

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITOS BENÉFICOS DO EXTRATO DAS CASCAS
DE NOZ PECÃ (*Carya illinoensis*) SOBRE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
COMPORTAMENTAIS DE CAMUNDONGOS
EXPOSTOS AO FUMO PASSIVO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Patrícia Reckziegel

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**EFEITOS BENÉFICOS DO EXTRATO DAS CASCAS DE NOZ
PECÃ (*Carya illinoensis*) SOBRE PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS DE
CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO FUMO PASSIVO**

por

Patrícia Reckziegel

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marilise Escobar Bürger

Santa Maria, RS, Brasil

2011

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

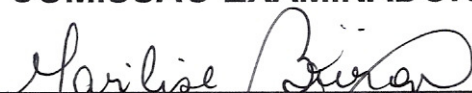
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**EFEITOS BENÉFICOS DO EXTRATO DAS CASCAS DE NOZ PECÃ
(*Carya illinoensis*) SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
COMPORTAMENTAIS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO FUMO
PASSIVO**

elaborada por
Patrícia Reckziegel

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

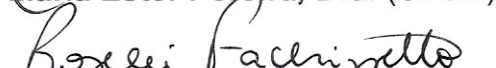
COMISSÃO EXAMINADORA:



Marilise Escobar Bürger, Dra.
(Presidente/Orientadora)



Maria Ester Pereira, Dra. (UFSM)



Roselei Fachinnetto, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 28 de janeiro de 2011.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Nossa Senhora Aparecida e meu Anjo da Guarda por sempre me iluminarem, guiarem meus passos e me darem forças nesta e em todas as caminhadas.

Aos meus queridos pais Telmo e Inês pela vida, amor, carinho, companheirismo e apoio. Obrigada pelos ensinamentos, por sempre acreditarem em mim e terem me incentivado na busca dos meus objetivos, sem medir esforços. Eis aqui os meus eternos agradecimentos por tudo o que vocês fizeram e continuam fazendo por mim.

Ao meu namorado, Gabriel, por seu amor, companheirismo, apoio e paciência incondicionais e fundamentais.

Às minhas irmãs, Caroline e Simone, pelo carinho e apoio.

À minha orientadora, Pr^a. Dr^a. Marilise Escobar Bürger, pela oportunidade e acolhida em seu laboratório, pelos conhecimentos ensinados, pela amizade e pela confiança que me foi depositada. À senhora, meus sinceros agradecimentos.

Em especial, aos amigos queridos que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho: Nardeli, Dalila, Raquel, Camila, Liz e Angélica. Este trabalho é nosso. Muito obrigada pela ajuda!

À Verônica, “minha estagiária”, e ao Hecson que sempre estiveram comigo ao longo desta caminhada. Agradeço muito pela ajuda e dedicação aos outros trabalhos que realizei durante este mestrado, bem como por suas amizades.

Aos demais integrantes do Laboratório da Professora Marilise: Geisa, Fabíola, Caren, Katiane, Déborah, Magali e Karine. A vocês os meus sinceros agradecimentos pela amizade e companheirismo.

Aos demais colaboradores deste trabalho, Dr. Renato Zanella, MSc Ana Cristina Pinheiro do Prado, Dr^a Roseane Fett e Dr^a Jane Mara Block.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia por terem contribuído para a minha formação.

Aos animais utilizados, meios para a realização deste trabalho, todo o meu respeito e gratidão.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela possibilidade de realizar este curso.

*“O mais importante neste mundo não é tanto onde
estamos, mas em que direção nos movemos.”*

O. W. Holmes

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITOS BENÉFICOS DO EXTRATO DAS CASCAS DE NOZ PECÃ (*Carya illinoensis*) SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO FUMO PASSIVO

Autora: Patrícia Reckziegel

Orientadora: Marilise Escobar Bürger

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de janeiro de 2011

O tabagismo representa a segunda maior causa de mortes no mundo, sendo responsável por 5 milhões de mortes anuais. Não apenas os fumantes ativos estão sujeitos aos efeitos danosos do cigarro, mas também os fumantes passivos, que compreendem um terço da população adulta mundial. A fumaça do cigarro contém nicotina e outros compostos relacionados à adição, bem como constituintes capazes de gerar estresse oxidativo (EO), um desequilíbrio entre os oxidantes e as defesas antioxidantes do organismo, possivelmente responsável pelos efeitos danosos do cigarro sobre o organismo. A casca da noz pecã (*Carya illinoensis*) é um subproduto industrial de baixo custo e elevado poder antioxidante, cujo chá é utilizado popularmente para tratar intoxicações medicamentosas e resultantes do tabagismo. Porém, até o momento, esse emprego não apresenta validação científica. Em vista disso, o presente estudo investigou a possível atividade protetora do extrato aquoso bruto (EAB) da casca da noz pecã sobre parâmetros comportamentais de abstinência e parâmetros bioquímicos de EO em animais expostos ao fumo passivo. Camundongos Swiss receberam água potável ou EAB (25g/L), *ad libitum*, no lugar da água de beber, uma semana antes e durante toda exposição à fumaça do cigarro, a qual teve duração de 3 semanas (6, 10 e 14 cigarros/dia em cada semana, respectivamente) e ocorreu em incubadora modificada. A concentração ambiental de monóxido de carbono e material particulado total na incubadora foram 130ppm e 188mg/m³, respectivamente. Quinze horas após a última exposição ao fumo passivo os animais foram avaliados no teste do campo aberto e no teste de esconder esferas. Vinte horas após a última exposição ao fumo passivo os animais foram anestesiados e eutanasiados por exsanguinação (punção cardíaca), com coleta de sangue e retirada do cérebro para as análises bioquímicas. Os dados foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias, seguido pelo teste de Duncan quando necessário. O protocolo de exposição ao fumo passivo elevou a concentração total de dióxido de carbono sanguíneo e o hematócrito, os quais são marcadores indiretos de exposição à fumaça do cigarro, bem como reduziu o ganho de peso dos animais sem alterar o consumo de líquidos. No campo aberto, animais expostos ao fumo passivo apresentaram aumento da atividade locomotora e exploratória, do tempo de auto-limpeza e do número de bolos fecais, bem como mostraram aumento do número de esferas escondidas no teste de esconder esferas em relação aos controles. Os animais que receberam EAB não desenvolveram essas modificações

comportamentais, as quais indicam ansiedade, característica essa relacionada a abstinência ao cigarro. Neste estudo, o envolvimento do tabagismo com os danos oxidativos já descritos na literatura foi confirmado através do aumento da peroxidação lipídica cerebral e eritrocitária, aumento da atividade da catalase (CAT) eritrocitária e redução das concentrações plasmáticas de ácido ascórbico. O EAB da casca de noz pecã protegeu os animais expostos ao fumo passivo da peroxidação lipídica e da redução dos níveis plasmáticos de ácido ascórbico. A atividade da CAT permaneceu aumentada nos eritrócitos e elevou-se no cérebro dos animais expostos ao fumo passivo e tratados com EAB em relação aos controles, possivelmente pela indução de mecanismos compensatórios que visam eliminar o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzido pelo cigarro. Hipotetizou-se que esses resultados bioquímicos devem-se, em grande parte, ao elevado potencial antioxidante do EAB, confirmado através dos testes *in vitro* do ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e pela dosagem de compostos fenólicos totais e taninos condensados. Através de correlação de Pearson, foram observadas correlações positivas entre os parâmetros comportamentais e a peroxidação lipídica eritrocitária, confirmando o envolvimento da ansiedade com o EO. Os resultados apresentados aqui evidenciam os efeitos protetores do EAB das cascas da noz pecã sobre os sinais de ansiedade durante abstinência e sobre danos oxidativos e defesas antioxidantes alterados pelo fumo passivo em camundongos. Ademais, confirma-se o uso popular do extrato das cascas de noz pecã frente danos induzidos pelo cigarro e entende-se que esse subproduto da indústria pode ser considerado no tratamento do tabagismo, o que aumentaria o carente arsenal terapêutico empregado atualmente no tratamento do tabagismo. Maiores estudos elucidando os componentes presentes nesse extrato, bem como os mecanismos neurais relacionados aos resultados encontrados são necessários.

Palavras-chave: abstinência, *Carya illinoensis*, casca da noz pecã, cigarro, estresse oxidativo, fumo passivo.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

BENEFICIAL EFFECTS OF PECAN NUT SHELLS (*Carya illinoensis*) AGAINST BIOCHEMICAL AND BEHAVIORAL PARAMETERS OF MICE EXPOSED TO PASSIVE SMOKE

Author: Patrícia Reckziegel

Advisor: Marilise Escobar Bürger

Date and place of defense: January 28th, 2011, Santa Maria

Smoking is the second major reason of death worldwide, amounting 5 millions of deaths annually. The adverse effects of cigarette smoking are not limited to active smokers, but also to passive smokers, which comprise one third of worldwide adult population. Cigarette smoking contain nicotine and other addiction related compounds, as well as components that can generate oxidative stress (OS), an unbalance between oxidants and antioxidants of the body, probably responsible for the pathogenesis of smoke-related disorders. The shells of pecan nut (*Carya illinoensis*) are an industrial byproduct of low cost and high antioxidant potential, whose tea is popularly used as treatment for drug and smoking intoxications, however without scientific validation. Therefore, the present study investigated the possible protection of pecan nut shells aqueous extract (AE) against abstinence behavioral parameters and OS biochemical parameters in animals exposed to passive cigarette smoke. Swiss mice received drinking water or AE (25g/L), *ad libitum*, in the place of water during one week before and during 3 weeks of cigarette smoke exposure (6, 10 and 14 cigarettes/day each week, respectively), which occurred in a modified incubator. The environmental concentration of carbon monoxide and total suspended particulate matter in the incubator were 130ppm and 188mg/m³, respectively. Fifteen hours after the last cigarette smoke exposure, the animals were evaluated in the open-field test and in the marble burning test. Twenty hours after the last cigarette smoke exposure, the animals were anesthetized and euthanized by exsanguination (cardiac puncture), with collection of blood and removal of brain for biochemical analysis. Data were analyzed by one or two-way ANOVA, followed by Duncan's test when necessary. The protocol of cigarette smoke exposure increased total concentration of carbon dioxide in blood and the hematocrit, which are indirect biochemical markers of cigarette smoke exposure, and reduced the body weight gain of animals without altering fluid intake. In the open-field test, animals exposed to passive smoke showed increase in locomotor and exploratory activities, self-cleaning time and fecal pellets number, as well as in the number of beads hidden in the marble burning test, than the controls. The animals that received AE did not develop these behavioral changes, which indicate anxiety, characteristic related to smoking abstinence. In this study, the involvement of smoking with oxidative damages described in the literature was confirmed by increasing cerebral and erythrocyte lipid peroxidation, increasing in erythrocyte catalase (CAT) activity

and decreasing in plasma ascorbic acid. The pecan shells AE was able to protect the mice exposed to cigarette smoke of the lipid peroxidation and decrease of plasma ascorbic acid levels. CAT activity remained high in erythrocytes and increased in brain of animals exposed to cigarette smoke and that received AE, possible as a compensatory mechanism to eliminate excess of reactive oxygen species (ROS) induced by cigarette smoke. It is hypothesized that these biochemical results are in large part due the high antioxidant potential of AE, confirmed by *in vitro* assays of ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and by measuring of total phenolic compounds and condensed tannins levels. By Pearson correlation, were observed positive correlations between behavioral parameters evaluated and erythrocyte lipid peroxidation, confirming the involvement of anxiety and OS. The results presented here show the protective effect of pecan nut shells AE on anxiety-like sings of cigarette withdrawal and on oxidative damages and altered antioxidant defenses induced by passive cigarette smoke in mice. Moreover, the popular use of pecan nut shell extract against cigarette smoke was confirmed. It is believed that this industrial byproduct can be considered in the treatment of smoking, increasing the poor therapeutic armamentarium currently employed for this end. Further studies elucidating the components present in this extract, as well as neural mechanisms related to these results are needed.

Key-words: withdrawal, *Carya illinoensis*, pecan nut shell, cigarette, oxidative stress, passive smoke.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Enzimas antioxidantes.....29

MANUSCRITO

FIGURE 1 - Effects of pecan shell AE treatment on TBARS levels in brain and red blood cells of mice exposed to passive cigarette smoke.....64

FIGURE 2 - Effects of pecan shell AE treatment on catalase (CAT) activity in brain and red blood cells of mice exposed to passive cigarette smoke.....65

FIGURE 3 - Effects of pecan shell AE treatment on plasma ascorbic acid (AA) levels of mice exposed to passive cigarette smoke.....66

FIGURE 4 - Linear regression analysis between red blood cell TBARS levels and crossing, rearing and grooming in the open-field test and beads hidden in the marble burning test of mice treated with pecan shells AE and exposed to CSE.....67

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

TABLE 1 - Phytochemical characterization of pecan shells aqueous extract (AE), and its antioxidant activity <i>in vitro</i>	68
TABLE 2 - Effect of pecan shell AE on the body weight and on liquid consumption of mice exposed to cigarette smoke.....	69
TABLE 3 - Effect of CSE on hematocrit and ctCO ₂ levels in mice.....	70
TABLE 4 - Effect of pecan shell AE on behavior parameters of mice exposed to cigarette smoke.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA – ascorbic acid
- ABTS – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
- AC – antioxidant capacity
- AE – aqueous extract
- ANOVA – analysis of variance
- C – control
- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CAT – catalase
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CSE – cigarette smoke exposure
- CO – monóxido de carbono / carbon monoxide
- CONCEA – Council for Control of Animal Experiments
- CT – condensed tannins
- ctCO₂ – total concentration of carbon monoxide
- DNPH – dinitrophenylhydrazine
- DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- EAB – extrato aquoso bruto
- EO – estresse oxidativo
- EROs – espécies reativas de oxigênio
- FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
- FDA – Food and Drug Administration
- FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa
- GAE – gallic acid equivalent
- GPx – glutathione peroxidase
- GR – glutathione reductase

GSH – glutathione reduced
GSR – glutathione reductase
GSSG – glutathione oxidized
H₂O₂ – peroxide of hydrogen / hydrogen peroxide
LP – lipid peroxidation
MAO – monoamine oxidase
MDA – malondialdehyde / malondialdehyde
NADP⁺ – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized
NADPH – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced
O₂^{•-} – superoxide radical
OH[•] – hydroxyl radical
OS – oxidative stress
PRPGP – Pró-Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa
RBC – red blood cells
RL – free radicals
ROS – reactive oxygen species
S – smoke
SC – sub-cutaneous
SEM – standard error of median
SOD – superoxide dismutase
TBA – thiobarbituric acid
TBARS – substances reactive to thiobarbituric acid / thiobarbituric acid reactive substances
TE – trolox equivalent
TP – total phenolic compounds contents
TRN – nicotine replacement therapy
U – units
WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
APRESENTAÇÃO	15
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Tabagismo	19
3.1.1 Aspectos Gerais.....	19
3.1.2 Fumo Passivo.....	21
3.1.3 Dependência.....	23
3.1.4 Estresse Oxidativo.....	27
3.2 <i>Carya illinoensis</i>	31
4 RESULTADOS	34
4.1 Manuscrito: Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry	35
5 DISCUSSÃO	72
6 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação apresenta os resultados na forma de manuscrito científico, o qual encontra-se submetido à revista científica e em fase de revisão. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas estão incorporadas no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

Ao fim desta dissertação encontram-se os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, nos quais há interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito científico contido neste estudo.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

O consumo de tabaco representa a segunda maior causa de morte no mundo, sendo responsável por cinco milhões de óbitos anuais (ARAUJO et al., 2004; WHO, 2010). Estima-se que aproximadamente um terço da população brasileira adulta fume, sendo essa população concentrada principalmente na faixa etária dos 20 aos 49 anos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2003). Além dos danos da exposição direta, o cigarro é responsável anualmente pela morte de 38.000 fumantes passivos (CDC, 2005).

A fumaça do cigarro consiste em uma complexa mistura de mais de 4.700 substâncias (GENBACEV-KRTOLICA, 2005; RAHMAN et al., 1996), que incluem elevada quantidade de aldeídos reativos (PARK et al., 1998), espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (PRYOR & STONE, 1993) e diversos metais, como cádmio (WHO, 1992). Ademais, estima-se que haja mais de 10^{15} radicais livres (RL) em um único *puff* de cigarro (PRYOR & STONE, 1993), os quais apresentam envolvimento direto no desenvolvimento de estresse oxidativo (EO), o possível mecanismo relacionado aos efeitos danosos do cigarro sobre o organismo (BRIVIBA & SLES, 1994; CROSS & TRADER, 1997).

O EO consiste em um desequilíbrio orgânico entre a produção de RL e as defesas antioxidantes do organismo, podendo resultar na oxidação de lipídeos, proteínas e DNA, prejudicando, assim, a função celular (HELEN et al., 2000; SIES, 1997). O sistema de defesa antioxidante, que visa o controle oxidativo dos RL (AMSTAD & CERUTTI, 1990; SIES, 1986), pode ser dividido em enzimático (que inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR)) e não enzimático (incluindo compostos como glutathiona reduzida (GSH), ácido ascórbico, α -tocoferol e β -caroteno) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Observa-se que os fumantes apresentam diminuição das concentrações plasmáticas de diversos antioxidantes, como ácido ascórbico, vitamina E e β -caroteno em relação a não fumantes (ALBERG, 2002; CHOW et al., 1986; DUTHIE et al., 1989).

Quando os níveis normais de antioxidantes do organismo são insuficientes para neutralizar o excesso de RL, a administração ou suplementação através de

antioxidantes exógenos, como aqueles presentes em plantas medicinais, pode exercer efeito benéfico evidente (REKHA et al., 2001), conforme relatado em diversos estudos (ANBARASI et al., 2006; BALAKRISHNAN & MENON, 2007; BEZERRA et al., 2006; EL-SOKKARY et al., 2007; LANZETTI et al., 2008; LUCHESE et al., 2009a, b).

Além da relação com o EO, o cigarro causa dependência principalmente pela presença de nicotina, substância que atinge o cérebro em poucos segundos após o uso do cigarro e apresenta relação com a iniciação, a manutenção e a dificuldade em parar de fumar. Entretanto, o poder aditivo do cigarro não está relacionado apenas à nicotina, mas também a outros compostos presentes no mesmo (BELLUZZI et al., 2005; DWOSKIN et al., 1999; GUILLEM et al., 2005; TALHOUT et al., 2007). Dentre os efeitos reforçadores positivos do cigarro observa-se prazer, excitação, relaxamento e aumento da atenção após fumar, os quais decorrem da ativação do sistema dopaminérgico meso-corticolímbico (ROBINSON & BERIDGE, 1993; WISE & BOZARTH, 1987). Já a redução do consumo de cigarro causa síndrome de abstinência, caracterizada por uma série de efeitos aversivos como irritação, ansiedade, dificuldade de concentração, fissura e ganho de peso (HUGHES et al., 1990; HUGHES et al., 1991; HUGHES & HATSUKAMI, 1986). A ansiedade durante período de abstinência representa um dos principais motivos que leva ao ato de fumar, dificultando o abandono do tabagismo (GILBERT et al., 1989; MANHÃES et al., 2008; PICCIOTTO et al., 2003; POMERLEAU, 1986). A grande maioria das terapias existentes para auxiliar fumantes no abandono do tabagismo busca o controle desses efeitos aversivos do cigarro. Entretanto essas terapias geralmente são de custo elevado e não são eficazes em muitos casos (GARWOOD & POTTS, 2007), gerando a necessidade de novas.

Nas regiões sul e sudeste do Brasil encontram-se extensas plantações da noqueira pecã (*Carya illinoensis*), que pertence à família Juglandaceae (JOLY, 1993). A casca de sua noz consiste em um subproduto de cor avermelhada intensa, de difícil degradação e que representa de 40% a 50% o tamanho da castanha (WORLEY, 1994). Essa casca representa uma fonte alternativa de compostos com alta capacidade antioxidante, como fenólicos totais e taninos condensados, sendo que a quantidade desses é superior àquela encontrada no conteúdo da noz (VILLAREALL-LOZOYA, 2007). Além disso, a casca da noz pecã vem sendo utilizada popularmente na forma de chá no tratamento de diversos distúrbios

orgânicos, como, por exemplo, em intoxicações por nicotina, o que ainda não apresenta validação científica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do extrato aquoso bruto (EAB) da casca da noz pecã (*Carya illinoensis*) sobre danos oxidativos e parâmetros comportamentais de abstinência induzidos pela exposição de camundongos ao fumo passivo.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar se o protocolo adotado de exposição ao fumo passivo altera parâmetros comportamentais que inferem ansiedade durante período de abstinência, bem como a ação do EAB frente às alterações comportamentais encontradas;
- Caracterizar o EAB utilizado através do potencial antioxidante *in vitro* (verificado pelas técnicas do ABTS e do DPPH) e através da dosagem dos compostos fenólicos totais e taninos condensados;
- Avaliar se o protocolo adotado de exposição ao fumo passivo causa EO e modifica defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas nos animais experimentais, bem como os efeitos do EAB frente às alterações bioquímicas encontradas;
- Avaliar o envolvimento do EO com a ansiedade durante período de abstinência ao fumo passivo por meio da análise das correlações existentes entre os parâmetros bioquímicos e comportamentais avaliados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Tabagismo

3.1.1 Aspectos Gerais

As folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) já eram utilizadas pela população desde 2000 a.C. em rituais religiosos e assumiram a forma comercial de cigarro no final do século XIX. O cigarro teve sua popularização após a Primeira Guerra Mundial (1914 a 1918) e a partir do século XX devido, em grande parte, ao desenvolvimento da publicidade e do marketing. Hoje, pela Organização Mundial da Saúde, o tabagismo é considerado uma pandemia, já que morrem no mundo 5 milhões de pessoas por ano em consequência das doenças provocadas pelo tabaco, o que corresponde a aproximadamente 6 mortes a cada segundo (DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, 2004).

Atualmente, existe cerca de 1,3 bilhão de fumantes ativos no mundo, sendo um bilhão do sexo masculino e o restante, em muito menor proporção, do sexo feminino. De acordo com o Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC, 2008), 77,8% dos fumantes fumam todos os dias e 22,2% não. Quanto aos grupos raciais e étnicos, a menor prevalência de fumantes é entre os asiáticos (9,6%), e a maior entre os índios americanos e nativos do Alasca (36,4%). Já em relação ao nível educacional, a maior prevalência de fumantes concentra-se no menor nível (44%) e entre 9 e 11 anos de escolaridade (33,3%), e a menor prevalência entre pessoas com diploma de graduação (6,2%). 28,8% dos adultos com os menores níveis de renda fumam e 20,3% daqueles que vivem dentro ou pouco acima do nível de pobreza. A prevalência do tabagismo é menor entre pessoas com 65 anos de idade ou mais (10,2%) e maior entre os 18 e 24 anos (23,9%). Observa-se um crescente número de mulheres fumantes e, decrescente de homens (JEREMY & LACEY, 2002). No Brasil, aproximadamente um terço da população adulta fuma,

sendo essa população concentrada principalmente na faixa etária dos 20 aos 49 anos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2003).

Estima-se que, nos próximos 20 anos, o maior percentual de fumantes esteja concentrado nos países em desenvolvimento (WORLD BANK & WHO, 2000). China e Índia serão alguns dos países responsáveis por essa mudança de perfil; somente na China, hoje, há 300 milhões de homens fumantes, o que equivale à população total dos EUA.

Apesar dos 47 anos passados desde o primeiro documento governamental sobre os prejuízos do cigarro à saúde (US PUBLIC HEALTH SERVICE, 1964), o mesmo persiste como uma das principais causas de mortes no mundo. A Organização Mundial da Saúde informa que o cigarro representa um dos 10 maiores riscos de prejuízos à saúde (WHO, 2002a), sendo a segunda maior causa de mortes evitáveis no mundo (WHO, 2010). Até o presente, aproximadamente 5 milhões de pessoas morrem por ano de doenças relacionadas ao fumo e, se os correntes dados continuarem, esse quadro pode chegar a 10 milhões de mortes em 2020, sendo que 7 milhões dessas ocorrerão em países emergentes (DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, 2004; WHO, 2007). Fumantes com idade entre 45 e 64 anos apresentam índice de mortalidade 3 vezes superior ao de não-fumantes, e entre 65-84 anos, o dobro (DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, 1991). Shaw et al. (2000) reporta que um cigarro reduz a vida de quem fuma em 11 minutos.

Dentre os prejuízos à saúde, o consumo de cigarro é um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de doenças pulmonares, cardíacas e cerebrovasculares, além de câncer de pulmão (US DHHS, 1989). Além disso, a inalação dos produtos do cigarro causa doença obstrutiva pulmonar crônica, vários tipos de neoplasias, hipertensão, mudanças desfavoráveis no perfil de lipoproteínas, sinais de inflamação (como elevação dos níveis de células brancas sanguíneas e marcadores inflamatórios como proteína C reativa, interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α), alterações na coagulação sanguínea (pela estimulação da agregação plaquetária e redução da fibrinólise), elevação do risco para desenvolvimento de diabetes *mellitus* e de doenças infecciosas (como várias formas de influenza, doença pneumocócica, tuberculose e infecções de feridas), bem como diminui a fertilidade e eleva o risco de parto espontâneo (BENOWITZ, 2008; BOWMAN et al., 2007; BURNS, 2001; CATANZARO et al., 2007; ELIASSON, 2003; GLEERUP &

WINTHER, 1996; HALPERIN et al., 2008; STEPTOE & USSHER, 2006; YILDIZ, 2004).

Esses danos à saúde devem-se, em parte, às mais de 4.700 substâncias presentes na fumaça do cigarro (GENBACEV-KRTOLICA, 2005; RAHMAN et al., 1996), as quais incluem numerosas substâncias reativas, como aldeídos (PARK et al., 1998), EROs e de nitrogênio (PRYOR & STONE, 1993) e diversos metais (WHO, 1992).

3.1.2 Fumo Passivo

Fumantes passivos estão expostos a fumaça ambiental do tabaco, a qual é definida como a soma da fumaça emitida da queima da ponta do cigarro (fumaça secundária) ou de outros produtos do tabaco com o ar ambiente, usualmente em combinação com a fumaça principal (exalada pelo fumante) (WHO, 2002b). Apesar de semelhante à fumaça principal, a fumaça secundária é três ou quatro vezes mais tóxica por grama de material particulado do que a fumaça principal, e sua toxicidade é maior do que a soma da toxicidade de seus constituintes (SCHICK & GLANTZ, 2005). Na verdade, a fumaça secundária tem maior concentração de alguns componentes tóxicos (por exemplo, monóxido de carbono, benzeno, amônia e muitas substâncias carcinogênicas) do que a fumaça principal (AMBROSE & BARUA, 2004; BROWNSON et al., 1997; PHILLIPS et al., 2003), além de apresentar duas vezes mais nicotina (BROWNSON et al., 1997). Como a fumaça é diluída no ar ambiente, fumantes passivos estão expostos a menos fumaça do cigarro do que os fumantes ativos; entretanto, tanto a fumaça principal quanto a secundária possui comparável capacidade carcinogênica e de risco cardiovascular (SWAN & LESSOV-SCHLAGGAR, 2007). Além disso, investigações epidemiológicas têm claramente demonstrado que o fumo passivo pode ser tão perigoso para a saúde quanto o fumo ativo (BARNOYA & GLANTZ, 2005; BROWNSON et al., 1997; SUBRAMANIAN & GOVINDAN, 2007; SWAN & LESSOV-SCHLAGGAR, 2007; VENN & BRITTON, 2007).

A fumaça do cigarro está presente virtualmente em todos os lugares onde fumar é permitido (NAVAS-ACIEN, 2004), e não existem níveis seguros de

exposição (HYLAND et al., 2008). Logo, globalmente, estima-se que um terço da população de adultos está regularmente exposta à fumaça do cigarro (ÖBERG et al., 2010). Muitos estudos mostram que não fumantes estão mais expostos ao fumo passivo no ambiente de trabalho do que de casa (JAMROZIK, 2005; KAUPPINEN & VIRTANEN, 2002). Em Barcelona (Espanha) a prevalência de fumantes passivos em casa e no trabalho em 2002 foi de 61,1% entre homens e 59,4% entre mulheres (NEBOT et al., 2004); entretanto contabilizando também a exposição em locais de lazer, esses valores sobem para 69,5% e 62,9%, respectivamente (TWOSE et al., 2004). Na União Européia, 14% dos não fumantes estão expostos à fumaça do cigarro em seus locais de trabalho (EUROPEAN COMMISSION, 2009). No Canadá, cerca de um quarto dos não fumantes alegam que estão regularmente expostos à fumaça do cigarro em casa (WHO, 2009). No Brasil, a cada 1.000 mortes ocorridas em áreas urbanas por ano, 25 são devido ao tabagismo passivo em domicílio (COSTA et al., 2003), e são escassos os dados epidemiológicos.

Quanto aos danos à saúde, um estudo alarmante mostrou que a exposição ao fumo passivo causou a morte de aproximadamente 603.000 pessoas mundialmente em 2004, as quais representam 1% da mortalidade mundial (ÖBERG et al., 2010). Nos Estados Unidos, cerca de 50.000 mortes por ano – ou 11% de todas as mortes relacionadas ao cigarro – são atribuídas ao fumo passivo (CDC, 2008). Cerca de 2.655 mortes por câncer de pulmão, doenças isquêmicas do coração e doenças cérebro-vasculares ocorridas somente na população urbana do Brasil poderiam ser evitadas a cada ano pela prevenção do fumo passivo (COSTA et al., 2003).

Fumantes passivos sofrem com os efeitos imediatos da poluição tabagística ambiental, tais como, irritação nos olhos, manifestações nasais, tosse, cefaléia, aumento de problemas alérgicos, principalmente das vias respiratórias e aumento dos problemas cardíacos, principalmente elevação da pressão arterial e angina. Em adição, a exposição ao fumo passivo é associado a elevado risco de doenças cardiovasculares (eleva o risco em 30%) (BARNOYA & GLANTZ, 2005), câncer de pulmão (US DHHS, 2006), infarto agudo do miocárdio (BARONE-ADESI et al., 2006; BARTECCHI et al., 2006; JUSTER et al., 2007; KHUDER et al., 2007; SARGENT et al., 2004), asma e sintomas respiratórios crônicos (CDC, 2003). Na verdade, o fumo passivo causa 379 mil mortes por doenças cardíacas, 165 mil por infecções respiratórias, 36,9 mil de asma e 21,4 mil de câncer de pulmão por ano (ÖBERG et

al., 2010). Essas doenças e mortes confirmam o perigo de ambientes contaminados pela fumaça de cigarro, os quais devem ser evitados.

Além dos riscos à saúde, o fumo passivo representa onerosos custos para os governos. Estima-se que 10% dos gastos relacionados aos problemas de saúde de fumantes são atribuídos aos problemas de saúde de fumantes passivos (ADAMS et al., 1999). Ademais, o fumo passivo nos Estados Unidos sozinho custa aproximadamente 5 bilhões de dólares em cuidados médicos e outros 5 bilhões em perda de produtividade pelas faltas ao trabalho e mortes prematuras por ano (BEHAN et al., 2005).

Para reduzir o contato de não fumantes com a fumaça do cigarro foram criadas campanhas anti-tabagistas. A Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco foi o primeiro tratado internacional de saúde pública firmado entre 192 países, com a coordenação da Organização Mundial de Saúde (OMS), que tem como objetivo proteger as gerações presentes e futuras das terríveis conseqüências sanitárias, sociais, ambientais e econômicas geradas pelo consumo e pela exposição à fumaça do tabaco. Entretanto, isso apenas mostra que muito mais ainda precisa ser feito, visto que apenas 9% dos países adotaram leis anti-tabagistas em bares e restaurantes e 65 países ainda não apresentam nenhum tipo de política para reduzir a exposição de não fumantes ao fumo passivo (WHO, 2009).

3.1.3 Dependência

As propriedades aditivas do tabaco são exemplificadas pela grande dificuldade dos fumantes em parar de fumar. Inquéritos epidemiológicos indicam que a maioria (70%) dos tabagistas quer parar de fumar, 34% tentam a cada ano, mas somente 2,5% o conseguem; 75% a 80% recaem nos primeiros seis meses e, após um ano no máximo 3% a 5% se mantêm sem fumar (CDC, 2000). A principal substância aditiva do cigarro é a nicotina, cujos efeitos farmacológicos e comportamentais são semelhantes a drogas com elevado poder de adição, como a heroína e a cocaína (US DHHS, 1988).

Quimicamente a nicotina é uma base fraca contendo uma piridina e um anel pirrolidina, cada um com uma amina terciária. Após absorvida, atravessa facilmente

a barreira hematoencefálica por difusão passiva e, eventualmente, por transportador (o exato mecanismo permanece incerto) (LOCKMAN et al., 2005; WANG et al., 2005). No cérebro, o tempo que decorre para que 50% do pico de nicotina seja atingido é de 10 minutos, entretanto, já altas concentrações cerebrais são atingidas entre 10-20s após um *puff*, mais rapidamente até que a administração intravenosa (HUKKANEN et al., 2005). A nicotina exerce sua ação farmacológica ligando-se a receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR). Cerca de 70-80% da nicotina é metabolizada a cotinina e eliminada na urina (HUKKANEN et al., 2005; O'LEARY et al., 2008; YILDIZ, 2004).

Dependendo da concentração, duração e frequência da exposição, fumantes passivos também podem desenvolver dependência (JAAKKOLA & JAAKKOLA, 1997). Isso seria resultado de repetidas exposições à fumaça do cigarro, com elevação das concentrações sanguíneas de nicotina (PACIFICI et al., 1995) e desenvolvimento de tolerância aos efeitos aversivos do cigarro, o que elevaria os efeitos positivos associados ao subsequente uso da droga (SOLOMON & CORBIT, 1973).

Diversos estudos sugerem, entretanto, que o hábito de fumar é reforçado não apenas pela nicotina, mas também por outras substâncias químicas e fatores comportamentais, ambientais e pré-disposição genética (CAGGIULA et al., 2001; LASSER et al., 2000; LI, 2003), sendo a exposição à nicotina através dos produtos do tabaco uma condição necessária para a dependência, entretanto não única. Por exemplo: 1) cigarros isentos de nicotina têm mostrado reduzir a fissura por cigarro e alguns sintomas de abstinência durante a cessação e são comparados com cigarros com nicotina em termos de recompensa (DAR & FRENK, 2004; ROSE, 2006; HENNINGFIELD et al., 2005); 2) injeções intravenosas *in bolus* de nicotina resultam em baixa sensibilidade à recompensa; 3) a nicotina tem mostrado apenas limitada habilidade em induzir auto-administração em animais no teste de preferência condicionada, sugerindo que a nicotina sozinha apresenta moderadas ações de reforço; 4) a terapia com reposição de nicotina tem eficácia limitada como tratamento do tabagismo (DAR & FRENK, 2004; HENNINGFIELD et al., 2005; LE FOLL & GOLDBERG, 2005; ROSE, 2006; SAMAHA et al., 2005; SAMAHA & ROBINSON, 2005; TALHOUT et al., 2007). Como exemplo de outras substâncias presentes no cigarro capazes de causar adição tem-se inibidores da monoaminoxidase (MAO) (BELLUZZI et al., 2005; DWOSKIN et al., 1999; GUILLEM et al., 2005), como o

acetaldeído (TALHOUT et al., 2007), e a nornicotina, um alcolóide constituinte do tabaco e um dos metabólitos ativos da nicotina (JACOB et al., 1999). Em adição, a nicotina quando administrada via intraperitoneal, intravenosa ou sub-cutânea não mimetiza a ação da nicotina quando inalada juntamente com a fumaça de cigarro, como ocorre com fumantes ativos e passivos (HARRIS et al., 2010). Finalmente, os estudos com nicotina não mimetizam com precisão as condições às quais o fumante está inserido e tornam difícil o entendimento da farmacologia da fumaça do cigarro (LERMAN et al., 2007). Logo, uma das melhores formas de estudar as ações do cigarro em animais experimentais ou humanos é pela exposição à fumaça do cigarro e não pela administração de nicotina.

Em termos gerais, os fumantes relatam prazer, excitação, relaxamento, aumento da atenção e redução do tempo para realizar uma tarefa após fumar (PICCIOTTO, 1998; STOLERMAN & SHOAIB, 1991), além de diminuição da ansiedade e apetite (PICCIOTTO, 2003). Estes sintomas estão relacionados ao poder reforçador positivo do cigarro, que decorre da ativação do sistema dopaminérgico meso-corticolímbico. Ademais, a sensibilização comportamental ao cigarro é resultado de alterações moleculares desse sistema, que são induzidas pela exposição prolongada às drogas (ROBINSON & BERIDGE, 1993; WISE & BOZARTH, 1987). Além disso, o cigarro gera efeitos reforçadores negativos no desuso, como qualquer outra droga capaz de causar dependência, os quais constituem a síndrome de abstinência, caracterizados por irritação, ansiedade, dificuldade de concentração, fissura e ganho de peso (HUGHES et al., 1990; HUGHES et al., 1991; HUGHES & HATSUKAMI, 1986).

A ansiedade representa um dos principais motivos que levam fumantes ao ato de fumar (GILBERT et al., 1989; MANHÃES et al., 2008; PICCIOTTO et al., 2002; POMERLEAU, 1986) e um fator crítico para o uso de cigarro devido a sua motivação para que se continue o consumo (GILBERT et al., 1989; PICCIOTTO et al., 2002; POMERLEAU, 1986). Estudos têm mostrado que fumantes apresentam redução da ansiedade durante o uso (GILBERT et al., 1989; PICCIOTTO et al., 2002; POMERLEAU, 1986) e aumento da ansiedade durante a retirada do cigarro (HUGHES et al., 2000; PARROTT, 2003). Além disso, uma associação entre aumento da ansiedade durante a abstinência e recaídas durante tratamentos tem sido bem discutida (ASTON-JONES & HARRIS, 2004; DUDAS et al., 2005; KENFORD, 2002). Esses resultados sugerem que fumantes continuam fumando

para regular seu estado de ansiedade e que o nível de ansiedade durante a abstinência constitui um parâmetro comportamental importante para que se entenda as características fisiológicas de subpopulações de indivíduos que são diferentemente afetados pela exposição à nicotina (MANHÃES et al., 2008). Logo compostos ansiolíticos podem ser utilizados nas terapias farmacológicas para parar de fumar.

A maioria dos tratamentos do tabagismo busca o controle dos sintomas reforçadores negativos do cigarro. Genericamente, há dois tipos de terapias farmacológicas para tratamento do tabagismo: tratamento de reposição de nicotina (TRN) e medicações sem nicotina, como bupropiona. A TRN é realizada com medicamentos que apresentam nicotina na composição. Comercialmente, existem gomas de mascar, pastilhas mastigáveis, adesivos, *spray* nasal e inaladores com adição de nicotina, os quais são utilizados na TRN. Já a bupropiona, originalmente usada como antidepressivo, constitui-se no medicamento psicoativo extensamente testado e validado pelo FDA (Food and Drug Administration) (HURT et al., 1997; JORENBY et al., 1999). Entretanto, devido aos efeitos colaterais (insônia, agitação, xerostomia), cerca de 38% dos tratamentos com bupropiona são suspensos (KOLBER et al., 2003). Outros tratamentos podem ser realizados com ribonabanto (antagonista de receptores endocanabinóides CB-1), vareniclina (agonista parcial dos receptores nicotínicos de acetilcolina $\alpha 4\beta 2$), ansiolíticos e antidepressivos, assim como de maneira não farmacológica. Diversos estudos evidenciam que o uso de medicações pode duplicar ou até triplicar o resultado do tratamento para cessação do tabagismo, em comparação com placebo (FIORE et al., 2000; SILAGY et al., 2004). Entretanto, como muitos fumantes são resistentes aos tratamentos existentes, a necessidade de novos compostos capazes de reduzir os sinais e sintomas da síndrome de abstinência ao cigarro torna-se necessário (GARWOOD & POTTS, 2007).

Em animais, modelos são propostos para estudar a síndrome de abstinência ao cigarro, o que facilita a investigação dos mecanismos neurais relacionados a esse fenômeno. Entretanto, apesar de diversos trabalhos com exposição de animais experimentais à fumaça do cigarro (ANBARASI et al., 2005, 2006; BEZERRA et al., 2006; DIKEN et al., 2001; KOUL et al., 2001; LANZETTI et al., 2008; LUCHESE et al., 2009a, b; VALENCA et al., 2008), poucos são os que avaliam o comportamento dos animais durante abstinência. Além disso, dentre os trabalhos que visam avaliar

parâmetros comportamentais de abstinência ao cigarro em animais, a maioria o faz pela administração de nicotina, o que não mimetiza as condições às quais o fumante está inserido (conforme discutido anteriormente). Nesses trabalhos, os sinais de abstinência à nicotina são avaliados após interrompidas as administrações de nicotina ou após a administração de antagonistas de receptores nicotínicos, como mecamilamina e hexametônio (MALIN, 2001), e incluem ranger dos dentes, contorções abdominais, fasciculações faciais, ptose, respiração ofegante e bocejos (MALIN, 2001; KENNY & MARKOU, 2001), assim como tremor facial e corporal, piloereção, comportamento agressivo e diarreia (GELLERT & HOLTZMAN, 1978). A depressão está muito relacionada à síndrome de abstinência, bem como a ansiedade (BOCK et al., 1996; O'BRIEN, 2001). Isola et al. (1999) mostram que os sinais de abstinência à nicotina de camundongos tratados com nicotina (2mg/Kg, sc, 4 vezes por dia, durante 14 dias) começam a se manifestarem após 4 horas da última administração de nicotina e são mais pronunciados entre 12 e 48 horas.

3.1.4 Estresse Oxidativo

O mecanismo preciso dos efeitos danosos do cigarro sobre o organismo ainda não está completamente esclarecido. A constante exposição dos fumantes ao estresse oxidativo (EO) provavelmente seja o maior desencadeante de desordens e doenças relacionadas ao mesmo (BRIVIBA & SLES, 1994; CROSS & TRADER, 1997).

EO é definido como um desequilíbrio no balanço entre os pró-oxidantes e os antioxidantes do organismo com potencialidade de exercer efeitos deletérios (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O EO pode se manifestar: 1) pelo aumento das EROs sem a diminuição das defesas antioxidantes; 2) pela redução das defesas antioxidantes sem aumento das EROs ou; 3) pelo aumento da concentração de EROs juntamente a uma paralela redução das defesas antioxidantes (AMSTAD & CERUTTI, 1990; SIES, 1986). Como resultado, o EO pode causar oxidação de lipídeos, proteínas e DNA, o que leva a prejuízos na função celular (HELEN et al., 2000; SIES, 1997).

Os radicais livres (RL) são espécies químicas altamente reativas que contêm um ou mais elétrons não-pareados em sua órbita de valência (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). São produzidos naturalmente em nosso organismo através de processos metabólicos oxidativos e durante a ativação do sistema imune, desintoxicação de drogas, ou produção de óxido nítrico (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). As EROs representam uma das principais classes de RL que compreendem o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil (OH^{\bullet}) e o oxigênio singlete, todos com elevada reatividade também.

Para manter baixas as concentrações de RL, o organismo apresenta mecanismos de defesa antioxidante, os quais atuam prevenindo a formação dessas espécies ou capturando-as quando são formadas. Esses mecanismos de defesa podem ser divididos em enzimático e não enzimático. Dentre os antioxidantes enzimáticos encontram-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR). A SOD converte radicais superóxido a peróxido de hidrogênio. A GPx, juntamente com a CAT, catalisam a transformação de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (LOHR et al., 2003). A CAT metaboliza o peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água; já a GPx catalisa o metabolismo de diversos hidroperóxidos orgânicos, e também converte o peróxido de hidrogênio a água pela oxidação concomitante da GSH à sua forma oxidada GSSG (Figura 1).

O sistema de defesa antioxidante não enzimático, por sua vez, inclui compostos sintetizados no organismo como bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico ou ainda substâncias que podem ser provenientes da dieta (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). Esses componentes podem ainda ser classificados em lipossolúveis (por exemplo, α -tocoferol e carotenóides) ou hidrossolúveis (por exemplo, compostos fenólicos, ácido ascórbico e a GSH).

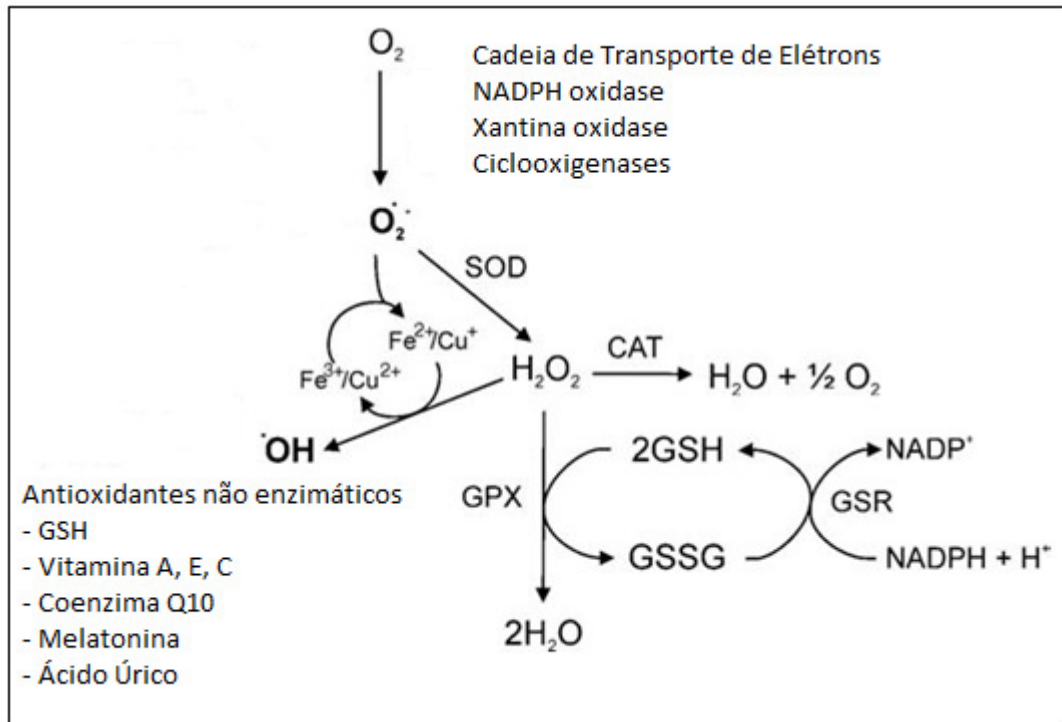


Figura 1. Via de formação de espécies pró-oxidantes e vias de detoxificação pelo sistema de defesa antioxidante. Abreviações: CAT: catalase; GPX: glutathiona peroxidase; GSSG/GSH: glutathiona oxidada / reduzida; GSR: glutathiona redutase; NADP $^+$ /NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada / reduzida; SOD: superóxido dismutase. (Adaptado de Hovatta et al., 2010).

O cigarro causa EO por dois mecanismos: 1) eleva as concentrações de RL e 2) reduz as defesas antioxidantes do organismo. Ao todo, a fumaça do cigarro contém mais de 4.700 substâncias identificadas, sendo que muitas das quais são RL (RANGASAMY et al., 2004; SMITH & HANSCH, 2000). Na verdade, cada *puff* de cigarro contém aproximadamente 10^{15} RL, incluindo ânion superóxido e óxido nítrico, que podem reagir e formar peroxinitrito, uma das formas mais reativas de RL (PRYOR & STONE, 1993; RAHMAN & MAC NEE, 1996).

A intensidade dos danos oxidativos causados em lipídeos (ou peroxidação lipídica) pode ser avaliada de acordo com os níveis dos produtos primários ou ainda com os produtos finais da peroxidação, como por exemplo, o malondialdeído (MDA) que é ensaiado com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e expresso em substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; RICE-EVANS et al., 1991). Assim, a reação do MDA com o TBA é um dos marcadores de EO mais utilizados (LIU et al., 1997). Diversos trabalhos mostram aumento dos níveis de TBARS e MDA em humanos e em animais de laboratório expostos à fumaça do

cigarro em relação a controles (BEZERRA et al., 2006; BLOOMER, 2007; DIKEN et al., 2001; KOUL et al., 2001; LANZETTI et al., 2008; LUCHESE et al., 2009b; SOLAK et al., 2005; VALENCA et al., 2008).

Quanto aos níveis de antioxidantes, sabe-se que os fumantes apresentam redução dos níveis de ácido ascórbico, α e β -caroteno, criptoxantina e folato (ALBERG, 2002; FARUQUE et al., 1995; HERBETH et al., 1989; HORN et al., 2008; MCPHILLIPS et al., 1994; ORTEGA et al., 1994; SUBAR et al., 1990), por exemplo. De forma semelhante, fumantes passivos apresentam redução das concentrações circulantes de ácido ascórbico (15%) (FARCHI et al., 2001; JENDRYCZKO et al., 1993; STRAUSS, 2001; TRIBBLE et al., 1993), α -caroteno (ALBERG et al., 2000; FARCHI et al., 2001), β -caroteno (ALBERG et al., 2000; FARCHI et al., 2001), criptoxantina (ALBERG et al., 2000), α e σ -tocoferol, luteína, zeaxantina e licopeno (ALBERG et al., 2000; FARCHI et al., 2001; SOBCZAK, 2004).

Fumantes deveriam ingerir maior quantidade de antioxidantes do que não fumantes para neutralizar os RL do cigarro, entretanto isso não é observado. Estudos epidemiológicos mostram que fumantes ingerem menos frutas e vegetais que não-fumantes (DALLONGEVILLE et al., 1998; JARVINEN et al., 1994; MA et al., 2000; PHILLIPS et al., 2000; WEI et al., 2001), e que fumantes passivos ingerem esses alimentos em quantidade intermediária entre fumantes e não fumantes (OSLER, 1998). Por outro lado, Dietrich et al. (2003) mostram que mesmo que fumantes ingiram a mesma quantidade de antioxidantes do que não fumantes, eles permanecem com níveis plasmáticos reduzidos de antioxidantes, e que fumantes passivos apresentam concentrações intermediárias entre fumantes e não fumantes. Adicionalmente, Bloomer (2007) mostra que fumantes jovens, que fumam há em média 6 anos e que tem uma ingestão dietética semelhante a de não fumantes, mostram menor capacidade antioxidante plasmática do que não fumantes. Com base nos trabalhos de Dietrich et al. (2003) e Bloomer (2007), o consumo de antioxidantes não deve ser desmotivado, uma vez que esses compostos atuam neutralizando RL e buscando evitar o desenvolvimento de EO.

Está bem documentado que a ingestão de antioxidantes exógenos através de alimentos ou suplementos alimentares pode influenciar tanto a capacidade antioxidante (CAO et al., 1998) como biomarcadores de EO (TESORIERE et al., 2004). Logo, quando os níveis normais de antioxidantes do organismo são

insuficientes para neutralizar o excesso de RL provenientes da fumaça de cigarro, a administração ou suplementação de antioxidantes exógenos pode exercer efeito benéfico evidente (REKHA et al., 2001), conforme relatado em diversos estudos (ANBARASI et al., 2005; BALAKRISHNAN & MENON, 2007; BEZERRA et al., 2006; EL-SOKKARY et al., 2007; LANZETTI et al., 2008; LUCHESE et al., 2009a,b). Como exemplo, Anbarasi et al. (2006) ao utilizar bacoside A, uma saponina isolada da planta *Bacopa monniera*, observou que os cérebros do grupo de ratos expostos à fumaça do cigarro e suplementados com a mesma apresentaram melhora nos níveis de Vitamina C (ácido ascórbico), E e A, GSH, e da atividade das enzimas SOD, CAT, GPx e GR em relação ao grupo apenas exposto à fumaça do cigarro, demonstrando um efeito antioxidante neuroprotetor da saponina.

3.2 *Carya illinoensis*

Nas regiões sul e sudeste do Brasil, encontram-se extensas plantações da noqueira-pecã (*Carya illinoensis*), que pertence à família Juglandaceae (JOLY, 1993). A mesma é nativa do sul dos Estados Unidos e norte do México, teve sua distribuição expandida até a América do Sul (HANCOCK, 1997) e foi introduzida no Brasil pelos imigrantes norte-americanos (JOLY, 1993). Essa árvore apresenta folhas caducas e pode atingir grande porte, superando 40 m de altura (HANCOCK, 1997). Seu produto de elevado interesse comercial e nutricional é a noz pecã, a qual apresenta proteínas, ácidos graxos monoinsaturados, fibras, esteróis e micronutrientes como tocoferol, o que estimula seu consumo (RAJARAM et al., 2001). Wu et al. (2004) analisaram diversos alimentos e vegetais comuns nos Estados Unidos e mostraram que a noz pecã apresenta a maior capacidade antioxidante e conteúdo fenólico dentro do grupo das nozes, ingressando entre alimentos com maior conteúdo fenólico. Os polifenóis são bem reconhecidos pelas suas propriedades antioxidantes decorrentes do mecanismo de redução da geração de ânion superóxido (ROBAK & GRYGLEWSKI, 1988), radicais hidroxil (HUSAIN et al., 1987) e peroxil (TOREL et al., 1986). Além disso, a noz pecã é rica em ácido gálico, substância que apresenta efeitos terapêuticos promissores (LU et al., 2006), principalmente por sua atividade como *scavenger* de RL (SAWA et al., 1999).

Proantocianidinas e taninos condensados também estão relatados na noz pecã (POLLES et al., 1981). Esses compostos apresentam atividades biológicas devido as suas propriedades antioxidantes e antimutagênicas (GRIMMER et al., 1992). De acordo com Polles et al. (1981), a concentração de taninos em pecãs está na faixa de 0,699 a 1,71%.

Devido ao elevado poder antioxidante, a noz pecã pode auxiliar no combate a danos oxidativos, o que reduz o risco de doenças crônicas (KRIS-ETHERTON et al., 2001). Além disso, estudos epidemiológicos e clínicos demonstram que as nozes, incluindo a pecã, reduzem os níveis de colesterol sanguíneo, diminuindo assim a incidência de doenças cardiovasculares; ainda, que esses efeitos se devem ao menos em parte pela proteção antioxidante fornecida (TORABIAN et al., 2009).

O processamento industrial da noz pecã gera um subproduto ainda sem destino, mas com usos promissores. Esse subproduto é a casca da noz pecã, a qual representa de 40 a 50% do tamanho da castanha (WORLEY, 1994). Popularmente essa casca é utilizada na forma de chá no tratamento de diversos distúrbios orgânicos, como tumor de mama, estômago, pulmões, ovários e útero, para reduzir os níveis de colesterol sanguíneo, dissolver coágulos de sangue e placas de gordura (prevenindo trombose) e reduzir a pressão arterial. Também apresenta benefícios no tratamento da insônia, em problemas respiratórios como bronquite asmática e sinusite, na doença de Chagas, em dores na coluna e articulações e no reumatismo, no alívio da enxaqueca e de problemas gastro-intestinais e ginecológicos, nas alergias, na cicatrização de feridas, varicoses e flebites, assim como auxiliar em situações de envenenamento por pesticidas, intoxicação por medicamentos e por nicotina, o principal constituinte aditivo do cigarro. Além disso, exerce efeito benéfico nas doenças mentais, nos problemas neurológicos como disritmia e epilepsias e em doenças degenerativas como Doença de Parkinson. No entanto, esses dados são baseados no conhecimento empírico, não havendo ainda estudos documentados que comprovam esses usos populares.

Um estudo recente demonstrou que a casca da noz pecã pode constituir uma rica fonte alternativa de antioxidantes, devido a sua grande quantidade de compostos fenólicos totais e taninos condensados, quantidade superior a da própria noz pecã (VILLAREALL-LOZOYA, 2007). Além disso, Vaggetti et al. (2009) demonstraram que a casca da noz pecã é capaz de remover cobre, manganês e chumbo de soluções aquosas de maneira mais eficiente do que o carvão ativado.

Essa ação biosorvente da casca de pecã pode estar relacionada ao seu poder detoxificante ainda sem comprovação. Recentemente, demonstrou-se o efeito protetor do EAB da casca de pecã frente toxicidade induzida por ciclofosfamida em fígado, rim, coração, bexiga, plasma e eritrócitos de ratos. Nesse último trabalho, o EAB da casca de pecã preveniu danos oxidativos e alterações em antioxidantes endógenos (como GSH, CAT e ácido ascórbico) induzidos pelo quimioterápico, mostrando seu elevado poder antioxidante (BENVEGNÚ et al., 2010).

Considerando que 1) o EO relacionado ao cigarro já se mostrou atenuado pela ação de antioxidantes, 2) a casca da noz pecã representa uma rica fonte de antioxidantes e 3) a casca de pecã é utilizada popularmente no tratamento de intoxicações por nicotina, emerge a necessidade de se estudar a ação do EAB da casca da noz pecã frente aos efeitos danosos do cigarro em modelo animal experimental. Ademais os tratamentos existentes para o tabagismo são demasiadamente caros e a casca de pecã é uma substância natural, de fácil acesso e baixo custo.

4 RESULTADOS

Os resultados inseridos nesta dissertação apresentam-se sob a forma de manuscrito científico, o qual se encontra aqui estruturado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito está disposto nos formatos em que foi submetido.

4.1 Manuscrito:

Estresse oxidativo e sintomas de ansiedade relacionados à abstinência ao fumo passivo em camundongos: efeitos benéficos do extrato das cascas da noz pecã, um subproduto da indústria de nozes

Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry

P. Reckziegel, N. Bouffleur, R.C.S. Barcelos, D.M.Benvegnú, C.S.Pase, L.G.Muller, A.M. Teixeira, R. Zanella, A.C.P. Prado, R. Fett, J. M. Block, M.E. Burger

Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry

P. Reckziegel^a, N. Boufleur^a, R.C.S. Barcelos^a, D.M.Benvegnú^a, C.S.Pase^b, L.G.Muller^b, A.M. Teixeira^a, R. Zanella^c, A.C.P. Prado^d, R. Fett^d, J. M. Block^d, M.E. Burger^{*a}

^aPrograma de Pós Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)- RS, Brazil.

^bDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, UFSM.

^cDepartamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas (Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas-LARP); UFSM.

^dDepartamento de Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil.

Corresponding author:

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Tel. +55-55-3220-8676

E-mail: mariliseeb@yahoo.com.br

ABSTRACT

The present study evaluated the role of pecan nut (*Carya illinoensis*) shells aqueous extract (AE) against oxidative damage induced by cigarette smoke exposure (CSE) and behavioral parameters of smoking withdrawal. Mice were passively exposed to cigarette smoke for three weeks (6, 10 and 14 cigarettes/day, respectively) and orally treated with AE (25g/L). CSE induced lipid peroxidation in brain and red blood cells (RBC), increased catalase (CAT) activity in RBC, and decreased plasma ascorbic acid levels. AE prevented oxidative damage and increased antioxidant defenses of mice exposed to cigarette smoke. In addition, AE reduced the locomotor activity and anxiety symptoms induced by smoking withdrawal, and these behavioral parameters showed a positive correlation with RBC lipid peroxidation. Our results showed the beneficial effects of this by-product of the pecan industry, indicating its usefulness in smoking cessation.

Keywords: Antioxidant, *Carya illinoensis*, cigarette smoke, oxidative stress, pecan nut shells, smoking withdrawal

1. Introduction

Cigarette smoking is a worldwide health problem implicated as a major risk factor in the development of pulmonary, cardio and cerebrovascular diseases, as well as lung cancer (US DHHS, 1989). Cigarette smoke is composed of a complex mixture of over 4,700 identified constituents (Rahman et al., 1996; Genbacev-Krtolica, 2005), including numerous reactive substances such as a large quantity of reactive aldehydes (Park et al., 1998), free radical (FR) species (Pryor and Stone, 1993), and different metals (WHO, 1992a).

Smokers have reported pleasure, arousal, relaxation, improved attention, and reduction time while performing a task (Stolerman and Shoaib, 1991; Picciotto, 1998), as well as a decrease of anxiety and appetite when smoking (Picciotto, 2003). However, cessation of chronic use of tobacco results in an abstinence syndrome characterized by anxiety, irritability, difficulty in concentrating, restlessness, tobacco craving and weight gain (Hughes and Hatsukami, 1986; Hughes et al., 1991). These symptoms are due to the absence of nicotine, which is the major addictive ingredient of tobacco. Eighty percent of smokers who attempt to quit smoking on their own relapse within the first month of abstinence, and only approximately 3% remain abstinent after six months (CDC, 2002).

The adverse effects of cigarette smoking are not limited to the direct exposure during active smoking (US Environmental Protection Agency, 1992; California Environmental Protection Agency, 1997; Hackshaw et al., 1997; Davis, 1998). A recent and alarming study showed that exposure to passive smoke may have caused about 603,000 deaths worldwide in 2004, which was about 1.0% of worldwide mortality, involving children, male non-smokers and female non-smokers (Öberg et al., 2010). In fact, passive smoke exposure is associated with a high risk of coronary heart disease, lung cancer (US DHHS, 2006), acute myocardial infarction (Sargent et al., 2004; Barone-Adesi et al., 2006; Bartecchi et al., 2006; Juster et al., 2007; Khuder et al., 2007), asthma, and chronic respiratory symptoms, leading many nonsmokers to death each year (CDC, 2003). These disorders confirm the harmfulness of environments polluted by cigarette smoke, which should be avoided.

It has been estimated that cigarette smoke contains approximately 10^{15} radicals per gram in the volatile fraction (Pryor and Stone, 1993; Pryor et al., 1998). This subject is highly important because the precise mechanisms underlying the

harmful effects of smoking on biological systems are not completely understood, and the unbalance between oxidants and antioxidants results in oxidative stress (OS), which is involved in the pathogenesis of smoke-related disorders (Briviba and Sies, 1994) as well as neurodegenerative diseases (Offen et al., 1999; Andreassen and Jorgensen, 2000; Gilgun-Sherki et al., 2001).

Concerning OS related to active or passive smoking, a recent study suggested a relationship between OS and anxiety (Bouayed et al., 2007), supporting previous reports that showed a close relation between brain OS markers and anxiety-related phenotypes in six inbred mouse strains (Hovatta et al., 2005). More recently, this hypothesis was confirmed in an animal study showing a link between anxiety levels and oxidative status in both neuronal and glial cells in different brain regions and peripheral leukocytes (Rammal et al., 2008a). Thus, efforts should be made to find agents that may attenuate OS and anxiety-like symptoms related to smoke withdrawal, as well as their co-morbidity.

The potential damage caused by OS is normally minimized by a combination of biological antioxidant systems (Naik, 2003) including non-enzymatic (ascorbic acid, alpha-tocopherol, and non-protein thiol groups) and enzymatic antioxidant defenses (superoxide dismutase, catalase (CAT), glutathione peroxidase, and glutathione reductase) (Halliwell and Gutteridge, 2000). Several micronutrients, vitamins, and antioxidants of synthetic and natural origin have been experimentally proved as effective agents against smoking-induced OS (Sohn et al., 1993; Dilsiz et al., 1999; Koul et al., 2001; Deniz, 2004; Tiwari, 2004; Anbarasi et al., 2005; Ozkan et al., 2007; Luchese et al., 2009a,b) and studies with the pecan nut shells can be promising (Villarreal-Lozoya et al., 2007; Prado et al., 2009).

The nuts of *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch, Juglandaceae, popularly known as “pecan”, are rich sources of monounsaturated fatty acids, stimulating their consumption (Rajaram et al., 2001). The industrial processing of pecan nuts results in a great amount of shells (40-50%), representing an alternative source of antioxidant compounds (Pecantea, 2010). Studies have shown a marked antioxidant potential of pecan nut shells because they contain higher total phenolics and condensed tannin as compared to kernels (Rajaram et al 2001; Villarreal-Lozoya et al., 2007). Furthermore, their tea has been popularly used as a treatment for nicotine and drug intoxications, as a way to improve lung functions in smokers, and as anti-inflammatory adjuvant (Balmé, 1982; Pecantea, 2010).

Considering the lack of an effective stop smoking therapy and that pecan nut shells are already popularly used and safe, we investigated their protective role against OS induced by cigarette smoke in mice. Behavioral parameters (locomotor activity and anxiety) were also assessed after a smoking withdrawal period.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Forty-two male Swiss mice initially weighting 25.6 ± 0.71 g (mean \pm SEM) were used. The animals were kept in Plexiglas cages with free access to food and water in a room with controlled temperature (23 ± 1 °C) and in 12h–light/dark cycle with lights on at 7:00 a.m. After 1 week of acclimatization, the mice were assigned to the experimental groups. This study was approved by the Animal Ethical Committee (Universidade Federal de Santa Maria- 109/2010), which is affiliated to the Council for Control of Animal Experiments (CONCEA), following international norms of animal care and maintenance.

The number of animals used was the minimum to obtain relevant results and they were maintained and used in accordance with the guidelines of the CONCEA.

2.2. Preparation of pecan nut shells AE

Shells of pecan nut shells were let overnight at 35°C in a heater and then fine powdered. The aqueous extract (AE) was freshly prepared by decoction (25g/L), filtered, and cooled to room temperature. The fresh extract was given daily to the animals always at the same time (5:00 p.m.).

2.3. Characterization of pecan nut shells AE

AE was standardized by the characterization of total phenolic compounds using the colorimetric method (Budini et al., 1980) and condensed tannin content (Villarreal-Lozoya et al., 2007).

Antioxidant capacity of AE was determined by ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)] and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) methods. ABTS method was carried out according to Re et al. (1999) and the results were expressed in μ mol TE (Trolox Equivalent)/g. DPPH method was carried out

according to the method modified by Kim et al. (2002) and the results were expressed in mg TE (Trolox Equivalent)/g after 30min and 24h, respectively.

2.4. Cigarette composition

The brand of cigarette used in this study was manufactured by Souza Cruz Indústria e Comércio Ltda in Santa Cruz do Sul, south Brazil. Cigarette smoke contains nicotine (0.8 mg), tar (10 mg) and carbon monoxide (10 mg), as well as thousands of different chemicals such as sugar, paper, plant extracts and flavoring agents. Moreover, ingredients in the 20-cigarette hard pack of the brand include burnt items (e.g. propylene glycol, glycerol, guar gum, side-seam adhesives, etc.) and unburnt items (e.g. filtration materials, filter wraps, filter adhesives, etc.).

2.5. Experimental design

Mice were divided into four experimental groups: control (C) (n=10), smoke (S) (n=10), pecan nut shells aqueous extract (AE) (n=10), and AE plus smoke (AE+S) (n=12). AE and AE+S received the extract *ad libitum* in place of drinking water and as sole source of fluid, while C and S received only tap water (vehicle). After one week of oral treatment, S and AE+S were submitted to cigarette smoke exposure (CSE) for 3 weeks, and maintained with the oral treatment (extract or water) during this time. The system of exposure was simple: Mice were placed in a chamber of smoke exposure (38x27x13 cm) inside an exhaustion chapel. Cigarettes were placed inside the box to burn one at a time, coupled in one side of the box to an air pump to supply oxygen. In this sub-chronic exposure, mice were maintained in the smoke-air condition during the burning of the required cigarettes (six, ten and fourteen cigarettes daily during the first, second and third weeks, respectively), divided in two daily exposures. This apparatus was used as a surrogate of environmental tobacco smoke or passive smoke. The animals of C and AE followed the same treatment, but with no exposure to cigarettes. Exposure conditions were monitored for carbon monoxide (CO) and total suspended particulate matter. CO level was assessed using Dräger-Tubes Carbon Monoxide 5/c (Dräger Safety AG & Co. KGaA, Lübeck, Germany). Total suspended particle matter in the exposure chamber was determined by assessment of samples collected from the chamber onto pre-weighed filters. The results of CO and total suspended particulate matter levels were 130 ppm and 188mg/m³, respectively.

After 3 weeks of CSE, the mice were deprived of this exposure for 15h in order to evaluate the development of abstinence signals, observed through behavioral parameters (Isola et al, 1999). Twenty hours after the last CSE, all the animals were anesthetized with thiopental and euthanized by exsanguination. Blood was collected by cardiac puncture, heparinized, and centrifuged (3,000 rpm; 15 min). Plasma and red blood cells (RBC) were used for biochemical analysis. Total brains were immediately removed and homogenized in 50mM Tris-HCl pH 7.2 (1/10 w/v), centrifuged (5,000rpm; 15min), and the supernatants used for biochemical assays.

2.6. Body weight variation and water/AE consumption

Body weight variation and water/AE consumption were monitored throughout the study period. Body weight values were expressed as % based on the weight recorded on day 1.

2.7. Validity of cigarette smoke exposure (CSE)

To verify the validity of the CSE exposure protocol, hematocrit and total concentration of carbon dioxide (ctCO₂) levels were measured by gas analysis (Roche Omni C gasometer) in arterial blood (Farkas et al., 2006). Hematocrit levels were expressed as the blood volume occupied by RBC (%) and ctCO₂ levels were expressed as mEq/L of blood.

2.8. Behavioral parameters

Open-field task: Fifteen hours after the last CSE, locomotor activity was evaluated in a box subdivided in nine communicating squares (42x42x28cm). Animals were placed individually in the apparatus for 5 min, when the horizontal movements (crossing) were quantified by the number of invaded segments and the vertical movements (rearing) were counted by observers blinded to treatment. At the same time, the number of self-cleaning (grooming) and the number of fecal pellets were also recorded (Montgomery, 1955).

Marble burying test: Immediately after the open-field test, the mice were individually put into a box (60x40x30cm) covered with sawdust and 12 spare beads, where they were allowed to remain for 30 min. After this time, the number of beads hidden was counted (Treit et al., 1981; Broekkamp et al., 1986).

2.9. Biochemical parameters

Lipid peroxidation (LP) of brain tissue and RBC were determined by measuring the accumulation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as described by Ohkawa et al. (1979), and expressed as nmol malondialdehyde (MDA)/g tissue and nmol MDA/mL RBC.

Catalase (CAT) activity was spectrophotometrically quantified by the method of Aebi (1984), which monitors the disappearance of H₂O₂ in the presence of RBC or brain tissue at 240 nm. The enzymatic activity was expressed as mU/mg tissue and mU/ μ L RBC (1 U decomposes 1 μ mol H₂O₂/min at pH 7 at 25°C).

Plasma ascorbic acid (AA) was estimated as described by Galley et al. (1996) with some modifications (Jacques-Silva et al., 2001). This method produces an orange chromogen by the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) at 37°C, measured spectrophotometrically at 520nm. Results were expressed as μ g ascorbic acid/mL plasma.

2.10. Statistical analysis

Data were analyzed by one or two-way ANOVA followed, when appropriate, by Duncan's multiple range test. Pearson's correlation coefficient was calculated between behavioral parameters (locomotor activity, grooming and hidden bead number) and lipid peroxidation (TBARS levels). Data were analyzed using Statistica 11.0 and expressed as means \pm SEM. *P*-values lower than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Extract characterization and *in vitro* antioxidant capacity

Table 1 shows the results for the total phenolic compounds contents (TP), condensed tannins (CT) and antioxidant capacity (AC) of the AE. The AE showed high levels of total phenolic compounds (192.4 mg GAE/g) and presence of condensed tannins (58.43 \pm 2.2 mg catechin equivalent/g).

3.2. Body weight variation and water/AE consumption

Two-way ANOVA revealed a significant main effect of CSE [$F(1,36)=163.43$; $P<0.001$] in body weight. Post hoc test showed that both S and AE+S showed

significant lower body weight than the controls. During the AE oral treatment (previous to CSE), no significant differences in body weight of mice were observed (Table 2).

No significant differences in the water/AE consumption were observed (Table 2).

3.3. Validity of the CSE

One-way ANOVA showed an increase of 10.45% of hematocrit and 58.14% of ctCO₂ levels in the blood of mice exposed to cigarette smoke, when compared to the control group ($P<0.05$ and $P<0.001$, respectively), which confirms the effectiveness of the smoking protocol (Table 3).

3.4. Behavioral parameters

The effects of CSE on behavior are shown in Table 4. Two-way ANOVA of crossing and rearing revealed a significant main effect of CSE [$F(1,36)=26.46$; $P<0.001$ and 16.24 ; $P<0.001$, respectively]. Post-hoc comparisons showed an increase in crossing (59.46%) and rearing (77.16%) in S as compared to control. In fact, the co-treatment with pecan nut shell AE (AE+S) decreased both crossing and rearing number in relation to S.

Two-way ANOVA of grooming and fecal pellets revealed a significant main effect of CSE [$F(1,36)=4.51$; $P<0.005$ and 8.77 ; $P<0.05$, respectively] and a significant CSE x AE interaction [$F(1,36)=11.18$; $P<0.05$ and 16.64 ; $P<0.001$, respectively]. Post-hoc test showed an increase of 389% of grooming in relation to the control group, and co-treatment with the extract reduced it. Smoke exposure increased the number of fecal pellets by 116%, and co-treatment with pecan nut shell AE prevented this smoke effect.

Two-way ANOVA of the marble burying test revealed a significant main effect of CSE and pecan nut shell AE [$F(1,36)=18.84$; $P<0.001$ and 4.64 ; $P<0.05$, respectively]. Univariate ANOVA showed a significant increase of hidden beads in S (157%) as compared to C, while this smoke effect was partially prevented by co-treatment with pecan nut shell AE. In fact, C and AE+S showed the same results in this behavioral parameter.

3.5. Biochemical parameters

Effects of CSE on LP in brain and RBC are shown in Figure 1. Two-way ANOVA in brain TBARS levels revealed a significant main effect of AE and a significant CSE x AE interaction [$F(1,36)=17.83$ and 12.35 ; $P<0.001$, respectively]. Post hoc comparisons showed an increase of 56% of TBARS levels in mice exposed to smoke (S) in relation to the control group. Co-treatment with pecan nut shell AE prevented this smoke-induced effect, showing TBARS levels similar to those of controls (Figure 1A).

Two-way ANOVA of RBC TBARS levels revealed a significant main effect of CSE [$F(1,36)=9.46$; $p<0.05$]. Post hoc comparisons showed an increase of 45% of TBARS levels in RBC in relation to control. Similarly to brain tissue, co-treatment with extract (AE+S) prevented this smoke effect (Figure 1B).

Effects of CSE on CAT activity in brain and RBC are shown in Figure 2. Two-way ANOVA of brain CAT activity revealed a significant main effect of CSE and pecan shell AE [$F(1,36)=12.82$; $P<0.001$ and 8.34 ; $P<0.05$, respectively]. Post hoc comparisons indicated a significant increase in the CAT activity in AE+S group in relation to all groups (Fig. 2A).

Two-way ANOVA of RBC CAT activity revealed a significant main effect of CSE, pecan shell AE, and CSE X AE interaction [$F(1,36)=50.17$; $P<0.001$; 9.83 ; $P<0.05$ and 6.90 ; $P<0.05$, respectively]. Post hoc comparisons showed an increase of CAT activity in S (63%), AE (38%) and AE+S (67%) as compared to control (Fig. 2B). The co-treated group (AE+S) showed higher CAT activity than the AE group.

Effects of CSE on plasma AA determination are shown in Figure 3. Two-way ANOVA of plasma AA revealed a significant main effect of CSE and pecan nut shell AE [$F(1,36)=9.22$; $P<0.05$ and 15.92 ; $P<0.001$, respectively]. Post hoc comparisons indicated a significant decrease in AA levels in S when compared to C (40.6%), and this effect was prevented by co-treatment with AE. The co-treated group (AE+S) showed plasma AA levels similar to control.

Correlation results are shown in Figure 4. Statistical analyses revealed a significant positive correlation between crossing ($r=0.46$, $P<0.05$), rearing ($r=0.54$, $P<0.001$), grooming frequency ($r=0.45$, $P<0.05$), number of hidden beads ($r=0.45$, $P<0.05$) and RBC TBARS levels.

4. Discussion

The present study showed toxic effects induced by passive smoking, which were prevented or attenuated by pecan nut shell AE. The validity of the CSE protocol used here was demonstrated by the increased hematocrit and ctCO₂ levels, which are indirect biochemical markers of CSE (Farkas et al., 2006). The highest hematocrit observed in the animals exposed to cigarette smoke represents a compensatory response for the decreased oxygen-carrying capacity of blood (Eisen and Hammond, 1956; Younoszai et al., 1968).

Body weight gain was lower in animals exposed to cigarette smoke than in control animals, a finding that seems to be in accordance with previous studies (Grunberg et al., 1986; Horn et al., 2008). It is probably a consequence of increased energy expenditure (Hofstetter et al., 1986) and lower calorie intake in smokers, due to the recognized appetite-suppressing action of nicotine (Perkins et al., 1991). Human smokers are characterized by an average body mass index at least 1 kg/m² lower than nonsmokers (Albanes et al., 1987; Bamia, 2004). AE did not affect the body weight of animals *per se* and did not restore it in the animals exposed to cigarette smoke. Literature data reported a relationship between nicotine administration and lower intake of water (Munster and Battig, 1975), but this was not observed in our study, where CSE and AE did not affect fluid consumption. These results are not contradictory, mainly because in our study the animals were exposed to passive cigarette smoke and did not receive an injection of nicotine.

Damages of tobacco use are well known. Its exposure results in approximately 5 million deaths annually worldwide and this is expected to increase to approximately 10 million by 2020 (WHO, 2007). Despite these consequences, people continue to smoke cigarettes mainly because of nicotine, a highly addictive drug that plays a major role in reinforcing the maintenance of tobacco use (US DHHS, 1988; Grenhoff and Svensson, 1989; Henningfield and Benowitz, 1995; Grunberg et al., 2000; Koob and Le Moal, 2008). Furthermore, cessation of cigarette smoking results in nicotine withdrawal symptoms such as dysphoric mood, anxiety, anger, difficulty in concentrating, sleep disturbance, and weight gain (WHO, 1992b; American Psychiatric Association, 2000; Hughes, 2007). In this context, anxiety is considered a risk factor for continued drug-use (Pomerleau, 1986; Gilbert et al., 1989; Picciotto et al., 2002). Manhães et al. (2008) provided experimental evidence that anxiety-like

behavior during nicotine withdrawal is associated with subsequent nicotine self-administration.

In our study mice showed anxiety-like signs, which were observed 15 h after withdrawal of CSE. We thus hypothesized that these anxiety-like behaviors are compatible with nicotine abstinence signs. They occur because repeated exposure to nicotine leads to hyperactive behavior, which is reflected by increased locomotor activity (Walter and Kuschinsky, 1989; Benwell and Balfour, 1992; Kim and Kim, 1999). Furthermore, according to László et al. (2009), hyperactive behavior is closely related to anxiety development, something that was also observed in our study, when animals previously exposed to smoke increased their grooming behavior and number of fecal pellets in the open-field test, as well as the number of hidden beads in the marble burying test, a test that evaluates the anxiety of animals (Treit et al., 1981; Broekkamp et al., 1986). Co-treatment with pecan nut shell AE prevented these anxiety signs observed during smoking withdrawal in mice exposed to cigarette smoke. These results show that pecan nut shells reduced the signs of cigarette withdrawal, showing that it can be important in therapies to quit smoking.

Cigarette smoke contains many different chemicals that are oxidants and pro-oxidants (WHO, 1992a), and most of them are generated during the combustion process (Burns, 1991). These smoke chemicals are inhaled and can penetrate the mucosal linings reaching the circulation, depositing and enhancing OS in vulnerable tissues (WHO, 1992a; Pryor and Stone, 1993; Bernhard and Wick, 2006). The brain is extremely vulnerable to OS in part because it is highly enriched with non-heme iron, which is catalytically involved in the production of reactive oxygen species (ROS). In addition, the brain contains a relatively high degree of polyunsaturated fatty acids that are particularly a good substrate for peroxidation reactions (Halliwell and Gutteridge, 2007), however, studies about how the brain responds to oxidative insults are scarce. The present study demonstrated an increase in lipid peroxidation observed by the increase in brain TBARS levels of animals exposed to cigarette smoke, similarly to other reports (Baskaran et al., 1999; Anbarasi et al., 2006). Treatment with pecan nut shell AE showed protective effects against these oxidative effects of smoke as reflected by reduced brain TBARS levels. In line with this, AE increased brain CAT activity, an antioxidant enzyme, whose activity seems crucial in scavenging high levels of H₂O₂ in the body. We hypothesized that the elevated CAT activity observed in the co-treated group (AE+S) may be either a compensatory

mechanism to elevate the antioxidant defense or a signaling mechanism of OS, helping to prevent LP development.

The effects of pecan nut shell AE on TBARS levels in RBC were similar to those observed in brain and confirm its antioxidant properties. In fact, blood is one of the first defenses against oxidative damage from chemical substances present in cigarette smoke (Bernhard and Wick, 2006), providing oxygen and nutrients to the brain, being of great importance for its antioxidant status. In our findings CSE increased CAT activity in RBC, and this effect was not prevented by pecan nut shell AE, by the same reasons before exposed to brain. In fact, the main components of pecan nut shell are polyphenols rich in hydroxyl radicals, which might act directly as scavengers of free radicals (Pratt, 1992). On the other hand, ascorbic acid (AA) is an important micronutrient water-soluble antioxidant (Schectman et al., 1989; Smith et al., 1993; Marangon et al., 1998), and it has been reported as the first strong reductant against cigarette smoke oxidants, affording considerable protection to the cells (Kallner et al., 1981). Exposure to oxidant chemicals in smoke is associated with depletion of endogenous levels of AA in plasma (Chow et al., 1986; Schectman et al., 1989; Tribble et al., 1993; Mezzetti et al., 1995; Ross et al., 1995; Marangon et al., 1998; Lykkesfeldt et al., 2000), which was also observed in our results. The lower concentrations of AA in smokers (40-45%) (Pelletier, 1968) are associated with elevated OS (Northrop-Clewes and Thurnham, 2007). We observed that the AE restored plasma AA levels in the animals exposed to cigarette smoke, proving to be a good source of antioxidant micronutrients.

Literature data show that pecan nut shells are rich in phenolic compounds and condensed tannins (Worley, 1994; Villarreal-Lozoya et al., 2007), which have high antioxidant capacity. Furthermore, AE antioxidant capacity was confirmed by ABTS and DPPH assays, which are the most commonly used methods for assessment of antioxidant properties of natural products, mainly due to its reproducibility and strong correlation with phenolic compounds. These results show the antioxidant property of this natural extract, which may be involved in the detoxification of mice passively exposed to cigarette smoke. In the present study, AE-treated animals showed no weight loss or other signs of toxicity, demonstrating safety in its use. In fact, popular long-term use of pecan nut shells extract to minimize withdrawal signs of tobacco confirms the safety of this vegetal. Animal toxicity studies conducted in our laboratory

(data not shown) confirmed the low toxicity of this extract, which has been widely used in ethnopharmacology.

A significant correlation between OS in RBC and behavioral parameters in mice exposed to passive smoke was also demonstrated here. Positive correlations between RBC TBARS levels and locomotor activity (crossing and rearing) and anxiety parameters (grooming, fecal pellets and hidden beads) were found. Accordingly, anxious animals showed higher LP levels than normal animals. These results are of great importance and reinforce previous studies that also showed correlations between OS and anxiety parameters (Bouayed et al., 2007; Masood et al., 2008; Rammal et al., 2008b).

Here we are showing for the first time the beneficial effects of pecan nut shells extract on central and peripheral OS, as well as on anxiety-like signs of cigarette withdrawal, suggesting its usefulness in therapies to quit smoking.

5. Conclusions

Pecan nut shells AE was able to reduce the toxicity of environmental CSE, increasing antioxidant defenses and preventing oxidative damages. In addition, AE prevented behavioral changes arising from cigarette withdrawal and thus may be used as a cheap adjuvant in quit smoking therapy.

6. Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPERGS, CNPq and CAPES. P.R., D.M.B. and M.E.B. are recipients of CAPES and CNPq fellowship, respectively. Authors are grateful for the financial support from PRPGP and FIPE/Enxoval Program (Universidade Federal de Santa Maria-Brazil).

The authors are grateful to Pecantea for their donation of pecan nut shells, and to professor L.F. Schelp for his important contribution.

Statement: We state that our study involving experimental animals was conducted in accordance with national and institutional guidelines for the protection of animal welfare.

7. References

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.

Albanes, D., Jones, D., Micozzi, M.S., Mattson, M.E., 1987. Associations between smoking and body weight in the US population: analysis of NHANES II. *Am. J. Public Health* 77, 439-444.

American Psychiatric Association, 2000. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th ed Washington, DC.

Anbarasi, K., Sabitha, K.E., Devi, C.S.S., 2005. Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns upon chronic exposure to cigarette smoke: protective effect of Bacoside A. *Environ. Toxicol. Pharm.* 20, 345-350.

Anbarasi, K., Vani, G., Balakrishna, K., Devi, C.S.S., 2006. Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sci.* 78, 1378-1384.

Andreassen, O.A., Jorgensen, H.A., 2000. Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesia in rats. Implications for tardive dyskinesia. *Prog. Neurobiol.* 61, 525-541.

Balmé, F., 1982. *Plantas Mediciniais*. Hemus, São Paulo, SP.

Bamia, C., Trichopoulou, A., Lenas, D., Trichopoulos, D., 2004. Tobacco smoking in relation to body fat mass and distribution in a general population sample. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28, 1091-1096.

Barone-Adesi, F., Vizzini, L., Merletti, F., Richiardi, L., 2006. Short-term effects of Italian smoking regulation on rates of hospital admission for acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 27, 2468-2472.

Bartecchini, C., Alsever, R.N., Nevin-Woods, C., Thomas, W.M., Estacio, R.O., Bartelson, B.B., 2006. Reduction in the incidence of acute myocardial infarction associated with a citywide smoking ordinance. *Circulation* 114, 1490-1496.

Baskaran, S., Lakshmi, S., Prasad P.R., 1999. Effect of cigarette smoke on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in albino rat. *Ind. J. Exp. Biol.* 37, 1196-1200.

Benwell, M.E., Balfour, D.J., 1992. The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity. *Br. J. Pharmacol.* 105, 849-856.

Bernhard, D., Wick, G., 2006. In vitro models for the analysis of cigarette smoke effects. In: Wang, X.L., Scott, D.A. (Ed.). *Molecular Mechanisms of Tobacco-induced Diseases*. Nova Science Publishers, New York, pp 29-54.

Bouayed, J., Rammal, H., Younos, C., Soulimani, R., 2007. Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 564, 146-149.

Briviba, K., Sies, H., 1994. Nonenzymatic antioxidant defense systems. In: Frei, B. (Ed.), *Natural antioxidants in human health and disease*. Academic Press, San Diego, pp 107-128.

Broekkamp, C.L., Rijik, H.W., Joly-Geloin, Lloyd, K.L., 1986. Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 126(3), 223-229.

Budini, R., Tonelli, D., Girotti, S., 1980. Analysis of total phenols using the prussian blue method. *J. Agric. Food. Chem.* 28, 1236-1238.

Burns, D.M., 1991. Cigarettes and cigarette smoking. *Clin. Chest. Med.* 12, 631-642.

California Environmental Protection Agency, 1997. Health effects of exposure to environmental tobacco smoke. California Environmental Protection Agency, Office of Environmental Health Hazard Assessment, Sacramento, CA.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2002. Cigarette smoking among adults - United States, 2000. *MMWR* 51:637-660.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2003. Cigarette smoking-attributable morbidity - United States, 2000. *MMWR*, 52(35), 842-844.

Chow, C.K., Thacker, R.R., Changehit, C., Bridges, R.B., Rehm, S.R., Humble, J., Turbek, J., 1986. Lower levels of vitamin C and carotenoids in plasma of cigarette smokers. *J. Am. Coll. Nutr.* 5, 305-312.

Davis, R.M., 1998. Exposure to environmental tobacco smoke: Identifying and protecting those at risk. *J. Am. Med. Assoc.* 280, 1947-1949.

Deniz, Y., 2004. Nicotine: its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol.* 43, 619-632.

Dilsiz, N., Olcucu, A., Cay, M., Naziroglu, M., Cabanoglu, D., 1999. Protective effects of selenium, vitamin C and vitamin E against oxidative stress of cigarette smoke in rats. *Cell. Biochem. and Funct.* 17, 1-7.

Eisen, M.E., Hammond, C., 1956. The effect of smoking on packed cell volume, red blood cell counts, hemoglobin and platelet counts. *Canad. Med. Ass. J.* 75, 520-523.

Farkas, S., Hussein J., Ariano R.E., Sitar D.S., Hasan S.U., 2006. Prenatal cigarette smoke exposure: Pregnancy outcome and gestational changes in plasma nicotine concentration, hematocrit, and carboxyhemoglobin in a newly standardized rat model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 214:118-125.

Galley, H., Davies, M.J., Webster, N.R., 1996. Ascorbil radical formation in patients with sepsis: effects of ascorbate loading. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 139-143.

Genbacev-Krtolica, O., 2005. Highlight for phenols, quinolines, indoles, benzene and 2-cyclopenten-1-ones are oviduct toxicants in cigarette smoke. In: Talbot, P., Riveles, K., Rosa, R., (Ed.), List of tobacco-smoke constituents that are harmful for reproduction grows-passive smokers may be at risk. Toxicol. Sci., San Francisco, pp 4-5.

Gilbert, D.C., Robinson, J.H., Chamberlin, C.L., Spielberger, C.D., 1989. Effects of smoking/nicotine on anxiety, heart rate and lateralization of EEG during a stressful movie. *Psychophysiology* 26, 311-320.

Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D., 2001. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood barriers. *Neuropharmacology* 40, 959-975.

Grenhoff, J., Svensson, T., 1989. Pharmacology of nicotine. *Br. J. Addict.* 84, 477-492.

Grunberg, N.E., Bowen, D.J., Winders, S.E., 1986. Effects of nicotine on body weight and food consumption in female rats. *Psychopharmacology* 90, 101-105.

Grunberg, N.E., Faraday, M.M., Rahman, M.A., 2000. The psychobiology of nicotine self-administration. In: Baum, A., Revenson, T., Singer, J.E. (Ed.). *Handbook of health psychology*. Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, N.J., pp 249-261.

Hackshaw, A.K., Law, M.R., Wald, N.J., 1997. Accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *Brit. Med. J.* 315, 980-988.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2000. *Free radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed Oxford, UK.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed Oxford, UK.

- Henningfield, J.E., Benowitz, N.L. 1995. Cigarettes and addiction. *Br. Med. J.* 310, 1082-1083.
- Hofstetter, A., Schutz, Y., Jequier, E., Wahren, J. 1986. Increased 24-hour energy expenditure in cigarette smokers. *N. Engl. J. Med.* 314, 79-82.
- Horn, K.H., Espósito, E.R., Greene, R.M., Pisano, M.M. 2008. The effect of cigarette smoke exposure on developing folate binding protein-2 null mice. *Reprod. Toxicol.* 26, 203-209.
- Hovatta, L., Tennant, R.S., Helton, R., Marr, R.A., Singer, O., Redwine, J.M., Ellison, J.A., Schadt, E.E., Verma, I.M., Lockhart, D.J., Barlow, C. 2005. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature* 438, 662-666.
- Hughes, J.R., 2007. Effects of abstinence from tobacco: etiology, animal models, epidemiology, and significance: a subjective review. *Nicotine Tob. Res.* 9, 329-339.
- Hughes, J.R., Gust, S.W., Skoog, K., Keenan, R.M., Fenwick, J.W., 1991. Symptoms of tobacco withdrawal. A replication and extension. *Arch. Gen. Psychiatry* 48, 52-59.
- Hughes, J.R., Hatsukami, D., 1986. Signs and symptoms of tobacco withdrawal. *Arch. Gen. Psychiatry* 43, 289-294.
- Isola, R., Vogelsberg, V., Wemlinger, T.A., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 1999. Nicotine abstinence in the mouse. *Brain Res.* 850, 189-196.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 88, 119-125.
- Juster, H.R., Loomis, B.R., Hinman, T.M., Farrelly, M.C., Hyland, A., Bauer, U.E., 2007. Declines in hospital admissions for acute myocardial infarction in New York after implementation of a comprehensive smoking ban. *Am. J. Public Health* 97, 2035-2039.

- Kallner, A.B., Hartmann, D., Hornig, D.H., 1981. On the requirements of ascorbic acid in man: steady state turnover and body pool in smokers. *Am. J. Clin. Nutr.* 34, 1347-1355.
- Khuder, S.A., Milz, S., Jordan, T., Price, J., Silvestri, K., Butler, P., 2007. The impact of a smoking ban on hospital admissions for coronary hearth. *Prev. Med.* 45, 3-8.
- Kim, D.O.; Lee, K.W.; Lee, H.J.; Lee, C.Y., 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3713-3717.
- Kim, H.S., Kim, K.S., 1999. Inhibitory effects of ginseng total saponin on nicotine-induced hyperactivity, reverse tolerance and dopamine receptor supersensitivity. *Behav. Brain Res.* 103, 55-61.
- Koob, G.F., Le Moal, M., 2008. Addiction and the brain antireward system. *Annu. Rev. Psychol.* 59, 29-53.
- Koul, A., Bhatia, V., Bansal, M.P., 2001. Effect of alpha-tocopherol on pulmonary antioxidant defence system and lipid peroxidation in cigarette smoke inhaling mice. *B.M.C. Biochem.* 2, 14-19.
- László, J., Tímár, J., Gyarmati, Z., Furst, Z., Gyires, K., 2009. Pain-inhibiting inhomogeneous static magnetic field fails to influence locomotor activity and anxiety behavior in mice: No interference between magnetic field-and morphine-treatment. *Brain Res. Bull.* 79, 316-321.
- Lykkesfeldt, J., Christen, S., Wallock, L.M., Chang, H.H., Jacob, R.A., Ames, B.N., 2000. Ascorbate is depleted by smoking and repleted by moderate supplementation: a study in male smokers and nonsmokers with matched dietary antioxidant intakes. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 530-536.

Luchese, C., Pinton, S., Nogueira, C.W., 2009a. Brain and lung of rats are differently affected by cigarettes smoke exposure: Antioxidant effect of an organoselenium compound. *Pharmacol. Res.* 59, 194-201.

Luchese, C., Stangherlin, E.C., Gay, B.M., Nogueira, C.W., 2009b. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: Involvement of glutathione. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 72(1), 248-254.

Manhães, A.C., Guthierrez, M.C.S., Filgueiras, C.C., Abreu-Villaça, Y., 2008. Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav. Brain Res.* 193, 216-224.

Marangon, K., Herbeth, B., Lecomte, E., Paul-Dauphin, A., Grolier, P., Chancerelle, Y., Artur, Y., Siest, G., 1998. Diet, antioxidant status, and smoking habits in French men. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 231-239.

Masood, A., Nadeem, A., 2008. Mustafa SJ, O'Donnell JM. Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 369-379.

Mezzetti, A., Lapenna, D., Pierdomenico, S.D., Calafiore, A.M., Costantini, F., Riario-Sforza, G., Imbastaro, T., Neri, M., Cuccurullo, F., 1995. Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and nonsmokers. *Atherosclerosis* 112, 91-99.

Montgomery, K.C., 1955. The relationship between fear induced by novel stimulation an explorative behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 48, 254-260.

Munster, G., Battig, K., 1975. Nicotine-induced hypophagia and hypodipsia in deprived and in hypothalamically stimulated rats. *Psychopharmacology* 41, 211-217.

Naik, S.R., 2003. Antioxidants and their role in biological functions: An overview. *Indian Drugs* 40, 501-516.

Northrop-Clewes, C.A., Thurnham, D.I., 2007. Monitoring micronutrients in cigarette smokers. *Clin. Chim. Acta* 377, 14-38.

Öberg, M., Jaakkola, M.S., Woodward, A., Peruga, A., Prüss-Üsturn, A., 2010. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *The Lancet*, doi:10.1016/S0140-6736(10)61388-8.

Offen, D., Gorodin, S., Melamed, E., Hanania, J., Malik, Z., 1999. Dopamine melanin is actively phagocytized by PC12 cells and cerebellar granular cells: possible implications for the etiology of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 260, 101-104.

Ohkawa, H., Ohishi, H., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-357.

Ozkan, A., Fiskin, K., Ayhan, A.G., 2007. Effect of vitamin E and selenium on antioxidant enzymes in brain, kidney and liver of cigarette smoke-exposed mice. *Biologia* 62/3, 360-364.

Park, E.M., Park, Y.M., Gwak, Y.S., 1998. Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 79-86.

Pecantea, 2010. <http://www.pecantea.com.br/index2.html>, homepage visited on April 1st, 2010.

Pelletier, O., 1868. Smoking and vitamin C levels in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 21, 1259-1267.

Perkins, K.A., Epstein, L.H., Stiller, R.L., Fernstrom, M.H., Sexton, J.E., Jacob, R.G., Solberg, R., 1991. Acute effects of nicotine on hunger and caloric intake in smokers and nonsmokers. *Psychopharmacology (Berl)* 103, 103-109.

Picciotto, M.R., 1998. Common aspects of the action of nicotine and other drugs of abuse. *Drug Alcohol Depend.* 51, 165-172.

Picciotto, M.R., 2003. Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted. *U. Trends Pharmacol. Sci.* 24, 493-499.

Picciotto, M.R., Brunzell, D.H., Caldarone, B.J., 2002. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport* 13, 1097-1106.

Pomerleau, O.F., 1986. Nicotine as a psychoactive drug: anxiety and pain reduction. *Psychopharmacol Bull.* 22, 865-869.

Prado, A.C.P., Aragão, A.M., Fett, R., Block, J.M., 2009. Antioxidant properties of Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] shell infusion. *Grasas y Aceites* 60, 330-335.

Pratt, D.E. 1992. Natural antioxidants from plant material. In: Huang, M.T., Ho, C.T. & Lee, C.Y. (eds.). *Phenolic compounds in food and their effects on health II. Antioxidants & cancer prevention.* ACS Symposium Series 507 (pp.54-71). Washington: American Chemical Society.

Pryor, W.A., Stone, K., 1993. Oxidants in cigarette smoke. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 686, 12-28.

Pryor, W.A., Stone, K., Zang, L.Y., Bermudez, E., 1998. Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 441-448.

Rahman, I., Morrison, D., Donalson, K., MacNee, W., 1996. Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care.* 154, 1055-1060.

Rajaram, S., Burke, K., Connell, B., Myint, T., Sebaste, J., 2001. A monounsaturated fatty acid-rich pecan-enriched diet favorably alters the lipid profile of healthy men and women. *J. Nutr.* 131(9), 2275-2279.

Rammal, H., Bouayed, J., Younos, C., Soulimani, R., 2008a. Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behavior in mice. *Brain, Behav. Immun.* 22:1156-1159.

Rammal, H., Bouayed, J., Younos, C., Soulimani, R., 2008b. The impact of high anxiety level on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 589, 173-175.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* 26(9-10), 1231-1237.

Ross, M.A., Crosley, L.K., Brown, K.M., Duthie, S.J., Collins, A.C., Arthur, J.R., Duthie, G.G., 1995. Plasma concentrations of carotenoids and antioxidant vitamins in Scottish males: influences of smoking. *Eur. J. Clin. Nutr.* 49, 861-865.

Sargent, R.P., Shepard, R.M., Glantz, S.A., 2004. Reduced incidence of admissions for myocardial infarction associated with public smoking ban: before and after study. *B.M.J.* 328, 977-980.

Schectman, G., Byrd, J.C., Gruchow, H.W., 1989. The influence of smoking on vitamin C status in adults. *Am. J. Public Health* 79, 158-162.

Smith, F.B., Lowe, G.D., Fowkes, F.G., Rumley, A., Rumley, A.G., Donnan, P.T., Housley, E., 1993. Smoking, haemostatic factors and lipid peroxides in a population case control study of peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 102, 155-162.

Sohn, H.O., Lim, H.B., Lee, Y.G., Lee, D.W., Kim, Y.T., 1993. Effect of subchronic administration of antioxidants against cigarette smoke exposure in rats. *Arch. Toxicol.* 67, 667-673.

Stolerman, I.P., Shoaib, M., 1991. The neurobiology of tobacco addiction. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 467-473.

Tiwari, A.K., 2004. Antioxidants: new-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Curr. Sci.* 86, 1092-1102.

Treit, D., Pinel, J.P., Fibiger, H.C., 1981. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15(4), 619-626.

Tribble, D.L., Giuliano, L.J., Fortmann, S.P., 1993. Reduced plasma ascorbic acid concentrations in nonsmokers regularly exposed to environmental tobacco smoke. *Am. J. Clin. Nutr.* 58, 886-890.

US Department of Health and Human Services (US DHHS), 1988. The health consequences of smoking: nicotine addiction. A report of the Surgeon General. Office on Smoking and Health, Maryland, Washington DC.

US Department of Health and Human Services (US DHHS), 1989. Reducing the health consequences of smoking: 25 years of progress. A report of the Surgeon General. In: Rockville, M.D. (Ed.), Public Health Service, Centers for Chronic Disease and Health Promotion, Office on Smoking and Health, DHHS Publication No. 89, Washington, DC, pp 89-8411.

US Environmental Protection Agency, 1992. Respiratory health effects of passive smoking: Lung cancer and other disorders. Office of Research and Development, Office of Health and Environmental Assessment, Washington, DC: Environmental Protection Agency Publication EPA/600/6-90/006F.

US Department of Health and Human Services (US DHHS), 2006. The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Office on Smoking and Health, Washington, DC.

Villarreal-Lozoya, J.E., Lombardini, L., Cisneros-Zevallos, L., 2007. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. *Food Chem.* 102, 1241-1249.

Walter, S., Kuschinsky, K., 1989. Conditioning of nicotine effects on motility and behaviour in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 339, 208-213.

World Health Organization (WHO), 1992a. Cadmium, Environmental Health Criteria. vol. 134. World Health Organization, International Progress in Chemical Safety, Switzerland, Geneva.

World Health Organization (WHO), 2007. The scientific basis of tobacco product regulation. Switzerland, Geneva.

Worley, R.E., 1994. Pecan physiology and composition. In: Santerre, C.R. (Ed.), Pecan technology. Chapman & Hall, New York, pp. 39-45.

Younoszai, M.K., Kacic, A., Haworth, J.C., 1968. Cigarette smoking during pregnancy: the effect upon hematocrit and acid-base balance of the Newborn infant. *Canad. Med. Ass. J.* 99(5), 197-200.

Legends for figures

Figure 1. Effects of pecan shell AE treatment on TBARS levels in brain (A) and red blood cells (B) of mice exposed to passive cigarette smoke. Control (C), smoke (S), pecan shell AE (AE) and co-treatment AE plus smoke (AE+S). Data appear as means \pm SEM. *($p < 0.05$), difference from control; ⁺($p < 0.05$), difference from S; ⁺⁺($p < 0.001$), difference from S.

Figure 2. Effects of pecan shell AE treatment on catalase (CAT) activity in brain (A) and red blood cells (B) of mice exposed to passive cigarette smoke. Control (C), smoke (S), pecan shell AE (AE) and co-treatment AE plus smoke (AE+S). Data appear as means \pm SEM. *($p < 0.05$) and ^{**}($p < 0.001$), difference from C group; [#]($p < 0.05$), difference from AE+S group.

Figure 3. Effects of pecan shell AE treatment on plasma ascorbic acid (AA) levels of mice exposed to passive cigarette smoke. Control (C), smoke (S), pecan shell AE (AE) and co-treatment AE plus smoke (AE+S). Data appear as means \pm SEM. *($p < 0.05$), difference from C group; ⁺⁺($p < 0.001$), difference from S group.

Figure 4. Linear regression analysis between red blood cell TBARS levels and crossing, rearing and grooming in the open-field test (r values: 0.46, 0.54, 0.45, respectively) and beads hidden in the marble burning test ($r = 0.45$) of mice treated with pecan shells AE and exposed to CSE.

Legends for tables

Table 1. Phytochemical characterization of pecan shells aqueous extract (AE), and its antioxidant activity *in vitro*.

A: Total phenolics (expressed as mg of Gallic Acid Equivalents per gram); B: Condensed tannin content (expressed as mg of Catechin Equivalent /g); C: Antioxidant capacity (ABTS expressed in μmol of Trolox Equivalent /g); D: Antioxidant capacity (DPPH expressed in mg of Trolox Equivalent /g, 30 min. assay); E: Antioxidant capacity (DPPH 24 hour assay).

Table 2. Effect of pecan shell AE on the body weight and on liquid consumption of mice exposed to cigarette smoke.

Values are means \pm S.E.M, ** $p < 0.001$, differences from control group (C); # $p < 0.001$, differences from AE+S group.

Table 3. Effect of CSE on hematocrit and ctCO₂ levels in mice.

Values are means \pm S.E.M, ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ differences from control group (C).

Table 4. Effect of pecan shell AE on behavior parameters of mice exposed to cigarette smoke.

Values are means \pm S.E.M., * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, difference from control group (C); # $p < 0.05$ difference from pecan shell AE plus smoke group (AE+S).

Figure 1:

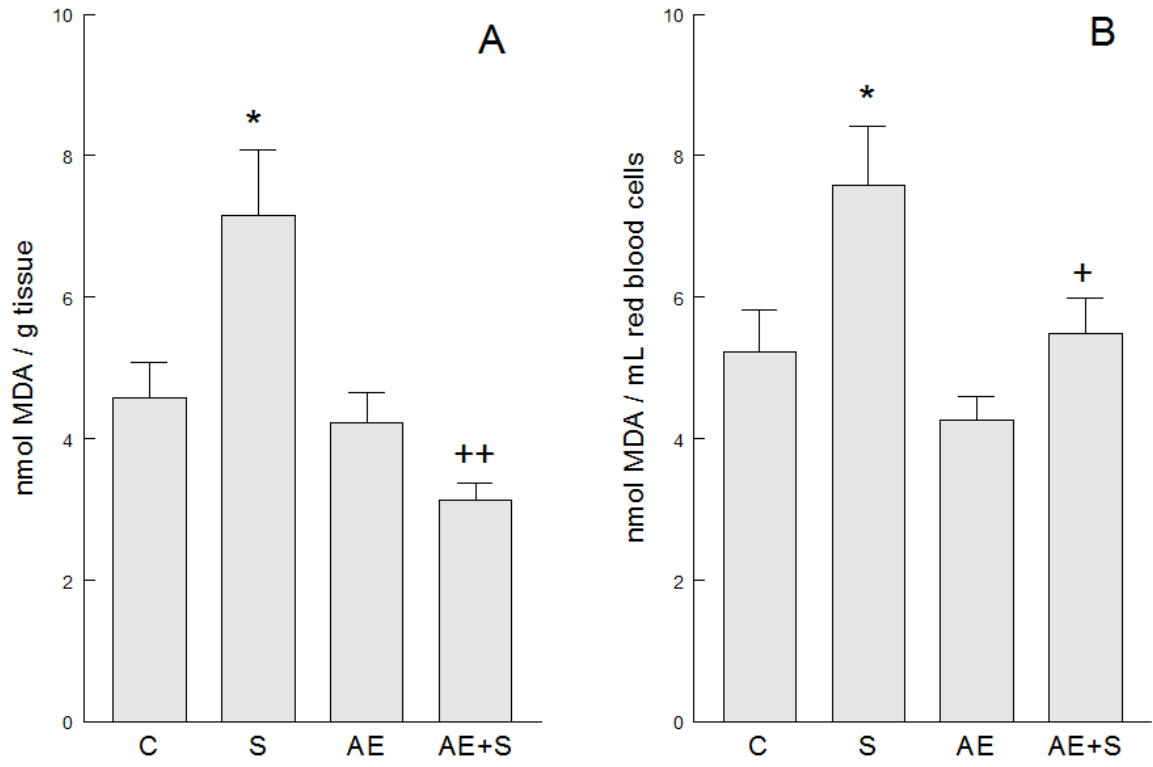


Figure 2:

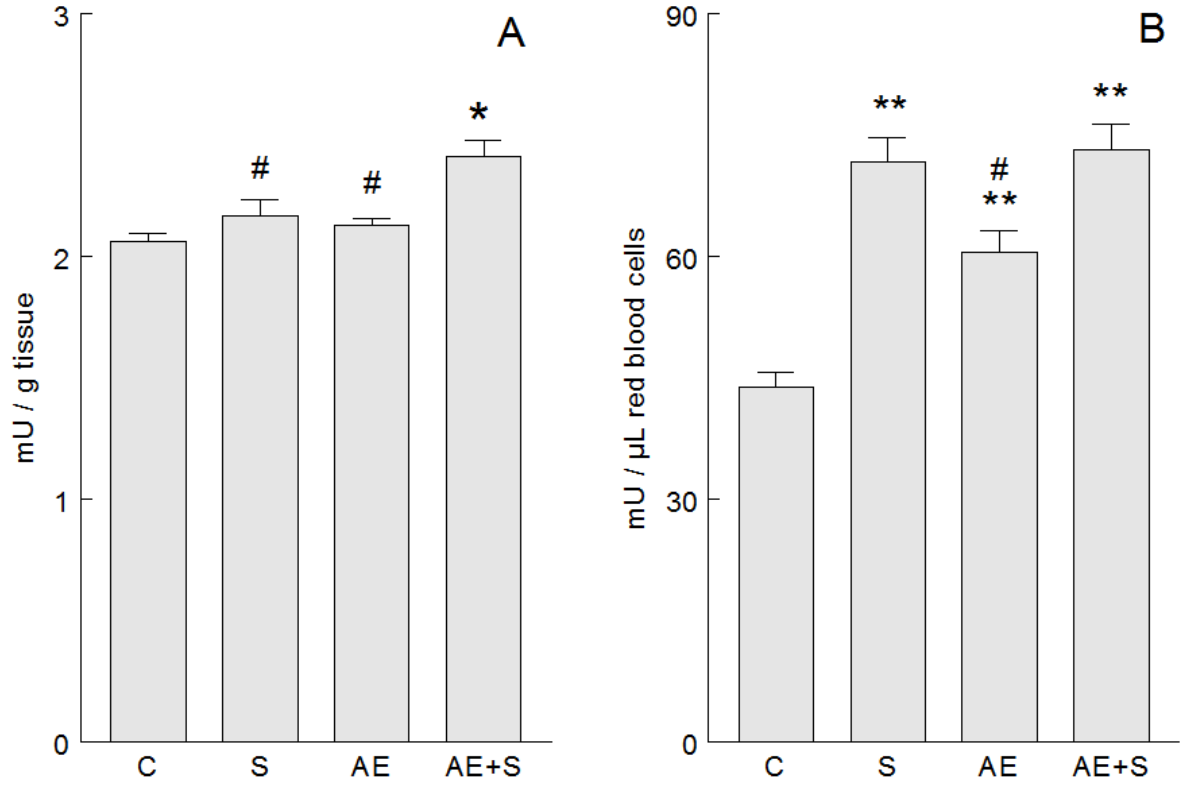


Figure 3:

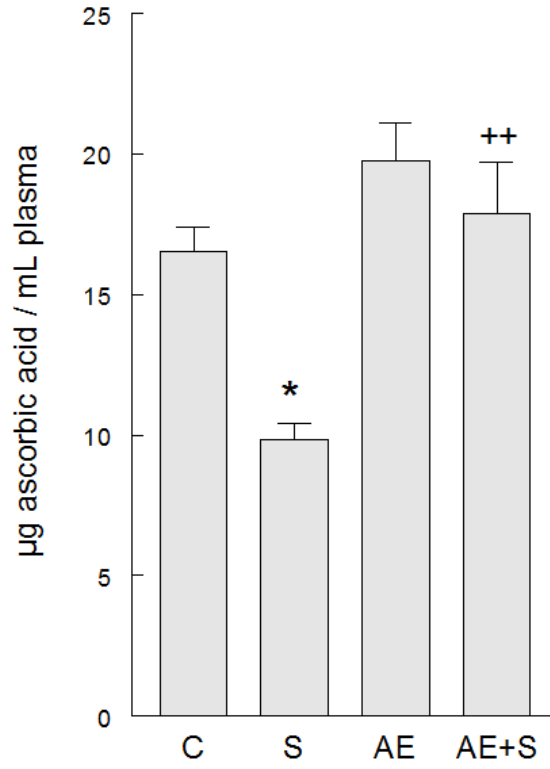


Figure 4:

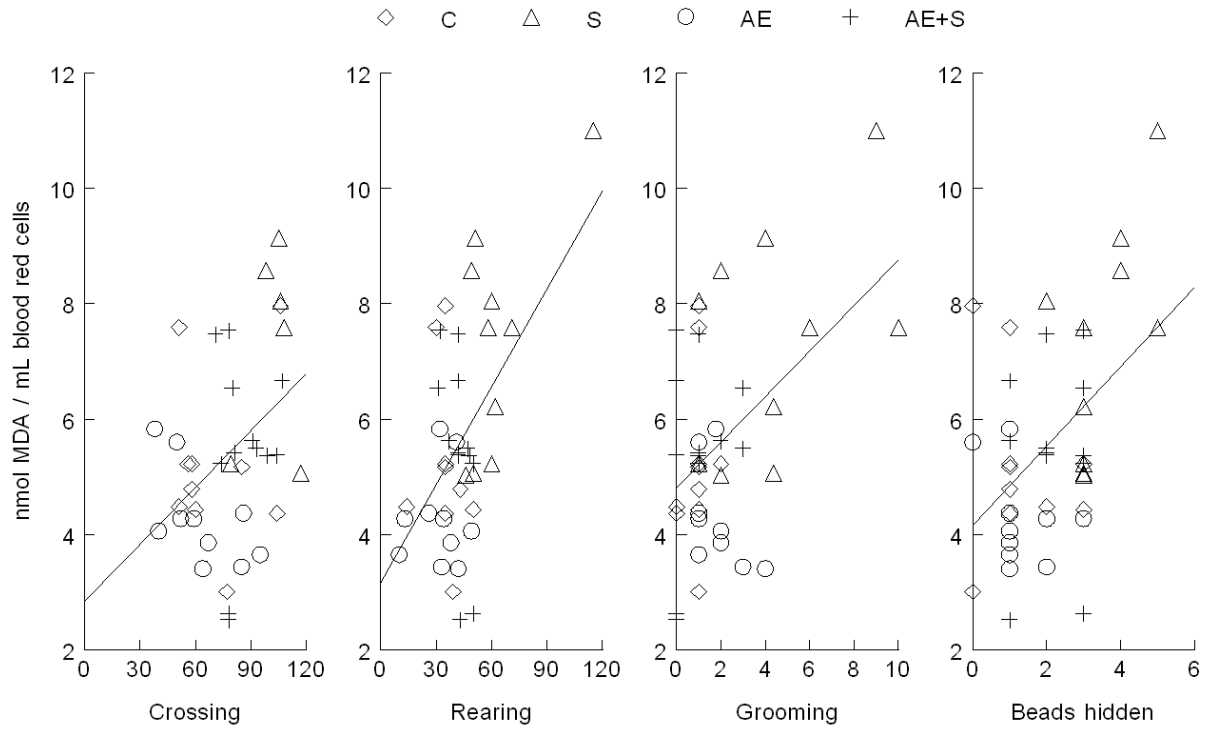


Table 1:

Assay	Average \pm SEM
TP ^A (mg GAE/g)	192.4 \pm 0.6
CT ^B (mg CE/g)	58.4 \pm 0.7
AC _{ABTS} ^C (μ mol TEAC/g)	2218.8 \pm 0.8
AC _{DPPH} ^D 30 min (mg TE/g)	529.4 \pm 2.5
AC _{DPPH} ^E 24 h (mg TE/g)	794.1 \pm 3.8

Table 2:

Measures/ groups	%Gain body weight		Water/AE consumption (mL/animal/day)	
	After AE treatment (1 week)	After cigarette smoke exposure (3 weeks)	After AE treatment	After cigarette smoke exposure
C	12.3±2.1	+32.3±4.9	6.3±0.1	6.5±0.3
S		9.6±4.3**		6.1±0.2
AE	9.3±0.7	+35.0±3.7 [#]	6.3±0.1	6.8±0.3
AE+S		0.1±2.2**		6.7±0.2

Table 3:

Measure/ groups	C	S
Hematocrit (%)	40.8±0.9	45.1±0.4*
ctCO ₂ (mEq/L blood)	21.6±0.4	34.2±1.3 **

Table 4:

Measures / groups	C	S	AE	AE+S
Crossing frequency	70.6±9.4	112.6±4.4 ^{***#}	63.6±7 [#]	86.3±2.6
Rearing frequency	35.1±3.7	62.2±7.1 ^{**}	31.8±4.4 [#]	42.2±2.2
Grooming time	0.9±0.2	4.4±1.3 ^{**}	1.8±0.4 [#]	1.0±0.4
Fecal pellets (units)	1.2±0.5	2.6±0.4 ^{*#}	1.7± 0.4 [#]	0±0 [*]
Beads hidden (units)	1.4±0.5	3.6±0.4 ^{***#}	1.3±0.3	2.2±0.3

5 DISCUSSÃO

Nessa dissertação objetivou-se avaliar a ação do EAB da casca da noz pecã (*Carya illinoensis*) sobre os danos oxidativos induzidos pela exposição de camundongos ao fumo passivo, bem como sobre parâmetros comportamentais de abstinência. Os resultados aqui mostrados confirmam o envolvimento dos constituintes do cigarro no desenvolvimento de EO, e que esse quadro pode ser prevenido/protegido por compostos antioxidantes. Além do mais, nosso protocolo experimental foi capaz de causar desenvolvimento de dependência à fumaça do cigarro, a qual foi evidenciada pelo aumento da ansiedade, característica de abstinência, nos animais expostos ao fumo passivo. Os resultados aqui mostrados dão embasamento científico, até agora inexistente, para o uso do extrato das cascas da noz pecã no tratamento do tabagismo, sugerindo seu uso *in natura* ou como um possível agente fitoterápico.

Os animais expostos ao fumo passivo mostraram perda de peso em relação aos controles, o que pode ser devido à ação da nicotina no centro da saciedade, a qual atua como um redutor na ingestão de alimentos (PERKINS et al., 1991). Os animais expostos ao fumo passivo apresentaram também aumento das concentrações sanguíneas de dióxido de carbono, um dos componentes da fumaça do cigarro, e maiores níveis de hematócrito. O aumento do hematócrito pode ser devido a um mecanismo compensatório do organismo de elevar a capacidade transportadora de oxigênio do sangue (NORDENBERG et al., 1990). Isso se deve ao fato da fumaça do cigarro apresentar elevadas quantidades de monóxido de carbono, gás de elevada afinidade pela hemoglobina. A combinação do monóxido de carbono com a hemoglobina forma a carboxihemoglobina, a qual possui baixa capacidade de transportar oxigênio em relação à hemoglobina. Em decorrência disso, o organismo eleva os níveis de eritropoetina, que estimula a síntese de novas células sanguíneas. Apesar do aumento dos níveis de monóxido de carbono e hematócrito serem considerados no presente trabalho como marcadores que validaram a exposição dos animais à fumaça de cigarro, existem outros biomarcadores mais fidedignos para esse fim, como a própria carboxihemoglobina

ou a dosagem plasmática dos níveis de cotinina (principal metabólito da nicotina) (MELLO et al., 2005).

Ao fim do protocolo experimental, que compreendeu 4 semanas (4 semanas de EAB juntamente a 3 semanas de exposição ao fumo passivo), os animais expostos ao fumo passivo permanecerem 15h sem exposição à fumaça do cigarro e apresentaram sinais de abstinência no teste do campo aberto, como aumento da atividade locomotora e exploratória, do tempo de auto-limpeza e do número de bolos fecais. Além disso, no teste de esconder esferas, os animais expostos ao fumo passivo apresentaram maior número de esferas escondidas em relação aos controles, o que indica ansiedade (BROEKKAMP et al., 1986; TREIT et al., 1981), já que cada esfera representa para o animal ansioso um objeto estranho que propicia uma ameaça (NOGUEIRA, 1997). Em conjunto, esses resultados demonstram que os animais expostos ao fumo passivo estavam com ansiedade, um sintoma de abstinência relacionado à dependência a cigarro (POMERLEAU, 1986; GILBERT et al., 1989; PICCIOTTO et al., 2002; MANHÃES et al., 2008). Estudos anteriores demonstram que existe uma relação direta entre o aumento da ansiedade na abstinência e recaídas durante tratamentos do tabagismo (ASTON-JONES & HARRIS, 2004; DUDAS et al., 2005; KENFORD, 2002). O EAB foi capaz de proteger contra essas alterações comportamentais, reduzindo os efeitos de ansiedade da abstinência ao cigarro (ou prolongando o tempo para surgimento deles), podendo diminuir o consumo de cigarros e auxiliar no abandono do tabagismo.

Os resultados das correlações indicam que a proteção do EAB às alterações comportamentais de abstinência ao cigarro está correlacionada positivamente a danos oxidativos. Logo, a ação benéfica do EAB nas avaliações comportamentais dos animais expostos ao fumo passivo pode ser devido à proteção exercida frente danos oxidativos. Diversos trabalhos têm mostrado o envolvimento do EO com a ansiedade, o que fortalece os resultados desse trabalho (BOUAYED et al., 2007; MASOOD et al., 2008; RAMMAL et al., 2008).

Já está bem documentado o envolvimento do cigarro com o desenvolvimento de EO, visto que a fumaça do cigarro é uma rica fonte de RL e é responsável pela depleção dos antioxidantes de indivíduos expostos à mesma (WHO, 1992). Os danos oxidativos causados pelo EO puderam ser observados no presente estudo pelo aumento do marcador de peroxidação lipídica, TBARS, em tecido cerebral e eritrócitos de camundongos expostos ao fumo passivo em relação aos camundongos

controles. Os danos cerebrais podem ser atribuídos, ao menos em parte, à susceptibilidade do cérebro aos RL (que se mostram em elevadas concentrações em fumantes) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007), enquanto que aos eritrócitos por esses formarem uma das primeiras defesas do organismo contra os RL provenientes da fumaça do cigarro (BERNHARD & WICK, 2006). O EAB da casca de noz pecã foi capaz de prevenir esses danos oxidativos devido à proteção antioxidante desempenhada.

A CAT representa uma das principais defesas antioxidantes enzimáticas do organismo. No presente trabalho, os animais expostos à fumaça do cigarro apresentaram aumento na atividade da CAT em eritrócitos, fato não modificado pelo EAB, e observou-se também aumento na atividade dessa enzima no cérebro dos animais expostos ao fumo passivo e que receberam EAB. Esses resultados podem ser devido a um mecanismo compensatório do organismo para eliminar o excesso de RL. Em adição, os níveis de ácido ascórbico, um antioxidante não enzimático, mostraram-se reduzidos nos animais expostos ao fumo passivo em relação aos controles, confirmando estudos prévios (CHOW et al., 1986; LYKKESFELDT et al., 2000; MARANGON et al., 1998; MEZZETTI et al., 1995; ROSS et al., 1995; SCHECTMAN et al., 1989; TRIBBLE et al., 1993). O EAB prerrotegeu o plasma dessa redução nas concentrações de ácido ascórbico uma vez que é rico em compostos fenólicos totais e taninos condensados que apresentam grupos hidroxil capazes de neutralizar RL (PRATT, 1992), além de elevada atividade antioxidante.

Estudos maiores precisam ser desenvolvidos para a determinação do principal ou dos principais compostos envolvidos na atividade antioxidante do EAB aqui observada. Até o presente momento, podemos sugerir que essa atividade antioxidante do EAB é determinada pela elevada quantidade de compostos fenólicos totais e taninos condensados, entretanto os mesmos precisam ser quimicamente determinados e estudados isoladamente. Quanto à toxicidade, os animais que receberam EAB não tiveram perda de peso ou redução do consumo de líquidos em relação aos animais que receberam água. Isso, em adição a resultados prévios realizados (dados não mostrados), mostra que o EAB das cascas de noz pecã apresenta baixa toxicidade e, logo, demonstra segurança no uso.

Conforme visto nessa dissertação, muitos são os danos à saúde causados pelo cigarro às pessoas (e a animais experimentais), e muitas são as mortes que poderiam ser evitadas com atitudes simples, como parar de fumar ou não fumar

próximo a outras pessoas. Entretanto, os fumantes apresentam limitada eficácia nas terapias de abandono do tabagismo (GARWOOD & POTTS, 2007) e, apesar de campanhas que limitam o uso do cigarro a determinadas áreas, muitos são os fumantes passivos (cerca de um terço da população mundial) (ÖBERG et al., 2010). Logo, qualquer composto que mostre ação em ajudar fumantes ativos no abandono do tabagismo ou em prevenir os danos relacionados ao mesmo é de extrema importância para a sociedade. O EAB das cascas da noz pecã mostrou potente atividade protetora a alterações bioquímicas e comportamentais em camundongos expostos ao fumo passivo, e esses resultados iniciais precisam ser mais explorados até que possam ser compreendidos os mecanismos neurais relacionados a esse fenômeno. Além dos excelentes resultados observados, as cascas de noz pecã representam um subproduto da indústria de nozes com baixo custo e fácil acesso, ao contrário de muitos dos tratamentos do tabagismo existentes, que muitas vezes são caros e não surtem os resultados esperados (GARWOOD & POTTS, 2007).

Não é possível concluir se os resultados do EAB frente ao fumo passivo aqui demonstrados são devido ao pré-tratamento de uma semana antes da exposição ao fumo passivo ou ao co-tratamento realizado. Logo, sugerimos que estudos futuros avaliem a ação do pré-tratamento e co-tratamento separadamente, bem como do pós-tratamento com EAB frente parâmetros bioquímicos e comportamentais de exposição ao fumo passivo.

De modo geral, pode-se concluir através do presente estudo que o EAB das cascas de noz pecã apresenta uso promissor no tratamento do tabagismo, uma vez que previne a ansiedade durante a síndrome de abstinência e danos oxidativos gerados pela exposição de camundongos ao fumo passivo. Esses resultados devem-se, em grande parte, a elevada concentração de compostos antioxidantes presentes no EAB, como compostos fenólicos totais e taninos condensados.

6 CONCLUSÕES

- Observou-se que o protocolo de exposição ao fumo passivo adotado causou aumento de parâmetros comportamentais que inferem ansiedade (atividade locomotora e exploratória, tempo de auto-limpeza e número de bolos fecais no teste do campo aberto e número de esferas escondidas no teste de esconder esferas) durante período de abstinência ao fumo passivo. O EAB foi capaz de proteger os animais experimentais dessas alterações. Como a ansiedade durante período de abstinência ao fumo está relacionada ao subsequente ato de fumar, hipotetiza-se que o EAB pode ter ação benéfica como auxiliar nas terapias de abandono do tabagismo.

- O EAB foi caracterizado através da atividade antioxidante *in vitro* nas técnicas do ABTS e DPPH, mostrando resultados consistentes com a literatura, e pela dosagem dos compostos fenólicos totais e taninos condensados, os quais tiveram como resultado 192,4 mg de equivalentes de ácido gálico por grama e 58,4 mg de equivalentes catequínicos por grama, respectivamente. Com isso observa-se que o EAB apresenta elevado poder antioxidante devido, em grande parte, a elevada quantidade de compostos fenólicos totais e taninos condensados presentes no mesmo.

- O protocolo adotado de exposição ao fumo passivo causou EO (evidenciado pelo aumento de TBARS) em tecido cerebral e eritrócitos, aumentou a atividade de defesa antioxidante enzimática (CAT) em eritrócitos e diminuiu as concentrações plasmáticas de antioxidante não enzimático (ácido ascórbico). O EAB protegeu tecido cerebral e eritrócitos de EO e o plasma da redução da concentração de ácido ascórbico, demonstrando seu elevado poder antioxidante. O EAB não modificou a atividade da CAT em eritrócitos e aumentou a mesma em tecido cerebral dos animais expostos ao fumo passivo.

- Foi observado envolvimento do EO com ansiedade durante período de abstinência ao fumo passivo através de correlações positivas significativas entre o EO

eritrocitário com parâmetros comportamentais avaliados (atividade locomotora e exploratória e tempo de auto-limpeza no teste do campo aberto, bem como número de esferas escondidas no teste de esconder esferas).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, K. A. et al. **The costs of environmental tobacco smoke (ETS): an international review**. Geneva: World Health Organization, 1999. 29p.

ALBERG, A. J. et al. Household exposure to passive cigarette smoking and serum micronutrient concentrations. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, n. 6, p. 1576-1582, 2000.

ALBERG, A. J. The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients. **Toxicology**, v. 180, n. 2, p. 121-137, 2002.

AMBROSE, J. A.; BARUA, R. S. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 43, n.10, p. 1731–1737, 2004.

AMSTAD, D.; CERUTTI, P. Genetic modulations of the cellular antioxidant defense capacity. **Env. Health Persp.**, v. 88, p. 77-82, 1990.

ANBARASI, K.; SABITHA, K. E.; DEVI, C. S. S. Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns upon chronic exposure to cigarette smoke: protective effect of bacoside A. **Environ. Toxicol. Phar.**, v. 20, n. 2, p. 345-350, 2005.

ANBARASI, K. et al. Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 12, p. 1378-1384, 2006.

ARAUJO, A. J. et al. Diretrizes para Cessação do Tabagismo. **J. Bras. Pneumol.**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. S1-S76, 2004.

ASTON-JONES, G.; HARRIS, G. C. Brain substrates for increased drug seeking during protracted withdrawal. **Neuropharmacology**, v. 47, n. 1, p. 167-179, 2004.

BALAKRISHNAN, A.; MENON, V. P. Antioxidant properties of hesperidin in nicotine-induced lung toxicity. **Fundamental e Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 5, p. 535-546, 2007.

BARNOYA, J., GLANTZ, S. A. Cardiovascular effects of second hand smoke: nearly as large as smoking. **Circulation**, v. 111, p. 2684–2698, 2005.

BARONE-ADESI, F. et al. Short-term effects of Italian smoking regulation on rates of hospital admission for acute myocardial infarction. **Eur. Heart J.**, v. 27, n. 20, p. 2468-2472, 2006.

BARTECCHINI, C. et al. Reduction in the incidence of acute myocardial infarction associated with a citywide smoking ordinance. **Circulation** v. 114, n. 14, p. 1490-1496, 2006.

BEHAN, D. F. et al. Economic effects of environmental tobacco smoke. **Society of Actuaries**, Schaumburg, 2005. Disponível em: <<http://www.soa.org/research/life/researcheconomic-effect.aspx>>. Acesso em: 13 Novembro 2009.

BELLUZZI, J. D.; WANG, R.; LESLIE, F. M. Acetaldehyde enhances acquisition of nicotine self-administration in adolescent rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 4, p. 705–12, 2005.

BENOWITZ, N. L. Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 83, n. 4, p. 531–541, 2008.

BENVEGNÚ, D. M. et al. Protective Effects of a By-Product of the Pecan Nut Industry (*Carya illinoensis*) on the Toxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**, v. 29, n. 3, p. 185-197, 2010.

BERNHARD, D.; WICK, G. In vitro models for the analysis of cigarette smoke effects. In: WANG, X.L.; SCOTT, D.A. **Molecular Mechanisms of Tobacco-induced Diseases**. New York: Nova Science Publishers, 2006. p. 29-54.

BEZERRA, F. S. et al. α -tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. **Nutrition**, v. 22, n. 11-12, p. 1192-201, 2006.

BLOOMER, R. J. Decreased blood antioxidant capacity and increased lipid peroxidation in young cigarette smokers compared to nonsmokers: Impact of dietary intake. **Nutrition Journal**, v. 6, p. 39-45, 2007.

BOCK, B. C.; GOLDSTEIN, M. G.; MARCUS, B. H. Depression following smoking cessation in women. **J. Subst. Abuse**, v. 8, n. 1, p. 137-44, 1996.

BOUAYED, J. et al. Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 564, p. 146-149, 2007.

BOWMAN, T. S. et al. A prospective study of cigarette smoking and risk of incident hypertension in women. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 50, n. 21, p. 2085–2092, 2007.

BRIVIBA, K.; SLES, H. Nonenzymatic antioxidant defense systems. In: FREI, B. **Natural antioxidants in human health and disease**. San Diego: Academic Press, 1994. p. 107-128.

BROEKKAMP, C. L. et al. Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 126(3), p. 223-9, 1986.

BROWNSON, R. C. et al. Environmental tobacco smoke. Health effects and policies to reduce exposure. **Annu. Rev. Public Health**, v. 18, p. 163–185, 1997.

BURNS, D. M. Nicotine addiction. In: BRAUNWALD, E.; FAUCI, S. A.; ISSELBACHER, J. K.; KASPER, D. L.; HAUSER, S. L.; LONGO, D. L.; JAMESON, J. L. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 15. ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2001. p. 2574–2577.

CAGGIULA, A. R.; DONNY, E. C.; WHITE, A. R.; CHAUDHRI, N.; BOOTH, S.; GHARIB, M. A. et al. Cue dependency of nicotine self-administration and smoking. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 70, n. 4, p. 515–530, 2001.

CAO, G. et al. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 68, n. 5, p. 1081-1087, 1998.

CATANZARO, D. F. et al. Potentially reduced exposure cigarettes accelerate atherosclerosis: evidence for the role of nicotine. **Cardiovasc. Toxicol.**, v. 7, n. 3, p. 192–201, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Cigarette cessation and Health Promotion**. Atlanta: Office on Smoking and Health, 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Cigarette smoking-attributable morbidity - United States, 2000. **M.M.W.R.**, v. 52, n. 35, p. 842-844, 2003.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Annual smoking-attributable mortality, years of potential life lost, and productivity losses - United States, 1997-2001. **M.M.W.R.**, v. 54, p. 625-628, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Smoking-attributable mortality, years of potential life lost, and productivity losses – United States, 2000–2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 57, p.1226–1228, 2008.

CHOW, C. K. et al. Lower levels of vitamin C and carotenes in plasma of cigarette smokers. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 5, n. 3, p. 305-312, 1986.

COSTA, A.J.L. et al. **Mortalidade Atribuível ao Tabagismo Passivo na População Urbana do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2003.

CROSS, C. E.; TRADER, M.G. Cigarette smoking and antioxidant vitamins: the smoke screen continues to clear but has a way to go. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 65, n. 2, p. 562-563, 1997.

DALLONGEVILLE, J. et al. Cigarette smoking is associated with unhealthy patterns of nutrient intake: a meta-analysis. **J. Nutr.**, v. 128, n. 9, p. 1450-7, 1998.

DAR, R.; FRENK, H., Do smokers self-administer pure nicotine? A review of the evidence. **Psychopharmacology (Berl.)**, v. 173, n. 1-2, p. 18–26, 2004.

DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS. **World population prospects**. New York: United Nations Publication, 1991. p. 226-231.

DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS. **World population prospects: the 2003 revision and world urbanization prospects**. New York: United Nations Publication, 2004. p. 492-496.

DIETRICH, M. et al. Smoking and exposure to environmental tobacco smoke decrease some plasma antioxidants and increase γ -tocopherol in vivo after adjustment for dietary antioxidant intakes. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 77, n. 1, p. 160-6, 2003.

DIKEN, H., et al. Effects of Cigarette Smoking on Blood Antioxidant Status in Short-Term and Long-Term Smokers. **Turk. J. Med. Sci.**, v. 31, p. 553-557, 2001.

DUDAS R. B.; HANS, K.; BARABAS, K. Anxiety, depression and smoking in school children—implications for smoking prevention. **J. R. Soc. Health**, v. 125, n. 2, p. 87-92, 2005.

DUTHIE, G. G.; WAHLE, K. W. J.; JAMES, W. P. T. Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. **Nutr. Res. Rev.**, v. 2, p. 51-62, 1989.

DWOSKIN L. P. et al. Acute and chronic effects of nornicotine on locomotor activity in rats: altered response to nicotine. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 145, n. 4, p. 442–51, 1999.

ELIASSON, B. Cigarette smoking and diabetes. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v. 45, n.5, p. 405–413, 2003.

EL-SOKKARY, G. H.; CUZZOCREA, S.; REITER, R. J. Effect of chronic nicotine administration on the rat lung and liver: Beneficial role of melatonin. **Toxicology**, v. 239, n. 1-2, p. 60-67, 2007.

EUROPEAN COMMISSION. **Survey on tobacco – analytical report**, Brussels, 2009. Disponível em: <http://ec.europa.eu/public_opinion/flash/fl_253_en.pdf>. Acesso em: 27 agosto 2009.

FARCHI, S. et al. Exposure to environmental tobacco smoke is associated with lower plasma b-carotene levels among nonsmoking women married to a smoker. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, v. 10, n. 8, p. 907-909, 2001.

FARUQUE, M. D. O. et al. Relationship between smoking and antioxidant nutrient status. **Br. J. Nutr.**, v. 73, n. 4, p. 625–32, 1995.

FIORE, M. C. et. al. **Treating Tobacco Use and Dependence, Clinical Practice Guideline**. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2000.

GARWOOD, C. L.; POTTS, L. A. Emerging pharmacotherapies for smoking cessation. **Am. J. Health-Syst. Pharm.**, v. 64, n. 16, p. 1693-1698, 2007.

GENBACEV-KRTOLICA, O. Highlight for phenols, quinolines, indoles, benzene and 2-cyclopenten-1-ones are oviduct toxicants in cigarette smoke. In: TALBOT, P.; RIVELES, K.; ROSA, R. **List of tobacco-smoke constituents that are harmful for reproduction grows-passive smokers may be at risk**. San Francisco: Toxicol. Sci., 2005. , p. 4-5.

GELLERT, V. F.; HOLTZMAN, S. G. Development and maintenance of morphine tolerance and dependence in the rat by scheduled access to morphine drinking solutions. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.205, p. 536–546, 1978.

GILBERT, D. G. et al. Effects of smoking/nicotine on anxiety, heart rate, and lateralization of EEG during a stressful movie. **Psychophysiology**, v.26, n.3, p. 311–20, 1989.

GLEERUP, G.; WINTHER, K. Smoking further increases platelet activity in patients with mild hypertension. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 26, n.1, p. 49–52, 1996.

GRIMMER, H. R.; PARBHOO, V.; MCGRATH, R. M. Antimutagenicity of polyphenol-rich fractions from sorghum-bicolor grain. **J. Sci. Food Agric.**, v.59, n. 2, p. 251-256, 1992.

GUILLEM, K. et al. Monoamine oxidase inhibition dramatically increases the motivation to self-administer nicotine in rats. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 38, p. 8593–8600, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford, 2007.

HALPERIN, R. O.; GAZIANO, J. M.; SESSO, H. D. Smoking and the risk of incident hypertension in middle-aged and older men. **Am. J. Hypertens.**, v. 21, n.2, p. 148–152, 2008.

HANCOCK, B. G. Development of Pecan Industry. In:____. **Texas Pecan Handbook**. Texas Agricultural Extension Service, 1997. p.1-7.

HARRIS, A. C. et al. Comparison of the behavioral effects of cigarette smoke and purê nicotine in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 96, n.2, p. 217-227, 2010.

HELEN, A. et al. Antioxidant effect of onion oil (*Allium cepa*. Linn) on the damages induced by nicotine in rats as compared to alpha-tocopherol. **Toxicol. Lett.**, v. 116, n. 1-2, p. 61-68, 2000.

HENNINGFIELD, J. E., et al. Pharmacotherapy for nicotine dependence. **C. A. Cancer J. Clin.** v. 55, p. 281–299, 2005.

HERBETH, B. et al. Dietary intake and other determinants of blood vitamins in an elderly population. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 43, n. 3, p. 175-186, 1989.

HORN, K. H. et al. The effects of cigarette smoke exposure on developing folate binding protein-2 null mice. **Reproductive Toxicology**, v. 26, n. 3-4, p. 203-209, 2008.

HOVATTA, I.; JUHILA, J.; DONNER, J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. **Neuroscience Research**, v. 68, p. 261-275, 2010.

HUGHES, J. R.; HATSUKAMI, D. Signs and symptoms of tobacco withdrawal. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 43, n. 3, p. 289-294, 1986.

HUGHES, J. R.; HIGGINS, S. T.; HATSUKAMI, D. Effect of abstinence from tobacco: a critical review, in: KOSLOWSKI, L.T., et al. **Research Advances in Alcohol and Drug Problems**, New York: Phenum, 1990. p. 317-398.

HUGHES, J. R., et al. Symptoms of tobacco withdrawal. A replication and extension. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 48, n. 1, p. 52-59, 1991.

HUGHES, J. R.; STEAD, L. F.; LANCASTER, T. Anxiolytics for smoking cessation. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 4., n. CD002849, 2000.

HUKKANEN, J.; JACOB, P.; BENOWITZ, N. L. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, n. 1, p. 79–115, 2005.

HURT, R. D. et al. A Comparison of Sustained-Release Bupropion and Placebo for Smoking Cessation. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, n. 17, p. 1195-1202, 1997.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2489–2491, 1987.

HYLAND, A. et al. A 32-country comparison of tobacco smoke derived particle levels in indoor public places. **Tobacco Control**, v. 17, n. 3, p. 159–165, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O Controle do Tabagismo no Brasil**, 2003. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/prevenção/tabagismo/control_e_br.html>. Acesso em 19 outubro de 2010.

ISOLA, R. et al. Nicotine abstinence in the mouse. **Brain. Res.**, v. 850, p. 189-196, 1999.

JAAKKOLA, M.; JAAKKOLA, J. Assessment of exposure to environmental tobacco smoke. **European Respiratory Journal**, v. 10, n. 10, p. 2384–2397, 1997.

JACOB, P. et al. Minor Tobacco Alkaloids as Biomarkers for Tobacco Use: Comparison of Users of Cigarettes, Smokeless Tobacco, Cigars, and Pipes. **Am. J. Public Health**, v. 89, n. 5, p. 731-736, 1999.

JAMROZIK, K. Estimate of deaths attributable to passive smoking among UK adults: database analysis. **B.M.J.**, doi:10.1136/bmj.38370.496632.8F (published 2 March 2005), 2005.

JARVINEN, R. et al. Antioxidant vitamins in the diet: relationship with other personal characteristics in Finland. **J. Epidemiol. Community Health**, v.48, n. 6, p. 549-54, 1994.

JENDRYCZKO, A. et al. Cigarette smoke exposure of school children: effect of passive smoking and vitamin E supplementation on blood antioxidant status. **Neoplasma**, v. 40, n. 3, p. 199-203, 1993.

JEREMI, P.; LACEY, C. **The Tobacco Atlas**. London: The Hanway Press, 2002. 17 p.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 1993. 222 p.

JORENBY, D. E.; LEISCHOW, S. J.; NIDES, M. A. et al. A controlled trial of sustained-release bupropion, a nicotine patch, or both for smoking cessation. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, n. 9, p. 685-691, 1999.

JUSTER, H. R. et al. Declines in hospital admissions for acute myocardial infarction in New York after implementation of a comprehensive smoking ban. **Am. J. Public Health**, v. 97, n. 11, p. 2035-2039, 2007.

KAUPPINEN, T. P.; VIRTANEN, S. V. Exposure to environmental tobacco smoke in Finland in 2000. **Scand. J. Work Environ. Health**, v. 28, n.2, p. 7-15, 2002.

KENFORD, S. L. et al. Predicting relapse back to smoking: contrasting affective and physical models of dependence. **J. Consult. Clin. Psychol.**, v. 70, n. 1, p. 206–27, 2002.

KENNY, P. J.; MARKOU, A. Neurobiology of the nicotine withdrawal syndrome. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 70, n. 4, p. 531-49, 2001.

KHUDER, S. A. et al. The impact of a smoking ban on hospital admissions for coronary hearth. **Prev. Med.**, v. 45, n. 1, p. 3-8, 2007.

KOLBER, M.; SPOONER, G. R.; SZAFRAN, O. Adverse events with Zyban(bupropion). **CMAJ**, v. 169, p. 103-4, 2003.

KOUL, A.; BHATIA, V.; BANSAL, M. P. Effect of alpha-tocopherol on pulmonary antioxidant defence system and lipid peroxidation in cigarette smoke inhaling mice. **B.M.C. Biochemistry**, v. 2, p. 14-18, 2001.

KRIS-ETHERTON, P. P. et al. The effects of nuts on coronary heart disease risk. **Nutr. Rev.**, v. 59, n. 4, p. 103–111, 2001.

LANZETTI, M. et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 375-381, 2008.

LASSER, K. et al. Smoking and mental illness: A population-based prevalence study. **Journal of the American Medical Association**, v. 284, n. 20, p. 2606–2610, 2000.

LE FOLL, B.; GOLDBERG, S. R. Control of the reinforcing effects of nicotine by associated environmental stimuli in animals and humans. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 26, n. 6, p. 287–293, 2005.

LERMAN, C. et al. Translational research in medication development for nicotine dependence. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 6, n. 9, p. 746–62, 2007.

LI, M. The genetics of smoking related behavior: A brief review. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 326, n. 4, p. 168–173, 2003.

LIU, J. et al. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared with thiobarbituric acid. **Anal. Biochem.**, v. 245, n. 2, p. 161-166, 1997.

LOCKMAN, P. R. et al. Brain uptake kinetics of nicotine and cotinine after chronic nicotine exposure. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 314, n. 2, p. 636–642, 2005.

LOHR, J. B.; KUCZENSKI, R.; NICULESCU, A. B. Oxidative mechanisms and tardive dyskinesia. **C.N.S. Drugs**, v. 17, n. 1, p. 47-62, 2003.

LU, Z. et al. Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochem. Int.**, v. 48, n. 4, p. 263-274, 2006.

LUCHESE, C.; PINTON, S.; NOGUEIRA, C. W. Brain and lungs of rats are differently affected by cigarette smoke exposure: Antioxidant effect of an organoselenium compound. **Pharmacological Research**, v. 59, n. 3, p. 194-201, 2009a.

LUCHESE, C. et al. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: Involvement of glutathione. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 2009b.

LYKKESFELDT, J. et al. Ascorbate is depleted by smoking and repleted by moderate supplementation: a study in male smokers and nonsmokers with matched dietary antioxidant intakes. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 530-536, 2000.

MA, J.; HAMPL, J. S.; BETTS, N. M. Antioxidant intakes and smoking status: data from the Continuing Survey of Food Intakes by Individuals 1994-1996. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.71, n. 3, p. 774-80, 2000.

MALIN, D. H. Nicotine dependence: Studies with a laboratory model. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 70, n. 4, p. 551-9, 2001.

MANHÃES, A. C. et al. Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. **Behav. Brain Res.**, v. 193, n. 2, p. 216-224, 2008.

MARAGON, K. et al. Diet, antioxidant status, and smoking habits in French men. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 67, p. 231-239, 1998.

MASSOD, A. et al. Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 326, p. 369-379, 2008.

MCPHILLIPS, J. R.; EATON, C. B.; GANS, K. M. Dietary differences in smokers and nonsmokers from two southeastern New England communities. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 94, n. 3, p. 287-92, 1994.

MELLO, P. R. B. et al. Evaluation of experimental tobacco exposure using cotinine and carboxyhemoglobin as exposure markers. **Pulmão R.J.**, v. 14, n. 3, p. 228-236, 2005.

MEZZETTI, A. et al. Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and nonsmokers. **Atherosclerosis**, v. 112, p. 91-99, 1995.

NAVAS-ACIEN, A. et al. Secondhand tobacco smoke in public places in Latin America, 2002-2003. **J.A.M.A.**, v. 291, n. 22, p. 2741-2745, 2004.

NEBOT, M. et al. Exposure to environmental tobacco smoke at work and at home: a population based survey. **Tob. Control.**, v. 13, n. 1, p. 95, 2004.

NOGUEIRA, T. C. M. L. **II Curso de Validação de Plantas Medicinais com Atividade no Sistema Nervoso Central**. Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento/Rede Iberoamericana de Validação de Plantas Medicinais, Florianópolis, 1997.

NORDENBERG, D.; YIP, R.; BINKIN, N. J. The effects of cigarette smoking on hemoglobin levels and anemia screening. **J.A.M.A.**, v. 264, p. 1556-1559, 1990.

ÖBERG, M. et al. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. **The Lancet**, v. 377, n. 9760, p. 139-146, 2010.

O'BRIEN, C. P. Drug addiction and Abuse. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of therapeutics**. 15. ed. New York: Pregamon, 2001. p.621-42.

O'LEARY, K. et al. Cotinine selectively activates a subpopulation of alpha3/alpha6beta2 nicotinic receptors in monkey striatum. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 325, n. 2, p. 646–654, 2008.

ORTEGA, R. M. et al. Influence of smoking on folate intake and blood folate concentrations in a group of elderly Spanish men. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 13, n. 1, p. 68-72, 1994.

OSLER, M. The food intake of smokers and non-smokers: the role of partner's smoking behavior. **Prev. Med.**, v.27, n. 1, p. 438-43, 1998.

PACIFICI, R. et al. Environmental tobacco-smoke—Nicotine and cotinine concentration in semen. **Environmental Research**, v. 68, n. 1, p. 69–72, 1995.

PARK, E. M.; PARK, Y. M.; GWAK, Y. S. Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. **Free Radical Biol. Med.**, v. 25, n. 1, p. 79-86, 1998.

PARROT, A. C. Cigarette-derived nicotine is not a medicine. **World J. Biol. Psychiatry**, v. 4, n. 2, p. 49–55, 2003.

PERKINS, K. A. et al. Acute effects of nicotine on hunger and caloric intake in smokers and nonsmokers. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 103, p. 103-109, 1991.

PHILLIPS, E. L. R. et al. Differences and trends in antioxidant dietary intake in smokers and non-smokers, 1980-1992: The Minnesota Heart Survey. **Ann. Epidemiol.**, v. 10, n. 7, p. 417-23, 2000.

PHILLIPS, D. E., et al. Tobacco smoke and the upper airway. **Clin. Otolaryngol. Allied. Sci.**, v. 28, p. 492–496, 2003.

PICCIOTO, M. R. Common aspects of the action of nicotine and other drugs of abuse. **Drug Alcohol Depend.**, v. 51, n. 1-2, p. 165-172, 1998.

PICCIOTTO, M. R.; BRUNZELL, D. H.; CALDARONE, B. J. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. **Neuroreport**, v. 13, n. 9, p.1097–106, 2002.

PICCIOTTO, M. R. Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted U. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24, n. 9, p. 493-499, 2003.

POLLES, G. S.; HANNY, B. W.; HARVEY, A. J. Condensed tannins in kernels of thirty one pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch] cultivars. **J. Agric. Food Chem.**, v. 29, n. 1, p. 196-197, 1981.

POMERLEAU, O. F. Nicotine as a psychoactive drug: anxiety and pain reduction. **Psychopharmacol Bull.**, v.22, n. 3, p. 865–9, 1986.

PRATT, D. E. Natural antioxidants from plant material. In: HUANG, M. T.; HO, C. T. & LEE, C. Y. **Phenolic compounds in food and their effects on health II. Antioxidants & cancer prevention**. Washington: American Chemical Society, 1992. p 54-71.

PRYOR, W. A.; STONE, K. Oxidants in cigarette smoke: radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate and peroxyxynitrite. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 686, n. 1, p. 12-27, 1993.

RAHMAN, I.; MACNEE, W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-inducedlung diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, n. 5, p. 669–681, 1996.

RAHMAN, I. et al. Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 154, n. 4, p. 1055-1060, 1996.

RAJARAM, S. et al. A monounsaturated fatty acid-rich pecan-enriched diet favorably alters the serum lipid profile of healthy men and women. **J. Nutr.**, v.131, n. 9, p. 2275-2279, 2001.

RAMMAL, H. et al. The impact of hight anxiety level on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 589, p. 173-175, 2008.

RANGASAMY, T. et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 9, p. 1248–1259, 2004.

REKHA, P. S.; KUTTAN, G.; KUTTAN, R. Antioxidant activity of brahma rasayana. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, n. 5, p. 447-452, 2001.

RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T.; SYMONS, M. C. R. Techniques in free radical research. In: BURTON, R.H., KNIPPENBERG, P.H. (Org), **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 147–149.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochem. Pharmacol.**, v. 37, n. 1, p. 837–841, 1988.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The Neural Basis of Drug Craving: an Incentive-Sensitization Theory of Addiction. **Brain Res. Rev.**, v. 18, n. 3, p. 247-91, 1993.

ROSE, J. E. Nicotine and nonnicotine factors in cigarette addiction. **Psychopharmacology (Berl.)**, v. 184, p. 274–285, 2006.

ROSS, M. A. et al. Plasma concentrations of carotenoids and antioxidant vitamins in Scottish males: influences of smoking. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 49, p. 861-865, 1995.

SAMAHA, A. N. et al. Rapid delivery of nicotine promotes behavioral sensitization and alters its neurobiological impact. **Biol. Psychiatry**, v. 57, n. 4, p. 351–360, 2005.

SAMAHA, A. N.; ROBINSON, T. E. Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? **Trends Pharmacol. Sci.** v. 26, n. 2, p. 82–87, 2005.

SARGENT, R. P.; SHEPARD, R. M.; GLANTZ, S. A. Reduced incidence of admissions for myocardial infarction associated with public smoking ban: before and after study. **B.M.J.**, v. 328, n. 7446, p. 977-980, 2004.

SAWA, T.; NAKAO, M.; AKAIKE, T. et al. Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, n. 2, p. 397-402, 1999.

SCHECTMAN, G.; BYRD, J. C.; GRUCHOW, H. W. The influence of smoking on vitamin C status in adults. **Am. J. Public Health**, v. 79, p. 158-162, 1989.

SCHICK, S.; GLANTZ, S. Philip Morris toxicological experiments with fresh sidestream smoke: more toxic than mainstream smoke. **Tobacco Control**, v. 14, n. 6, p. 396–404, 2005.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev. Bras. Med. Esp.**, v. 10, n. 4, p. 308-313 , 2004.

SHAW, M.; MITCHELL, R.; DORLING, D. Time for a smoke? One cigarette reduces your life by 11 min. **B.M.J.**, v. 320, n. 7226, p. 53, 2000.

SIES, H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291-295, 1997.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 25, p. 1058-1071, 1986.

SILAGY, C. et al. Nicotine Replacement Therapy for Smoking Cessation. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 3, n. CD000146, 2004.

SMITH, C. J.; HANSCH, C. The relative toxicity of compounds in mainstream cigarette smoke condensate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 7, p. 637–646, 2000.

SOBCZAK et al. The effects of tobacco smoke on plasma alpha- and gamma-tocopherol levels in passive and active cigarette smokers. **Toxicology Letters**, v. 151, p. 429-437, 2004.

SOLAK, Z. A. et al. Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people. **Clin. Exp. Med.**, v. 5, n. 3, p. 99-105, 2005.

SOLOMON, R. L.; CORBIT, J. D. An opponent-process theory of motivation. 1. Cigarette addiction. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 81, n. 2, p. 158–171, 1973.

STEPTOE, A.; USSHER, M. Smoking, cortisol and nicotine. **International Journal of Psychophysiology**, v. 59, n. 3, p. 228-235, 2006.

STOLERMAN, I. P.; SHOAIB, M. The neurobiology of tobacco addiction. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 12, n. 12, p. 467-473, 1991.

STRAUSS, R. S. Environmental tobacco smoke and serum vitamin C levels in children. **Pediatrics**, v. 107, n. 3, p. 540-542, 2001.

SUBAR, A. F.; HARLAN, L. C.; MATTSON, M. E. Food and nutrient intake differences between smokers and non-smokers in the US. **Am J Public Health**, v. 80, n. 11, p. 1323-9, 1990.

SUBRAMANIAN, J.; GOVINDAN, R. Lung cancer in never smokers: a review. **J. Clin. Oncol.**, v. 25, n. 5, p. 561-570, 2007.

SWAN, G. E.; LESSOV-SCHLAGGAR, C. N. The effects of tobacco smoke and nicotine on cognition and the brain. **Neuropsychol. Rev.**, v. 17, n. 3, p. 259-273, 2007.

TALHOUT, R.; OPPERHUIZEN, A.; VAN AMSTERDAM, J. G. Role of acetaldehyde in tobacco smoke addiction. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v.17, n. 10, p. 627-636, 2007.

TESORIERE, L. D. et al. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 80, n. 2, p.391-395, 2004.

TORABIAN, S.; HADDAD, E.; RAJARAM S. Acute effect of nut consumption on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and lipid peroxidation. **J. Hum. Nutr. Diet.**, v. 22, n. 1, p .64-71, 2009.

TOREL, J.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 383-385, 1986.

TREIT, D., PINEL, J. P., FIBIGER, H. C. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 15, n. 4, p. 619-26, 1981.

TRIBBLE, D. L.; GIULIANO, L. J.; FORTMANN, S. P. Reduced plasma ascorbic acid concentrations in nonsmokers regularly exposed to environmental tobacco smoke. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 58, n. 6, p. 886-890, 1993.

TWOSE, J. et al. Prevalencia de la exposición al humo ambiental del tabaco en un área urbana. **Med. Clin. (Barc.)**, v. 123, n. 13, p. 496-8, 2004.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (US DHHS). **The health consequences of smoking: Nicotine addiction**. A report of the Surgeon General. Rockville: Public Health Services, 1988.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (US DHHS). **Reducing the health consequences of smoking: 25 years of progress**. A report of the Surgeon General. Washington: Public Health Services, 1989.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (US DHHS). **The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General**. Washington: Department of Health and Human Services, 2006.

US PUBLIC HEALTH SERVICE. **Smoking and Health**. New York: Public Health Service Publication, 1964.

VAGHETTI, J. C. P. et al. Pecan nutshell as biosorbent to remove Cu (II), Mn(II) and Pb(II) from aqueous solutions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, n. 1, p. 270-280, 2009.

VALENCA, S. S. et al. Oxidative stress in mouse and lungs induced by smoke and lipopolysaccharide. **Environmental Research**, v. 108, p. 199-104, 2008.

VENN, A.; BRITTON, J. Exposure to secondhand smoke and biomarkers of cardiovascular disease risk in never-smoking adults. **Circulation** v. 115, n. 8, p. 990-995, 2007.

VILLARREAL-LOZOYA, J. E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chem.**, v. 102, n. 4, p. 1241-1249, 2007.

WANG, J. S. et al. P-glycoprotein does not actively transport nicotine and cotinine. **Addict. Biol.**, v. 10, n. 2, p. 127-129, 2005.

WEI, W.; KIM, Y.; BOUDREAU, N. Association of smoking with serum and dietary levels of antioxidants in adults: NHANES III, 1988–1994. **Am. J. Public Health**, v. 91, n. 2 , p. 258–264, 2001.

WISE, R. A.; BOZARTH, M. A. A Psychomotor Stimulant Theory of Addiction. **Psychol. Rev.**, v. 94, n. 4, p. 469-92, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Environmental Health Criteria: Cadmium**. vol. 134. Geneva: World Health Organization, International Progress in Chemical Safety, 1992.

WORLD BANK; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). In: PRABHAT, J.H.A.; CHALOUPKA, F.J. **Tobacco Control in Developing Countries**. Oxford: Oxford University Press, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The World Health Report 2002—reducing risks, promoting healthy life**. Geneva: World Health Organization, 2002a. 248 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Tobacco smoke and involuntary smoking: summary of data reported and evaluation**. Geneva: International Agency for Research on Cancer, 2002b.

World Health Organization (WHO). **The scientific basis of tobacco product regulation**. Geneva: World Health Organization, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2009: Implementing smoke-free environments**. Geneva: World Health Organization Press, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Why is tobacco a public health priority?** Geneva, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/tobacco/health_priority/en/> Acesso em: 10 jan de 2011.

WORLEY, R. E. Pecan physiology and composition. In: SANTERRE, C. R. **Pecan Technology**. 1.ed. New York: Chapman & Hall, 1994. p.39–45.

WU, X. L. et al. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 12, p. 4026-4037, 2004.

YILDIZ, D. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. **Toxicol.**, v. 43, n. 6, p. 619–632, 2004.