



**Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Carla Cristiane Soares da Silva

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO NEUROPROTETORA DO SUCO CLARIFICADO
DO AÇÁI SOBRE DISTURBIOS NEUROMOTORES CAUSADO PELO
CONSUMO DO ETANOL EM PADRÃO BINGE DRINKING EM RATAS
ADULTAS JOVEM INTOXICADAS DESDE O INÍCIO DA ADOLESCÊNCIA.**

**Belém-PA
2022**

Carla Cristiane Soares da Silva

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO NEUROPROTETORA DO SUCO CLARIFICADO
DO AÇAÍ SOBRE DISTURBIOS NEUROMOTORES CAUSADO PELO
CONSUMO DO ETANOL EM PADRÃO BINGE DRINKING EM RATAS
ADULTAS JOVEM INTOXICADAS DESDE O INÍCIO DA ADOLESCÊNCIA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção de título de mestre em ciências farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Cristiane do Socorro Ferraz Maia (ICS/UFPA – Orientadora)

Dr^o Hervé Rogez (UFPA – Membro)

Dr^a. Marta Chagas (UFPA – Membro)

Dr^o Enéas de Andrade Fontes Júnior (UFPA – Suplente)

Dr^a Diandra Araujo da Luz (Unama – Suplente)

Dedico este trabalho a todos os profissionais de saúde que estiveram à frente de batalha durante os piores picos da pandemia de SARS-Cov-2, que arriscaram e deram a vida para cuidar do próximo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo sacrifício feito por mim por meio do seu amado filho Jesus, que me deu a chance de estar aqui hoje, e que sempre se sustenta quando eu estou prestes a cair;

Aos meus pais, Carlos e Cleia, que sempre priorizaram e incentivaram meus estudos, e que com muito amor me mostraram que esse era o caminho certo.

À minha Irmã, Paula, cunhado Anderson e sobrinho Israel, que mesmo de longe, torcem a cada vitória minha.

À minha orientadora Cristiane Maia, que nunca desistiu de mim, e me guia na vida acadêmica, sempre com amor e me “acordando quando necessário”.

Ao Bruno Pinheiro, um incansável parceiro de análises e experimentos, a quem eu tenho eterna gratidão por toda a disponibilidade a me ajudar.

Ao Igor Rodrigues, que se tornou um companheiro de vida e que, na reta final desta jornada, foi fundamental, me encorajando e dando suporte logístico e emocional.

À Karina, que me ajudou a manter-me com as energias equilibradas, me ajudando a enfrentar o gigante que eu estava evitando.

Aos meus amigos de jornada acadêmica, que me ajudaram direta ou indiretamente na construção deste trabalho, com ajuda nos experimentos ou palavras de amor e incentivo.

Resumo

Adolescentes estão tendo iniciação cada vez mais precoce ao consumo de bebidas alcoólicas, em média entre 11 a 14 anos. No Brasil, cerca de 22% dos adolescentes consomem mais de cinco doses de álcool por episódio de consumo, caracterizando padrão *binge drinking*. O encéfalo de adolescentes é mais sensível aos efeitos neurotóxicos do álcool neste padrão de consumo, pois ainda está em processo de maturação. O desbalanço na neurotransmissão e o estresse oxidativo consistem em mecanismos envolvidos na neurotoxicidade induzida pela abstinência de etanol. O açaí apresenta altas concentrações de antocianinas e outros flavonóides, possuindo elevada atividade antioxidante. Assim, este estudo investigou os efeitos do suco clarificado do açaí sobre as alterações motoras em ratas intoxicadas por etanol no padrão *binge drinking*, da adolescência à fase adulta. Suco de açaí clarificado (10µl/g) ou água foram administrados cronicamente a partir do 31º dia pós-natal a ratas wistar. Etanol (3g/kg/dia) ou água destilada foram administrados em binge de 3 dias a partir do 35ª dia pós natal às mesmas ratas wistar, em 4 ciclos de binge. Vinte e quatro horas após o quarto ciclo do último *binge drinking*, os animais foram submetidos aos testes comportamentais motores de *open field*, *pole test*, *beam walking* e *rotarod*. Os grupos tratados com etanol apresentaram os danos motores já descritos em literatura para o padrão *binge drinking* de consumo e os animais com tratamento prévio com açaí apresentaram resultados similares aos apresentados pelo grupo controle. Com isso foi possível concluir que o tratamento com suco clarificado de açaí é capaz de evitar que os danos motores causados pelo etanol no padrão *binge drinking* desde o início da adolescência se instalem na fase adulta.

Palavras-chave: Açaí; álcool; Adolescência; *Binge drinking*; Desordens motoras.

Abstract

Adolescents are having an increasingly early initiation to the consumption of alcoholic beverages, on average between 11 and 14 years old. In Brazil, about 22% of adolescents consume more than five doses of alcohol per consumption episode, characterizing a binge drinking pattern. The brain of adolescents is more sensitive to the neurotoxic effects of alcohol in this consumption pattern, as it is still in the process of maturation. Imbalance in neurotransmission and oxidative stress are mechanisms involved in neurotoxicity induced by ethanol withdrawal. The açai presents high concentrations of anthocyanins and other flavonoids, having high antioxidant activity. Thus, this study investigated the effects of the clarified açai juice on the motor alterations in rats intoxicated by ethanol in the binge drinking pattern, from adolescence to adulthood. Clarified açai juice (10µl/g) or water were administered chronically from the 31st postnatal day to wistar rats. Ethanol (3g/kg/day) or distilled water were administered in a 3-day binge from the 35th postnatal day to the same wistar rats, in 4 binge cycles. Twenty-four hours after the fourth cycle of the last binge drinking, the animals were submitted to the open field, pole test, beam walking and rotarod motor behavioral tests. The groups treated with ethanol presented the motor damage already described in the literature for the binge drinking pattern of consumption and the animals with previous treatment with açai presented results similar to those presented by the control group. With this, it was possible to conclude that the treatment with clarified açai juice is able to prevent the motor damage caused by ethanol in the binge drinking pattern from the beginning of adolescence to install in adulthood.

Keywords: Açai; Alcohol; Adolescence; Binge Drinking, Motor disorders.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

FIGURA 1 -	Metabolismo do Etanol	14
FIGURA 2 -	Fruto do açaí	18
FIGURA 3 -	Açaizeiro	19
QUADRO 1-	Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo	24
FIGURA 4 -	Esquema do tratamento experimental	25
FIGURA 5 -	Figura do campo aberto	26
FIGURA 6 -	Desenho esquemático do <i>pole test</i>	27
FIGURA 7 -	Desenho esquemático do <i>beam walking test</i>	28
FIGURA 8 -	Figura do <i>Rotarod</i>	29
FIGURA 9 -	Efeito da administração de 4 ciclos de etanol (EtOH) em forma de <i>binge drinking</i> e suco clarificado de açaí so bre o peso corporal de ratas na fase de adolescência à fase adulta.....	31
FIGURA 10 -	Efeito do suco clarificado de açaí na intoxicação com 4 ciclos de etanol (EtOH) no padrão <i>binge drinking</i> na atividade locomotora espontânea de ratas da adolescência até o início da fase de adulta	32
FIGURA 11 -	Efeito do suco clarificado de Açaí na intoxicação com 4 ciclos de etanol (EtOH) em padrão <i>binge drinking</i> no pole teste	33
FIGURA 12 -	Efeito do suco clarificado de açaí na intoxicação em padrão <i>binge drinking</i> no Beam Walking Test, observando o parâmetro Tempo de latência	35
FIGURA 13 -	Efeitos do suco clarificado de açaí na intoxicação em padrão <i>binge drinking</i> no Beam Walking Test, observando o parâmetro Número de escorregadas	36
FIGURA 14 -	Efeito do suco clarificado de açaí na intoxicação em padrão <i>binge drinking</i> no Rotarod observando os parâmetros tempo de latência para a primeira queda e número de quedas	37

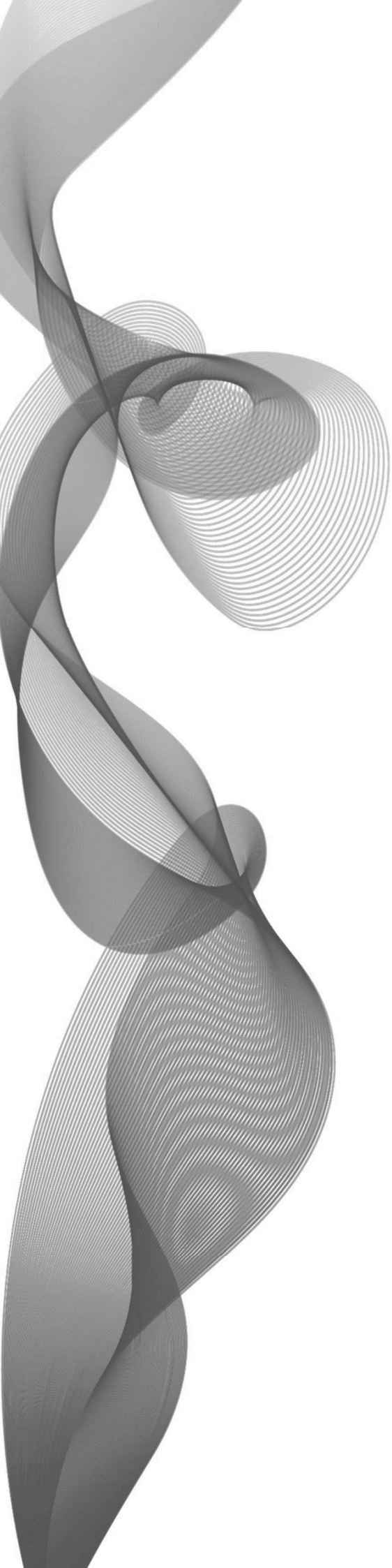
LISTA DE ABREVIACOES

OMS	Organização Mundial de Saúde
BD	Binge drinking
SNC	Sistema nervoso central
GABA	cido gama-aminobutírico
NMDA	N-metil D-Aspartato
NO	xido nítrico
MPP ⁺	1-methyl-4-phenylpyridinium
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
Nrf2	fator nuclear eritroide 2

Sumário

I.	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Consumo do etanol	12
1.2	Adolescência.....	12
1.3	<i>Binge drinking</i>	13
1.4	Neurotoxicidade do etanol.....	13
1.5	Álcool e sistema motor	16
1.6	Açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Martius).....	18
II.	OBJETIVOS.....	21
4.1.	Geral.....	22
4.2.	Específicos:.....	22
III.	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	Animais e grupos experimentais.....	24
3.2	Tratamento com etanol	24
3.3	Tratamento com suco clarificado de açaí.....	25
3.4	Ensaio comportamentais	26
3.4.1	Teste da atividade locomotora espontânea	26
3.4.2	Teste de descida em viga vertical (<i>pole test</i>).....	27
3.4.3	Teste de equilíbrio em vigas graduadas (<i>beam walking test</i>)	27
3.4.4	Teste de locomoção forçada em cilindro giratório (<i>Rotarod test</i>).....	28
3.5	Análise Estatística.....	29
IV.	RESULTADOS.....	30
4.1	A administração contínua do suco clarificado de açaí e o <i>binge drinking</i> não alteram o peso corpóreo das ratas.....	31
4.2	Administração do suco clarificado de açaí previne danos causados pelo <i>binge drinking</i> na atividade locomotora espontânea.	31
4.3	Suco clarificado de açaí previne bradicinesia causada pelo consumo de etanol em <i>binge drinking</i>	32

4.4	Suco clarificado de açaí previne danos na coordenação motora provocados pelo consumo de etanol em padrão <i>binge drinking</i>	34
4.5	Animais tratados com suco clarificado de açaí e etanol não demonstraram prejuízo na coordenação motora em teste de locomoção forçada	37
V.	DISCUSSÃO	39
VI.	CONCLUSÃO	45
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47



I. INTRODUÇÃO

1.1 Consumo do etanol

O consumo recreativo do etanol é considerado um fenômeno social, representando um grave problema de saúde pública mundial, fato que tem despertado a atenção médica e sanitária de diversos países (VARGAS et al., 2009). Este hábito é fator de risco para o surgimento de doenças infecciosas, desenvolvimento de doenças não infecciosas, além de ser uma das principais causas de acidentes de trânsito e mortalidade global (SHIELD, 2020). De acordo com estudos epidemiológicos, o consumo de álcool tem aumentado entre adolescentes, principalmente do sexo feminino (INPAD, 2014; WILLHELM, 2015), o que representa um risco maior de danos em longo prazo, visto que neste período do neurodesenvolvimento há robustas modificações na arquitetura cerebral (CSERVENKA et al., 2017).

1.2 Adolescência

A adolescência, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é uma fase do desenvolvimento humano que se inicia aos 10 anos e se estende até aos 19 anos (OMS, 2018). É um período de intensas mudanças físicas e psicológicas, onde o adolescente passa por um processo de amadurecimento, no qual se vê a necessidade de construção de relações e pertencimento a um grupo, principalmente de amizade (COUTINHO et al., 2013). Nesta fase da vida, como há uma imaturidade em lidar com sentimentos e decisões, há um aumento no comportamento impulsivo e menor capacidade de controle inibitório, levando à maior chance de comportamento de risco, como o uso de substâncias como o álcool e drogas (WILLHELM, 2017; ALVES, 2005; COUTINHO et al., 2013).

Um dado alarmante levantado pela OMS é a iniciação cada vez mais precoce dos adolescentes ao consumo de bebidas alcoólicas, ocorrendo por volta dos 11 a 14 anos, (MARTINS-OLIVEIRA et al., 2018; JORGE et al., 2017). Quanto mais cedo é o primeiro contato com o álcool, maior o risco de desenvolver o hábito do padrão de consumo em *binge drinking* (BD) e *heavy drinking* (SANCHEZ, 2013). No Brasil, cerca de 26% dos adolescentes admitem o consumo de álcool e 22% consomem mais de cinco doses por episódio de consumo (INPAD, 2014), o que é característico do padrão BD (NIAAA, 2004).

1.3 *Binge drinking*

O padrão BD, de acordo com o *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA), é a forma de consumo em que há ingestão intensa de álcool em um curto espaço de tempo, seguido de um período de abstinência. No padrão BD, a concentração alcoólica no sangue é igual ou superior a 0,08 g/dL (NIAAA, 2004).

O consumo em *binge* de álcool pode ser considerado como o precursor ao alcoolismo crônico, culminando com maiores alterações no sistema nervoso central (SNC) e são especialmente danosos devido às altas doses ingeridas seguidas de abstinência, sendo mais rápidos e mais perigosos em comparação aos efeitos que o consumo crônico em baixas doses (SKALA e WALTER, 2013). O encéfalo de adolescentes é mais sensível aos efeitos neurotóxicos do álcool em padrão de consumo BD que o encéfalo adulto (PETIT et al., 2013), pois a adolescência é um período marcado pela intensa proliferação da substância branca, processo que fortalece as conexões sinápticas e se estende ao estágio do jovem adulto (CSERVENKA et al., 2017). Estudos mostram que o consumo de etanol por adolescentes provoca uma diminuição no volume de estruturas como o córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo (DE BELLIS et al., 2005), causando danos à memória de trabalho (CREGO et al., 2010), ansiedade (LEE et al., 2018) e incapacidades motoras (FERNANDES et al., 2018).

1.4 Neurotoxicidade do etanol

O álcool situa-se entre o grupo de drogas psicotrópicas, ou seja, substâncias que atuam no SNC promovendo modificações neuroanatomofisiológicas e comportamentais. Esta droga é considerada como depressora do SNC por apresentar ação inibidora do córtex motor, o qual atua de modo integrador de estímulos e ações (ZALESKI et al., 2004).

O etanol, após ingestão, é metabolizado por diferentes vias, sendo alvo da enzima álcool desidrogenase, do sistema de enzimas microssomais oxidativas (CYP2E1), e da catalase, ambos tendo como produto final o acetaldeído e espécies reativas de oxigênio. O acetaldeído, por ser muito tóxico, é rapidamente convertido em acetato pela enzima

aldeído desidrogenase. Este processo ocorre principalmente no fígado, mas no cérebro também ocorre de forma menos intensa (ZAKHARI, 2006; Figura 1).

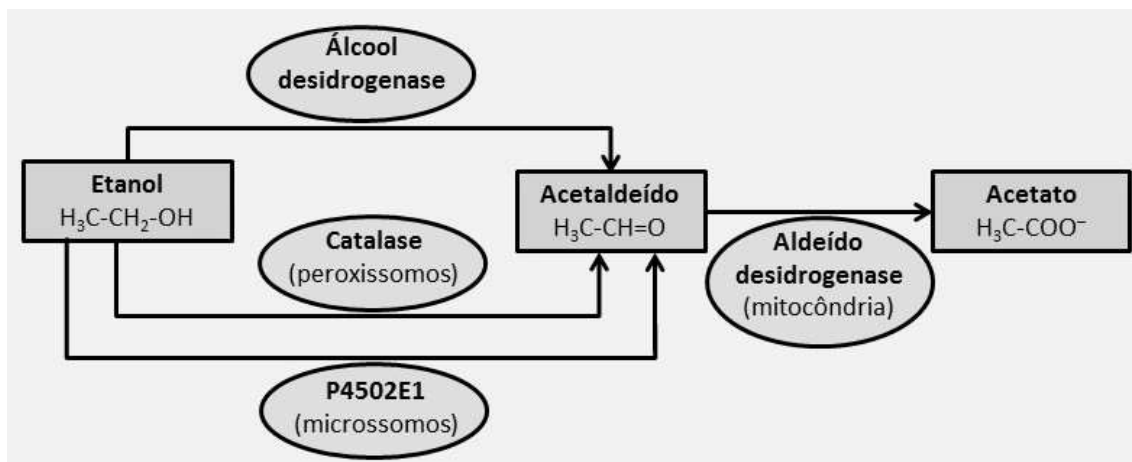


Figura 1. Metabolismo do etanol. (Fonte: CISA – Centro de Informações sobre Saúde e Álcool, 2015)

Compreender o padrão de consumo de álcool é um passo de suma importância ao se analisar os danos que o álcool causa na saúde de seus apreciadores. Populações que bebem apenas ocasionalmente se apresentam menos susceptíveis às alterações alcoólicas do que aquelas nas quais o ato de beber se mostra uma prática constante e abusiva, principalmente nos indivíduos mais jovens (ALMEIDA, 2011).

O encéfalo de adolescentes sofre processos de neuromaturação que acarreta mudanças na neurotransmissão e plasticidade que estão associados com alterações estruturais em algumas regiões do encéfalo, influenciando no desenvolvimento do SNC, tornando este período mais vulnerável aos efeitos neurotóxicos do álcool em *binge* (PETIT *et al.*, 2013; CREWS e BAUN, 2003; HAO *et al.*, 2003; TATENO *et al.*, 2005).

Os primeiros sintomas de intoxicação aguda são euforia e desinibição, que progridem para estupor e depressão respiratória (VALE, 2007?). Estes sintomas refletem a regulação positiva do receptor de glutamato e a regulação negativa do receptor ácido gama-aminobutírico (GABA), a abstinência rápida após o beber prolongado ou em excesso pode resultar em tremor, alucinações (visuais, auditivas ou tácteis), convulsões ou *delirium tremens*, com atenção severamente afetada, níveis de alerta totalmente comprometidos, agitação e instabilidade autonômica (VALE, 2007). É possível que, além disso, repetidos binges e retiradas causem não apenas sintomas de abstinência precoce, mas também hiperatividade glutamatérgica induzida por excitotoxicidade e danos

neuronal permanentes, por sua vez, contribuindo para distúrbios neurológicos mais duradouros, incluindo a demência (BRUST, 2010).

A neurotoxicidade do etanol é induzida por vários mecanismos, incluindo a excitotoxicidade do glutamato e o estresse oxidativo (HARPER, 2005). O uso crônico de etanol promove a regulação positiva dos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil D-Aspartato (NMDA) e a regulação negativa dos receptores GABAérgicos. Assim, o processo excitotóxico ocorre a partir da exacerbação da via de sinalização excitatória em comparação com a via inibitória (VANGELIENE et al., 2005), havendo excesso de ligação de glutamato aos receptores NMDA em detrimento à sinalização GABAérgica (VANGELINE et al., 2008). Essa superatividade de NMDA intensifica a abertura de canais de Ca^{2+} e Na^{+} dependentes de ligantes que alteram o potencial elétrico do neurônio e abrem também os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, promovendo intenso influxo desse íon para o citosol, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares, resultando em degeneração neuronal (BERLIOCCHI et al., 2005; JAATINEN e RINTALA, 2008).

Esse processo mediado por glutamato tem íntima relação com danos mitocondriais e estresse oxidativo (NOVELLI et al., 1988), que desencadeiam uma cascata de eventos intracelulares, resultando em degeneração neuronal (BERLIOCCHI et al., 2005; JAATINEN e RINTALA, 2008).

Neste sentido, radicais livres são átomos ou moléculas constantemente produzidos como produto do metabolismo celular, sendo caracterizados por possuir um ou mais elétrons desemparelhados, apresentando forte reatividade química. Estas podem ser espécies reativas de oxigênio, nitrogênio, radicais derivados de tióis, entre outras (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000).

Uma das principais espécies reativas de nitrogênio é o óxido nítrico (NO) o qual é produzido pela enzima óxido nítrico sintase, que é induzida em situações patológicas como a intoxicação crônica por etanol (BROCARDI et al., 2011). Os radicais livres causam peroxidação lipídica, sendo uma das consequências do estresse oxidativo causado por etanol, configurando o principal mecanismo de dano na membrana e morte celular (HERNANDEZ et al., 2016).

Em estudos com modelo de exposição crônica ao etanol em ratos adultos observou-se que o córtex cerebral altera a fluidez da membrana celular, provavelmente, devido ao estresse oxidativo indicado pelo aumento dos níveis de nitrito e peroxidação

lipídica, maior presença de óxido nítrico sintase e diminuição da superóxido dismutase (SOD), causando degeneração celular (REDDY et al., 2013).

Os radicais livres são neutralizados por moléculas antioxidantes. Esta neutralização é necessária, pois os radicais livres são extremamente danosos às células causando danos nas membranas da célula e no DNA (OLIVEIRA, 2009). Este processo de produção e neutralização de radicais livres ocorre naturalmente e de forma equilibrada no organismo, causando a manutenção da vida celular. Porém, há diversos fatores que alteram esse equilíbrio, fazendo com que a quantidade de radicais livres supere a capacidade de neutralização do sistema antioxidante, causando o estresse oxidativo. Esses fatores incluem dieta inadequada, consumo de álcool, estresse físico e mental e algumas patologias (OLIVEIRA, 2009).

No intuito de equilibrar a produção de moléculas pró-oxidantes é necessário que o sistema antioxidante atue equilibrando o sistema REDOX. A ação antioxidante pode ser do tipo enzimática, como exemplo a Superóxido dismutase, a catalase, a glutationala peroxidase, a glutationala redutase, entre outras. A ação antioxidante não enzimática se dá por moléculas como a glutationala, o α -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), e diversos metabólitos secundários como os flavonóides, entre outros (FERREIRA & ABREU, 2007).

Estudos do nosso grupo mostram que o *binge drinking* na adolescência têm grande impacto no estresse oxidativo do sistema nervoso central. Fernandes 2018 mostrou que ratas adolescentes submetidas a quatro BD de etanol na dose de 3mg/Kg atingiram a concentração alcoólica de 0,08 g/dL (concentração alcoólica sérica compatível com BD segundo o NIAAA) e apresentaram, no final do quarto BD, já em idade adulta jovem, altos níveis de malondialdeído, indicando a ocorrência de peroxidação lipídica pelas espécies reativas, e óxido nítrico em córtex motor, além de diminuição das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase, indicando o estresse oxidativo.

1.5 Álcool e sistema motor

O sistema neuromotor é o responsável pelo comando e refinamento e aprendizagem do movimento. É um complexo sistema que envolve o córtex motor, gânglios da base e cerebelo. O córtex motor é responsável pela tomada de decisão em

realizar o movimento e planejamento de como este movimento será realizado (SVODOBA et al, 2018), sendo composto pelo córtex motor primário, área pré-motora e área motora suplementar (GUYTON, 1993). Os núcleos da base são compostos por núcleo caudado, putâmen, globo pálido (os quais formam o estriado dorsal), substância inominada, núcleo accumbens e o tubérculo olfatório (os quais formam o corpo estriado ventral), o corpo amigdalóide e o cláustro. O corpo estriado dorsal é a porção dos núcleos da base que atuam no controle e ajuste dos movimentos, realizando ajustes posturais e movimentos sequenciais, sendo uma área predominantemente dopaminérgica (BOSTAN & STROCK, 2018; GRAYBIEL, 2000).

O cerebelo, apesar de representar 10% do volume do cérebro, contém cerca de 50% dos neurônios deste (MARGOLIS, 2001). É responsável pela coordenação motora fina e aprendizado motor. É também o centro que corrige e refina o movimento (VALENZUELA & JOTTY, 2015). Sua estrutura é dividida em lobo anterior, posterior, floclonodular. Quanto a histologia, é formado pela camada molecular, composta de células estreladas e células em cesto, fibras paralelas e dendritos de células de Purkinje; camada intermediária, a qual é composta pelo corpo de neurônios, chamados de células de Purkinje; e a camada granular, mais interna e composta pelas células granulares, células de Golgi e fibras musgosas (BOTTA et al. 2007; VOOGD & RUIGROK, 2004).

O cerebelo segue com a maturação estrutural e funcional até meados da segunda década de vida, sofrendo poda da substância cinzenta e maturação da substância branca, sendo que as meninas atingem a maturação mais cedo que os meninos (LISDAHL et al, 2013). O álcool age nos neurônios GABAérgicos e nas células granulares glutamatérgicas, desregulando as células de Purkinje e afetando a sua plasticidade, além de gerar substância inflamatórias e radicais livres, causando morte celular, e conseqüentemente atrofia e problemas na maturação neuronal (Pierce et al., 2011). Alterações em receptores GABA_A têm sido atribuídas ao mal funcionamento induzida pelo álcool da circuitaria cerebelar (JAATINEN & RINTALA, 2008). A neurotransmissão dopaminérgica também é reduzida em adolescentes que se submetem ao BD, causando diminuição no volume e densidade neuronal (COLEMAN et al., 2011).

Muito se tem estudado sobre a ação de compostos bioativos como prevenção e tratamento em várias doenças e substâncias que causam danos neuromotores. Dentre os compostos bioativos mais estudados estão os flavonóides, possuindo ação antioxidante, antiinflamatória, neuroprotetora e entre outras (KHAN, 2020). Estudos com modelo

animal Parkinson-like revelam que extratos ricos em antocianinas protegem células dopaminérgicas contra danos causados pelo agente neurotóxico MPP⁺ e 6-OHDA, além de prevenirem sintomas parkinsonianos como a bradicinesia (KIM et al, 2010). Foi demonstrado por Crespo-Lopez, 2019 que compostos fenólicos do açaí previnem danos motores e oxidativos causados dos pela intoxicação por mercúrio em ratos swiss. Dietas ricas em antocianinas reduzem o risco de desenvolvimento de doença de Parkinson em humanos (KHAN, 2020).

1.6 Açaí (*Euterpe oleracea* Martius)

O gênero *Euterpe* está amplamente distribuído na América Central e do Sul, habitando florestas de terras baixas e montanhas de florestas tropicais. No Brasil, cinco espécies e variedades são relatadas: *Euterpe edulis* Martius (palmitheiro ou juçara), *Euterpe catinga* Wallace (açaí da caatinga), *Euterpe oleraceae* Martius (açaizeiro), *Euterpe longibracteata* Barbis Rodrigues (açaí da terra firme), *Euterpe precatória* Martius (açaí do Amazonas). Destas, apenas a primeira se distribui até o sul do Brasil pela costa Atlântica; as demais espécies distribuem-se na Floresta Amazônica (HENDERSON, 2000; Figura 2).



Figura 2. Fruto do açaí. (Fonte: Stock fotos)

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira que se destaca entre as plantas da biodiversidade das matas de terra firme, várzeas e igapós da região amazônica. O açaí, fruto do açaizeiro, apresenta grande importância econômica e, sobretudo, alimentar para as populações ribeirinhas e urbanas (SANTANA et al., 1997).



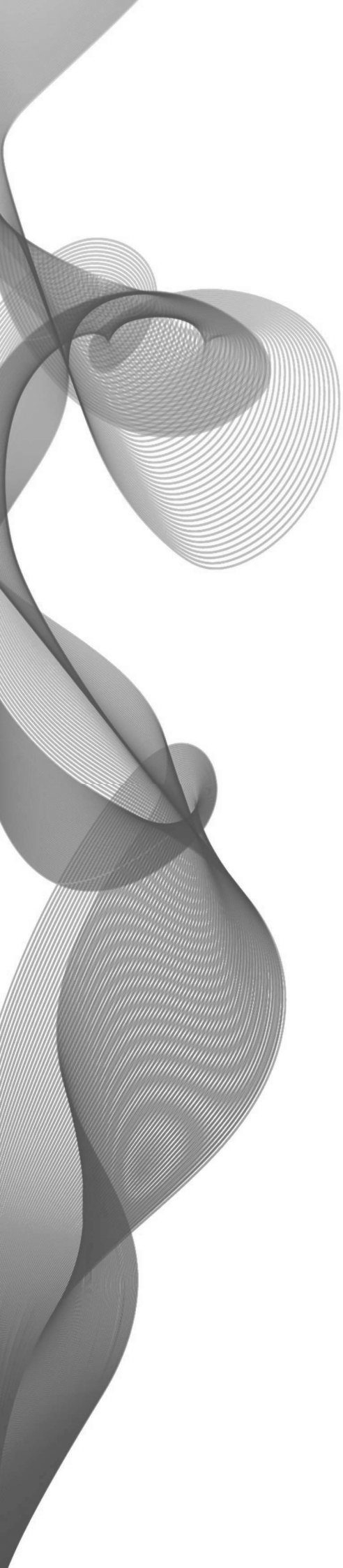
Figura 3. Açazeiro. Foto: José Edmar Urano de Carvalho

O açáí é geralmente consumido como alimento na forma de um suco viscoso que tem sido associado com benefícios nutricionais e medicinais (PACHECO-PALENCIA et al., 2008). Por apresentar altas concentrações de compostos bioativos como antocianinas (principalmente cianidina 3-O-glicosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo) e outros flavonóides, atribui-se alta atividade antioxidante a este fruto (NIMSE et al., 2015; GALLORI et al., 2004; SCHAUSS et al., 2006; ROSSO et al., 2008; POMPEU e ROGEZ, 2009). Estudos mostram que os flavonóides têm pouca biodisponibilidade após ingestão (CARDONA, 2013; MERTENS-TALCOTT et al., 2008) porém a quantidade biuodisponível na circulação sanguínea tem alta capacidade antioxidante (MERTENS-TALCOTT et al., 2008).

O efeito neuroprotetor do açáí tem sido bastante explorado na área acadêmica. Constatou-se que o açáí aumenta a expressão de Nrf2 em hipocampo e córtex de ratos, aumentando a expressão de fatores antioxidantes endógenos (POULOUSE et al, 2017), diminui fatores pró inflamatórios em soro como iNos, ciclooxigenase 2, e óxido nítrico (CAREY et al, 2017), além de diminuir TNF- α , IL-1 β , e IL-18 em cérebro de ratos modelos para encefalopatia hepática (SOUZA-MACHADO et al, 2015). Também já foi demonstrado o efeito anticonvulsivante do açáí por Souza-Monteiro 2015, onde suco clarificado de açáí protegeu contra convulsões e diminuiu o estresse oxidativo causado pelas convulsões em ratos swiss.

Desta forma, o álcool, sendo uma droga socialmente aceita e muitas vezes tendo seu uso incentivado pela sociedade, é o intoxicante mais utilizado entre os adolescentes, e as

taxas de utilização aumentam drasticamente durante a adolescência, principalmente na forma de BD (OMS, 2018). A produção de espécies reativas de oxigênio derivadas de seu metabolismo no organismo é um dos agentes causais da neurotoxicidade do álcool no sistema nervoso central. Diante disso, este trabalho visou investigar os efeitos do suco clarificado de açaí (*Euterpe oleraceae*) sobre as alterações neuromotoras em ratas intoxicados por etanol em padrão BD, iniciando na adolescência até a fase adulta jovem, em busca de uma alternativa nutricional para prevenção das desordens motoras observadas.



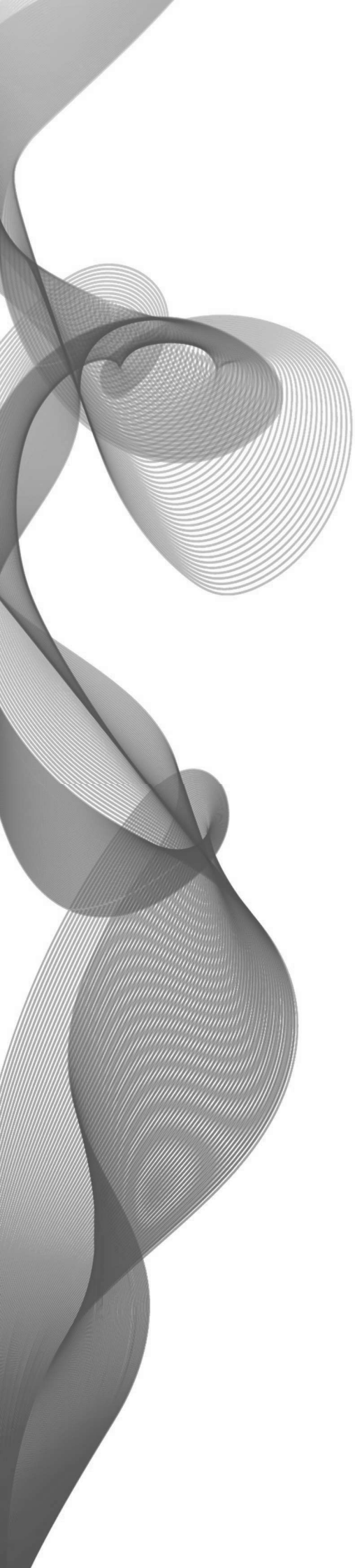
II. OBJETIVOS

4.1. Geral

- Investigar os efeitos do suco clarificado do açaí sobre as alterações comportamentais em ratas com danos neuromotores intoxicadas por etanol no padrão intermitente e episódico da adolescência à fase adulta.

4.2. Específicos:

- Avaliar os efeitos do suco clarificado de açaí sobre as alterações no peso corporal das ratas;
- Avaliar os efeitos do açaí na atividade locomotora espontânea em todos os grupos experimentais;
- Investigar os efeitos do suco clarificado de açaí em ratas com danos na coordenação e equilíbrio motor, intoxicadas com etanol, através dos testes comportamentais equilíbrio em vigas graduadas (*Beam walking test*), teste de descida em viga vertical (*Pole test*) e de locomoção forçada em cilindro giratório (*Rotarod test*).



III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e grupos experimentais

Este estudo foi inicialmente submetido ao Comitê de ética em pesquisa com animais e experimentação da Universidade Federal do Pará (UFPA), o qual obteve aprovação sob o documento CEUA N° 3835160117.

Foram utilizadas um total de 60 ratas Wistar com 31 dias de vida pós-natal, com média de peso 70-80 gramas, provenientes do Biotério da UFPA. Os animais foram encaminhados para Faculdade de Farmácia, UFPA, onde foram mantidos em uma sala em condições padronizadas de temperatura (25°C), exatidão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (6:00-18:00 horas), água e comida *ad libitum*.

Os 60 animais foram divididos em quatro grupos experimentais (Quadro 1):

Quadro 1: Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo.

GRUPO	DESCRIÇÃO	NÚMERO
Controle	Animais tratados com H ₂ O _{dest.} por 4 episódios de 3 dias consecutivos/ semana.	15
EtOH	Animais tratados com etanol em 4 episódios de <i>binge</i> , 3 dias consecutivos/ semana.	15
EO	Animais tratados continuamente com suco clarificado de açaí por 4 semanas.	15
EtOH/EO	Animais tratados continuamente com o suco clarificado de açaí por 4 semanas e com etanol em 4 episódios de <i>binge</i> , 3 dias consecutivos/ semana.	15
TOTAL		60

3.2 Tratamento com etanol

As ratas foram mantidas em caixas próprias em grupos de 5 animais para evitar o estresse pelo isolamento. Os grupos EtOH e EtOH/EO receberam o protocolo de BD, sendo o etanol administrado por via oral (gavagem), através de cânula orogástrica (Insight, Brasil), na dose de 3 g/kg/dia (20% p/v) (LAUING et al., 2008; LINDTNER et al., 2013), durante três dias consecutivos/semana. Os grupos que foram submetidos ao protocolo de BD, foram administrados 4 ciclos de BD, entre o 35° e 58° dia de vida, correspondendo ao período entre o início da adolescência até o início da fase adulta jovem, neste modelo animal (SPEAR, 2004). Nos grupos que não houve *binge* de etanol

(Controle e EO), foi administrada água destilada ($H_2O_{\text{dest.}}$) em volume de 1 mL/kg/dia por gavagem para mimetizar o BD. A pesagem dos animais foi realizada semanalmente para o ajuste de dose (Figura 4).

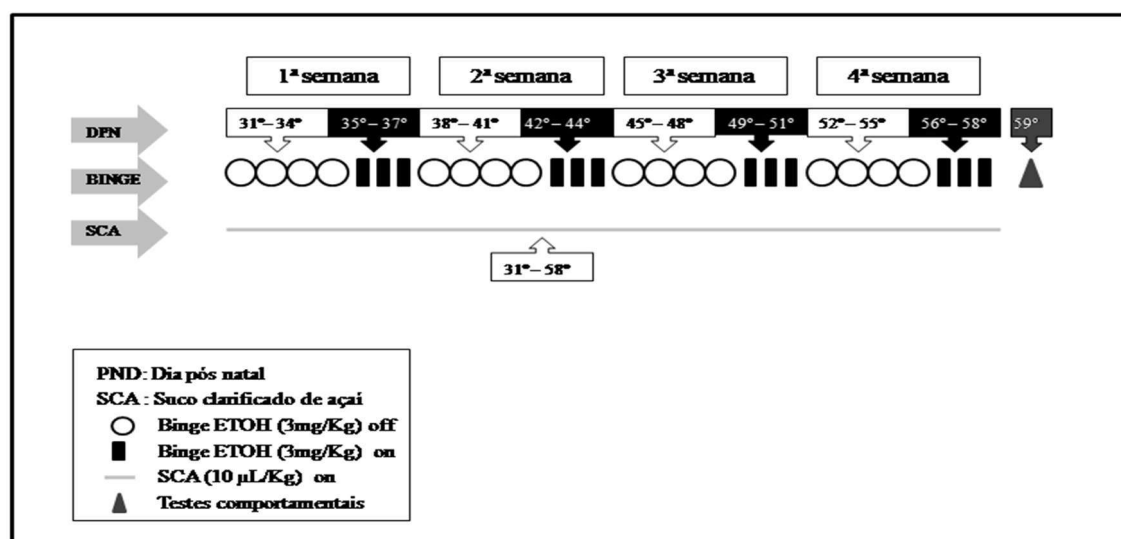


Figura 4: Esquema do tratamento experimental com EtOH 20% (3g/Kg/dia) na forma *binge* e suco clarificado de açaí (SCA) 10µL/g do 31º-58º dia de vida do animal.

3.3 Tratamento com suco clarificado de açaí

A planta foi previamente identificada como *Euterpe oleracea* Martius por comparação com uma amostra depositada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA, Brasil). As amostras do suco clarificado de açaí foram gentilmente cedidas pela empresa Amazon Dreams (Belém, Pará). O suco foi submetido à um processo de produção que consiste em microfiltração e centrifugação de um suco de açaí preparado com frutos frescos. Por conseguinte, o produto final não contém lipídios, proteínas, e fibras, constituindo um modelo ideal para avaliar o impacto de compostos fenólicos (>1400 mg de ácido gálico equivalente/L) (ARRIFANO, 2018), sendo composto por cianidina 3-rutinosídeo (450 mg/L), orientina (380 mg/L), taxifolina deoxyhexose (310 mg/L), homoorientina (250 mg/L), e cianidina 3-glucoside (180 mg/L) (SOUZA-MONTEIRO et al., 2019). Este processo foi patenteado e licenciado em parceria da empresa Amazon Dreams e a Universidade Federal do Pará.

Para avaliar a ação do suco clarificado de açaí nos animais intoxicados com etanol na forma de *binge*, o grupo EtOH/EO foi tratado concomitantemente com o *binge* de

etanol e suco clarificado e açaí em um volume de 10 uL/g de peso corporal (equivalente a uma dose de 700 mL de açaí para um indivíduo humano de 70 kg) (SOUZA-MONTEIRO et al, 2015; CRESPO-LÓPEZ et al, 2019) de forma crônica, iniciando-se no 31º até o 58º dias de vida do animal. O grupo EO também recebeu suco clarificado de açaí no mesmo modelo de tratamento, como descrito na figura 2.

Os testes comportamentais motores ocorreram no 59º dia pós-natal (Figura 2).

3.4 Ensaaios comportamentais

3.4.1 Teste da atividade locomotora espontânea

Este teste avalia a atividade locomotora espontânea de roedores, onde cada animal foi exposto individualmente em um aparato de acrílico preto de 1m² e paredes de 40 cm de altura (Figura 5).

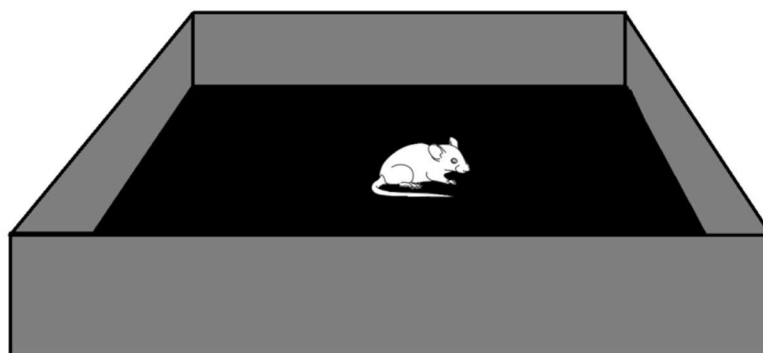


Figura 5: Figura do campo aberto.

Para avaliar a atividade locomotora espontânea vertical e horizontal, os parâmetros de distância total percorrida e o número de levantamentos foram medidos em um período de 5 min (FERNANDES et al., 2018). O teste foi filmado e o parâmetro distância total foi analisado pelo software ANY-maze™ (Stoelting, EUA). Quanto ao número de parâmetros de levantamentos, a contagem foi realizada manualmente por um observador que não conhecia a que grupo pertencia o animal em teste. Entre os intervalos de exposição animal, o aparelho foi higienizado com álcool 10%.

3.4.2 Teste de descida em viga vertical (*pole test*)

Este teste avalia distúrbios do movimento, especialmente bradicinesia. O aparato utilizado consiste em uma viga vertical rugosa (2 cm x 50 cm) apoiado em uma plataforma circular (1 cm; $r = 25$ cm), onde os animais foram colocados no topo da viga com a face voltada para cima e devem virar o corpo e descer através da viga vertical (Figura 6).

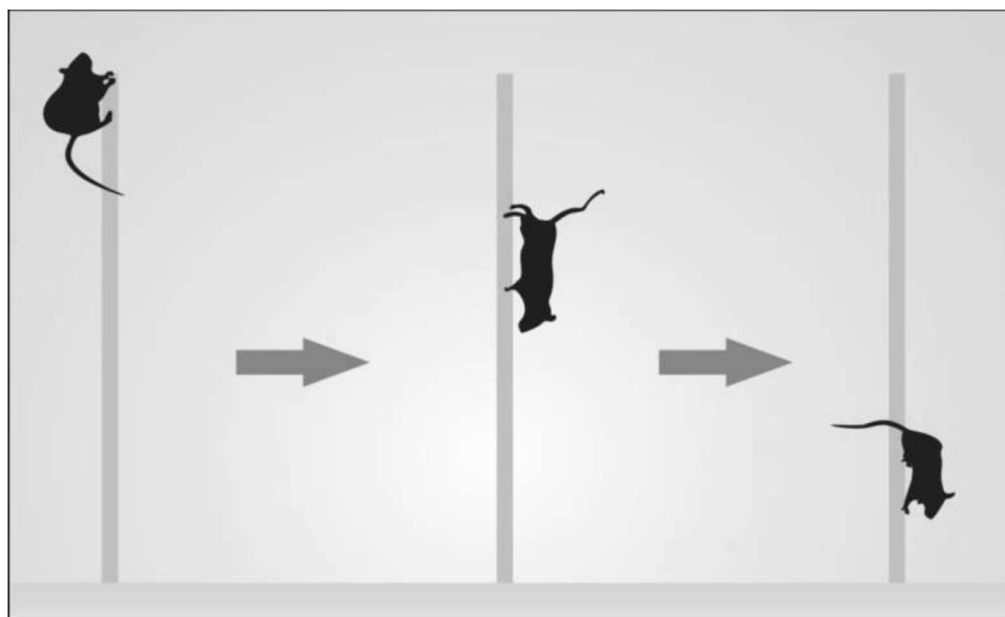


Figura 6: Desenho esquemático do *pole test*. A primeira haste ilustra como o animal foi posicionado sobre o equipamento. Na segunda, observa-se a inversão do eixo e (a terceira) a descida até a plataforma do aparato.

Durante o teste, as pontuações de tempo de giro e tempo de descida dos animais na viga foram registradas ao longo de 5 tentativas, limitadas a 120s cada, com um intervalo de 60s entre elas. Os animais que não giraram ou caíram receberam o tempo máximo (120 s). A média foi calculada com os três melhores tempos de cada animal (ANTZOULATOS et al., 2010).

3.4.3 Teste de equilíbrio em vigas graduadas (*beam walking test*)

Este teste avalia a coordenação motora e o equilíbrio motor através da capacidade dos animais de atravessar uma série graduada de vigas estreitas até alcançar uma plataforma segura (STANLEY et al., 2005). O aparelho consiste em uma plataforma

segura (caixa fechada) e uma plataforma aversiva (aberta com luz aversiva), conectada por uma viga de madeira de 1 m de comprimento e elevado 0,5 m do solo (Figura 7).



Figura 7: Desenho esquemático do *beam walking test*. Os animais foram colocados na extremidade da viga com a face voltada para a caixa fechada segura, no qual devem percorrer a viga para chegar ao ambiente seguro.

A força e o equilíbrio motor foram avaliados colocando os animais na plataforma aversiva e foi contado o tempo necessário para cruzar a viga (tempo de latência) até a caixa fechada e o número de escorregadas das patas traseiras durante o percurso. O protocolo utilizado foi adaptado de Carter (1999) e as vigas utilizadas foram de secção transversais quadrados (12 e 5 mm) e circulares (17 e 11 mm). O animal foi exposto pela primeira vez na plataforma segura para a ambientação (60s) e posteriormente passaram por um treino e duas exposições por viga, com um intervalo de 60s entre cada exposição.

3.4.4 Teste de locomoção forçada em cilindro giratório (*Rotarod test*)

Este teste é utilizado para avaliar a coordenação motora, equilíbrio e ataxia em roedores (FERNANDES et al., 2018). O aparato utilizado (Insight®, EFF-411) consiste em uma caixa de acrílico com um cilindro de 8 cm de diâmetro, instalado transversalmente a aproximadamente 16 cm da base, e mantido em rotação por um motor. A caixa é dividida em 4 baias, permitindo a análise de 4 animais simultaneamente (Figura 8).

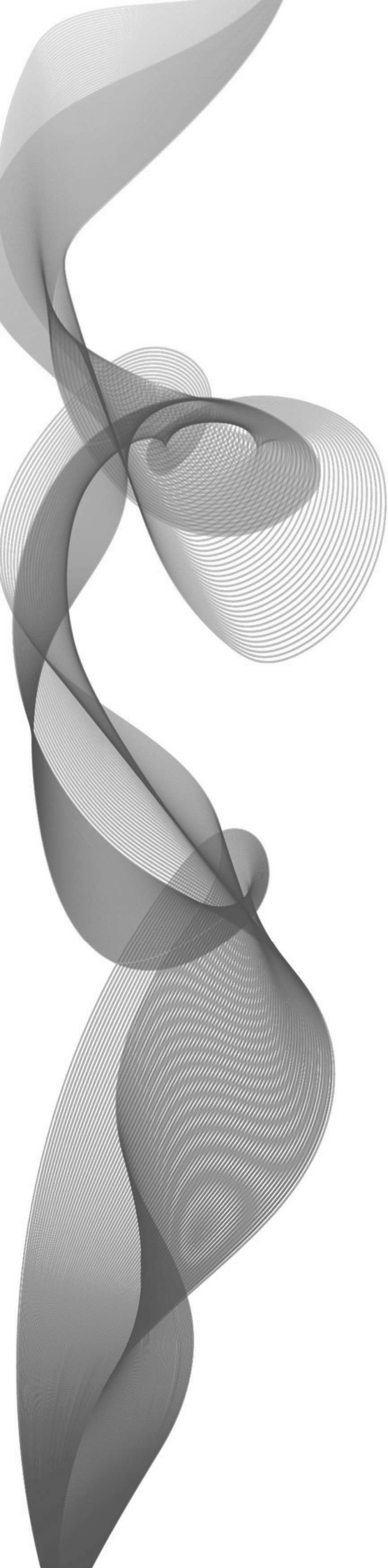


Figura 8: Figura do *Rotarod*. Fonte: Insight, Brasil.

O protocolo consistiu inicialmente no estágio de treinamento, no qual os animais foram colocados no eixo de rotação por um período de 120 segundos a 8 rpm. Após o treinamento, os animais foram submetidos a três exposições de 120 segundos a 8 rpm constantes, com intervalo de 60s entre cada exposição. Para a avaliação dos parâmetros motores, foram registrados o tempo de latência (tempo entre o início da exposição e a primeira queda) e o número de quedas (FERNANDES et al., 2018; DA SILVA et al., 2018).

3.5 Análise Estatística

A construção gráfica e a análise estatística foram realizadas através do programa GraphPad® Prisma 5.0, no qual os dados obtidos dos testes comportamentais foram analisados pelo teste de Kolgomorov-Smirnov para avaliar a normalidade (distribuição gaussiana) e, confirmada a normalidade dos grupos, foi aplicada a análise de variância de 1 via (ANOVA), seguido de teste post-hoc de Bonferroni. Em caso de normalidade não confirmada foi utilizado o teste de Kruskal Wallis. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) do total de animais de cada grupo experimental. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significantes foi de $p < 0,05$.



IV. RESULTADOS

4.1 A administração contínua do suco clarificado de açaí e o *binge drinking* não alteram o peso corpóreo das ratas.

A ANOVA demonstrou que o tratamento com suco clarificado de açaí na dose de 10 uL/g e/ou os 4 ciclos de BD na dose de 3g/kg/dia não alterou o peso corporal das ratas em relação ao grupo controle (Figura 9).

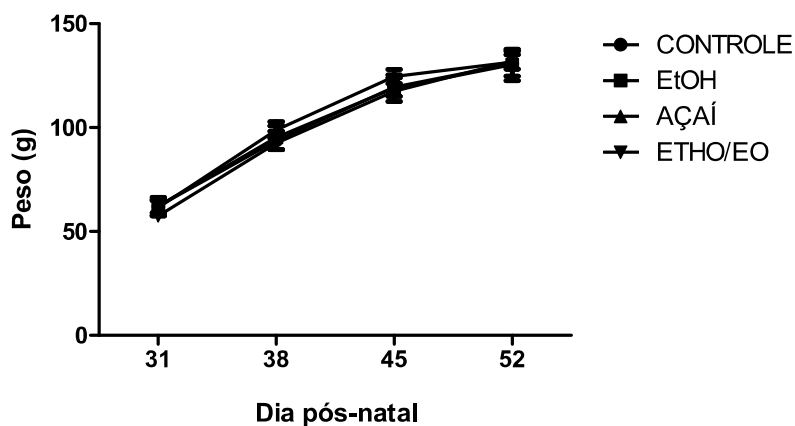


Figura 9: Efeito da administração de 4 ciclos de etanol (EtOH) em forma de *binge drinking* e suco clarificado de açaí sobre o peso corporal de ratas na fase de adolescência à fase adulta. Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m dos animais pesados semanalmente a partir do 31º DPN até o 52º DPN. (n=10; ANOVA de uma via de medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

4.2 Administração do suco clarificado de açaí previne danos causados pelo *binge drinking* na atividade locomotora espontânea.

As ratas que receberam apenas o *binge drinking* demonstraram pelo teste de ANOVA de uma via uma diminuição da deambulação espontânea e do comportamento exploratório no teste do campo aberto através dos parâmetros distância total percorrida e número de levantamentos ($P < 0,001$ e $P < 0,05$, respectivamente; Figura 10A e B).

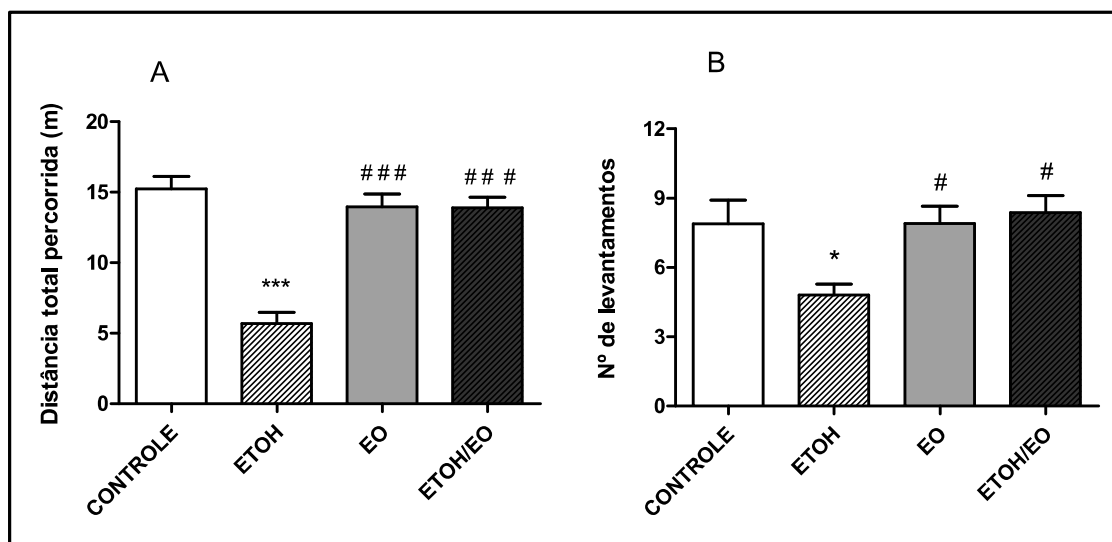


Figura 10: Efeito do suco clarificado de açai na intoxicação com 4 ciclos de etanol (EtOH) no padrão *binge drinking* na atividade locomotora espontânea de ratas da adolescência até o início da fase de adulta através dos parâmetros: (A) distância total percorrida e (B) número de levantamentos. N = 10 - 15 animais por grupo. Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m. (ANOVA de uma via, Bonferroni test post-hoc). * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle; *** $P < 0.001$ comparado ao grupo controle; # $P < 0.05$ comparado ao grupo ETOH; ### $P < 0.001$ comparado ao grupo EtOH.

A administração do suco clarificado de açai aos animais submetidos ao protocolo de BD minimizou os prejuízos na deambulação espontânea, demonstrando uma atividade exploratória vertical ($P < 0,05$) e horizontal ($P < 0,001$) similar ao grupo controle (Figura 10A,B).

4.3 Suco clarificado de açai previne bradicinesia causada pelo consumo de etanol em *binge drinking*

A administração de etanol em *binge drinking* na dose de 3g/kg/dia induziu bradicinesia nos animais no pole teste, através dos parâmetros do tempo de virada, tempo de descida e tempo total de performance do teste ($P < 0,001$; Figura 11A, B e C).

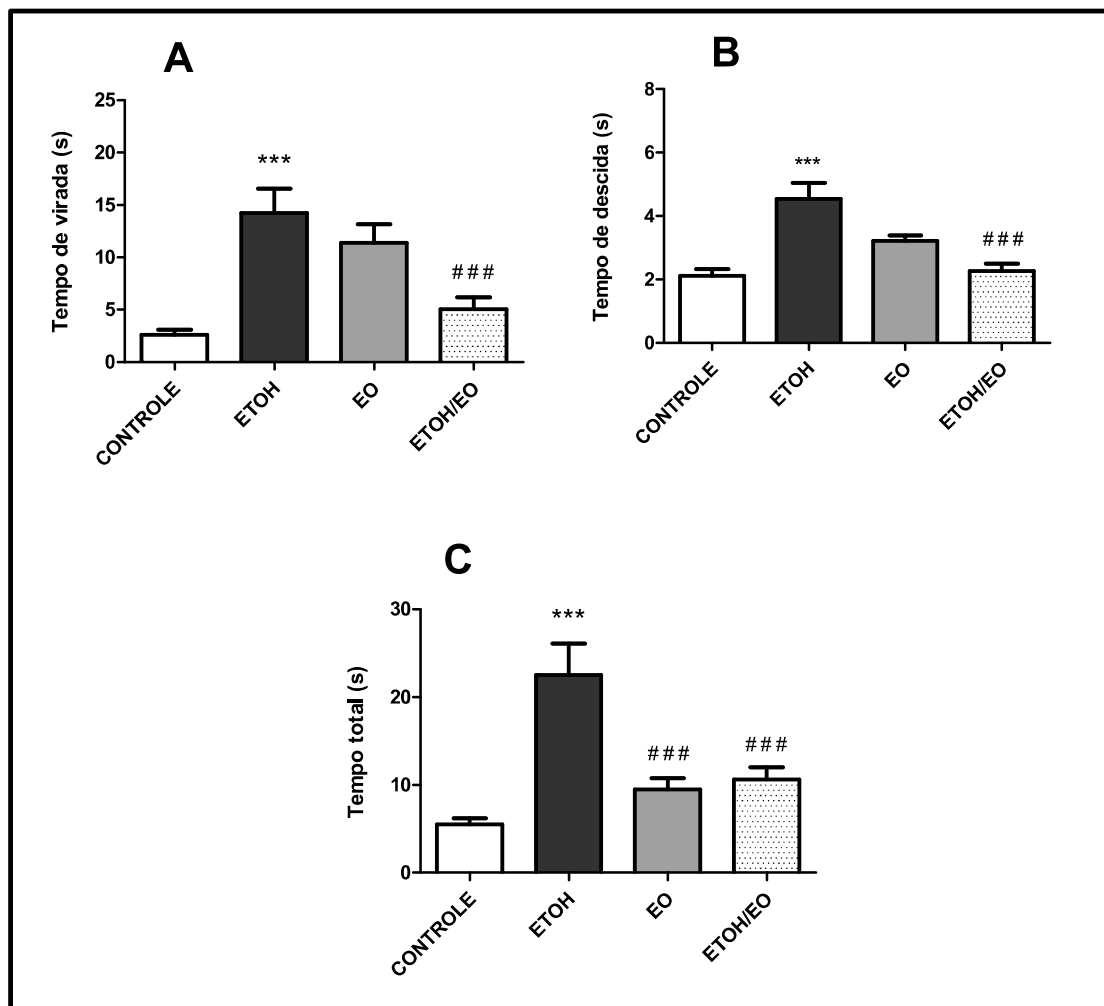


Figura 11: Efeito do suco clarificado de Açai na intoxicação com 4 ciclos de etanol (EtOH) em padrão *binge drinking* no pole teste, observando os parâmetros (A) Tempo de virada, (B) Tempo de descida e (C) Tempo total de performance. N = 10 animais por grupo; os resultados estão expressos em média \pm e.p.m. (ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni test pos-hoc). ***P<0,001 comparado ao grupo controle; ###P<0,001 comparado ao grupo EtOH.

Os animais tratados com BD que receberam o suco clarificado de açai reduziram o tempo de virada (Figura 11A), o tempo de descida (Figura 11B), assim como o tempo total do teste (Figura 11C), melhorando a performance no pole teste de forma similar ao grupo controle, demonstrando a redução da bradicinesia causada pelo consumo de etanol.

4.4 Suco clarificado de açaí previne danos na coordenação motora provocados pelo consumo de etanol em padrão *binge drinking*.

O teste de locomoção em vigas graduadas, ou beam walking test, foi útil para demonstrar que os animais tratados previamente com suco clarificado de açaí não apresentaram danos na coordenação motora fina (Figuras 12 e 13).

Na avaliação do tempo de latência, os animais que foram submetidos à intoxicação no padrão BD apresentaram aumento no tempo de execução do teste apenas na viga quadrada de 5mm ($p < 0,001$), que não foi observado nas vigas quadrada de 12mm, assim como nas vigas redondas de 17mm e 11mm (Figura 12 A,B,C e D). A administração do suco clarificado de açaí reduziu o tempo de latência dos animais intoxicados pelo etanol nas vigas de 5mm ($p < 0,01$; Figura 12B), assim como melhorou a performance dos animais na viga mais exigente (redonda de 11mm) quando comparado ao grupo controle (EO: $p < 0,001$; EtOH+EO: $p < 0,001$; Figura 12D).

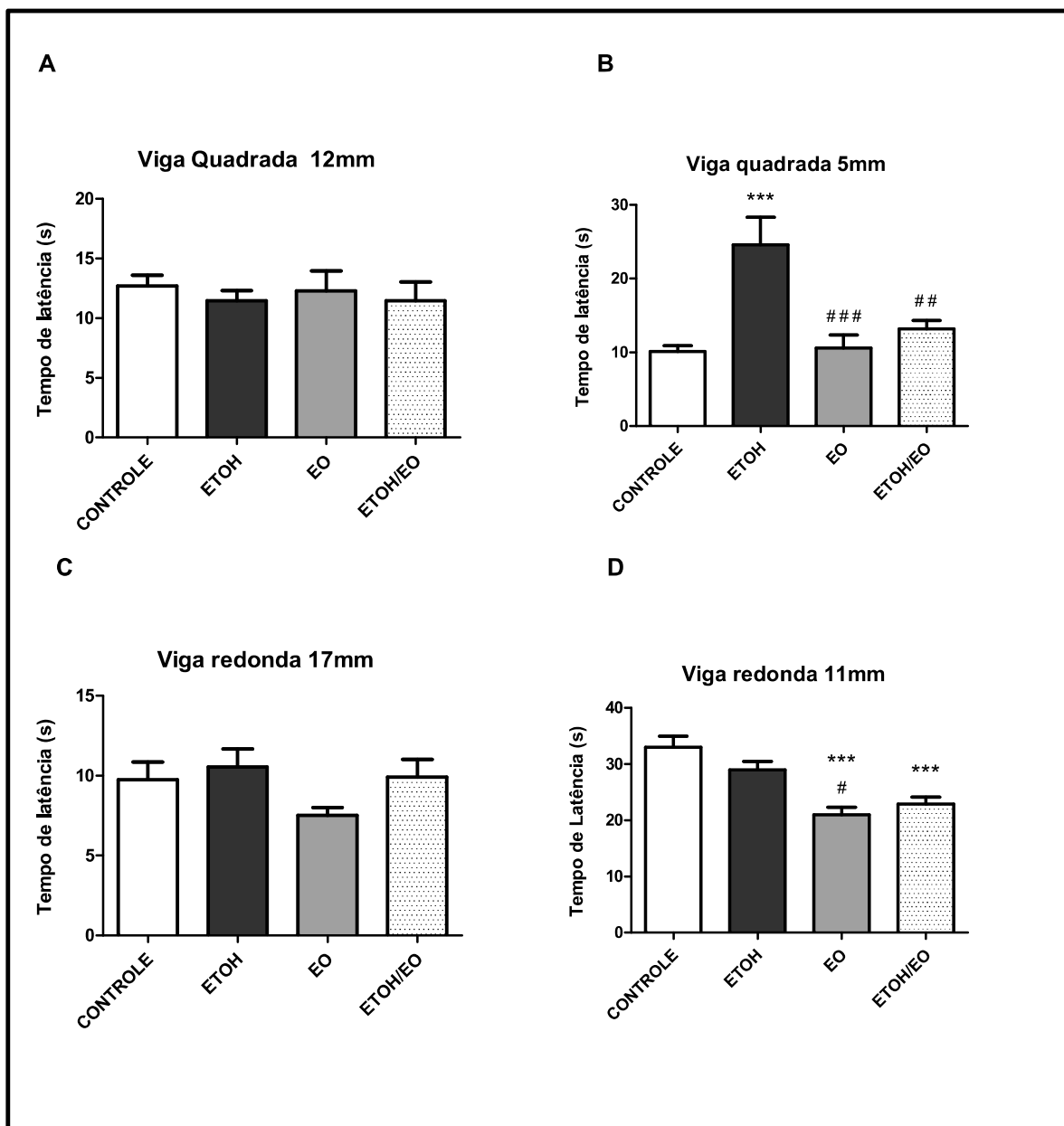


Figura 12: Efeito do suco clarificado de açai na intoxicação em padrão *binge drinking* no Beam Walking Test, observando o parâmetro Tempo de latência em (A) Viga quadrada 12 mm, (B) Viga quadrada 5 mm, (C) Viga redonda 17 mm e (D) Viga redonda 11 mm. N = 10 por grupo; Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m., (ANOVA de uma via, Bonferroni test pos-hoc). ***P<0,001 comparado ao grupo controle; #P<0,05 comparado ao grupo EtOH; ##P<0,01 comparado ao grupo EtOH; ###P<0,001 comparado ao grupo EtOH.

Na avaliação do número de escorregadas (Figura 13), observamos que houve diferença apenas na viga redonda de 11 mm (a mais exigente de todas), onde os animais que receberam apenas o BD escorregaram mais que o grupo controle. A administração

do suco clarificado de açaí reduziu o número de escorregadas em relação ao grupo EtOH ($P < 0,01$), se equiparando ao grupo controle.

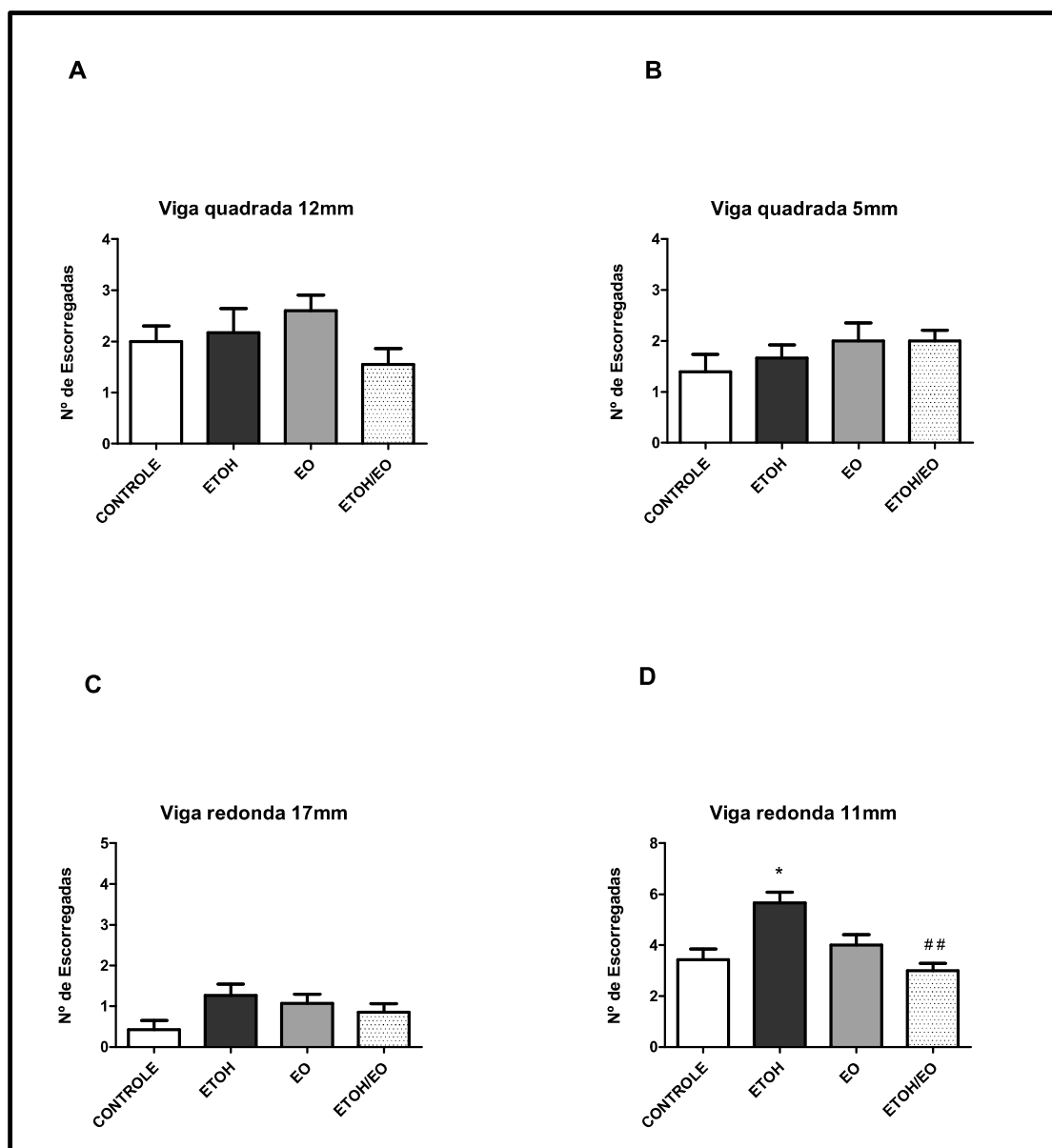


Figura 13: Efeitos do suco clarificado de açaí na intoxicação em padrão *binge drinking* no Beam Walking Test, observando o parâmetro Número de escorregadas em (A) Viga quadrada 12 mm, (B) Viga quadrada 5 mm, (C) Viga redonda 17 mm e (D) Viga redonda 11 mm. N = 10 por grupo; Os resultados estão expressos em média \pm EPM, (ANOVA de uma via, Bonferroni test pos-hoc). * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle; ## $P < 0.01$ comparado ao grupo.

4.5 Animais tratados com suco clarificado de açaí e etanol não demonstraram prejuízo na coordenação motora em teste de locomoção forçada

A figura 14 demonstra o teste de locomoção forçada em cilindro giratório. Na avaliação do parâmetro tempo para a primeira queda no aparato (Figura 14A) é observado que o grupo EtOH demorou menos tempo para cair do que o grupo controle apenas na primeira exposição ($P < 0,05$). O grupo que recebeu suco clarificado de açaí e etanol não demonstrou prejuízo no tempo de latência, demorando mais tempo para cair, nas três exposições ao aparato em relação ao grupo EtOH ($P < 0,001$ na primeira e segunda exposição e $P < 0,01$ na terceira exposição). Observamos também que na terceira exposição o grupo EtOH/EO demorou mais tempo para cair que o grupo controle ($P < 0,05$).

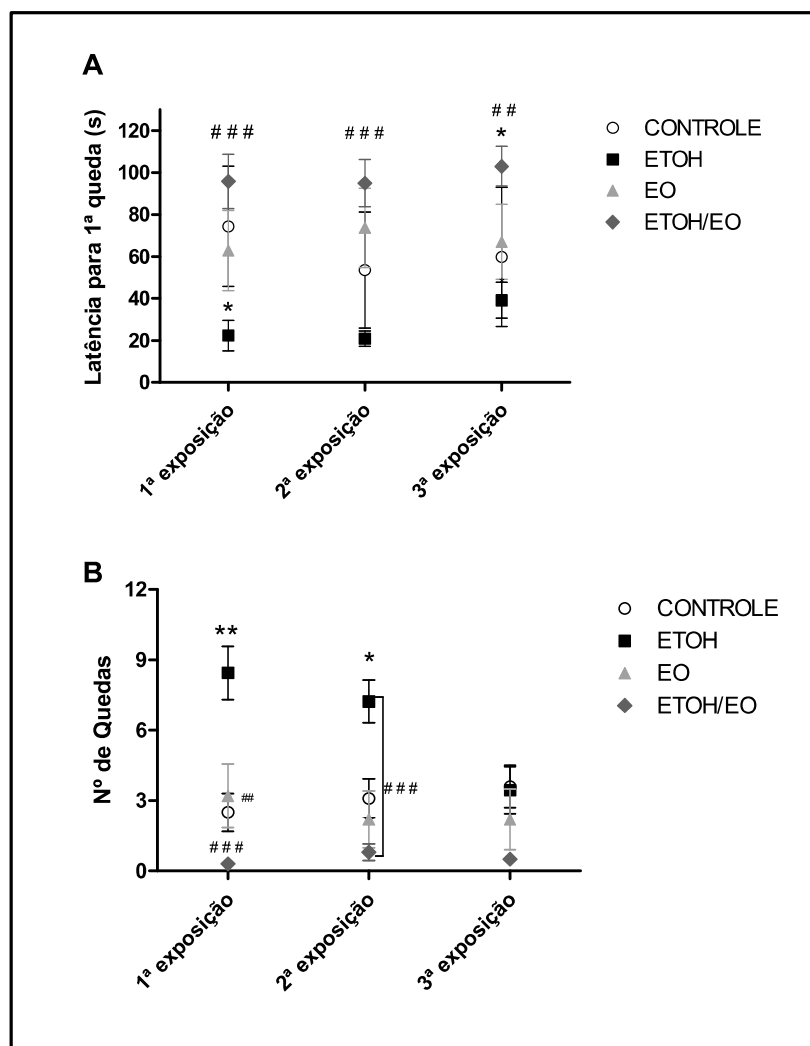
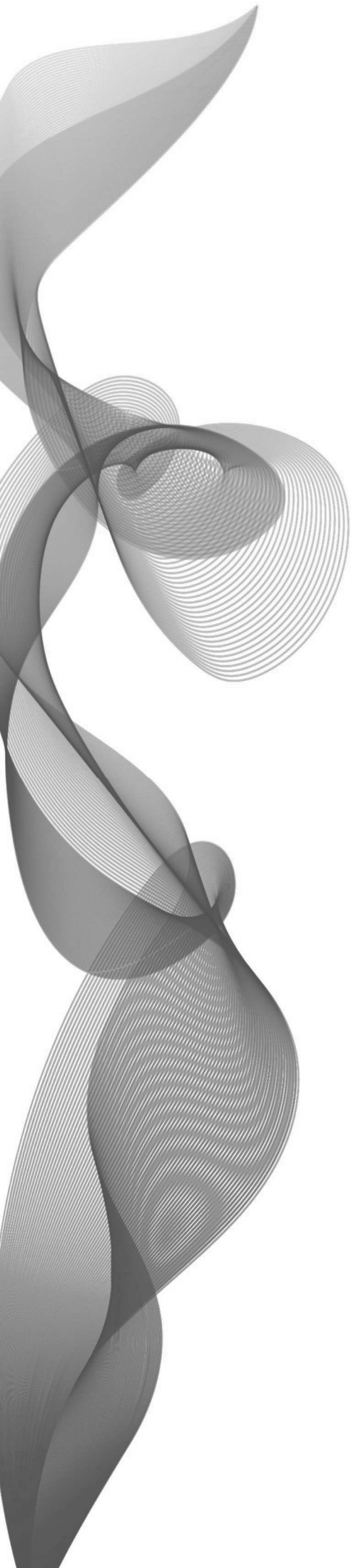


Figura 14: Efeito do suco clarificado de açaí na intoxicação em padrão *binge drinking* no Rotarod observando os parâmetros (A) tempo de latência para a primeira queda (s), (B) número de quedas (N = 10 animais por grupo). Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m. (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, Bonferroni test pos-hoc). *P<0.05 comparado ao grupo controle; ##P<0.01 comparado ao grupo ETOH. ###P<0.001 comparado ao grupo ETOH.

No parâmetro de número de quedas do cilindro giratório (Figura 14B), os animais que sofreram BD caíram mais vezes que o grupo controle na primeira (P<0,01) e segunda exposições (P<0,05), mas não na terceira exposição. Já o grupo que recebeu suco clarificado de açaí e etanol não mostrou o prejuízo no desempenho nas duas primeiras exposições que etanol isoladamente mostrou (P<0,001). Na terceira exposição nenhum grupo diferiu entre si quanto ao número de quedas.



V. DISCUSSÃO

Este trabalho vem pela primeira vez demonstrar o efeito neuroprotetor que o suco clarificado do açaí tem em relação aos danos motores causados em ratas adultas jovens que foram expostas ao consumo do etanol em padrão BD desde o início da adolescência até o início da fase adulta.

Os danos que o consumo do etanol causa ao organismo humano são bem conhecidos e podem variar de acordo com o padrão de consumo, a faixa etária de exposição e o sistema estudado. O modo de padrão de consumo BD acarreta, além das consequências do efeito agudo de uma alta concentração sanguínea de álcool, um efeito em longo prazo, como foi demonstrado por Fernandes et al. (2018), onde se constatou que ratas, quando expostas ao BD de etanol desde o início da adolescência, demonstraram prejuízos na função motora, na memória e na emocionalidade quando analisadas no início da fase adulta. Oliveira (2018) realizou um trabalho semelhante em relação à idade das ratas e protocolo de DB, onde comparou a intoxicação por mercúrio isoladamente, mercúrio em associação com etanol e a intoxicação por etanol isoladamente no padrão BD, constatando que o grupo intoxicado apenas com etanol apresentou problemas na execução dos testes motores *rotarod*, *beam walkink teste* e *pole test*. comparado ao grupo controle.

A dose de etanol utilizada no estudo de 3g/kg/dia é preconizada como dose suficiente para alcançar a concentração alcoólica sanguínea de 0,08% em ratas Wistar na fase estudada (LINDTNER et al., 2013; FERNANDES et al., 2018), condizente com a concentração para caracterizar BD (NIAAA, 2004).

O álcool é uma substância solúvel em água, com rápida absorção no intestino delgado e pico de concentração sanguínea atingida entre 30 a 90 minutos (HERNANDEZ, 2016). A passagem através da barreira hematoencefálica é rápida. As mulheres, como possuem menor índice de massa corporal e menor composição corporal de água em relação aos homens, tendem a ter concentração alcoólica no sangue maior, sentindo mais rapidamente e com mais intensidade os efeitos do álcool (MANCINELLI, 2007; WOLLE, 2011). Adolescentes são mais susceptíveis aos danos do etanol em padrão BD (PETIT et al, 2013), com prejuízos motores que perduram até a fase adulta. Essa susceptibilidade ocorre pois o sistema nervoso do adolescente ainda está em maturação (CSERVENKA et al., 2017).

O efeito prejudicial do consumo do etanol em padrão BD no comportamento motor das ratas no presente estudo corrobora os estudos realizados por Fernandes e colaboradores (2018) e Oliveira e colaboradores (2018), nos quais ratas foram tratadas com etanol em forma de BD desde o início da adolescência e foram testadas no início da fase adulta. Da Silva e colaboradores (2018) demonstrou que o álcool, na forma de *heavy drinking*, induz atrofia e perda neuronal no cerebelo de ratas adultas que foram expostas ao etanol desde a adolescência. Danos na coordenação motora e aprendizado motor, além de degeneração celular de células de Purkinje foram mostrados por Forbes e colaboradores (2013), onde ratos Sprague-Dawles foram submetidos à administração de etanol intraperitoneal mimetizando BD, desde a adolescência até a fase adulta.

Nossos resultados mostraram que o açaí preveniu efeitos prejudiciais do etanol sobre a locomoção espontânea das ratas. As ratas preservaram a deambulação e o comportamento exploratório. O teste de campo aberto é útil para avaliar tanto a atividade locomotora quanto o comportamento tipo ansioso/depressivo (KARL et al., 2003; BAHIL, 2013), trazendo à luz que o suco clarificado de açaí pode ter ação sobre o comportamento do tipo emocional, os quais não foram explorados neste estudo.

O Pole test é utilizado para avaliar a bradicinesia em roedores. Este estado é associado com o funcionamento anormal da circuitaria dos núcleos da base (BROOKS, 1999; GRAFTON, 2004), principalmente após lesão e morte celular nos terminais dopaminérgicos do estriado (OGAWA et al., 1985; DIGUET et al., 2005). Nossos resultados estão em concordância com a literatura, a qual mostra que os animais intoxicados com etanol apresentaram bradicinesia (FERNANDES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018). Entretanto, este estudo demonstra pela primeira vez que o açaí provavelmente atuou com efeito neuroprotetor sobre a circuitaria dos gânglios da base, pois o grupo que foi intoxicado com etanol e tratado com açaí não apresentou bradicinesia.

Outra região vital para a função motora é a cerebelar. O cerebelo é o órgão responsável pela coordenação e equilíbrio motor, atuando no refinamento dos movimentos e aprendizado motor. Em humanos, danos no cerebelo causam distúrbios motores, como ataxia, dismetria e déficit no aprendizado motor (FORBES et al, 2013). O etanol é uma substância exógena capaz de produzir desordens no cerebelo, causando os referidos danos. Estudos em humanos mostram que o cerebelo de adolescentes que

ingerem álcool tem menor volume cerebelar que o adolescente abstêmico (COLEMAN et al., 2011), e também que um consumo excessivo de álcool em idade precoce leva a danos permanentes ao cerebelo (DE BELLIS et al., 2005). Um estudo de Pascoal e colaboradores (2007) mostra que ratos adolescentes expostos ao etanol apresentam danos motores na fase adulta, indicando dano cerebelar persistente.

Para avaliar a função cerebelar (coordenação e equilíbrio motor), foram realizados neste estudo o *beam walking test* e o rotarod. Apesar de ambos testarem os mesmos parâmetros motores, o *beam walking test* avalia a coordenação motora fina enquanto que o *Rotarod* avalia a coordenação motora de maneira mais robusta (CURZON et al, 2009), ou seja, o rotarod avalia se o animal executa a tarefa motora e o *beam walking test* avalia a qualidade da execução da tarefa motora como a tarefa é executada (STANLEY et al., 2005).

A coordenação motora avaliada no *beam walking test* mostrou que nas vigas mais espessas não houve diferença de performance entre os grupos, tanto no tempo de latência quanto no número de escorregadas, porém quando avaliamos as vigas mais estreitas, ou seja, as que exigem um maior refinamento dos movimentos, observamos que os animais tratados com açaí e intoxicados com etanol e tiveram melhor desempenho nas atividades, inclusive melhor até que o grupo controle na viga redonda de 11mm (considerada a mais exigente de todas).

O teste do *rotarod* também avalia a coordenação motora e o aprendizado motor, mas de forma forçada, já que os animais são forçados a se locomover no cilindro giratório. Para realizar esta tarefa, a função e coordenação cerebelar do animal deve estar intacta (CARTER et al., 1999). Foi observado neste estudo que os animais tratados com suco clarificado de açaí e intoxicados com etanol preservaram a coordenação motora, demorando mais tempo para a primeira queda em todas as exposições ao aparato. Em relação ao número de quedas, o grupo tratado com açaí e etanol caiu menos que o grupo apenas intoxicado com etanol na primeira e segunda exposição ao aparato. Na terceira exposição, os grupos não diferiram no número de quedas, demonstrando que a aprendizagem motora não foi prejudicada.

Para testar o potencial de prevenção desses danos, utilizamos o suco clarificado de açaí, o qual é rico em espécies antioxidantes (NIMSE et al., 2015). Sabe-se que

antioxidantes tem papel importante na manutenção do equilíbrio redox no organismo, protegendo as células de graves danos causados por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio oriundos tanto de processos naturais do organismo quanto diretamente de substâncias exógenas ou do seu metabolismo (SANTANA et al., 2010).

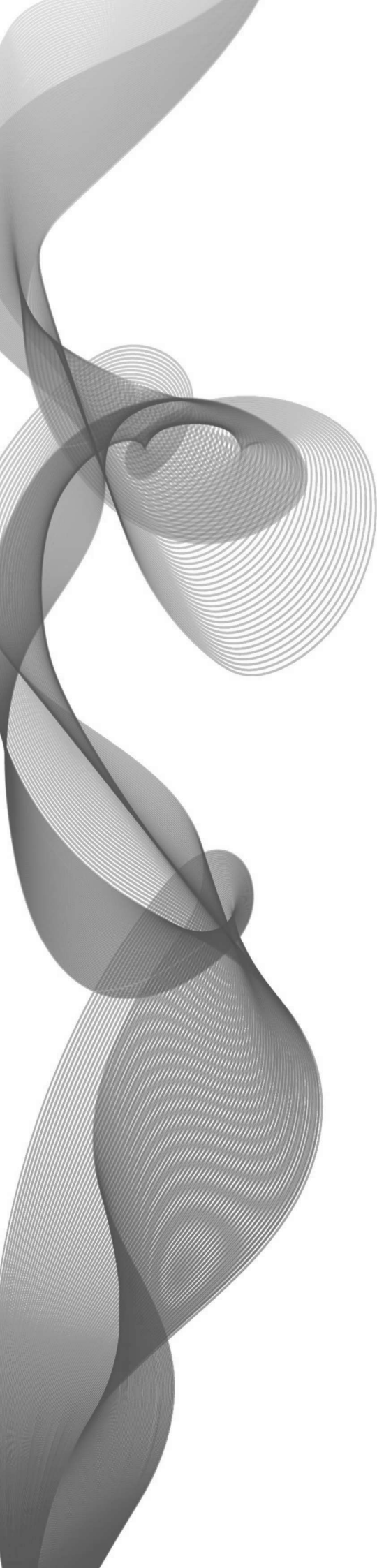
O Açaí é rico em flavonóides, especialmente antocianinas, as quais tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e produzir efeitos centrais (FARIAS, 2010). O suco clarificado utilizado neste estudo foi submetido a um processo de microfiltração, ficando livre de lipídeos, proteínas e fibras, não influenciando no peso corpóreo das ratas como foi observado neste estudo. O suco clarificado utilizado é rico em compostos fenólicos (>1400 mg ácido gálico equivalente/L) com prevalência de cianidina 3-rutinosídeo (450 mg/L), orientina (380 mg/L), taxifolina deoxyhexose (310 mg/L), homorientina (250 mg/L), e cianidina 3-glucosídeo (180 mg/L) (SOUZA-MONTEIRO et al., 2019). A dose administrada de 10 µl/g de peso do animal é equivalente a uma dose de 700 mL de açaí para um indivíduo de 70 kg, sendo compatível com o volume usualmente consumido pela população amazônica (SOUZA-MONTEIRO et al., 2015), onde o fruto é consumido frequentemente como alimentação principal. Estudos sobre toxicidade demonstraram que o consumo de suco clarificado de açaí não é tóxico para humanos (MERTENS-TALCOTT et al., 2008), e não provocam efeitos genotóxicos em roedores (RIBEIRO et al., 2010).

No intuito de tratar ou prevenir danos no sistema neuromotor, alguns estudos utilizaram o suco clarificado de açaí devido ao seu grande potencial antioxidante. Souza-Monteiro e colaboradores (2015) demonstrou o potencial anticonvulsivante do açaí, no qual o tratamento com suco clarificado de açaí na dose 10µg/kg protegeu ratos *Swiss* contra convulsões e o estresse oxidativo causado pelas convulsões. Da Silva e colaboradores (2021) corroboraram estes achados em estudos *in vivo* com peixe *Collossoma maccropomum*, onde a alimentação com açaí diminuiu convulsões nos animais modelos para epilepsia. Crespo-Lopez (2019) identificou que animais intoxicados com mercúrio apresentava tempo de latência no *rotarod* superior ao grupo controle, porém o grupo intoxicado e tratado com açaí, mostrou tempo de latência igual ao tempo do grupo controle.

Os danos causados pelo padrão BD são relacionados ao desbalanço na neurotransmissão, onde há *upregulation* da neurotransmissão glutamatérgica e

downregulation da transmissão gabaérgica, culminando em excitotoxicidade glutamatérgica (VENGELINE et al., 2008). A neuroproteção do açaí observada neste estudo através dos testes motores pode estar ligada à restauração do equilíbrio da neurotransmissão. Arrifano et al. (2018) demonstrou em cultura de neurônios corticais e astrócitos que o suco clarificado de açaí aumentou a transmissão gabaérgica pela interação com o receptor GABA_A, modulando a retirada de GABA da fenda sináptica e consequentemente, aumentando a sua concentração disponível no meio sináptico.

Levando em consideração que o cerebelo é predominantemente gabaérgico e que alterações em receptores GABA_A tem sido atribuídas ao mal funcionamento induzida pelo álcool na circuitaria cerebelar (JAATINEN & RINTALA, 2008), esta descoberta traz à luz um possível mecanismo de restauração da neurotransmissão pelo aumento da transmissão gabaérgica, podendo ser um importante fator neuroprotetivo do açaí contra os danos motores causados pelo consumo do etanol, pois o desbalanço na neurotransmissão favorece a excitotoxicidade glutamatérgica e estresse oxidativo, culminando em dano e perda neuronal. Somado a este fator, temos o grande potencial antioxidante já conhecido e comprovado do açaí, que garante proteção contra os efeitos oxidantes do metabolismo do etanol no sistema nervoso, impedindo que os danos causados pelo consumo do etanol se instaurem no organismo.



VI. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou através de testes de comportamento motor que o açai tem a capacidade de prevenir os danos causados pelo consumo de etanol em padrão BD em ratas que foram intoxicadas desde o início da adolescência até o início da fase adulta. Esse achado é de extrema relevância para a sociedade, haja vista que é preocupante o consumo do álcool entre adolescente, embora seja proibida a venda. Além de políticas públicas para conscientização ao não uso do álcool por esse público, é de suma importância encontrar um método de prevenir ou tratar os danos causados a longo prazo pelo consumo de etanol.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, N.D. (2011). Uso de álcool, tabaco e drogas por jovens e adultos da cidade de Recife. *Psicol. Argum. (Curitiba)*, 29(66) 295-302.
- Antzoulatos, E., Jakowec, M.W., Petzinger, G.M., & Wood, R.I. (2010). Sex differences in motor behavior in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Pharma.Biochem and Behav*, 95, 466 – 472.
- Arrifano, G.P.F., Lichtenstein, M.P., Souza-Monteiro, J.R., Farina, M., Rogez, H., Carvalho, J.C.T., Suñol, C., & Crespo-López, M.E., (2018). Clarified Açaí (*Euterpe oleracea*) Juice as an Anticonvulsant Agent: *In Vitro* Mechanistic Study of GABAergic Targets. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1–6.
- Bahi, A. (2013). Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted higher ethanol consumption and preference in outbred mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 105, 83-88.
- Berliocchi, L., Bano, D., & Nicotera, P., (2005). Ca²⁺ signals and death programmes in neurons. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci*, 360, 2255–2258.
- Bostan, A. C., & Strick, P. L. (2018). The basal ganglia and the cerebellum: nodes in an integrated network. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(6), 338-350.
- Botta, P., Mameli, M., Floyd, K. L., Radcliffe, R. A., & Valenzuela, C. F. (2007). Ethanol sensitivity of GABAergic currents in cerebellar granule neurons is not increased by a single amino acid change (R100Q) in the $\alpha 6$ GABAA receptor subunit. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323(2), 684-691.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
- Brocardo, P.S., Gil-Mohapel, J., & Christie, B.R. (2011). The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. *Brain Research Reviews*. 67, 209-225.

Brust, J.C.M. (2010). Ethanol and cognition: indirect effects, neurotoxicity and neuroprotection: A review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7, 1540-1557.

Carey A.N., Miller M.G., Fisher D.R., Bielinski D.F., Gilman C.K., & Poulos S.M. (2017). Dietary supplementation with the polyphenol-rich açai pulps (*Euterpe oleracea* Mart. and *Euterpe precatoria* Mart.) improves cognition in aged rats and attenuates inflammatory signaling in BV-2 microglial cells. *Nutr Neurosci.*, 20(4), 238-45.

Carter, R.J., Lione, L. A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G.P., Dunnett, S.B., & Morton, A J. (1999). Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J. Neurosci*, 19, 3248–3257.

Crespo-López, M. E., Soares, E. S., Macchi, B. D. M., Santos-Sacramento, L., Takeda, P. Y., Lopes-Araújo, A., ... & Arrifano, G. D. P. (2019). Towards therapeutic alternatives for mercury neurotoxicity in the amazon: Unraveling the pre-clinical effects of the superfruit açai (*Euterpe oleracea*, Mart.) as juice for human consumption. *Nutrients*, 11(11), 2585.

Coutinho, R., Dos Santos, W., Folmer, V., & Puntel, R. (2012). Risk behaviors prevalence in adolescents. *Cadernos de Saúde Coletiva*, 21, 441-449.

Crego, A., Rodriguez-Holguín, S., Parada, M., Mota, N., Corral, M., & Cadaveira, F. (2010). Reduced anterior prefrontal cortex activation in young binge drinkers during a visual working memory task. *Drug Alcohol Depend.*, 109, 45–56.

Crews, F.T., & Braun, C.J. (2003). Binge ethanol treatment causes greater brain damage in alcohol-preferring rats than in alcohol non preferring in rats. *Alcohol Clin Exp Res.*, 27:1075-82.

Cservenka, A., & Brumback, T. (2017). The burden of binge and heavy drinking on the brain: Effects on adolescent and young adult neural structure and function. *Front. Psychol.*, 8.

Curzon, P., Zhang, M., Radek, R.J., & Fox, G.B. (2009). The behavioral assessment of sensorimotor processes in the mouse: acoustic startle, sensory gating, locomotor activity, rotarod, and beam walking. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, 2, 21204341

- Da Silva, F.B.R., Cunha, P.A., Ribera, P.C., Barros, M.A., Cartágenes, S.C., Fernandes, L.M.P., Teixeira, F.B., Fontes-Júnior, E.A., Prediger, R.D., Lima, R.R., Maia, C.S.F., (2018). Heavy chronic ethanol exposure from adolescence to adulthood induces cerebellar neuronal loss and motor function damage in female rats. *Front. Behav. Neurosci.* 12, 1–11.
- De Bellis, M.D., Narasimhan, A., Thatcher, D.L., Keshavan, M.S., Soloff, P., & Clark, D.B. (2005). Prefrontal cortex, thalamus, and cerebellar volumes in adolescents and young adults with adolescent-onset alcohol use disorders and comorbid mental disorders. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 1590–1600.
- de Souza Machado, F., Marinho, J. P., Abujamra, A. L., Dani, C., Quincozes-Santos, A., & Funchal, C. (2015). Carbon tetrachloride increases the pro-inflammatory cytokines levels in different brain areas of wistar rats: the protective effect of acai frozen pulp. *Neurochemical research*, 40(9), 1976-1983.
- Elmann, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82: 70-77.
- Faria, A., Pestana, D., Teixeira, D., Azevedo, J., De Freitas, V., Mateus, N. & Calhau, C. (2010). Flavonoid transport across RBE4 cells: a blood-brain barrier model. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 15, 234-241.
- Fernandes, L. M. P., Lopes, K. S., Santana, L. N. S., Fontes-Júnior, E. A., Ribeiro, C. H. M. A., Silva, M. C. F., ... & Maia, C. S. F. (2018). Repeated cycles of binge-like ethanol intake in adolescent female rats induce motor function impairment and oxidative damage in motor cortex and liver, but not in blood. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.
- Forbes, A., Cooze, J., Malone C., French, V., & Weber, J.T. (2013). Effects of intermittent binge alcohol exposure on long-term motor function in young rats. *Alcohol*, 47, 95-102.
- Gallori, S., Bilia, A.R., Bergonzi, M.C., Barbosa, W.L.R., & Vincieri, F.F. (2004). Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). *Cromatographia*, 59(11-12), 739–743.
- Graybiel, A. M. (2000). The basal ganglia. *Current biology*, 10(14), R509-R511.

- Harper, C., & Matsumoto, I. (2005). Ethanol and brain damage. *Curr. Op. Pharmacol.*, 5, 73-78.
- Hao, H.N., Parker, G.C., Zhao, J., Barami, K., & Lyman, W.D. (2003). Human neural stem cells are more sensitive than astrocytes to ethanol exposure. *Alcohol ClinExp Res.* 27: 1310-7.
- Henderson, A. (2000). The genus *Euterpe* in Brazil. *Sellowia* (49-52): 1-22.
- Hernández, A., López-Sánchez, R.C., & Rendón-Ramírez, A. (2016). Lipids and oxidative stress associated with ethanol-induced neurological damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, Article ID 1543809.
- Jaatinen, P.I.A., & Rintala, J. (2008). Mechanisms of ethanol-induced degeneration in the developing, mature, and aging cerebellum. *The cerebellum*, 332–347.
- Jorge, K.O., Oliveira, A., Lacerda, S.M.S.N., Magalhães, S.R., Grossmann, S.M.C., & Melgaço, C.A. (2017). Alcoholic beverage consumption by adolescents: related problems and associated factors. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde (Três Corações)*, 15(1), 727-737.
- Khan, H., Tundis, R., Ullah, H., Aschner, M., Belwal, T., Mirzaei, H., & Akkol, E. K. (2020). Flavonoids targeting NRF2 in neurodegenerative disorders. *Food and Chemical Toxicology*, 146, 111817.
- Karl, T., Pabst, R., & Vonhörsten, S. (2003). Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp Toxic Pathol.*, 55, 69–83.
- Kim H.G., Ju, M.S., & Shim J.S.(2010). Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models. *Br J Nutr*, 104, 8–16.
- Laranjeira, R., Madruga, C. S., Pinsky, I., Caetano, R., Mitsuhiro, S. S., & Castello, G. (2014). II levantamento nacional de álcool e drogas (LENAD)-2012. *São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP.*
- Lauing, K., Himes, R., Rachwalski, M., Strotman, P., & Callaci, J.(2008). Binge alcohol treatment of adolescent rats followed by alcohol abstinence is associated with site-

specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength. *Alcohol*, 42(8), 649-656.

Lee, K.M., Coelho, M.A., Sern, K.R., & Szumlinski, K.K. (2018). Homer2 within the central nucleus of the amygdala modulates withdrawal-induced anxiety in a mouse model of binge-drinking. *Neuropharmacology*, 128, 448–459.

Lindtner, C., Scherer, T., Zielinski, E., Filatova, N., Fasshauer, M., Tonsk, N.K., Puchowicz, M., & Buettner, C. (2013). Binge drinking induces whole-body insulin resistance by impairing hypothalamic insulin action. *Science Translational Medicine*, 5(170), 170-184.

Lisdahl, K.M., Thayer, R., Squeglia, L.M., McQueeney, T.M., & Tapert, S.F. (2013). Recent binge drinking predicts smaller cerebellar volumes in adolescents. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 211, 17–23.

Mancinelli, R., Binetti, R., & Ceccanti, M. (2007). Woman, alcohol and environment: Emerging risks for health. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31(2), 246-253.

Martins-Oliveira, J.G., Kawachi, I., Paiva, P.C.P., Paiva, H.N., De Pordeus, I.A., & Zarzar P.M. (2018). Correlates of *binge drinking* among brazilian adolescents. *Cien. Saude Colet.* 23, 3445–3452.

Mertens-Talcott, S. U., Rios, J., Jilma-Stohlawetz, P., Pacheco-Palencia, L. A., Meibohm, B., Talcott, S. T., & Derendorf, H. (2008). Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(17), 7796-7802.

Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407-412.

National Institute On Alcohol Abuse And Alcoholism (NIAAA) 2004. National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism Council approves definition of binge drinking. NIAAA Newsl. 3:3.

Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*, 5(35), 27986-28006.

Novelli, A., Reilly, J.A., Lysko, P.G., & Henneberry, R.C. (1988). Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Bain*. 451, 205-12.

Oliveira, A. C. D., Valentim, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., & Trevisan, M. T. S. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32, 689-702.

Oliveira, A. N., Pinheiro, A. M., Belém-Filho, I. J. A., Fernandes, L. M. P., Cartágenes, S. C., Ribera, P. C., ... & Maia, C. S. F. (2018). Unravelling motor behaviour hallmarks in intoxicated adolescents: methylmercury subtoxic-dose exposure and binge ethanol intake paradigm in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(22), 21937-21948.

Pacheco-Palencia, L.A., Mertens-Talcott, S., Talcott, S.T. (2008). Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J. Agric. Food Chem.*, 56, 4631–4636.

Pandolfo, P., Pamplona, F.A., Prediger, R.D.S., & Takanashi, N. (2007) Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *European Journal of Pharmacology*, 563, 141–148.

Percário, S. (2004). Dosagem do dialdeídoomalônico. *NewsLab* (São Paulo), 6, 46-50.

Petit, G., Kornreich, C., Verbanck, P., & Campanella, S. (2013). Gender differences in reactivity to alcohol cues in binge drinkers: A preliminary assessment of event-related potentials. *Psychiatry Research*, 209, 494-503.

Pompeu, D.R., Silva, E.M., & Rogez, H. (2009). Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 100(23), 6076–6082.

Poulose S.M., Bielinski D.F., Carey A., Schauss A.G., & Shukitt-Hale B. (2017). Modulation of oxidative stress, inflammation, autophagy and expression of Nrf2 in

hippocampus and frontal cortex of rats fed with açai-enriched diets. *Nutr Neurosc.*, 20(5):305-15.

Reddy, V.D., Padmavathi, P., Kavitha, G., Saradamma, B., & Varadacharyulu, N. (2013). Alcohol-induced oxidative/nitrosative stress alter brain mitochondrial membrane properties. *Mol Cell Biochem.*, 375, 39–47.

Rosso, V.V., Hillebrand, S., Montilla, E.C., Bobbio, F.O., Winterhalter, P., & Mercadante, A.Z. (2008). Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia marginata*DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(4), 291–299.

SANTANA, A. C. D. (1997). Modelos intersetoriais de planejamento econômico: matrizes de insumo-produto (MIP) e de contabilidade social (MCS). *Belém: Basa/FCAP*.

Santana, A. S., Koblitz, M.G.B., Costa, R.S., & Silva, M.L.C. (2010). Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3), 669-681.

Schauss, A., Wu, X., Prior, R.L., Ou, B., Huang, D., Owens, J., Agarwarl, A., Jensen, G.S., Hart, A.N., & Shanbrom, E. (2006). Antioxidant capacity and others bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart. (açai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8604–8610.

Schalcher T.R., Borges R.S., Coleman M.D., Batista Júnior J., Salgado C.G., & Vieira J.L.F. (2014). Clinical oxidative stress during leprosy multidrug therapy: impact of dapsone oxidation. *PLoS ONE*, 9(1), e85712.

Skala, K., & Walter, H. (2013). Adolescence and alcohol: a review of the literature. *neuropsychiatrie*, 27(4), 202-211.

Souza-Monteiro, J.R., Hamoy, M., Santana-Coelho, D., Arrifano G.P., Paraense, R.S., Costa-Malaquias, A., Mendonça, J.R., Da Silva, R.F., Monteiro, W.S., Rogez, H., Oliveira, D.L., Nascimento, J.L., & Crespo-López, M.E. (2015). Anticonvulsant properties of *Euterpe oleracea* in mice. *Neurochem Int.*, 90, 20-7.

Souza-Monteiro, J.R., Arrifano, G.P.F., Queiroz, A.I.D.G., Mello, B.S.F., Custódio, C.S., Macêdo, D.S., Hamoy, M., Paraense, R.S.O., Bittencourt, L.O., Lima, R.R., Burbano,

- R.R., Rogez, H., Maia, C.S.F., Macchi, B.M., Nascimento, J.L.M., & Crespo-López, M.E. (2019). Antidepressant and antiaging effects of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) in mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 3614960.
- Spear, L.P. (2004). Adolescent brain development and animal models. *Ann NY Acad Sci.*, 1021, 23–26.
- Stanley, J.L., Lincoln, R.J., Brown, T.A., McDonald, L.M., Dawson, G.R., & Reynolds, D.S. (2005). The mouse beam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines. *J. Psychopharmacol.*, 19, 221–227.
- Svoboda, K. & Li, N. (2018). Neural mechanisms of movement planning: motor cortex and beyond. *Current Opinion in Neurobiology*, 49, 33–41.
- Tateno, M., Ukai, W., Yamamoto, M., Hashimoto, E., Ikeda, H., & Saito, T. (2005). The effect of ethanol on cell fate determination of neural stem cells. *Alcoholism: clinical and experimental research*, 29(12).
- Vale, A. (2007). Ethanol. *Medicine*, 35(11), 615-616.
- Valenzuela, C.F., & Jotty, K. (2015). Mini-review: effects of ethanol on GABA_A receptor-mediated neurotransmission in the cerebellar cortex – recent advances. *Cerebellum*, 14 (4), 438–446.
- Vargas, D., Oliveira, M., & Araújo, E. (2009). Prevalência de dependência alcoólica em serviços de atenção primária à saúde de Bebedouro, São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, 25, 1711-1720.
- Vengeliene, V., Bachteler, D., Danysz, W., & Spanagel, R. (2005). The role of the NMDA receptor in alcohol relapse: A pharmacological mapping study using the alcohol deprivation effect. *Neuropharmacology*, 48, 822–829.
- Voogd, J., & Ruigrok, T. J. (2004). The organization of the corticonuclear and olivocerebellar climbing fiber projections to the rat cerebellar vermis: the congruence of projection zones and the zebrin pattern. *Journal of neurocytology*, 33(1), 5-21.

Zaleski, M., Morato, G.S., Silva, V.A., & Lemos, T. (2004). Aspectos neurofarmacológicos do uso crônico e a síndrome de abstinência do álcool. *Revista Brasileira de psiquiatria*, (supl I), 40-42.

Willhelm, A. R., Cabral, J. C. C., Steiger, J. O., da Silva, J. F. F., Ugarte, L. M., & de Almeida, R. M. M. (2015). Consumo de álcool na adolescência e relação com uso excessivo de bebidas alcoólicas dos pais: estudantes de quatro escolas de Porto Alegre. *Psico*, 46(2), 208-216.

Wolle, C.C., Sanches, M., Zilberman, M.L., Caetano, R., Zaleski, M., Laranjeira, R.R., & Pinsky, I. (2011). Differences in drinking patterns between men and women in Brazil. *Rev Bras Psiquiatr.*, 33, 367-373.

World Health Organization. (2018). Global Status Report on Alcohol and Health 2018.