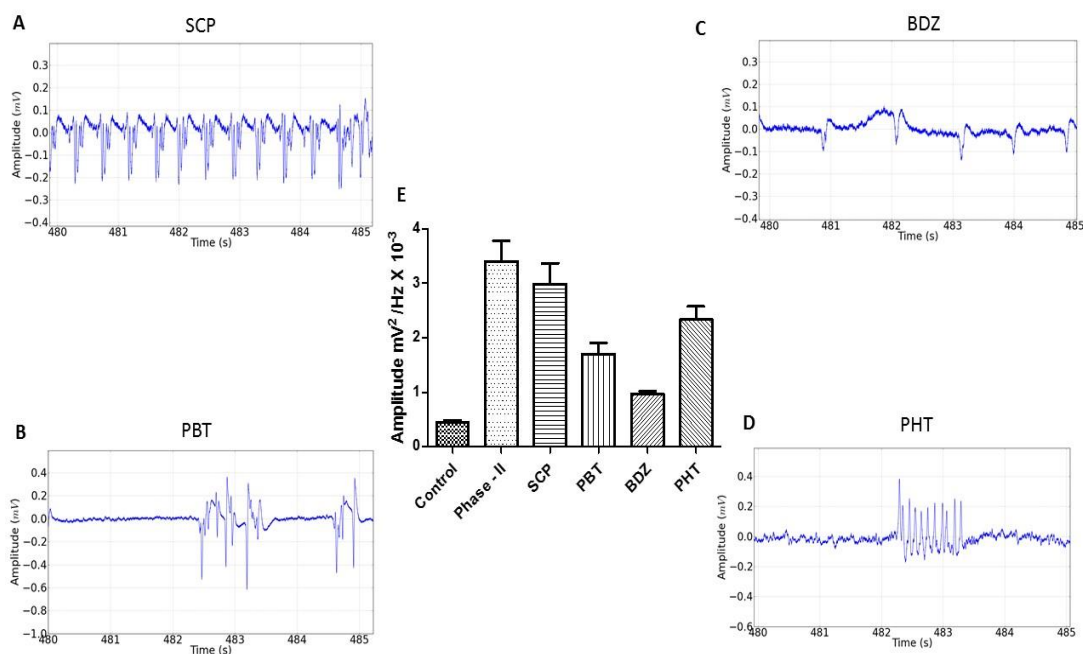
The behavioral feature can be elucidated from analysis of the electrocorticographic tracing. The animal at the control roamed normally, presenting a tracing that reveals a spectrogram that has a larger concentration of energy lower than 10Hz (FIGURE 3A). During the phase I, which occurs right after the application of EENO it is observed muscle relaxation in the behavior. However when it is analyzed in the electrocorticographic (ECoG) it can be observed a smaller irregularity in the tracing and a smooth reduction of the energy level compared to the control spectrogram. Thus the largest energy keeps lower than 10Hz – similar to the control ECoG (FIGURE 3). The Phase -II begins with a bigger distribution of frequency energy as revealed in the spectrogram – due to a cerebral excitability, which contrast with the phase -I (FIGURE 3C).

**Figure 4** Electroencephalographic record obtained after the application of EENO verified two phases (A); Spectrogram demonstrating the difference between the distribution of forces between 1 and 50 Hz for phase I and II (B); power amplitude medium distributed to each frequency phase I, II and basal register (C); Graph showing the amplitude in linear scale in frequency of 1 to 50 Hz (D). (n = 9)



According to behavioral analysis observed after the injection of the EENO, it was established two distinct phases into the central nervous system (CNS) that can be proven from the EcoG analysis (FIGURE 4). In the spectrogram it can be noticed a higher concentration of frequencies lower than 10Hz in the phase - I, followed by a higher distribution of energy in the phase - II, pointing that a higher brain activity, compatible with a seizure condition (FIGURE 4A and 4B). The amplitude graph described in a logarithmic scale (FIGURE 4C), showed that there was no statistical difference between the amplitude mean average obtained in the phase I and the record of control. The phase II showed that during the condition of increased cerebral excitability the level of amplitude increased more in comparison to the control and phase - II. The evaluation of the linear scale of amplitude in frequency values until 50Hz obtained in the control with an amplitude average of  $0.453 \pm 0.0807 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$  was not statistically relevant when compared to the potency mean average in the phase - I ( $0.293 \pm 0.0381 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ). In the phase -II the amplitude mean average was  $3.406 \pm 0.9947 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ , showing significantly difference in comparison to the control and phase - I (FIGURE 4D).

**Figure 5.** Electroencephalographic record obtained in phase -II after drug application in the attempt of controlling phase -II. Demonstration of the tracing pattern found for scopolamine (SCP) (A), phenobarbital (PBT) (B), Diazepam (BDZ) (C) and phenytoin (PHT) (D). Graph showing the activity in the control of seizures observed in phase - II (E).



In order to control the seizure condition observed in the stage II, it was used drugs as scopolamine (10mg/kg); phenobarbital (10mg/kg), Diazepam (10 mg/kg) and phenytoin (10mg/kg). The record of the control display an amplitude mean average of  $0.453 \pm 0.08 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$  in the phase - II the seizure condition triggered an amplitude increase of de  $3.406 \pm 0.994 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ . After the use of scopolamine (SCP), all the animals presented an medium average of de  $2.99 \pm 1.023 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ , which did not represent an statistical difference in comparison with the seizure condition caused by EENO. For the manage of the seizure, more efficient results were obtained using phenobarbital (PBT) (amplitude mean  $1.705 \pm 0.53 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ), diazepam (BDZ) (amplitude mean  $0.974 \pm 0.122 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ) and phenytoin (amplitude mean  $2.33 \pm 0.636 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ). From all these medicines, the most efficient for the proper control of the seizures was diazepam (FIGURE 5).

## 6 - DISCUSSION

### 6.1 – BEHAVIORAL ALTERATIONS .

Nagarjun et al., 2003, affirm the Ethanoic Extract of Nerium oleander promotes alterations in the GABA neurotransmission system due to increase of this neurotransmitter levels in the CNS. This mechanism induces the reduction of motor activity via CNS depression – what confers sedative and hypnotic activity to this extract, changing rats' behavior (Zia *et al.*, 1995) (Leewanich *et al.*, 1996). Behavioral patterns of nervous system depression demonstrated by phase -I of this study, presenting initial myorelaxation, which corroborates with increased activity of GABAergic neurotransmission. However, increased excitability was observed leading the animals to the convulsions that characterized phase -II. The phases were proven from the analysis of electroencephalographic and electromyographic records and for the first time described.

Poisoning by *N. oleander* were observed excitability cited in several articles Langford and Boor (1996) found sialorrhea and muscle tremors in humans. Aslani et al. (2004) observed vocalisation, seizures and muscle tremors in sheep. There were muscle tremors, rigid walking, pedaling and death in dogs (Pedroso et al., 2006; Soto-Blanco et al., 2006; Aslani et al. 2006).

Pedroso et al. (2009) performed an experiment with *N. oleander* in cattle. Twenty-nine minutes after ingestion, the animals presented sialorrhea, followed by frequent urination, teeth grinding and generalized muscle tremors, there was difficulty in locomotion, regurgitation of ruminal contents, abrupt fall of the animal to the ground, lateral decubitus, pedal movements, Intense tachycardia, mooing and death.

Behavioral data show that changes in symptoms of intoxication, repeated in several species, components such as muscle tremors and convulsions indicate excitability of the CNS, corroborating with phase II. In the present study, the Electromyogram demonstrated muscle contraction compatible with a long-term convulsive condition, according to electrocorticographic analysis

The observation of electrical signals in the nervous system is described as a marker of nerve impulse. The electroencephalogram has been widely used in the diagnosis and follow up of neurological pathologies. Thus, to prove the convulsive effects of the EENO in the CNS, the EEG was made that demonstrated the phases of depression and increased excitability observed in the behavior.

The basis for the mechanism of action for intoxication of the oleander cardenolides is similar to the for intoxication of the classic digitalis glycosides, i.e. inhibition of plasmalemma  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity significantly decreased after PTZ-

induced seizures (60 mg/kg). A significant positive correlation between  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity and latency to myoclonic jerks and generalized seizures was found (Langford & Boor, 1996; Marquean, et al. 2013).

The triggering of seizures observed during the intoxication that characterizes phase II is related to  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase inhibitory activity. The compounds contained in the extract have characteristics that allow passage through the blood-brain barrier. In the CNS it initially causes decreased motor activity (myorelaxation) and subsequently excitability.

Hypothesized that this molecular mechanism could play a role in removing  $\text{K}^+$  released in the extracellular space during neuronal firing. These results have therefore been investigated in acute and chronic epileptogenic lesions of cats with freeze lesion. It was demonstrated that within the primary and the secondary or 'mirror' focus the  $\text{K}^+$  activation of the glial  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dramatically decreased compared to both control animals and the perifocal non epileptogenic area. Similar results were observed in man when using specimens of anterolateral temporal neocortex obtained during temporal lobectomies in patients with intractable temporal lobe epilepsy, compared with postmortem human specimens or control brain tissues (Guillaume, 1988; Grisar, et al. 1992).

Thus, patients with low convulsive threshold may be more susceptible to seizures caused by *Nerium oleander* intoxication. The seizures are long-lasting and have tonic-clonic characteristics of difficult control, since different anticonvulsants were used, diazepam controlled convulsions. In a model epilepticus provoked by pilocarpine, the use of scopolamine reduced convulsion, but in *Nerium oleander* intoxication, it had no effect on seizure control.

Brain  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity contributes to the maintenance of the electrochemical gradients underlying neuronal resting and action potentials as well as the uptake and release of neurotransmitters. Accordingly, a decrease of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase increases neuronal excitability and may predispose to appearing of seizure activity (Funck et al. 2015).

Cardenolides are naturally occurring plant toxins which act primarily on the heart. Death occurs from ventricular fibrillation or tachycardia. A wide range of treatments have been used, the more common including activated charcoal, atropine,  $\beta$ -adrenoceptor agonists, temporary pacing, anti-digoxin Fab and magnesium, and more novel agents include fructose-1,6-diphosphate (clinical trial in progress) and anticalin. However, even in the case of those treatments that have been in use for decades, there is debate regarding their

efficacy, the indications and dosage that optimizes outcomes. This contributes to variability in use across the world (Roberts & Bruckey, 2006; Roberts, *et al.* 2016).

Seizures are present during the course of intoxication by *Nerium oleander*, but no anticonvulsive drugs have been used. In our experiment the most effective drug for the control of convulsions was diazepam (FIGURE 5). Inclusion in the treatment protocol of anticonvulsants when they are detected when the excitability manifests.

## 7 - CONCLUSION

The behavioral stages demonstrate two patterns characterized by depression followed by excitation of the nervous system, this promotes a great opportunity to the study and development of new therapeutic proposals to control intoxication. The importance in patients with low epileptic threshold, where the excitability may become worse.

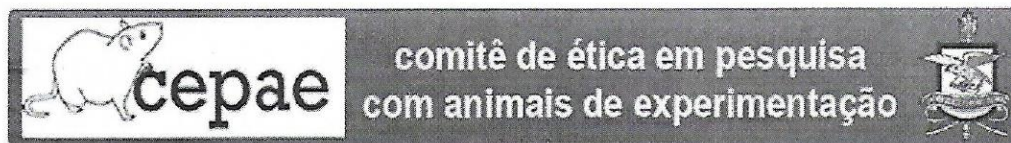
## 8 - REFERENCES

1. ASLANI, M. R.; et al. Clinical and pathological aspects of experimental oleander (*Nerium oleander*) toxicosis in sheep. *Veterinary Research Communications* v.28, n.7, p. 609-616. 2004. Link: <http://link-springer-com.ez3.periodicos.capes.gov.br/article/10.1023/B:VERC.0000042870.30142.56>. Accessed: March 2nd 2017.
2. ASLANI, M. R.; et al. Experimental oleander (*Nerium oleander*) poisoning in goats: a clinical and pathological study. Islamic republic of Iran, *Iranian Journal of Veterinary Research* v.8, p. 58-63. 2007. Link: [http://ijvr.shirazu.ac.ir/article\\_2708\\_8.html](http://ijvr.shirazu.ac.ir/article_2708_8.html). Accessed: March 2nd 2017.
3. Akhtar,T.; Sheikh,N.\* and Abbasi, M.H. Clinical and pathological features of Nerium oleander extract toxicosis in wistar rats. *BMC Research Notes*, 7:947, 2014.
4. Bandara V.; Weinstein Scott A.; White J.; Eddleston M. A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. *Toxicion* 56, 3, p\_273-281, 2010.
5. Cao, Y.L.; Zhang, M. H.; Lu, Y.F.; Li, C.Y.; Tang, j. S.; Jiang, M.M. **Cardenolides from the leaves of *Nerium oleander***. *Fitoterapia, Volume 127, p293-300. 2018.*
6. Funck V.R; Ribeiro L.R; Pereira L.M<sup>1</sup>; de Oliveira, C.V<sup>1</sup> Grigoletto, J; Della-Pace, I.D; Figuera, M.R; Royes, L.F; Furian, A.F; Larrick, J.W; Oliveira, M.S. Contrasting effects of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activation on seizure activity in acute versus chronic models. *Neuroscience*. 9;298:171-9. 2015.
7. Grisar, T.; Guillaume, D.; Delgado-Escueta, A.V. Contribution of Na<sup>+</sup>,K(+)-ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Res.* 12(2):141-9. 1992.
8. Guillaume, D. Brain cortical (Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>)-ATPase in epilepsy. A biochemical study in animals and humans. *Acta Neurol Belg.* 88(5):257-80.1988.

9. Langford, S.D.; Boor, P. J. Oleander toxicity: an examination of human and animal toxic exposures. **Toxicology**. 3.109, p. 1-13 1996.
10. LANGFORD, S.; BOOR, P. Oleander toxicity: An examination of human and pet toxic exposures. **Elsevier Science** v.109, p. 1-13. 1996. Link: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0300483X9503296R>. September 12th 2017.
11. LEEWANICH, P.; et al. Behavioural studies on alkaloids extracted from leaves of *Hunteria zeylanica*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v.19, p. 394-399. 1996. September 12th 2017.
12. Marquezan, B.P.; Funck, V.R.; Oliveira, C.V.; Pereira, L.M.; Araújo. S.M.; Zarzecki, M.S.; Royes, L.F.; Furian, A.F.; Oliveira, M.S. Pentylentetrazol-induced seizures are associated with Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity decrease and alpha subunit phosphorylation state in the mice cerebral cortex. **Epilepsy Res**.105(3):396-400.2013.
13. MESA SOCHA, J. J. **Intoxicação experimental de cães com folhas verdes de *Nerium oleander* e uso da frutose 1,6 difosfato e da glicose como tratamentos. Dissertação** (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 48 p. 2011. Link: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/89202>. September 12th 2017.
14. NADJI, S.; ABDAOUI, A.; OUERDANE, H.; AZZOUZ, M; ABTRON, R.; REGGAB, M.; ALAMIR, B. Determination of Oleandrin Levels by HPLC-DAD in Vegetal Material Collected Throughout Algeria and the Study of Some Influencing Factors. **Res. J. Phytochem.**, 11: 74-84. 2017
15. NAGARJUN, N. S.; SOUNDARI, P. G.; KUMARESAN, P. T. CNS depressant activity of *Dalbergia malaberrica*. **Indian Drugs** v.40, p. 716-717. 2003.
16. PEDROSO, P. M. O; et al. Intoxicação natural e experimental por 39 *Nerium oleander* (Apocynaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.5, p. 404-408. 2009. Link: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/80746>. Accessed:October 25th 2017.
17. Praveen U.S., Gowtham M.D., Yogaraje-Gowda C.V., Nayak V.G., Mohan BM. Detection of Residues of Cardenolides of *Nerium oleander* by High-Performance Thin-Layer Chromatography in Autopsy Samples. **International Journal of Medical Toxicology and Forensic Medicine**. 2(4):135-142, 2012
18. Roberts. D.M.; Buckley, N.A. Antidotes for acute cardenolide (cardiac glycoside) poisoning. **Cochrane Database Syst Rev**.18;(4): 2006.
19. Roberts, D.M.; Gallapatthy, G.; Dunuwille, A.; Chan, B.S. Pharmacological treatment of cardiac glycoside poisoning. **Br J Clin Pharmacol**. 81(3):488-95. 2016.
20. SOTO-BLANCO, B.; et al. NÓBREGA, J. E. Acute cattle intoxications by *Nerium oleander* pods. **Tropical Animal Health and Production** v.38, p. 451-454. 2006. Link: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-006-4400-x>. Accessed:October 25th 2017.
21. VITAL, M. A. B. F. Agonistas e antagonistas colinérgicos. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**, 3ª Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 59-71, 2002. Link: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGB.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expression=mfn=239107> Accessed:October 25th 2017.

22. Zhao, M. ; Bai, L.; Wang, L.; Toki, A.; Hasegawa, T.; Kikuchi,M.; Abe, M.; Sakai, j.; Hasegawa, R.; Bai, Y.; Mitsui,T.;□ Ogura, H.;□ Kataoka,T.;□ Oka, S.; Tsushima, H.; Kiuchi, M.; Hirose,K.; Tomida, A.; Tsuruo, T. and Masayoshi Ando, Bioactive Cardenolides from the Stems and Twigs of *Nerium oleander* , **J. Nat. Prod.** , 70, 1098-1103, 2017.
23. ZIA, A.; et al. Studies on the constituents of leaves of *Nerium oleander* on behavior pattern in mice **Journal of Ethnopharmacology**. v.49, n.1; p. 33-39. 1995.Link:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378874195013008>. Accessed:October25th2017.

## ANEXO A – FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER- 11/15

**Projeto:**  
**CARACTERIZAÇÃO HEMATILÓGICA, COMPORTAMENTAL E ELETROCORTICOGRÁFICA DAS CONVULSÕES INDUZIDAS PELA APLICAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *NERIUM OLEANDER* EM RATOS WISTAR ADULTOS.**

**Coordenador:** Prof. Dr Moises Hamoy

**Área Temática:** Ciências Biológica

Área: - Neurofisiologia  
Farmacologia

Vigência: 01/04/2015 a 01/03/2017.

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do (s) modelo (s) animal proposto (s). Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para o tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 0276/2015 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação que correspondem a **57 Ratos Wistars** nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

Belém, 20 de maio de 2015

Professor Dr. Moisés Hamoy

Presidente do CEPAE-UFPA

## ANEXO B – LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA



### ABORATÓRIO DE BOTÂNICA-HERBÁRIO LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

1) Dados do Solicitante

Pessoa Física ou Jurídica: <b>BRUNA SILVA DE MELO - UFPA</b>			
CPF ou CNPJ:		C.I. ou Inscrição Estadual:	
Endereço: Rua João Balbi			
Bairro: Nazaré	CEP:	Cidade: Belém	UF: PA
Tel: 982374945	FAX:	E-mail:	

2) Dados do Material para Análise – N° do NID: 50/2018 (controle do Laboratório)

Local de Origem: <b>Belém (planta de jardim)</b>	Quantidade de Amostras: <b>01</b>
Tipo de Amostra: ( X ) Fértil ( ) Estéril	
Nome do Coletor: <b>BRUNA SILVA DE MELO</b>	
Data de Entrada no Laboratório: 25.05.2018	Analisado por: Miguel e Ednaldo
Destino e/ou Utilização do Laudo: <b>TCC</b>	Supervisionado por: Silvane Tavares

3) Processo utilizado para Identificação:

Comparação com exsicatas do acervo do herbário IAN.  
Classificação dos gêneros em família segundo APG III.  
Lista de espécie da Flora do Brasil.

#### RESULTADO DAS ANÁLISES

Cod.	Nome Comum	Nome Científico	Família
Col. 01 (IAN: 197195)		<i>Nerium oleander</i> L.	Apocynaceae

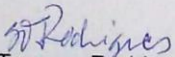
**Obs: Prazo de permanência do material no laboratório: 60 dias; a partir dessa data, o material ficará a critério do laboratório.**

Laudo digitado em: 03.07.2018

Supervisionado em: 05.07.2018

Recebido em:

P/Orlando

  
Silvane Tavares Rodrigues  
Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental