



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA - *Campus* Sobral
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RAYANE SIQUEIRA DE SOUSA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS NEUROFARMACOLÓGICOS DE *Stemodia*
maritima (LINN): ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E AVALIAÇÃO DO
ESTRESSE OXIDATIVO**

Sobral

2017

RAYANE SIQUEIRA DE SOUSA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS NEUROFARMACOLÓGICOS DE *Stemodia
maritima* (LINN): ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E AVALIAÇÃO DO
ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – UFC/*Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Macromoléculas.

Orientadora: Prof. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

Sobral

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S698i Sousa, Rayane Siqueira de.
INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS NEUROFARMACOLÓGICOS DE *Stemodia maritima* (LINN):
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO / Rayane Siqueira
de Sousa. – 2017.
81 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia, Sobral, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar.
1. *Stemodia maritima*. 2. Depressão. 3. Atividade antioxidante. I. Título.
- CDD 660.6
-

RAYANE SIQUEIRA DE SOUSA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS NEUROFARMACOLÓGICOS DE *Stemodia
maritima* (LINN): ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E AVALIAÇÃO DO
ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – UFC/*Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Macromoléculas.

Aprovada em: ____/____/2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr^a. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar (orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* Sobral

Profa. Dr^a. Angela Martha Campos Arriaga
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Tiago Sousa de Melo
Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

Prof. Dr. Ricardo Basto Souza
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

AGRADECIMENTOS

À DEUS que é o dono de tudo.

À minha família pelo apoio incondicional e toda a ajuda oferecida a mim desde o momento que me ausentei de casa, em especial à minha mãe que tanto precisa de mim, mas entende e apoia minhas escolhas.

À minha orientadora, Lissiana Magna, por ter me aceito em sua equipe, pelos ensinamentos e horas dedicadas a mim e a esse trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/UFC e aos professores orientadores do Laboratório de Fisiologia e Neurociência: Ronaldo Graça, Emmanuelle Coelho e Carla Thiciane.

À professora Angela Arriaga, que forneceu o material botânico para estudo e realização desse trabalho. Obrigada pela confiança.

Aos meus amigos, Annyta Frota e Ricardo Basto, por todo incentivo, ensinamento e tempo dedicado a mim, desde a Iniciação Científica até hoje, obrigada pela parceria e amizade.

Ao meu companheiro, Amadeu Junior, por toda atenção e palavras direcionadas a mim, pelo amor e carinho de sempre, obrigada por me fazer uma pessoa melhor.

Aos meus colegas e amigos doidos, Nayara Araújo, Rondynele Lima, Marcos Eber, Denise Nogueira e Lais Feitosa, pela descontração e palhaçadas durante esses dois anos de convivência.

À minha amiga, Nayara Araújo, pela amizade, parceria e ajuda durante esses seis anos juntas.

Aos amigos, Luziana Mara e Tarcizio Brito, que mesmo internos sempre se disponibilizaram a ajudar.

Aos demais colegas do laboratório de Fisiologia e Neurociência: Carol, Eloi, Fernando Filho, Ian, Juliana, Larissa, Manu, Nayara Cardoso e Thomas.

Aos técnicos de laboratório, Francisco Gomes e Nayara Alves, pela ajuda e companhia nas horas de trabalho.

Ao Laboratório NUBEM/INTA pela ajuda e parceria, disponibilizando equipamentos para serem utilizados.

Aos animais de experimentação laboratorial, pelas vidas dadas a esse trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Desordens neurocomportamentais são compostas por um grupo de deficiências neurológicas, as quais estão associadas tanto com doenças cerebrais permanentes, como doenças cerebrais transitórias e/ou ocasionadas por injúrias. Entre essas desordens, pode-se destacar a depressão e a ansiedade. Estudos demonstram que plantas do gênero *Stemodia* são usadas no tratamento de doenças na medicina tradicional. *Stemodia maritima* Linn. apresenta ação antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante, a literatura relata para esta espécie a presença de variedade estrutural de constituintes, com destaque para a classe dos esteróides, flavonóides e terpenos, principalmente diterpenos. Este estudo investigou a ação do extrato etanólico de *S. maritima* (Sm) no sistema nervoso central (SNC), com possível efeito neuropsicofarmacológico e avaliação do estresse oxidativo em modelos animais de ansiedade e depressão. Camundongos swiss machos (25-35 g) foram tratados de forma aguda com Sm (1; 10 e 100 mg/Kg i.p.) ou veículo (DMSO 5%) e foram submetidos a análise neuropsicofarmacológica preliminar. Outros grupos de animais foram tratados de forma subcrônica com Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg – 14 dias/ i.p.) ou veículo (DMSO 5%), seguido pela realização de testes comportamentais para avaliar a atividade locomotora, ansiolítica, antidepressiva e de envolvimento do sistema noradrenérgico. Após o tratamento e a realização dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados e dissecadas as áreas cerebrais (hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal) para posterior análises neuroquímicas: determinação dos níveis de peroxidação lipídica, concentração de nitrito/nitrato e glutatona reduzida (GSH). De acordo com os resultados, Sm apresenta atividade no SNC, foi possível observar atividade antidepressiva similar ao antidepressivo Imipramina, sem alteração na atividade locomotora e com o possível envolvimento do sistema noradrenérgico nesta atividade. Sm não altera os níveis de peroxidação lipídica, porém, aumenta os níveis de nitrito/nitrato na dose de 5 mg/Kg o que pode explicar o aumento da atividade antioxidante (GSH) nessa mesma dose. Portanto, Sm apresenta uma potencial estratégia para estudos mais elaborados e assim ser utilizado na terapêutica de desordens neurocomportamentais.

Palavras-chave: *Stemodia maritima*, Depressão, Atividade antioxidante

ABSTRACT

Neurobehavioral disorders are composed of a group of neurological deficiencies, which are associated with both, permanent brain diseases as well as transient brain diseases and/or injury. Among these disorders, depression and anxiety can be highlighted. Studies show that plants of the *Stemodia* genus are used in the treatment of diseases in traditional medicine. *Stemodia maritima* Linn. presents an antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant action. Literature reports for this species the presence of a structural variety of constituents, especially steroid class, flavonoids and terpenes, mainly diterpenes. This study investigated the action of ethanolic extract of *S. maritima* (Sm) in the central nervous system (CNS), with possible neuropsychopharmacological effect and evaluation of oxidative stress in animal models of anxiety and depression. Male swiss mice (25-35 g) were treated acutely with Sm (1, 10 and 100 mg/kg i.p.) or vehicle (5% DMSO) and were subjected to preliminary neuropsychopharmacological analysis. Other groups of animals were treated subchronic with Sm (2.5, 5, 10 and 20 mg / kg - 14 days/ip) or vehicle (DMSO 5%) followed by behavioral tests to evaluate locomotor activity, anxiolytic, antidepressant and noradrenergic system involvement. After treatment and behavioral tests, animals were euthanized and brain areas (hippocampus, striatum and prefrontal cortex) were dissected for posterior neurochemical analysis: determination of lipid peroxidation, nitrite/nitrate concentration and glutathione (GSH). According to the results, Sm shows activity in the CNS, it was possible to observe antidepressant activity similar to the antidepressant Imipramine, without alteration in locomotor activity and with the possible involvement of the noradrenergic system in this activity. Sm does not alter lipid peroxidation levels, but increases nitrite/nitrate levels at the dose of 5 mg/kg, which may explain the increase in antioxidant activity (GSH) at the same dose. Therefore, Sm presents a potential strategy for more elaborate studies and thus be used in the therapy of neurobehavioral disorders.

Keywords: *Stemodia maritima*, Depression, Antioxidant activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Stemodia maritima</i> L.	24
Figura 2 - Análise neurocomportamental.	30
Figura 3 - Teste do Campo aberto.	31
Figura 4 - Teste de Labirinto em Cruz elevado (<i>plus maze test</i>).	32
Figura 5 - Teste da Placa Perfurada (<i>Hole board test</i>).	33
Figura 6 - Teste de Suspensão da Cauda.	34
Figura 7 - Teste de Nado Forçado.	35
Figura 8 - Avaliação da atividade motora no Teste do Campo Aberto.	43
Figura 9 - Número de entradas e percentagem de entradas nos braços abertos no Teste de Labirinto em Cruz Elevado (NEBA e PEBA).	45
Figura 10 - Tempo de permanência e percentagem de permanência nos braços abertos no Teste de Labirinto em Cruz Elevado (TPBA e PTBA).	46
Figura 11 - Número de entradas (<i>head dips</i>) e tempo de permanência no Teste de Placa Perfurada.	48
Figura 12 - Tempo de imobilidade no Teste de Suspensão da Cauda.	49
Figura 13 - Tempo de imobilidade no Teste de Nado Forçado.	50
Figura 14 - Efeito de Sm (20 mg/Kg) sozinha ou associada com Prazosina (1mg/Kg) sobre o tempo de imobilidade no Teste de Suspensão da Cauda.	52
Figura 15 - Efeito de Sm (20 mg/Kg) sozinha ou associada com Prazosina (1mg/Kg) sobre o tempo de imobilidade no Teste de Nado Forçado.	53
Figura 16 - Análise dos níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) nas áreas cerebrais.	55
Figura 17 - Análise dos níveis de Nitrito/Nitrato nas áreas cerebrais.	57
Figura 18 - Análise dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) nas áreas cerebrais.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Drogas utilizadas na metodologia.	28
Tabela 2 - Análises neurocomportamentais preliminares.....	40
Tabela 3 - Análises fisiológicas preliminares.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Célcius
5-HT	Serotonina
μMol	Micromol
A/ABS	Absorbância
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
BDZ	Benzodiazepínicos
CA	Teste do Campo Aberto
Ce	Ceará
CE	Corpo estriado
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
CFP	Córtex Pré-frontal
Cm	Centímetros
DA	Dopamina
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB	Ácido 2-nitrobenzóico
DZP	Diazepam
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas ao oxigênio
ERN	Espécie reativa ao nitrogênio
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
h	Hora
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HC	Hipocampo
HCl	Ácido clorídrico
i.p.	Intraperitoneal
IMI	Imipramina

Kg	Quilogramas
LCE	Teste do Labirinto em Cruz Elevado
MDA	Malonildialdeído
mg	Miligramas
mL	Microlitros
mM	Milimolar
n	Quantidade de animais por grupo
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NE	Norepinefrina
NEBA	Número de entradas nos braços abertos
NEED	N-naftil-etilenodiamina
NF	Teste do Nado Forçado
Nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH	Hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PEBA	Percentagem de entradas nos braços abertos
pH	Potencial Hidrogeniônico
PRA	Prasozina
PTBA	Percentagem do tempo de permanência nos braços abertos
s	Segundos
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SC	Teste de Suspensão da cauda
Sm	Extrato etanólico de <i>Stemodia maritima</i>
SNC	Sistema nervoso central
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
UFC	Universidade Federal do Ceará
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Ansiedade.....	12
1.1.1. Tratamento Farmacológico.....	14
1.2. Depressão.....	14
1.2.1. Epidemiologia.....	16
1.2.2. Fisiopatologia.....	16
1.3. Estresse oxidativo.....	18
1.4. Modelos Animais para a Investigação de Possíveis Alterações Neurocomportamentais induzidas por Bioativos.....	20
1.5. Plantas e produtos naturais.....	21
1.5.1. Considerações sobre o gênero <i>Stemodia</i>	23
1.5.1.1. <i>Stemodia maritima</i> Linn.....	23
2. OBJETIVOS	26
2.1. Geral.....	26
2.2. Específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Material Botânico.....	27
3.2. Animais.....	27
3.2.1. Aspectos Éticos.....	27
3.3. Drogas e Reagentes.....	28
3.4. Preparo das drogas e via de administração.....	28
3.5. Tratamento dos grupos experimentais.....	28
3.6. Protocolo experimental.....	29
3.7. Análises neurocomportamentais e fisiológicas preliminares.....	29
3.8. Modelo Experimental da Atividade Locomotora.....	31
3.8.1. Teste do Campo Aberto (<i>Open field test</i>).....	31
3.9. Modelos Experimentais da Atividade Ansiolítica.....	32
3.9.1. Teste de Labirinto em Cruz Elevado (<i>Plus maze test</i>).....	32
3.9.2. Teste da Placa Perfurada (<i>Hole board test</i>).....	33
3.10. Modelos Experimentais da Atividade Antidepressiva.....	34
3.10.1. Teste da Suspensão da Cauda.....	34
3.10.2. Teste do Nado Forçado.....	35

3.11. Avaliação do Envolvimento do Sistema Noradrenérgico na Atividade Antidepressiva	35
3.12. Dissecção das Áreas Cerebrais	36
3.13. Análises Neuroquímicas.....	36
3.13.1. Determinação dos Níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS)	36
3.13.2. Determinação da Concentração de Nitrito/Nitrato	36
3.13.3. Determinação da Concentração de Glutathione Reduzida (GSH).....	37
3.14. Análise Estatística	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Análises Neurocomportamentais e Fisiológicas Preliminares	39
4.2. Avaliação da Atividade locomotora.....	42
4.2.1. Teste do Campo Aberto (<i>Open field test</i>)	42
4.3. Avaliação da Atividade Ansiolítica	44
4.3.1. Teste de Labirinto em Cruz Elevado (<i>Plus maze test</i>)	44
4.3.2. Teste da Placa Perfurada (<i>Hole board test</i>).....	47
4.4. Avaliação da Atividade Antidepressiva	49
4.4.1. Teste da Suspensão da Cauda	49
4.4.2. Teste do Nado Forçado	50
4.5. Avaliação do Envolvimento do Sistema Noradrenérgico na Atividade Antidepressiva ..	51
4.6. Análises Neuroquímicas.....	54
4.6.1. Determinação dos Níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS).....	54
4.6.2. Determinação da Concentração de Nitrito/Nitrato.....	56
4.6.3. Determinação da Concentração de Glutathione Reduzida (GSH)	58
5. DISCUSSÃO.....	60
6. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ansiedade

A ansiedade consiste em uma excitação do sistema nervoso que, em níveis baixos, ocorre sempre quando há detecção de algo imprevisível, capaz de fugir ao controle e funciona, desse modo, como um alarme natural contra ameaças externas. Contudo, em excesso, passa a ser uma desordem psiquiátrica. É uma condição muito comum que causa uma angústia considerável ao indivíduo, família e a sociedade em geral. Juntamente com o medo constituem as primeiras respostas naturais de defesa frente a um perigo potencial, porém, enquanto o medo é a resposta a uma ameaça definida, a ansiedade é fruto da incerteza, com fonte causal desconhecida (BARBARD; CHAPMAN, 2016; CLARK; BECK, 2012; PASQUINI; BERARDELLI; BIONDI, 2014).

A ansiedade pode manifestar-se em diferentes níveis: nos planos afetivo, cognitivo e fisiológico. Do ponto de vista clínico, a sensação mais característica é de “estrangulamento” ou “constrição”. Essa sensação se traduz como motivação negativa, inibindo sistemas motivacionais, como apetite, libido e dor. No plano da cognição, a ansiedade manifesta-se através da antecipação de acontecimentos potencialmente perigosos, de pensamentos de que algo ruim está prestes a acontecer, interferindo na capacidade de concentração e no desempenho de tarefas intelectuais. Entre as manifestações fisiológicas ao medo e à ansiedade está a ativação do sistema nervoso simpático, desencadeando o aumento da frequência cardíaca, tremores, sudorese, hiperventilação. O sistema nervoso parassimpático também pode estar ativado, resultando em desconforto gástrico, aumento da motilidade intestinal e urgência para defecação e micção (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

São identificados neste conjunto alguns transtornos de ansiedade que, segundo o Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais (DSM-5) da Associação Americana de Psiquiatria (2013), os principais são:

- Agorafobia - ansiedade ou hesitação para com lugares ou situações de onde a fuga pode ser difícil ou embaraçosa, ou aonde o socorro pode não ser possível.
- Fobia social - ansiedade intensa provocada pela exposição a certas situações sociais ou de desempenho, geralmente levando a comportamentos de hesitação.

- Fobias específicas - ansiedade intensa provocada pela exposição a determinados objetos ou situações temidas, geralmente levando a comportamentos de hesitação.
- Transtorno de ansiedade generalizada - ansiedade ou preocupação excessiva e persistente com duração maior de seis meses.
- Transtorno do pânico - frequentes ataques de pânico com início súbito e sem causa aparente, consistindo em sentimentos de intenso terror, com palpitações, sudorese, tremores, falta de ar, dor no peito, náusea, sensação de formigamento, e até sensação de morte eminente.
- Transtorno do estresse pós-traumático - sentimento de reviver um acontecimento extremamente traumático acompanhado por sintomas de aumento do estado de alerta e de hesitação à fatores associados ao trauma.
- Transtorno obsessivo-compulsivo - obsessões que podem causar intensa ansiedade ou perturbações e/ou compulsões que servem para neutralizar a ansiedade.
- Transtorno de ansiedade de separação - ansiedade excessiva envolvendo o afastamento de casa ou de figuras importantes de vinculação.
- Mutismo seletivo - ansiedade em uma determinada situação social, pessoas não são capazes de falar e compreender linguagens quando isso é o que se espera deles, mas em momentos normais são totalmente aptas.

Os transtornos de ansiedade estão aumentando em todo o mundo e estão entre os distúrbios mentais mais comuns. O número de pessoas afetadas por algum transtorno mental aumentou em quase 50%, entre os anos de 1990 e 2013, passou de 416 milhões para 615 milhões, o que corresponde a cerca de 10% da população mundial. A Organização Mundial da Saúde estima que, durante emergências, até 1 em cada 5 pessoas são afetadas pela ansiedade (OMS, 2016; SOUSA; OLIVEIRA; FERNANDES, 2012).

Apesar de possuírem aspectos clínicos diferentes, os transtornos de ansiedade aparentam ter a mesma base neural, às vezes, podendo ser explicados como o resultado de uma redução na sinalização inibitória mediada pelo ácido γ -aminobutírico (GABA), porém, apenas esta hipótese não explica totalmente a complexidade destes transtornos (JANHSEN; ROSER; HOFFMANN, 2015).

O GABA é um dos principais neurotransmissores envolvidos na ansiedade e o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central dos vertebrados, sua ação é mediada pelos receptores GABA_A, GABA_B e GABA_C, onde GABA_A e GABA_C são canais de

cloreto dependentes de ligantes e receptores GABA_B estão acoplados à proteína G (GAFFORD; RESSLER, 2015).

1.1.1. Tratamento Farmacológico

O tratamento da ansiedade pode abranger métodos psicoterapêuticos, incluindo a terapia cognitiva-comportamental e métodos farmacológicos, usados isoladamente ou em combinação (GALLO; COMER; BARLOW, 2013).

Os benzodiazepínicos são a classe mais importante usada para tratar os estados de ansiedade. Atuam de modo seletivo sobre os receptores A do GABA, medeiam a transmissão sináptica inibitória rápida, através do Sistema Nervoso Central (SNC). Os benzodiazepínicos potencializam a resposta ao GABA, por facilitarem a abertura dos canais de cloreto ativados pelo GABA. Os principais efeitos desses fármacos são: redução da ansiedade e da agressão, sedação e indução do sono, redução do tônus muscular e da coordenação, e possuem ainda efeito anticonvulsivante (KATZUNG, 2014).

Outros fármacos são usados para amenizar os efeitos da ansiedade, entre eles pode-se citar: a buspirona que é um agonista parcial dos receptores serotonina e possui atividade ansiolítica com pequena sedação, e os barbitúricos que são depressores não-seletivos do SNC e produzem efeitos que vão da sedação e redução da ansiedade à inconsciência e morte por falência respiratória e cardiovascular. Os inibidores de recaptação de serotonina, como a fluoxetina e inibidores de captação mistos, serotonina/noradrenalina, são usados como fármacos antidepressivos e também mostram eficácia nos distúrbios da ansiedade (CARLINI; MENDES, 2011; GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

Entretanto, os fármacos ansiolíticos produzem muitos efeitos indesejáveis como amnésia, dependência, síndrome de abstinência, reação paradoxal e decréscimo da função psicomotora (SCHWEIZER; RICKELS, 1998). Diante disso, tem-se a necessidade de novos fármacos ansiolíticos com menor potencial de induzir reações adversas.

1.2. Depressão

A depressão é conhecida desde os tempos antigos, onde Hipócrates, no século V a.C., já definia a depressão sob a denominação de melancolia: “uma afecção sem febre, na

qual o espírito triste permanece sem razão fixado em uma mesma ideia, constantemente abatido” (GONÇALVES; MACHADO, 2007).

A depressão pode ser descrita como uma alteração em quatro campos do funcionamento humano: afetivo, cognitivo, comportamental e fisiológico (ALMEIDA et al., 2011), podendo ser caracterizada por tristeza, perda de interesse, ausência de prazer, angústia, medo, sentimento de culpa, inferioridade, falta de sentido da vida ou desejo de morte, além de distúrbios do sono ou do apetite (FIOCRUZ, 2015; REN et al., 2015). Estes problemas podem se tornar crônicos e gerar prejuízos substanciais na capacidade de um indivíduo de cuidar de suas responsabilidades cotidianas. Em muitos casos a depressão pode vir acompanhada de ansiedade, o que gera nos indivíduos sintomas como: tremor, palpitações, dores no estômago e náuseas (HIRSCHFELD, 2001).

Os diferentes transtornos depressivos possuem diagnóstico complexo, de modo que a caracterização de cada um deles não é simples. O estudo dos sinais e sintomas do paciente que sofre de depressão constitui-se o eixo central no sistema de classificação internacional de transtornos mentais. A classificação mais aceita e utilizada atualmente é proposta pelo DSM-5, da Associação Americana de Psiquiatria, que classifica os transtornos depressivos em transtorno disruptivo da desregulação do humor, transtorno depressivo maior, transtorno depressivo persistente (distímia), transtorno depressivo induzido por substância/medicamento, transtorno depressivo devido à outra condição médica, transtorno depressivo especificado e transtorno depressivo não especificado (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA, 2013).

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) representa a condição clássica desse grupo de transtornos, sendo caracterizado por alterações nítidas no afeto, na cognição e em funções do sistema nervoso autônomo. Para o estabelecimento do diagnóstico da depressão maior, o indivíduo deve apresentar pelo menos um de dois sintomas principais: humor deprimido ou perda de interesse ou prazer, em associação com pelos menos outros quatro sintomas, que podem ser: alterações significativas do peso sem estar fazendo dieta; insônia ou hipersonia quase todos os dias; agitação ou retardo psicomotor; fadiga ou perda de energia; sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva, entre outros. Essas mudanças devem durar pelo menos duas semanas (embora a maioria dos episódios dure um tempo consideravelmente maior) e interferir consideravelmente nas atividades profissionais e nas relações pessoais do indivíduo (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA, 2013).

1.2.1. Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde demonstra que a depressão está entre os principais distúrbios psiquiátricos. Em 2004, a depressão foi classificada em terceiro lugar no ranking como distúrbio incapacitante entre todas as idades e sexos. Hoje é a principal causa mundial de incapacitação e afeta aproximadamente 350 milhões de indivíduos em todo o mundo (KESSLER; WANG, 2009; OMS, 2016). Adicionalmente, existe um elevado índice de mortalidade associado ao suicídio, além disso, os pacientes deprimidos são mais propensos a desenvolverem doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes mellitus tipo 2 e atrofia reversível do hipocampo (VAN DER FELTZ-CORNELIS et al., 2010). O elevado risco de desenvolver esse transtorno, também está associado com a presença de condições médicas como doenças cardíacas e câncer. Além disso, a medicação usada para essas enfermidades pode produzir efeitos colaterais que podem contribuir para o desenvolvimento da depressão (PARKER; BROTHIE, 2010).

1.2.2. Fisiopatologia

A causa da depressão está relacionada com inúmeros fatores que podem abranger aspectos biológicos, socioeconômicos, doenças crônicas, gravidez, pós-parto e mudanças de ambiente, onde episódios depressivos podem ocorrer após um período estressante ou de perda (RIHMER; GONDA; DÖME, 2014).

A depressão é um transtorno multifatorial, diversas teorias são usadas para tentar explicar sua fisiopatologia. Acredita-se que a depressão resulte de anormalidades celulares e moleculares que interagem com fatores genéticos e ambientais. Sabe-se também que a doença resulta, em parte, de uma deficiência na atividade monoaminérgica no cérebro. Alterações na função do receptor/neurotransmissor e no fator neurotrófico; desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; disfunção da via do óxido nítrico; neuroinflamação e estresse oxidativo são outras hipóteses estudadas para explicar a sua fisiopatologia (CHOPRA; KUMAR; KUHAD, 2011).

A hipótese monoaminérgica da depressão surgiu em 1965 e postula que o maior processo neuroquímico envolvido na depressão é a disfunção na neurotransmissão monoaminérgica e concomitante diminuição das monoaminas (norepinefrina (NE) e/ou serotonina (5-HT)) na fenda sináptica, e também pode ser estendida para dopamina (DA) (SCHILDKRAUT, 1965).

Desta maneira a concentração de monoaminas pode ser alterada através de uma perturbação na síntese, armazenamento ou liberação, ou estes podem manter-se inalterados, mas as atividades dos receptores e/ou mensageiros intracelulares podem estar alteradas. Esta hipótese é aceita principalmente pelo fato de a maioria dos antidepressivos utilizados na clínica, aumentam os níveis de monoaminas no cérebro através da inibição da recaptação de 5-HT, NE ou DA e/ou ainda age como inibidor da enzima monoamina oxidase, enzima que biotransforma as monoaminas (PALAZIDOU, 2012).

O envolvimento do sistema serotoninérgico não participa só na neurobiologia da depressão, mas também, em alterações do comportamento (ansiedade, impulsividade, agressividade, regulação emocional). A serotonina é um neurotransmissor sintetizado a partir do aminoácido triptofano. O triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano, pela enzima triptofano hidroxilase, posteriormente, é descarboxilado, formando a 5-hidroxitriptamina ou serotonina, pela ação da L-aminoácido descarboxilase. No organismo, a serotonina pode se ligar a 14 tipos de receptores, que estão distribuídos em 7 famílias (5-HT₁ a 5-HT₇). Os fármacos que agem sobre este sistema têm sido largamente utilizadas no tratamento dos distúrbios depressivos, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, como, por exemplo, a fluoxetina, continuam sendo os fármacos mais prescritos (ANDREWS et al.; 2015; RODAN; GIBSON; PEARL, 2015).

Adicionalmente, o sistema dopaminérgico também é um importante alvo implicado nas desordens envolvendo os transtornos de humor, devido ao fato de que a função dopaminérgica reduzida também está implicada na fisiopatologia da depressão. A DA é formada na via de síntese das catecolaminas, a partir do aminoácido tirosina (GOLAN et al., 2014; RANG; DALE, 2016; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012). Estudos têm mostrado que a DA regula circuitos neuronais responsáveis pela mediação de diversos sintomas da depressão, como os circuitos do humor deprimido e as vias de recompensas mesolímbicas, que modulam os circuitos da apatia, considerada como uma característica central do transtorno, e que o efeito de antidepressivos sobre a transmissão dopaminérgica parece ser um importante fator que contribui para a eficácia da terapia antidepressiva (SHANKMAN et al., 2010).

O papel do sistema noradrenérgico na depressão também têm sido relatado na literatura. A noradrenalina (NA) é produzida a partir da DA pela ação da enzima dopamina β -hidroxilase. A ação da NA, quando liberada na fenda sináptica mediante ao impulso nervoso, se dá por meio da ativação dos adrenoreceptores localizados pós-sinápticamente (α_1 , α_2 e β) ou pré-sinápticamente (α_2 e β_2). Todos os adrenoreceptores trabalham através da interação

com proteínas G. Os receptores β estimulam a adenilato ciclase e aumentam os níveis de AMPc (adenosina monofosfato cíclico), o receptor $\alpha 1$ causa liberação de Ca^{++} intracelular, via fosfolipase. E a ativação dos receptores $\alpha 2$, de localização pré-sináptica, agem como autorreceptores, reconhecem a NA e inibe a atividade da adenilato ciclase (LIUKAITIS, 2005; SALGADO et al., 2012). Diversas evidências demonstram a participação de α -adrenoceptores e β -adrenoceptores na ação de fármacos antidepressivos. Sendo que o bloqueio de $\alpha 1$ -adrenoceptores está associado a estados depressivos, enquanto que o tratamento crônico com antidepressivos causa um aumento na densidade e na atividade de $\alpha 1$ -adrenoceptores no córtex frontal e no hipocampo (PYTKA, 2016; RODAN; GIBSON; PEARL, 2015).

As vias de estresse oxidativo também realizam um papel importante na depressão. Estudos relatam vários distúrbios oxidativos em pacientes deprimidos, incluindo dano oxidativo e diminuição dos níveis de enzimas antioxidantes. O estresse oxidativo causa danos às proteínas e ao DNA no cérebro, causando lesão e apoptose de neurônios (O'DONNELL; DO; ARANGO, 2014). Além disso, a ativação do processo de estresse oxidativo provoca peroxidação lipídica, redução da atividade antioxidante e o aumento do catabolismo de monoaminas, tudo relacionado com a fisiologia da depressão (VOLPE; PANENI, 2015).

1.3. Estresse oxidativo

Estresse oxidativo pode ser visto como um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e os radicais livres, e a habilidade da célula de se defender contra esses radicais, o que pode fornecer um processo nocivo à célula. Radicais livres são geralmente formados durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, de auto-oxidação, ou ainda, pelas espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN). As EROs são por exemplo, o radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH), e as principais ERNs são o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO^-) (APRIOKU, 2013).

O peroxinitrito (ONOO^-) é um oxidante potente que pode nitrar resíduos de tirosina de proteínas estruturais e, sob condições fisiológicas, pode reagir com outros componentes presentes em concentrações elevadas, tais como H_2O_2 , promovendo alterações na função da NADPH-oxidase. O peroxinitrito é altamente reativo, que induz a nitração da

tirosina, peroxidação lipídica, e citotoxicidade, incluindo a morte celular (ARMENTA et al., 2014).

Os radicais livres resultantes do desequilíbrio redox endógeno podem desempenhar um papel importante na determinação do estresse oxidativo, morte celular e consequentemente dano tecidual. O oxigênio reativo ocasiona a oxidação dos lipídeos de membrana promovendo a peroxidação lipídica, assim, a função e estrutura das membranas celulares são perturbadas e destruídas pela peroxidação lipídica. Esse processo gera subprodutos como aldeídos reativos que podem alterar ainda mais a sua função e, subsequentemente, provocar danos celulares. O grau de peroxidação dos fosfolipídios é determinado pelas concentrações de malondialdeído (MDA) e o método comumente aplicado é o de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (MARTINC; GRABNAR; VOVK, 2014).

As EROs e ERNs têm importante função biológica, no organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, uma produção descontrolada de EROs ou ERNs pode levar à geração de um estresse oxidativo e/ou nitrosativo (ANSCHAU; IAGUER, 2011).

O estresse oxidativo é uma característica crucial nas doenças do SNC, como doenças neurodegenerativas e outras doenças psiquiátricas (VOLPE; PANENI, 2015). Devido ao cérebro conter uma grande quantidade de lipídeos e metais oxidáveis em relação a outros tecidos, é mais sensível aos efeitos do estresse oxidativo. Para manter a produção de radicais livres em níveis aceitos para a homeostasia celular, existem alguns sistemas de defesa endógeno de enzimas antioxidantes no cérebro (MAZZETTI et al., 2015).

Os antioxidantes são capazes de neutralizar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo seus efeitos nocivos, como: o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando assim, a formação de lesões e perda da integridade celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Muitas substâncias naturais com atividade antioxidante são utilizadas para reduzir ou neutralizar radicais livres. Os antioxidantes naturais dos organismos com função enzimática são representados pelas enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione reduzida e peroxidase, são importantes por estarem associadas ao processo de detoxificação de compostos oxidantes formados nos seres vivos. Havendo produção exagerada de agentes

oxidantes nas células, são necessárias o uso de fontes exógenas para a neutralização. Diante disso, uma fonte potencialmente promissora para obtenção exógena de produtos antioxidantes são os produtos naturais, uma vez que muitos alimentos e organismos vegetais são ricos em agentes antioxidantes (TIWARI, 2011).

A glutathiona, um tripeptídeo formado a partir dos aminoácidos ácido glutâmico, cisteína e glicina, permanece no organismo em formas reduzidas (GSH) e oxidada (GSSG), agindo diretamente em processos biológicos, incluindo metabolismo e proteção celular. A glutathiona reduzida (GSH) é atualmente um dos antioxidantes mais estudados e o mais abundante no meio intracelular. Esta molécula desempenha um papel crucial no processo de desintoxicação que ocorre dentro das células. O GSH tem uma relação importante com a peroxidação lipídica devido à capacidade de tais compostos combinarem com radicais livres que podem iniciar a peroxidação lipídica, bem como peróxido de hidrogênio reduzido formado em células. (GIBLIN, 2000; MARTINC; GRABNAR; VOVK, 2014; MAZZETTI et al., 2015).

1.4. Modelos Animais para a Investigação de Possíveis Alterações Neurocomportamentais induzidas por Bioativos

A resposta emocional ao estresse, processos de aprendizado, conclusão de tarefas são atividades esperadas de um sistema nervoso intacto, o qual está vulnerável a fatores ambientais que incluem condições físicas (traumas e alterações na temperatura), bem como fatores químicos. A exposição a químicos podem resultar em efeitos neurocomportamentais dependendo da substância química em particular, as circunstâncias de exposição, duração e intensidade de exposição, bem com a susceptibilidade do organismo. Muitos ensaios neurocomportamentais têm sido utilizados por décadas para se compreender sobre as bases neurais do comportamento. Os testes de análises neurocomportamentais podem avaliar uma variedade de aspectos, incluindo funções autonômicas, neuromusculares, sensitivas e excitatórias (MOSER, 2001).

Os modelos animais de avaliação neurocomportamental têm sido caracterizados em três classes: modelos animais de distúrbios clínicos, bioensaios comportamentais e teste de *screening* comportamentais (WILLNER, 1991). Entre eles, o *screening* neurocomportamental têm sido utilizado para avaliar o impacto de fármacos em comportamentos específicos, os quais estão envolvidos em distúrbios comportamentais de interesse, como a ansiedade e a depressão (TECOTT; NESTLER, 2004).

Uma grande variedade de modelos têm sido empregado no esforço de se avaliar comportamentos ansiogênicos ou ansiolíticos em roedores. Entre os testes mais comuns estão a caixa claro-escuro, o enterramento de esferas, o labirinto em cruz elevada, a placa perfurada e a observação de alguns parâmetros do campo aberto. Alguns destes procedimentos são baseados na aversão inata de roedores a espaços abertos, elevados, iluminados e no comportamento exploratório natural em resposta a novos ambientes (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; RAUPP et al., 2008).

Estes testes geram uma situação de conflito nos roedores entre o comportamento exploratório e a tendência inicial de se evitar um ambiente não familiar (neofobia), e são classificados como testes de conflito não-condicionados, uma vez que aferem dados a partir do comportamento natural dos animais, sem exigir treinamento, privação alimentar ou dor antes da execução do teste (GRAEFF; GUMARÃES, 2012).

Os modelos animais de depressão mais utilizados são os testes de nado forçado e suspensão da cauda. Esses modelos são baseados na exposição do animal a condições estressantes, situações ameaçadoras onde o animal entra em desespero comportamental, tendendo a assumir uma postura imóvel (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005; STERU et al., 1985).

O uso de modelos animais permite uma investigação científica do comportamento de processos e mecanismos fisiopatológicos envolvidos no controle de comportamentos normais e anormais (HOLMES, 2003; MATTHEWS et al., 2005; OVERMIER, 1999; PETERS; SOMMER, 2000; RODGERS et al., 1997). Por este motivo, modelos animais de avaliação de alterações neurocomportamentais são importantes em todas as áreas de pesquisas biomédicas.

1.5. Plantas e produtos naturais

Durante séculos, produtos naturais, particularmente plantas, foram usadas para controlar e tratar doenças e isso culminou na descoberta da maioria dos modernos agentes farmacêuticos. A utilização desses produtos é tão antiga quanto à civilização humana, registros da prática farmacêutica de antigos egípcios foram datadas em "Ebers Papyrus", e é de aproximadamente 1550 a.C. O papiro, que descreve mais de 700 fármacos, principalmente de origem vegetal, detalha diferentes formulações farmacêuticas, sendo comumente utilizados como veículos (CRAGG; NEWMAN, 2013). Além disso, a documentação do conhecimento

desempenha um papel fundamental na bioprospecção de plantas medicinalmente valiosas (PARIMELAZHAGAN, 2016).

Nos últimos anos, tem crescido o interesse de produtos naturais para o uso terapêutico, algumas plantas medicinais descritas, são até hoje, relevantes na medicina moderna. Embora alguns materiais vegetais já não sejam utilizados como medicamentos, continuam a ser importantes fontes de princípios ativos purificados que se tornaram fundamentais para a terapia moderna (LALL; KISHORE, 2014; TABASSUM; HAMDANI, 2014). Os produtos naturais são estruturalmente diversos e servem como fonte de estudo no desenvolvimento de novos fármacos (SCHUFFENHAUER; VARIN, 2011). Portanto, acredita-se que os produtos naturais têm essa vantagem em relação aos grandes compostos sintéticos (HARVEY et al., 2010).

Segundo Ferreira e colaboradores (2014), a Organização Mundial da Saúde tem incentivado o uso de terapias alternativas juntamente com conhecimentos técnicos, a mesma afirma que cerca de 85% da população mundial, usa plantas medicinais para propósitos terapêuticos.

Apesar da vasta utilização da fitoterapia como terapia alternativa, o uso clínico de medicamentos obtidos de plantas ainda é limitado, estima-se que somente 6% de aproximadamente 300.000 espécies de plantas têm sido investigadas farmacologicamente e cerca de 15% investigadas quimicamente (CRAGG; NEWMAN, 2013). Porém, há vários relatos na literatura de atividades farmacológicas de plantas, que contribuem para um avanço da investigação científica e para o desenvolvimento de uma visão crítica sobre o uso da fitoterapia (ANTONIO et al., 2014).

Dentre esses relatos podemos citar estudos envolvendo a aplicação de espécies vegetais para tratar enfermidades, tais como: bronquite, distúrbios digestivos (BENARBA et al., 2015; CHERMAT et al., 2015), doenças do trato respiratório (BENARBA et al., 2015), hematomas (TUTTOLOMONDO et al., 2014), inflamações urinárias (ÖZDEMIR; ALPINAR, 2015), psoríase (DENG et al., 2014), depressão (PIRES; FREITAS; RODRIGUES, 2013). A crescente busca por agentes terapêuticos derivados de plantas justifica-se pela quantidade de doenças ainda sem tratamento efetivo e pelo reconhecimento científico de fitofármacos como importantes alternativas terapêuticas. Esses estudos podem auxiliar na obtenção de dados para uma maior segurança farmacológica e, assim, menos efeitos adversos (RAMOS; DUARTE; JIMENEZ, 2015).

1.5.1. Considerações sobre o gênero *Stemodia*.

Stemodia é um gênero da família Scrophulariaceae, representado por cerca de 150 espécies distribuídas na Ásia, África, Austrália e América. No Brasil, são predominantes 16 destas essas espécies. Recentemente, pesquisas taxonômicas com base em dados genéticos e moleculares, para este gênero, em conjunto com outros gêneros, como *Bacopa*, *Deinostema*, *Digitaris*, *Dopatrium*, *Ellisiophyllum*, *Hemiphragma*, *Limnophila*, *Mecardonia*, *Microcarpaea*, *Scoparia*, *Veronica* e *Veronicastrum*, foram transferidos para a família Plantaginaceae. Este é um problema que o avanço científico vem tentando contornar. Com o advento de ferramentas moleculares, a identificação e posicionamento de muitas espécies estão sendo reclassificadas. (CHAMY et al., 1991; ZIPCODEZOO, 2015; FLORA DO BRASIL, 2017).

Esse gênero apresenta planta do tipo herbácea, perene, com cerca de 50 cm de altura. Possui folhas simples, sésseis, com filotaxia opostas cruzadas e presença de tricomas. As flores são isoladas, pedunculadas, de coloração lilás, dispostas em número de 2 ou 3 flores nas inserções foliares, ao longo de todo ramo. Os frutos são marrons e permanecem aderidos à planta por várias semanas após a maturação das sementes.

O estudo químico das espécies de *Stemodia* tem apresentado algumas classes de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, flavonoides, triterpenos esteroidais e curcubitacinas, geralmente glicosilados, e com predominância de diterpenos com esqueleto do tipo estemodano, labdano, abietano e bisepóxido (RODRIGUES et al., 2010; ALLEN et al., 2006; SILVA; SILVEIRA; PESSOA, 2010; SILVA et al., 2008).

1.5.1.1. *Stemodia maritima* Linn.

Stemodia maritima L. (Figura 1), encontrada na parte norte da América do Sul e na maioria das ilhas do Caribe, é conhecida como “a força do homem pobre”, por ser usada como remédio para tratar vários tipos de doenças do corpo, como dor de estômago, edema e inchaço (WHITE; SOMERS, 1994). No Nordeste brasileiro é conhecida popularmente como “melosa ou meladinha” e ocorre principalmente em áreas salinizadas (SILVA et al., 2006; MOREIRA; BRAGANÇA, 2011). Diversas atividades biológicas são relatadas para seus compostos, tais como: atividade antioxidante, antimicrobiana, antiviral e anticâncer (HUFFORD et al., 1991; SILVA et al., 2014).

Figura 1 - *Stemodia maritima* L.



Fonte: Zipcodezoo, 2015. Foto de Alex Popovkin.

O estudo químico de *Stemodia maritima* Linn. proporcionou um conhecimento de oito compostos naturais, são esses: jaceidina, estemodinol, estemodina, estemodinosídeo, isocrenatosídeo, crenatosídeo, isoverbascosídeo e verbascosídeo. No Sm são relatados seis, destes oito compostos, excetuando-se o isoverbascosídeo e verbascosídeo, apenas relatado nas raízes de *Stemodia maritima* (SILVA et al., 2014).

A Jaceidina, já conhecida na literatura pelo seu teor antioxidante (ALJANCIC et al., 2010), é uma flavanona descrita em Sm, além de antioxidante, jaceidina demonstra atividade antibacteriana (ALLISON et al., 2017).

A Estemodina e o Estemodinosídeo apresentam atividade antibacteriana, onde o primeiro relato foi feito por Silva e colaboradores (2014). Os diterpenóides do tipo estemodanes despertam interesse há anos, porque possuem uma estrutura esquelética semelhante à de Aphidicolin - o potente agente antiviral, antitumoral e fitotóxico - isolado de fermentações do fungo *Cephalosporium Aphidicola*. Estemodinosídeo apresenta atividade antibacteriana contra *Klebsiella pneumonia* e *Listeria monocytogenes*. Muitas substâncias produzidas a partir de Estemodina por biocatálise também demonstram atividades antivirais, bem como atividade inibidora da peroxidação de lípidos e ciclooxigenase 1 e 2 (RUSSELL et al., 2011).

Crenatosídeo e isocrenatosídeo apresentam atividade antiviral, inibindo seletivamente a neuraminidase (propriedades dos glicoproteínas localizadas na superfície do

vírus influenza). Neuraminidases são cruciais para a replicação e infecciosidade do vírus. Além disso, pode facilitar o estágio de infecção pelo vírus influenza para as células epiteliais pulmonares (CHEN et al., 2016). Silva (2014) demonstrou em seu estudo que o crenatosídeo também possui alto potencial antioxidante *in vitro* quando comparado a vitamina C, pelo bioensaio de inibição de DPPH.

Portanto, a literatura demonstrou vários efeitos dos constituintes existentes no extrato etanólico de *Stemodia maritima*, entre eles bioativos antioxidantes e anti-inflamatórios, contudo não foram encontrados trabalhos que tenham verificado efeitos centrais desse extrato, desse modo, após *screening* neurofarmacológico, hipotetizamos que esse extrato apresenta modulação no Sistema Nervoso Central de camundongos contra ansiedade, depressão e o estresse oxidativo.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar os efeitos do extrato etanólico de *Stemodia maritima* no Sistema Nervoso Central, em modelos experimentais de Ansiedade e Depressão em camundongos, em um tratamento subcrônico.

2.2. Específicos

-Identificar os possíveis efeitos neurocomportamentais do extrato de *S. maritima* em camundongos;

-Avaliar possíveis alterações fisiológicas indicativas de toxicidade em camundongos;

-Investigar se *S. maritima* interfere na atividade locomotora espontânea de camundongos;

-Analisar os efeitos da administração subcrônica de *S. maritima* em camundongos submetidos a modelos comportamentais de ansiedade (labirinto em cruz elevado; placa perfurada) e depressão (nado forçado; suspensão da cauda);

-Investigar o envolvimento do sistema noradrenérgico no tratamento subcrônico com *S. maritima* em modelos de ansiedade e depressão.

-Avaliar o efeito de *S. maritima* em alterações neuroquímicas (níveis de nitrito/nitrato; peroxidação lipídica e glutatona reduzida) no córtex pré-frontal (CFP), corpo estriado (CE) e hipocampo (HC) de camundongos submetidos ao modelo de Ansiedade e Depressão;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Botânico

As folhas de *Stemodia maritima* Linn. foram coletadas em Flexeiras no município de Trairi – Ce, pela equipe do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará – UFC, sob orientação da Professora Dra. Angela Martha Campos Arriaga. A identificação botânica dessa espécie foi realizada pelo professor Edson P. Nunes, do Departamento de Biologia da UFC. Sua exsiccata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra do mesmo departamento, sob o número de registro 38.483.

A extração foi realizada pela doutoranda Francisca Renata Lopes da Silva, conforme descrito a seguir: as folhas (830 g) de *S. maritima* foram trituradas, secas e submetidas à extração com etanol à temperatura ambiente. A solução obtida foi filtrada e evaporada à pressão reduzida em rota-evaporador, resultando no extrato denominado Sm (65,4 g) com 7,88% de rendimento. Uma alíquota de Sm, foi cedido gentilmente pela Profa. Dra. Angela Martha Campos Arriaga para realização desse estudo, e outra parte está sendo utilizada para estudo químico por métodos cromatográficos, para separação, identificação e modificação de seus constituintes químicos, que constituem o tema de tese de doutorado de Francisca Renata Lopes da Silva do Programa de Pós-graduação em Química da UFC.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss (Mus musculus albinus)* adultos, machos, com peso entre 25-35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e encaminhados ao *Campus* Sobral. Os animais foram mantidos na Hospedaria da UFC em caixas de polipropileno com no máximo 6 animais, em condições ambientais semelhantes, com temperatura média de $24 \pm 2^\circ \text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água a vontade.

3.2.1. Aspectos Éticos

Os protocolos experimentais seguiram de acordo com o “Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório” da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de

Laboratório (SBCAL). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais.

O projeto com as metodologias utilizadas nesse trabalho foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*, com o número de protocolo de aprovação 15/15 (ANEXO A).

3.3. Drogas e Reagentes

Tabela 1 - Drogas utilizadas na metodologia.

Drogas/Reagentes	Origem
Cloridrato de Imipramina	Cristália
Cloridrato de Prazosina	Minipress®, Pfizer
Diazepam	União Química Brasil
Dimetil Sulfóxido (DMSO)	Sigma Chemical., Co.,USA
Extrato de <i>Stemodia maritima</i>	Laboratório de Química Orgânica e Inorgânica - UFC

Fonte: Autora.

3.4. Preparo das drogas e via de administração

A Sm foi dissolvida em Dimetil Sulfóxido a 5% (DMSO 5%), administrados via intraperitoneal (i.p.), a via foi escolhida com base nos tratamentos de extrato etanólico encontrados na literatura (RABIEI et al., 2013). Foram utilizadas as doses de Sm: 2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg, selecionadas a partir de estudos de *screening* realizados no laboratório de Fisiologia e Neurociências da UFC – *Campus Sobral*. Os grupos controles receberam veículo (DMSO 5% i.p.). As demais drogas utilizadas foram dissolvidas diretamente em água destilada e administradas via i.p. e/ou oral. Todas as substâncias foram administradas em um volume de 0,1 mL/10 g de peso do animal.

3.5. Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos (n=6) e tratados com Sm, nas doses de 2,5 (Sm2,5); 5 (Sm5); 10 (Sm10) e 20 (Sm20) mg/Kg (i.p.), durante 14 dias. Durante o período de tratamento os animais foram pesados diariamente e o volume administrado foi de acordo com o peso de cada animal. Os testes comportamentais foram realizados no 14º dia de tratamento, 30 minutos após o tratamento com Sm e/ou veículo e 30 minutos após o tratamento com as demais drogas.

Como padrão de drogas antidepressivas, foi utilizado Imipramina (IMI) 10 e 30 mg/Kg (i.p), nos testes de Nado Forçado e Suspensão da Cauda, respectivamente. Diazepam (DZP), na dose de 1 mg/Kg (i.p.) foi utilizado como droga padrão para os testes de Placa Perfurada e Labirinto em Cruz Elevada, DZP 2 mg/Kg (i.p.) para o teste de Campo Aberto. Ainda foi utilizado Prazosina (PRA) na dose de 1 mg/Kg via oral (v.o.), nos testes de Nado Forçado e Suspensão da Cauda, para avaliar o envolvimento do sistema noradrenérgico.

3.6. Protocolo experimental

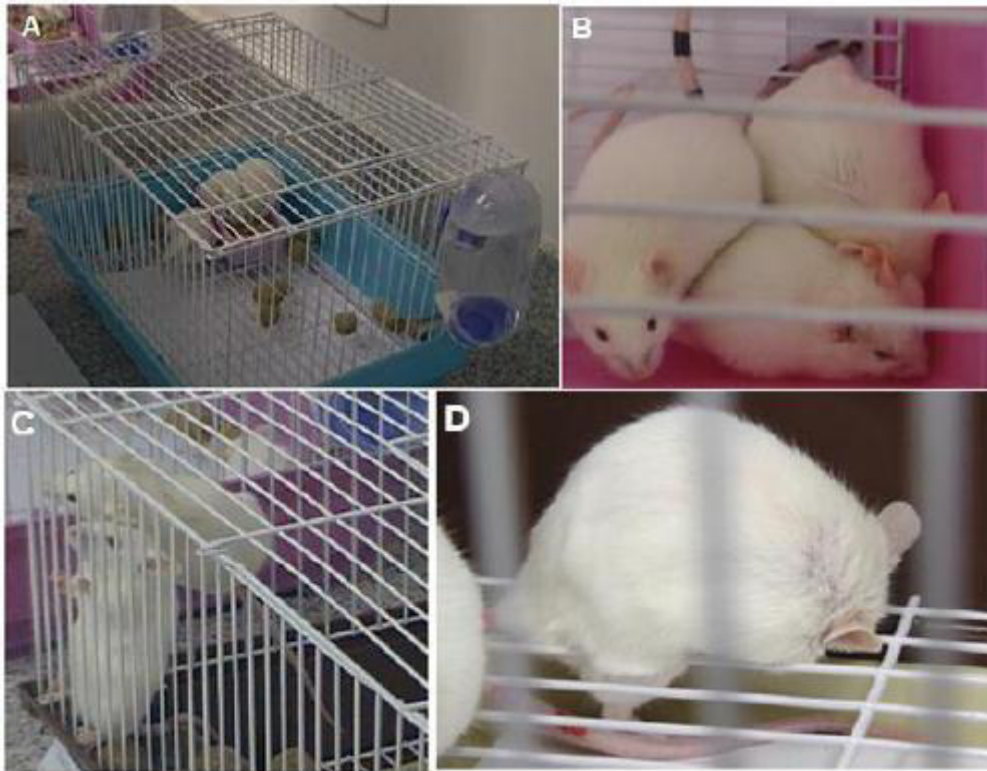
Os experimentos comportamentais foram realizados entre 10:00 e 15:00 horas, em dias distintos, onde os animais foram observados em um ambiente fechado, desprovido de barulhos externos e com temperatura constante ($24 \pm 1^\circ\text{C}$). Para o teste de campo aberto e labirinto de Cruz elevada, foi utilizado uma iluminação de baixa densidade (luz vermelha de 15 W). Os demais ensaios foram realizados com iluminação normal. Em todos os testes com exceção da suspensão da cauda e nado forçado, após a observação de cada animal foi utilizado álcool 10% para a remoção de resíduos e odor deixados pelo animal. Grupos de animais foram utilizados apenas uma vez nos testes de Campo aberto, Labirinto em Cruz elevado e Placa perfurada, respectivamente. E outros grupos animais foram utilizados para os testes de Suspensão da Cauda e Nado Forçado, respectivamente. Outros animais ainda foram utilizados para as análises preliminares.

3.7. Análises neurocomportamentais e fisiológicas preliminares

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=3 per grupo), os quais foram tratados uma única vez com Sm (1; 10 e 100 mg/Kg, i.p.) ou veículo (DMSO 5% i.p.) e alocados em gaiolas para observações de possíveis alterações neurocomportamentais e fisiológicas nos períodos de 0-5, 15 e 30 minutos, e 1, 2, 4 e 24 horas após a administração,

de acordo como descrito por Carlini (1972) (Figura 2). Após 24 horas, os animais foram sacrificados e, em seguida, fígado, rins e coração foram removidos para análise de uma possível alteração na massa úmida.

Figura 2 - Análise neurocomportamental.



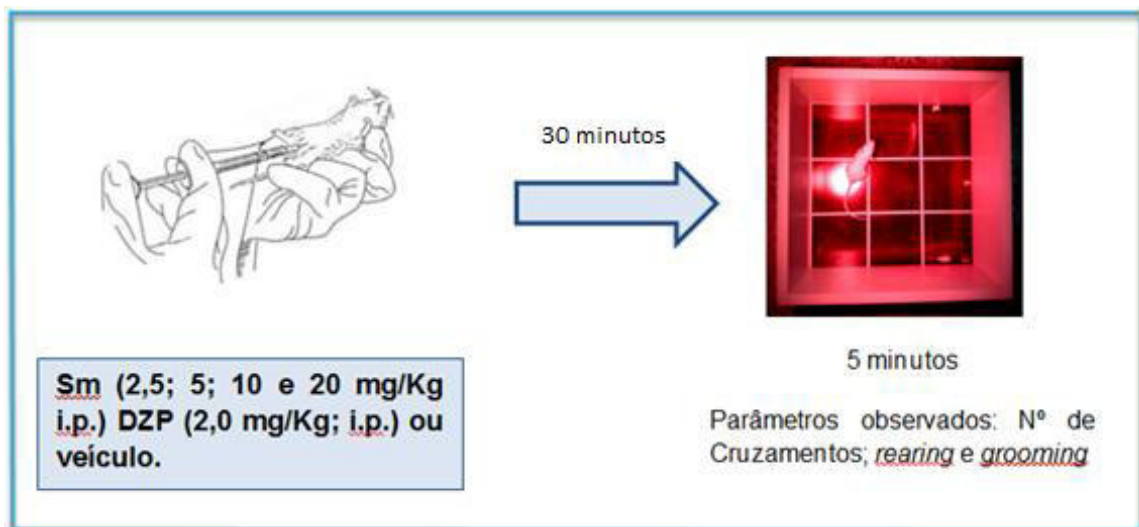
Fonte: Frota, 2015. **Legenda:** Camundongos foram colocados em gaiolas apropriadas para observação dos parâmetros (A), segundo Carline (1972), como: Permanência nos cantos (B), Escalção (C), Sonolência (D).

3.8. Modelo Experimental da Atividade Locomotora

3.8.1. Teste do Campo Aberto (*Open field test*)

Este teste, baseado na metodologia descrita por Sielgel (1946) e validada por Archer (1973), é utilizado para analisar a atividade exploratória do animal. Consiste numa caixa de madeira com piso preto (30 x 30 x 15 cm) dividido em nove quadrantes iguais. Os animais foram submetidos ao campo aberto após 30 minutos do tratamento, os parâmetros avaliados foram: número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), número de levantamentos sob as patas traseiras (*rearing*), número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*), registrados no tempo de 5 minutos (Figura 3). Além dos grupos tratados com Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg i.p.) e veículo (DMSO 5%), um grupo foi tratado com DZP (2 mg/Kg; i.p.) como controle positivo.

Figura 3 - Teste do Campo aberto.



Fonte: Autora.

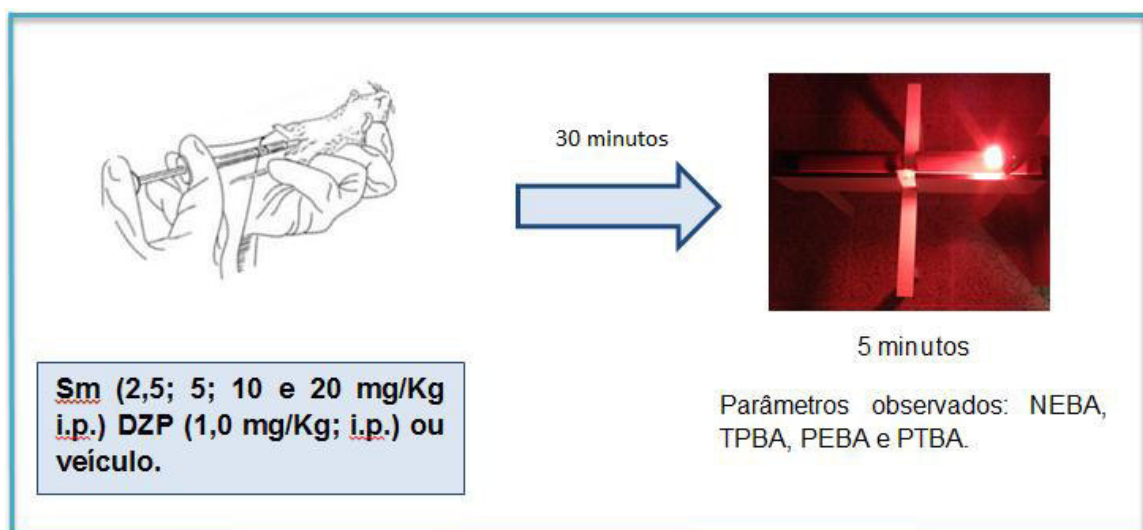
3.9. Modelos Experimentais da Atividade Ansiolítica

3.9.1. Teste de Labirinto em Cruz Elevado (*Plus maze test*)

Este teste foi descrito inicialmente por Pellow e colaboradores (1985) e, adaptado para camundongos por Lister (1987), é utilizado como ensaio comportamental para avaliar possíveis efeitos ansiolíticos de agentes farmacológicos, bem como para auxiliar na determinação de regiões cerebrais e mecanismos envolvidos no comportamento relacionado com a ansiedade. Consiste em uma junção de quatro braços elevados a 45 centímetros do chão, consistindo de dois braços abertos (30 x 5 cm) (sem paredes, deixando os animais expostos ao meio) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm) (com paredes, servindo com um abrigo seguro para o animal) perpendiculares, os quais são quantificados o percentual relativo ao número de entradas do animal em cada braço (WALF; FRYE, 2007).

Os animais foram colocados no centro da junção dos braços, para avaliação dos parâmetros comportamentais, que foram: número de entradas (NEBA) e tempo de permanência (TPBA) nos braços abertos e percentagem do número de entradas (PEBA) e do tempo de permanência (PTBA) nos braços abertos (Figura 4). Cada animal foi analisado no referido teste por um período de 5 min. Além dos grupos tratados com Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg i.p.) e veículo (DMSO 5%), um grupo foi tratado com DZP (1 mg/Kg; i.p.) como controle positivo.

Figura 4 - Teste de Labirinto em Cruz Elevado (*Plus maze test*).

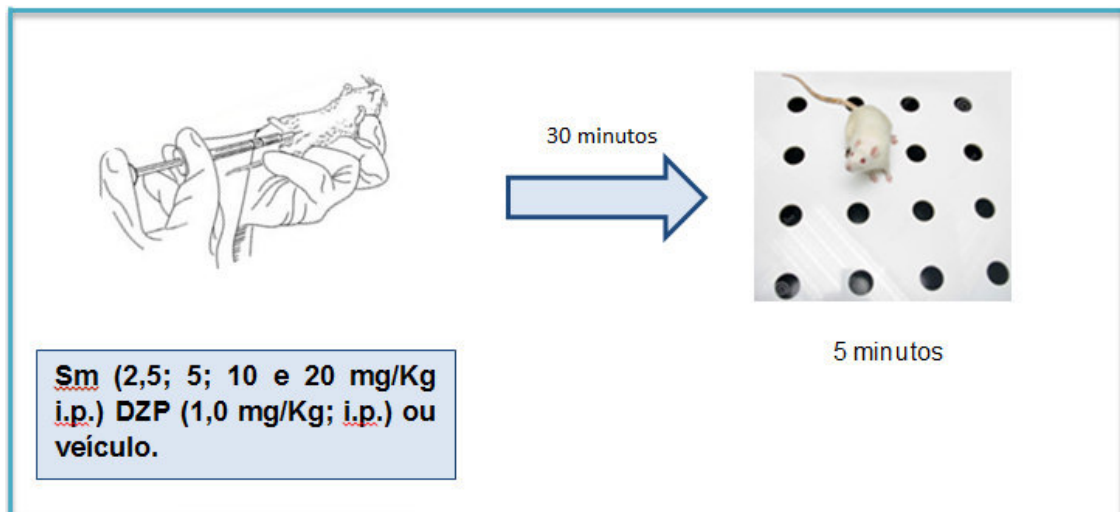


Fonte: Autora.

3.9.2. Teste da Placa Perfurada (*Hole board test*)

O teste da Placa Perfurada foi utilizado para determinar a ação de bioativos no comportamento exploratório e, em especial no aprendizado. O aparato utilizado consiste em uma plataforma plana com orifícios, pelos os quais os camundongos podem colocar suas cabeças a fim de explorar o ambiente (*head dips*) (CLARK et al., 1971). Através da análise da quantidade de vezes do animal em colocar a cabeça nos orifícios, bem como pelo tempo de permanência da mesma, é possível avaliar drogas quanto a possíveis efeitos psicotrópicos (DHARA; PAL; NAG CHAUDHURI, 2002). Deste modo, buscou-se utilizar o teste da Placa Perfurada para avaliar os efeitos de Sm na atividade exploratória de camundongos. Após 30 minutos do tratamento, os animais foram submetidos a placa perfurada para avaliação dos parâmetros comportamentais (Figura 5). Além dos grupos tratados com Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg i.p.) e veículo (DMSO 5%), um grupo foi tratado com DZP (1 mg/Kg; i.p.) como controle positivo. Cada animal foi analisado no referido teste durante de 5 min.

Figura 5 - Teste da Placa Perfurada (*Hole board test*).



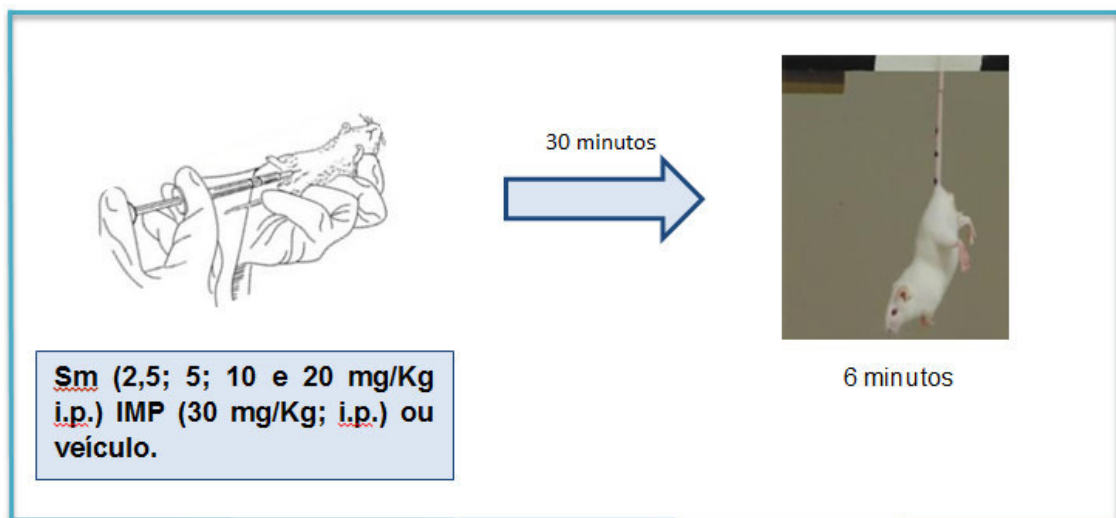
Fonte: Autora.

3.10. Modelos Experimentais da Atividade Antidepressiva

3.10.1. Teste da Suspensão da Cauda

O teste da suspensão da cauda é um dos modelos clássicos utilizado para avaliar os efeitos antidepressivos de uma droga (STERU et al., 1985). Os animais foram suspensos por cerca de 1 cm a partir da ponta da cauda, por uma fita adesiva numa plataforma a 45 cm de altura. Foi analisado a duração da imobilidade dos animais durante 6 minutos (Figura 6). Esse modelo tem validade preditiva, uma vez que drogas com atividade antidepressiva utilizadas na terapia da depressão em humanos diminuem o tempo de imobilidade de camundongos nesse teste (STERU et al., 1985; CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). Além dos grupos tratados com Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg i.p.) e veículo (DMSO 5%), um grupo foi tratado com IMP (30 mg/Kg; i.p.) foi utilizada como droga-padrão para a confiabilidade do teste.

Figura 6 - Teste de Suspensão da Cauda.

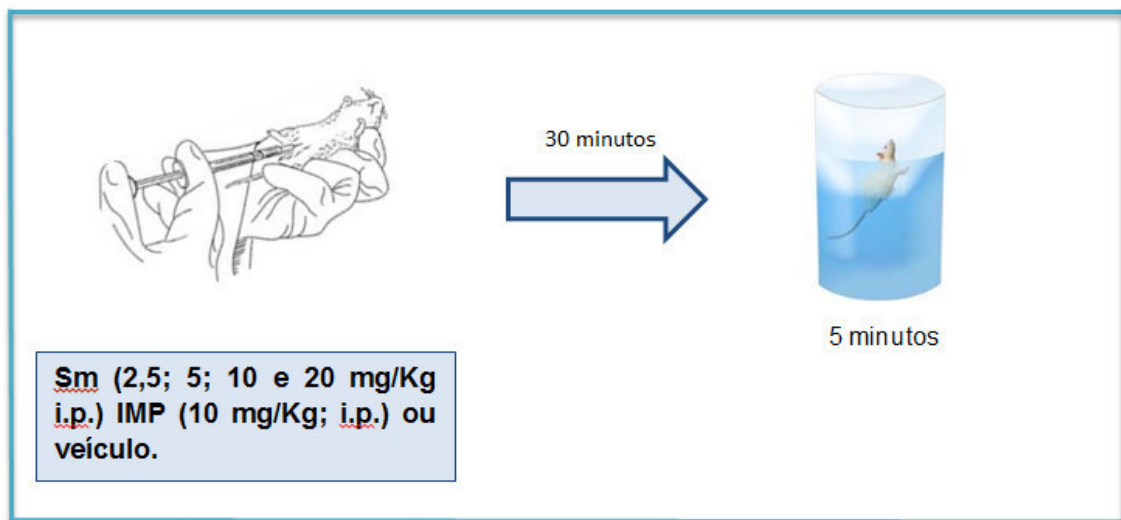


Fonte: Autora.

3.10.2. Teste do Nado Forçado

O teste consiste em uma exposição do animal a um tanque (22 cm de diâmetro por 40 cm de altura) com água (25 °C) até a metade, cerca de 20 cm, por 5 minutos, onde é avaliado a duração de imobilidade de cada animal. Este teste consiste em avaliar uma possível atividade antidepressiva induzida por drogas, seguindo a metodologia descrita por Porsolt et al. (1978) (Figura 7). Os animais foram submetidos ao teste 30 minutos após o tratamento com IMP (10 mg/Kg; i.p.), Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg i.p.) e veículo (DMSO 5%).

Figura 7 - Teste de Nado Forçado.



Fonte: Autora.

3.11. Avaliação do Envolvimento do Sistema Noradrenérgico na Atividade Antidepressiva

Para avaliar a participação do Sistema Noradrenérgico no efeito antidepressivo, os animais foram pré-tratados com um antagonista do receptor adrenérgico α_1 , Prazosina (PRA 1 mg/Kg), via oral (v.o.), trinta minutos antes do tratamento com Sm (20 mg/Kg); Veículo ou IMP (10 e 30 mg/Kg). Após trinta minutos do último tratamento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de Nado Forçado ou Suspensão da Cauda.

3.12. Dissecação das Áreas Cerebrais

No 14º dia, após os testes comportamentais, os animais foram devidamente sacrificados por descolamento cervical e, logo em seguida, os encéfalos foram retirados e colocados sobre papel alumínio e gelo. Em seguida o hipocampo (HC), o corpo estriado (CE) e o córtex pré-frontal (CFP), foram isolados das estruturas circunjacentes por divulsionamento. Após a dissecação, cada área foi pesada e armazenada separadamente em papel alumínio a -80 °C para posteriores análises neuroquímicas.

3.13. Análises Neuroquímicas

3.13.1. Determinação dos Níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS)

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais (HC; CE e CFP), foi medido através da determinação das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990), seguindo o protocolo a seguir.

Os tecidos cerebrais foram homogeneizados a 10% em tampão fosfato 150 µM (pH 7,4). Após homogeneização, sessenta e três microlitros (63 µL) do homogenato foram adicionadas em microtubos tipo eppendorf, seguido da adição de 100 µL de ácido perclórico a 35%. As amostras foram centrifugadas a 14000 g durante 15 minutos a 4 °C. Em seguida, 150 µL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para novos microtubos e adicionado 50 µL de ácido tiobarbitúrico a 1,2%. A mistura foi levada ao banho de água fervente (95°C/30 min). Após as amostras esfriarem, foram colocadas em uma placa de 96 poços para leitura em Elisa (535 nm). Os resultados foram expressos em micromol de malondialdeído (MDA) por mg de tecido.

3.13.2. Determinação da Concentração de Nitrito/Nitrato

Para a determinação da produção de Nitrito/Nitrato, primeiramente foi preparado uma curva padrão. Para isso, foram pesados 6,9 mg de NaNO₂ e dissolvidos em 10 mL de água destilada (estoque-10 µM) e feitas as diluições em série (10 e 20 x), ficando 1 µM, 100 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,625 µM, 0,312 µM. Foi realizada uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN; TANNEMBAUN; GOLDMAN,

1981). Para a determinação da concentração de nitrito em cada tecido, foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% (em tampão fosfato 150 mM (pH 7,4). Uma alíquota de 200 µL dos homogenatos foi centrifugada (11000 x g, 15 min). Após centrifugação, 100 µL de sobrenadante foram coletados e a produção de óxido nítrico (NO) determinada através da reação de Griess. Foi incubado 100 µL do sobrenadante com 100 µL do reagente de Griess [sulfanilamida 1 % em H₃PO₄ 1 %/ *N*-(-1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1 %/ H₃PO₄ 1 %/ diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em equipamento de Elisa a 540 nm. A concentração de nitrito (µM) será determinada a partir de uma curva padrão de NaNO₂.

3.13.3. Determinação da Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

A glutathiona é o maior agente antioxidante produzido por células animais, o qual pode ser encontrado em sua forma oxidada (GSSG) ou reduzida (GSH) (SCHOLZ et al., 1964). A determinação da concentração de GSH baseia-se na reação do reagente de Ellman (5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico.

Inicialmente preparou-se o homogenato a 10% em EDTA 0,02 M, em seguida foi retirado 400 µL desse homogenato e adicionado 320 µL de água destilada e mais 80 µL de ácido tricloracético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000 g por 15 minutos. Em seguida, foi recolhido 400 µL do sobrenadante e acrescido 800 µL de tampão Tris-HCL 0,4 M (pH 8,9) e mais 20 µL de DTNB (0,01 M) e após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412 nm através de um espectrofotômetro. A concentração de glutathiona reduzida foi expressa em nanogramas de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão. A curva padrão foi construída a partir da solução padrão de GSH (1 mg/mL), a qual foi preparada em triplicata de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tubo das soluções de GSH foi acrescentado de 4 mL de tampão Tris HCl 0,4 M (pH 8,9). Para a determinação da equação da curva padrão de GSH, foi adicionado ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (0,01 M) e após 1 minuto feito a leitura da coloração em 412 nm (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

3.14. Análise Estatística

Todos os valores numéricos foram apresentados com erro padrão da média (EMP) e submetidos a análises de diferenças estatísticas. Utilizou-se a análise de variância (*one-way* ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Foram considerados os valores $p < 0,05$ como estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 6.0 (San Diego, CA, EUA). Adicionalmente, todos os experimentos foram realizados por observadores “cegos”.

4. RESULTADOS

4.1. Análises Neurocomportamentais e Fisiológicas Preliminares

De acordo com as análises preliminares, os resultados sugerem que Sm, nas doses de 1; 10 e 100 mg/Kg, apresentam efeitos neurocomportamentais similares. Foram observados efeitos indicativos de ação no Sistema Nervoso Central, tais como: diminuição da atividade motora; tremor; piloereção; ptose palpebral; *grooming* excessivo e sonolência. Todas as doses foram relacionadas com o grupo controle, tratado com Veículo (DMSO 5%), como mostra a tabela 2.

Nenhuma alteração fisiológica significativa foi encontrada, em relação à atividade renal (micção) e do cólon (defecação), bem como nas massas úmidas dos órgãos analisados (fígado, rins e coração), quando comparados ao grupo controle (Tabela 3).

Tabela 2 - Análises neurocomportamentais preliminares.

Grupos	Efeitos comportamentais observados
Veículo (i.p.)	Alterações comportamentais não significativas.
Sm 1 mg/Kg (i.p.)	Diminuição da atividade motora de 30 min a 4 ^a h; Permanência nos cantos a partir dos 30 min após administração; Tremor nos primeiros 15 min; Piloereção a partir dos 30 min; Ptose palpebral semi-parcial e total a partir da 2 ^a h; <i>Grooming</i> excessivo nos primeiros 15 min; (em relação ao grupo Veículo).
Sm 10 mg/Kg (i.p.)	Diminuição da atividade motora de 15 min a 4 ^a h; Permanência nos cantos a partir dos 30 min após administração; Tremor na 24 ^a h; Piloereção a partir dos 30 min; Ptose palpebral semi-parcial ou parcial a partir da 4 ^a h; Redução do tônus muscular de 15 min a 2 h, após administração; Sonolência a partir da 4 ^a h; (em relação ao grupo Veículo).
Sm 100 mg/Kg (i.p.)	Diminuição da atividade motora; Permanência nos cantos; Piloereção no 30 ^o min e a partir da 2 ^a h; Ptose palpebral semi-parcial na 2 ^a h; Sonolência dos 30 min a 2 ^a h; (em relação ao grupo Veículo).

Fonte: Autora. **Legenda:** Os camundongos (n=3) foram tratados com Sm (1; 10 e 100 mg/Kg i.p.) e observados segundo os parâmetros neurocomportamentais de Carlini (1972), durante os primeiros 5 minutos, e, posteriormente nos tempos de 15, 30, 60 min e 2, 4 e 24 h.

Tabela 3 - Análises fisiológicas preliminares.

Grupos	Micção (número de vezes) Média \pm EPM	Defecação (número de bolos fecais) Média \pm EPM	Fígado (massa úmida - g) Média \pm EPM	Rins (massa úmida -g) Média \pm EPM	Coração (massa úmida - g) Média \pm EPM
Veículo	2,66 \pm 0,66	89,3 \pm 68,3	1,34 \pm 0,18	0,46 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01
Sm 1	1,33 \pm 0,33	73,3 \pm 60,3	1,29 \pm 0,04	0,49 \pm 0,02	0,23 \pm 0,03
Sm 10	1,43 \pm 0,37	63,4 \pm 23,3	1,12 \pm 0,08	0,38 \pm 0,03	0,17 \pm 0,01
Sm 100	1,33 \pm 0,33	57,6 \pm 47,1	1,15 \pm 0,08	0,38 \pm 0,03	0,16 \pm 0,01

Fonte: Autora. **Legenda:** Os camundongos (n=3) foram tratados com Sm (1; 10 e 100 mg/Kg; i.p.) e contabilizados os bolos fecais e sinais de micção segundo Carlini (1972), durante os primeiros 5 minutos, e, posteriormente nos tempos de 15, 30, 60 min e 2, 4 e 24 h. Após 24^a h os camundongos foram sacrificados e dissecados fígado, rins e coração e obtidos sua massa úmida em gramas.

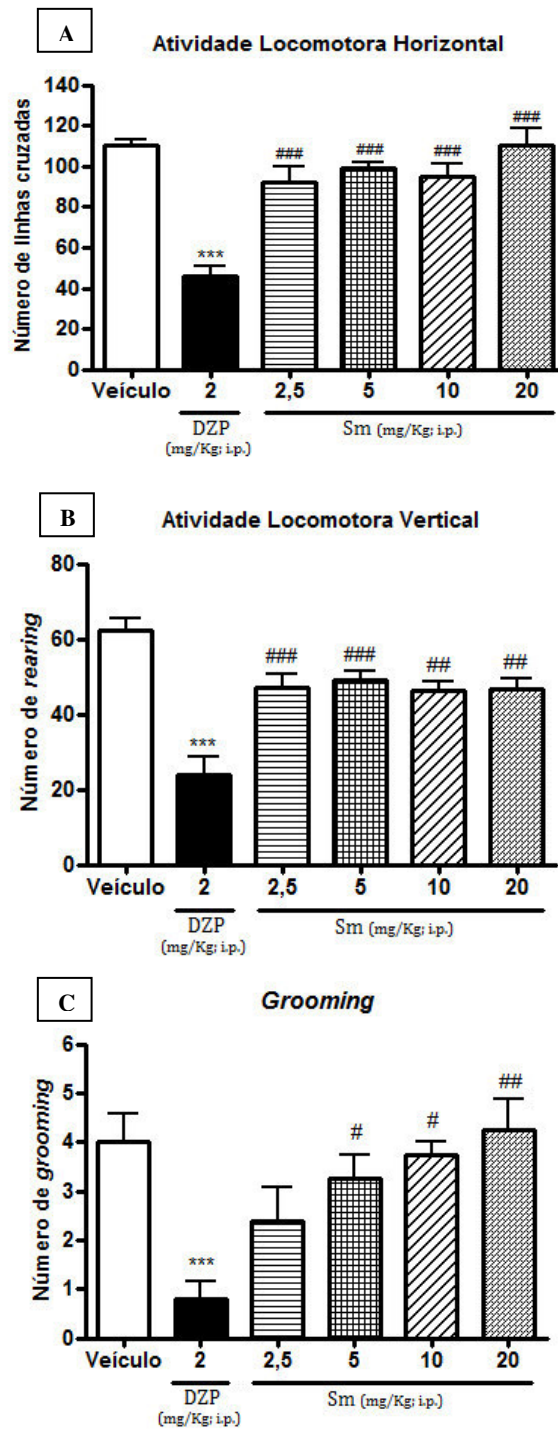
4.2. Avaliação da Atividade locomotora

4.2.1. Teste do Campo Aberto (*Open field test*)

Os parâmetros avaliados no teste de Campo aberto foram: atividade locomotora espontânea horizontal, expressa em número de cruzamentos; atividade locomotora vertical (*rearing*) e atividade de auto-limpeza (*grooming*). Observou-se que o DZP, usado como droga padrão, reduziu em 59% o número de cruzamentos, 62% o número de *rearing* e 75% o número de *grooming* (DZP Cruzamento: $45,8 \pm 4,8$; *rearing*: $23,8 \pm 4,9$; *grooming*: $1,0 \pm 0,57$), respectivamente em relação ao grupo controle (Veículo - Cruzamento: $110 \pm 2,54$; *rearing*: $62,25 \pm 3,11$; *grooming*: $4,0 \pm 0,57$).

Os grupos que foram submetidos ao tratamento com Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg i.p, respectivamente) não apresentaram alterações no números de cruzamentos, quando comparados ao grupo controle (Sm 2,5: $92,40 \pm 7,6$; Sm 5: $99,0 \pm 2,7$; Sm 10: $95,0 \pm 5,9$; Sm 20: $110,5 \pm 8,4$; veículo: $110,4 \pm 2,5$, respectivamente) (Figura 8 - A). Também não foi observada nenhuma alteração no número de *rearing* (Sm 2,5: $47,0 \pm 3,8$; Sm 5: $49,1 \pm 2,4$; Sm 10: $46,2 \pm 2,5$; Sm 20: $46,6 \pm 2,9$, respectivamente) (Figura 8 - B) e *grooming* (Sm 2,5: $2,0 \pm 0,70$; Sm 5: $3,2 \pm 0,47$; Sm 10: $3,7 \pm 0,25$; Sm 20: $4,2 \pm 0,62$, respectivamente) (Figura 8 - C), com relação ao grupo controle (veículo - *rearing*: $62,25 \pm 3,1$; *grooming*: $4,0 \pm 0,57$, respectivamente).

Figura 8 - Avaliação da atividade motora no Teste do Campo Aberto.



Fonte: Autora. **Legenda:** Os camundongos foram tratados com Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg; i.p., respectivamente; Diazepam (DZP 2 mg/Kg; i.p.) ou Veículo (DMSO 5%). Após 30 minutos os animais foram submetidos ao teste de campo aberto e contabilizados o número de cruzamentos (A) de *rearing* (B) e de *grooming* (C). Os dados são expressos em Média \pm EPM. *One-way* ANOVA seguido de Bonferroni. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs Veículo; # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ vs DZP, respectivamente.

4.3. Avaliação da Atividade Ansiolítica

4.3.1. Teste de Labirinto em Cruz Elevado (*Plus maze test*)

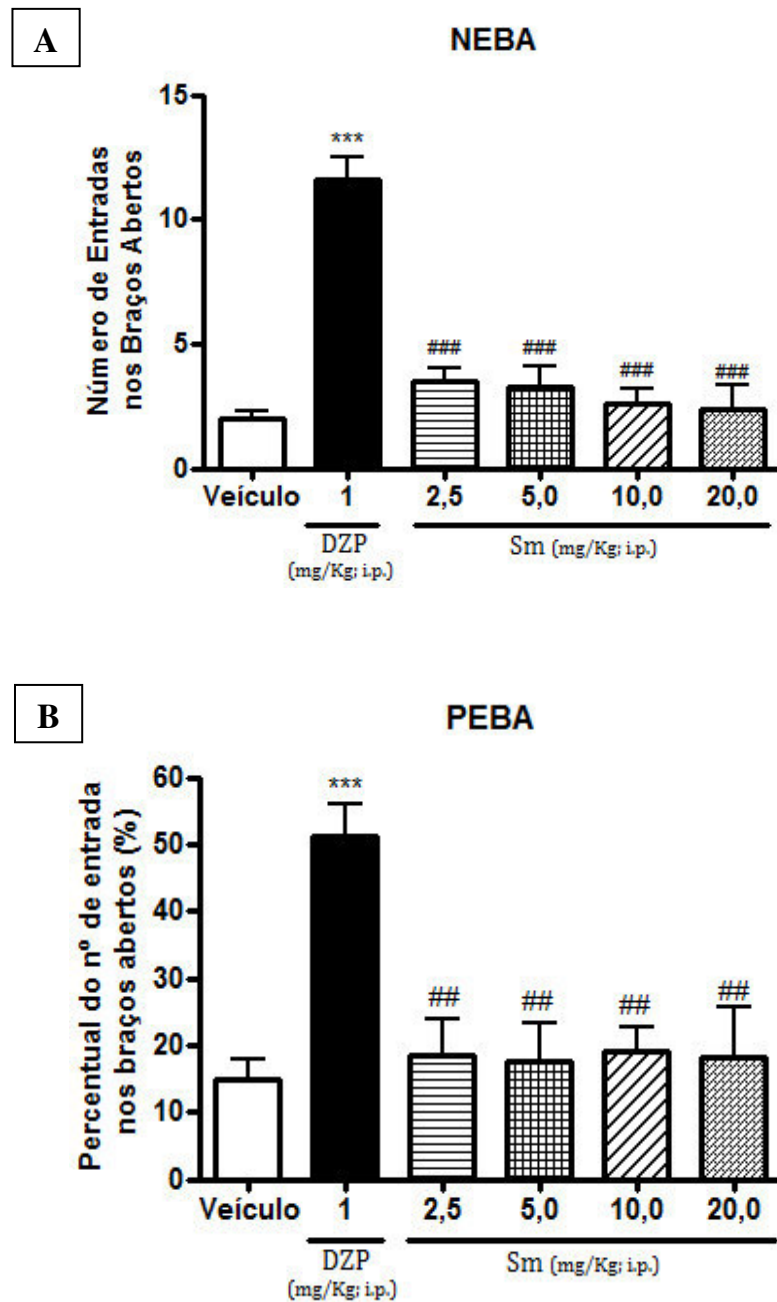
Neste modelo experimental, os parâmetros avaliados foram: NEBA (número de entradas nos braços abertos); PEBA (percentagem de entradas nos braços abertos); TPBA (tempo de permanência nos braços abertos); PTBA (percentagem do tempo de permanência nos braços abertos).

O DZP (1 mg/Kg), utilizado como droga padrão, aumentou significativamente ($p < 0,001$) todos os parâmetros avaliados (NEBA: $11,6 \pm 0,92$; PEBA: $51,3 \pm 4,5 \%$; TPBA: $72,2 \pm 8,2$ s; PTBA: $49,9 \pm 5,3 \%$) em relação ao grupo controle (Veículo - NEBA: $2,0 \pm 0,31$; PEBA: $14,8 \pm 3,0$; TPBA: $4,2 \pm 0,75$; PTBA: $3,2 \pm 0,5$).

Os grupos submetidos ao tratamento com Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg i.p., respectivamente) não apresentaram alterações no número de entradas nos braços abertos e nem no seu percentual, quando comparados ao grupo controle: NEBA (Sm 2,5: $3,5 \pm 0,50$; Sm 5: $3,2 \pm 0,85$; Sm 10: $2,6 \pm 0,60$; Sm 20: $2,4 \pm 0,97$; veículo: $2,0 \pm 0,31$) (Figura 9 - A); PEBA (Sm 2,5: $18,5 \pm 5,4 \%$; Sm 5: $17,6 \pm 5,6 \%$; Sm 10: $19,0 \pm 3,5 \%$; Sm 20: $18,1 \pm 7,6 \%$; veículo: $14,8 \pm 3,0 \%$) (Figura 9 - B).

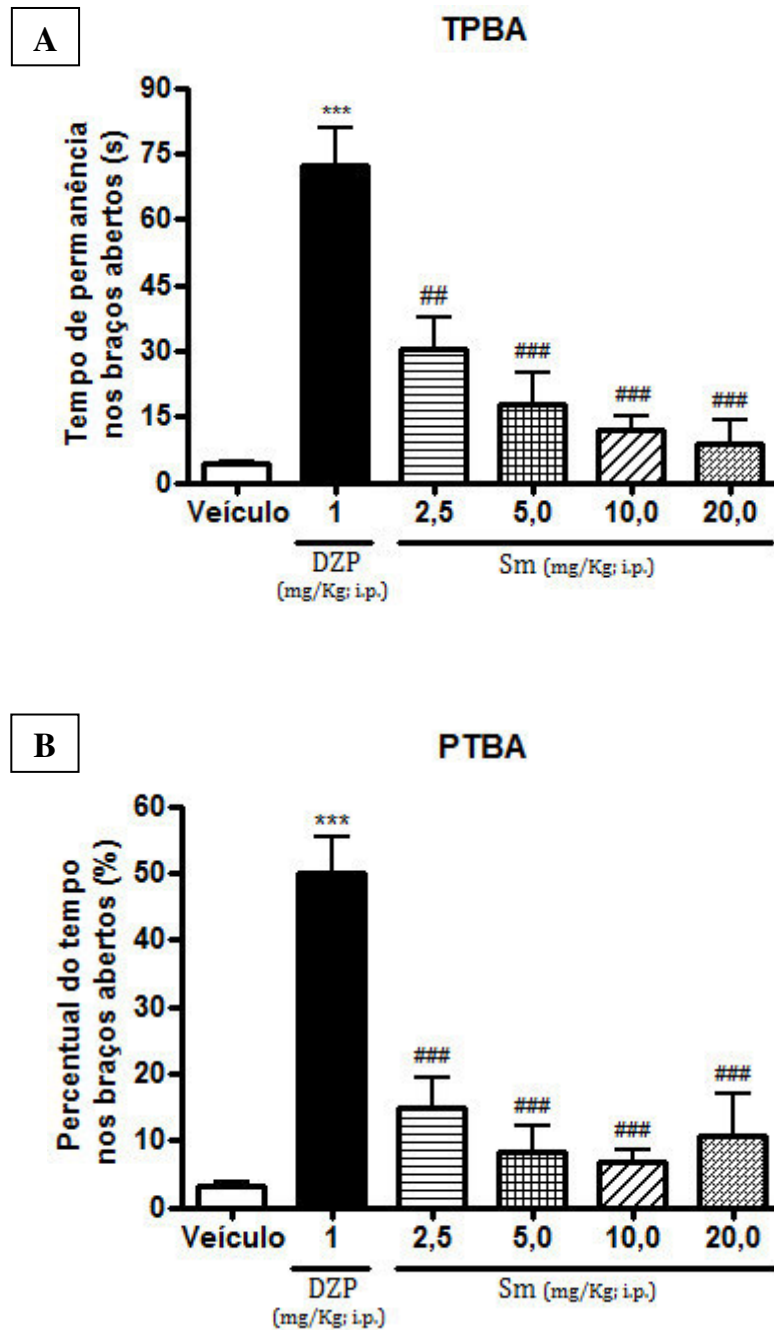
Quanto ao tempo de permanência e seu percentual, também não foi observada nenhuma alteração dos grupos tratados com Sm, quando comparados aos seus respectivos controles: TPBA (Sm 2,5: $30,5 \pm 7,3$ s; Sm 5: $18,0 \pm 7,0$ s; Sm 10: $12,0 \pm 3,3$ s; Sm 20: $8,6 \pm 5,6$ s; veículo: $4,2 \pm 0,75$ s) (Figura 10 - A); PTBA (Sm 2,5: $14,9 \pm 4,4 \%$; Sm 5: $8,2 \pm 3,9 \%$; Sm 10: $6,8 \pm 1,8 \%$; Sm 20: $10,6 \pm 6,3 \%$; veículo: $3,2 \pm 0,5 \%$) (Figura 10 - B).

Figura 9 - Número de entradas e percentagem de entradas nos braços abertos no Teste de Labirinto em Cruz Elevado (NEBA e PEBA).



Fonte: Autora. **Legenda:** Os camundongos foram tratados com Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg; i.p., respectivamente); Diazepam (DZP 1 mg/Kg; i.p.) ou Veículo (DMSO 5%). Após 30 minutos, os animais foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado e contabilizados o número de entradas nos braços abertos (A) e seu percentual (B). Os dados são expressos em Média \pm EPM. *One-way* ANOVA seguido de Bonferroni. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs Veículo; ### $p < 0,001$ vs DZP, respectivamente.

Figura 10 - Tempo de permanência e percentagem de permanência nos braços abertos no Teste de Labirinto em Cruz Elevado (TPBA e PTBA).



Fonte: Autora. **Legenda:** Os camundongos foram tratados com Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg; i.p., respectivamente); Diazepam (DZP 1 mg/Kg; i.p.) ou Veículo (DMSO 5%). Após 30 minutos, os animais foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado e considerado o tempo de permanência do animal nos braços abertos (A) e seu percentual de permanência (B). Os dados são expressos em Média \pm EPM. *One-way ANOVA* seguido de Bonferroni. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs Veículo; ### $p < 0,001$ vs DZP, respectivamente.

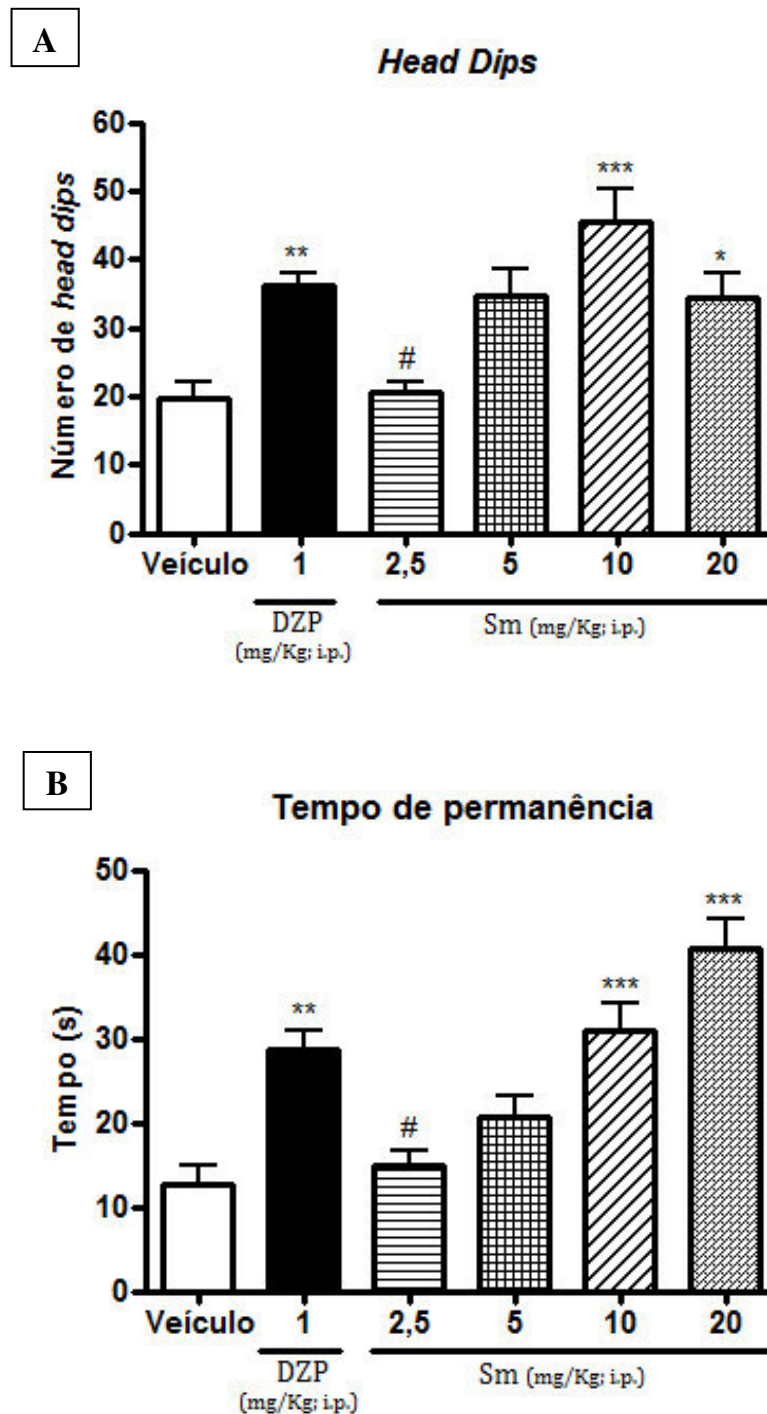
4.3.2. Teste da Placa Perfurada (*Hole board test*)

No teste da Placa perfurada, a capacidade exploratória dos animais foi avaliada através do número de *head dips*, e do tempo de permanência nos buracos.

O grupo tratado com DZP (1 mg/Kg), como esperado, aumentou 83% o número de *head dips* (DZP: $36,3 \pm 1,6$; Veículo: $19,8 \pm 2,3$, respectivamente) e 126% o tempo de permanência (DZP: $28,6 \pm 2,1$ s; Veículo: $12,6 \pm 2,3$ s, respectivamente), em relação aos seus respectivos controles.

Nos grupos submetidos ao tratamento com Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg i.p., respectivamente), apenas os grupos Sm (10 e 20) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) no número de *head dips*, quando comparados ao grupo controle (Sm 10: $45,6 \pm 4,7$; Sm 20: $34,4 \pm 3,6$; Veículo: $19,8 \pm 2,3$, respectivamente) (Figura 11 - A). No tempo de permanência, os grupos Sm (10 e 20) aumentaram significativamente ($p < 0,001$) em relação ao controle (Sm 10: $31,0 \pm 3,2$ s; Sm 20: $40,6 \pm 3,4$ s; Veículo: $12,6 \pm 2,3$ s, respectivamente) (Figura 11 - B).

Figura 11 - Número de entradas (*head dips*) e tempo de permanência no Teste de Placa Perfurada.



Fonte: Autora. **Legenda:** Os camundongos foram tratados com Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg; i.p., respectivamente); Diazepam (DZP 1 mg/Kg; i.p.) ou Veículo (DMSO 5%). Após 30 minutos, os animais foram observados durante 5 minutos na placa perfurada, (A) representa o número de vezes que o animal colocou a cabeça (*head dips*) e (B) o tempo de permanência nos buracos. Os dados são expressos em Média \pm EPM. *One-way ANOVA* seguido de Bonferroni. Valores significativos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs Veículo; # $p < 0,05$ vs DZP, respectivamente.

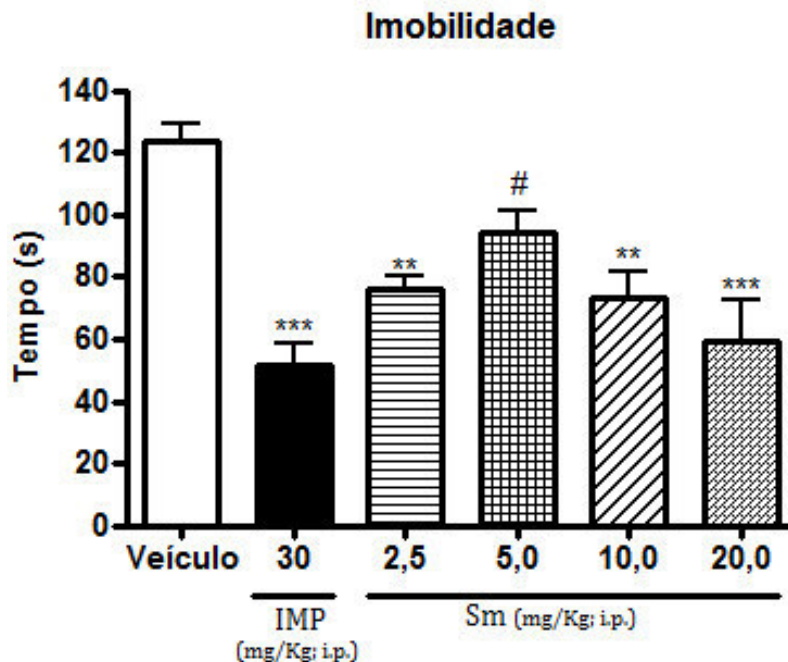
4.4. Avaliação da Atividade Antidepressiva

4.4.1. Teste da Suspensão da Cauda

No teste da suspensão da cauda também foi avaliado o parâmetro de imobilidade. IMP 30 mg/Kg, como droga padrão, apresentou redução de 58% no tempo de imobilidade em relação ao controle (IMP: $123,3 \pm 5,5$ s; Veículo: $51,8 \pm 6,5$ s).

Dos grupos submetidos ao tratamento com Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg i.p., respectivamente), apenas o grupo Sm 5 não apresentou redução do tempo de imobilidade, os demais grupos: Sm (2,5; 10 e 20), apresentaram redução significativa ($p < 0,01$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) no tempo de imobilidade, quando comparados ao grupo controle (Sm 2,5: $72,6 \pm 4,5$ s; Sm 10: $73,1 \pm 8,2$ s; Sm 20: $59,3 \pm 13,2$ s; Veículo: $123,3 \pm 5,5$ s, respectivamente) (Figura 12).

Figura 12 - Tempo de imobilidade no Teste de Suspensão da Cauda.



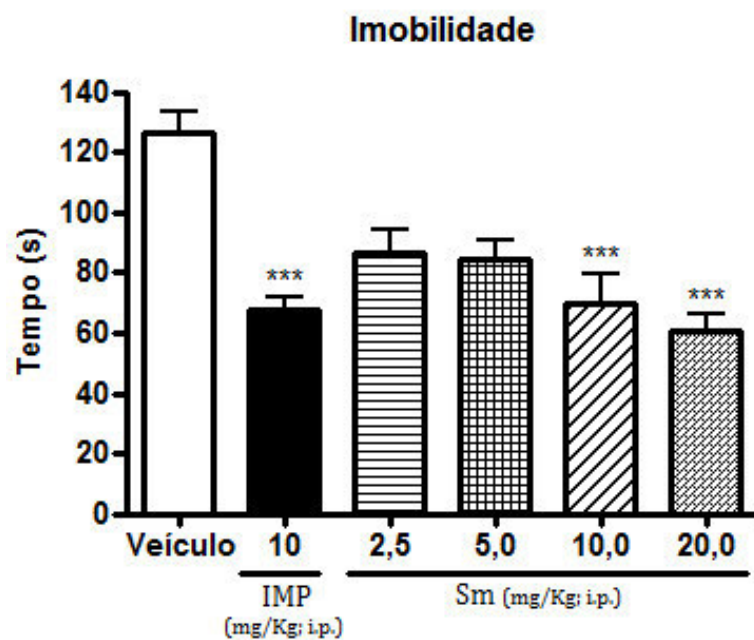
Fonte: Autora. **Legenda:** Os camundongos foram tratados com Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg; i.p., respectivamente); Imipramina (IMP 30 mg/Kg; i.p.) ou Veículo (DMSO 5%). Após 30 minutos, os animais foram observados durante 6 minutos no teste de suspensão da cauda, e considerado o seu tempo de imobilidade. Os dados são expressos em Média ± EPM. *One-way* ANOVA seguido de Bonferroni. Valores significativos: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs Veículo; # $p < 0,05$ vs IMP, respectivamente.

4.4.2. Teste do Nado Forçado

No teste do nado forçado, observou-se o tempo de imobilidade para avaliar a atividade antidepressiva. Foi utilizado como droga padrão a Imipramina (IMP 10 mg/Kg) que, como esperado, reduziu de maneira significativa ($p < 0,001$) o tempo de imobilidade dos animais, quando comparado ao grupo controle (IMP: $68,0 \pm 3,5$; Veículo: $126,3 \pm 6,8$ s, respectivamente).

Nos grupos testados com Sm, apenas Sm (10 e 20) apresentaram uma redução significativa ($p < 0,001$) de 44 e 51% respectivamente, quando comparada ao controle, assemelhando-se a IMP (Sm 10: $69,6 \pm 9,9$; Sm 20: $61,0 \pm 5,3$; Veículo: $126,3 \pm 6,8$ s, respectivamente) (Figura 13).

Figura 13 - Tempo de imobilidade no Teste de Nado Forçado.



Fonte: Autora. **Legenda:** Os camundongos foram tratados com Sm (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg; i.p., respectivamente); Imipramina (IMP 10 mg/Kg; i.p.) ou Veículo (DMSO 5%). Após 30 minutos, os animais foram observados durante 5 minutos no teste de nado forçado, e considerado o seu tempo de imobilidade. Os dados são expressos em Média \pm EPM. *One-way* ANOVA seguido de Bonferroni. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs Veículo.

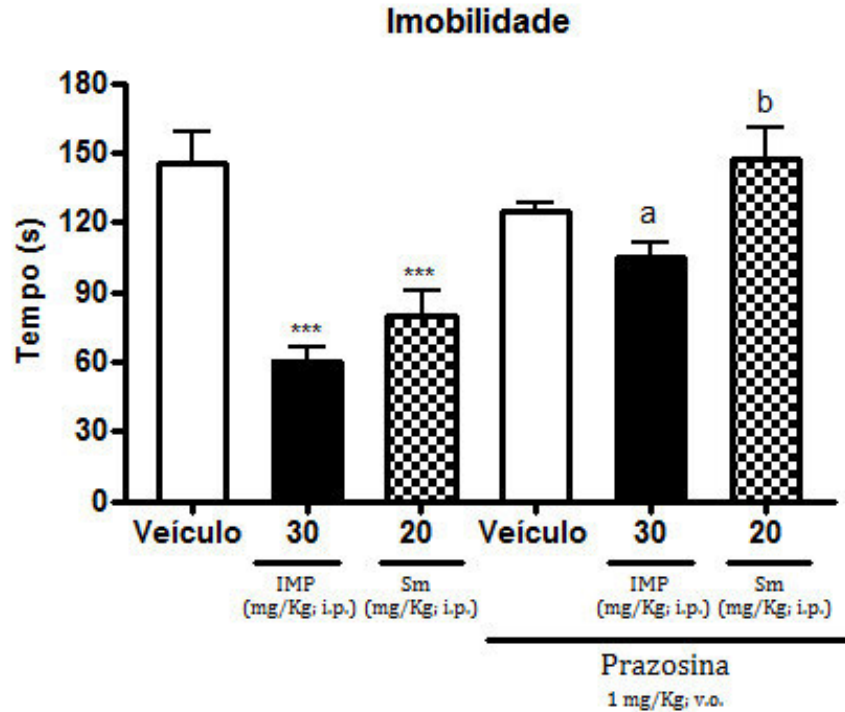
4.5. Avaliação do Envolvimento do Sistema Noradrenérgico na Atividade Antidepressiva

O possível envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito antidepressivo apresentado pelo grupo Sm 20, foi avaliado através do pré-tratamento dos animais com o antagonista dos receptores noradrenérgicos α_1 , Prazosina (PRA 1 mg/Kg; v.o.).

No teste de suspensão da cauda, o pré-tratamento dos animais com PRA seguido de IMP 30 e Sm 20 reverteu significativamente ($p < 0,05$) o tempo de imobilidade em 42 e 45%, respectivamente, em relação a IMP30 e Sm 20 que não receberam pré-tratamento com PRA (PRA + IMP30: $105,4 \pm 5,8$ s; IMP30: $60,3 \pm 5,7$ s; Sm 20 + PRA: $147 \pm 13,1$ s; Sm 20: $79,7 \pm 10,4$ s, respectivamente) (Figura 14).

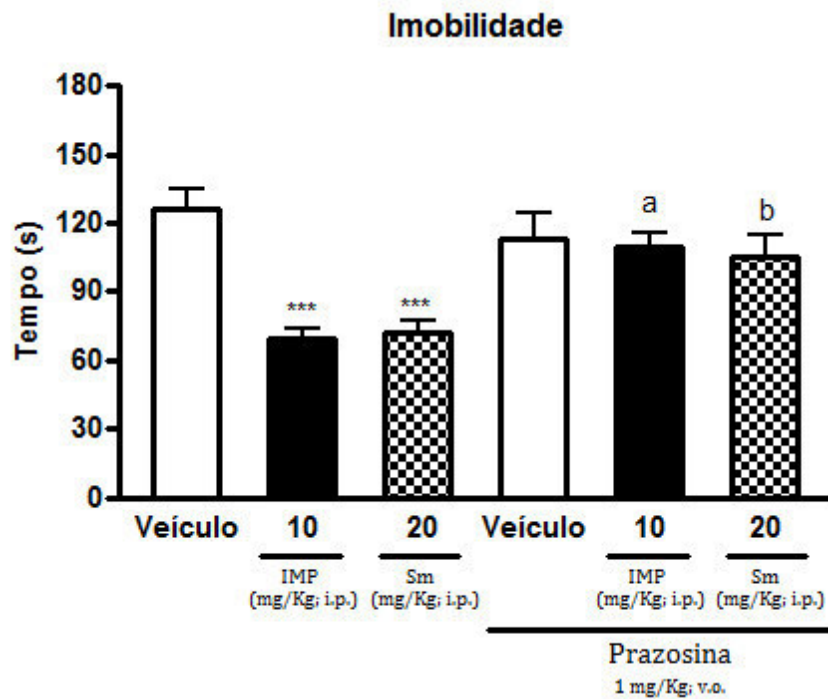
No teste de nado forçado, o pré-tratamento com PRA seguido de IMP10, também foi capaz de reverter ($p < 0,05$) o efeito antidepressivo de IMP, através do aumento do tempo de imobilidade desses animais em relação ao grupo que foi tratado apenas com IMP (PRA + IMP10: $109,8 \pm 6,1$ s; IMP10: $69,7 \pm 3,9$ s, respectivamente). Efeito semelhante foi observado no grupo pré-tratado com PRA seguido de Sm 20, onde PRA reverteu ($p < 0,05$) o possível efeito antidepressivo de Sm, em relação ao grupo que foi tratado apenas com Sm 20, sugerindo o envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_1 (Sm 20 + PRA: $105,3 \pm 9,7$ s; Sm 20: $71,8 \pm 5,0$ s, respectivamente) (Figura 15). Nos dois modelos comportamentais a prazosina não alterou o grupo controle (veículo).

Figura 14 - Efeito de Sm (20 mg/Kg) sozinha ou associada com Prazosina (1mg/Kg) sobre o tempo de imobilidade no Teste de Suspensão da Cauda.



Fonte: Autora. **Legenda:** Os camundongos foram tratados com Sm (20 mg/Kg; i.p.); Imipramina (IMP 30 mg/Kg; i.p.) ou Veículo (DMSO 5%). Após 30 minutos os animais foram observados durante 6 minutos no teste de suspensão da cauda, e considerado o seu tempo de imobilidade. Quando associados, foram tratados 30 minutos depois da administração com Prazosina (PRA 1mg/Kg; v.o.) e 30 minutos depois submetido ao teste. Os dados são expressos em Média ± EPM. *One-way* ANOVA seguido de Bonferroni. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs Veículo; (a) $p < 0,05$ vs IMP 30; (b) $p < 0,05$ vs Sm 20, respectivamente.

Figura 15 - Efeito de Sm (20 mg/Kg) sozinha ou associada com Prazosina (1mg/Kg) sobre o tempo de imobilidade no Teste de Nado Forçado.



Fonte: Autora. **Legenda:** Os camundongos foram tratados com Sm (20 mg/Kg; i.p.); Imipramina (IMP 10 mg/Kg; i.p.) ou Veículo (DMSO 5%). Após 30 minutos os animais foram observados durante 5 minutos no teste de nado forçado, e considerado o seu tempo de imobilidade. Quando associados, foram tratados 30 minutos depois da administração com Prazosina (PRA 1mg/Kg; v.o.) e 30 minutos depois submetido ao teste. Os dados são expressos em Média ± EPM. *One-way* ANOVA seguido de Bonferroni. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs Veículo; (a) $p < 0,05$ vs IMP 10; (b) $p < 0,05$ vs Sm 20, respectivamente.

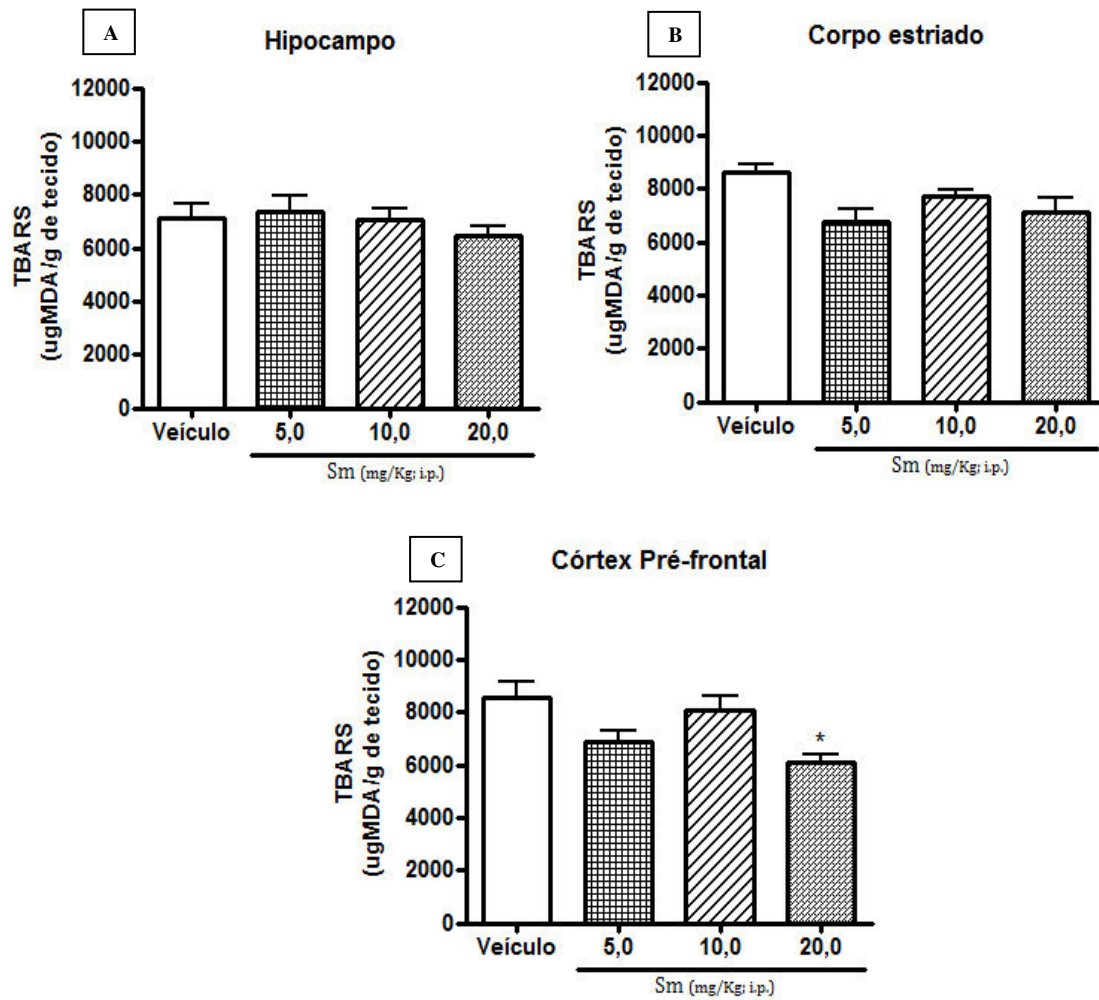
4.6. Análises Neuroquímicas

4.6.1. Determinação dos Níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS)

De acordo com o resultado obtido, Sm 20 foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) os níveis de MDA no córtex pré-frontal, quando comparado ao controle (Veículo: $8536 \pm 623,9$; Sm 20: $6111 \pm 297,8$, respectivamente) (Figura 16 - C).

Nas demais áreas cerebrais (hipocampo e corpo estriado), nenhuma das doses de Sm testadas apresentam efeito significativo em relação ao grupo controle (Figura 16 – A e B).

Figura 16 - Análise dos níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) nas áreas cerebrais.

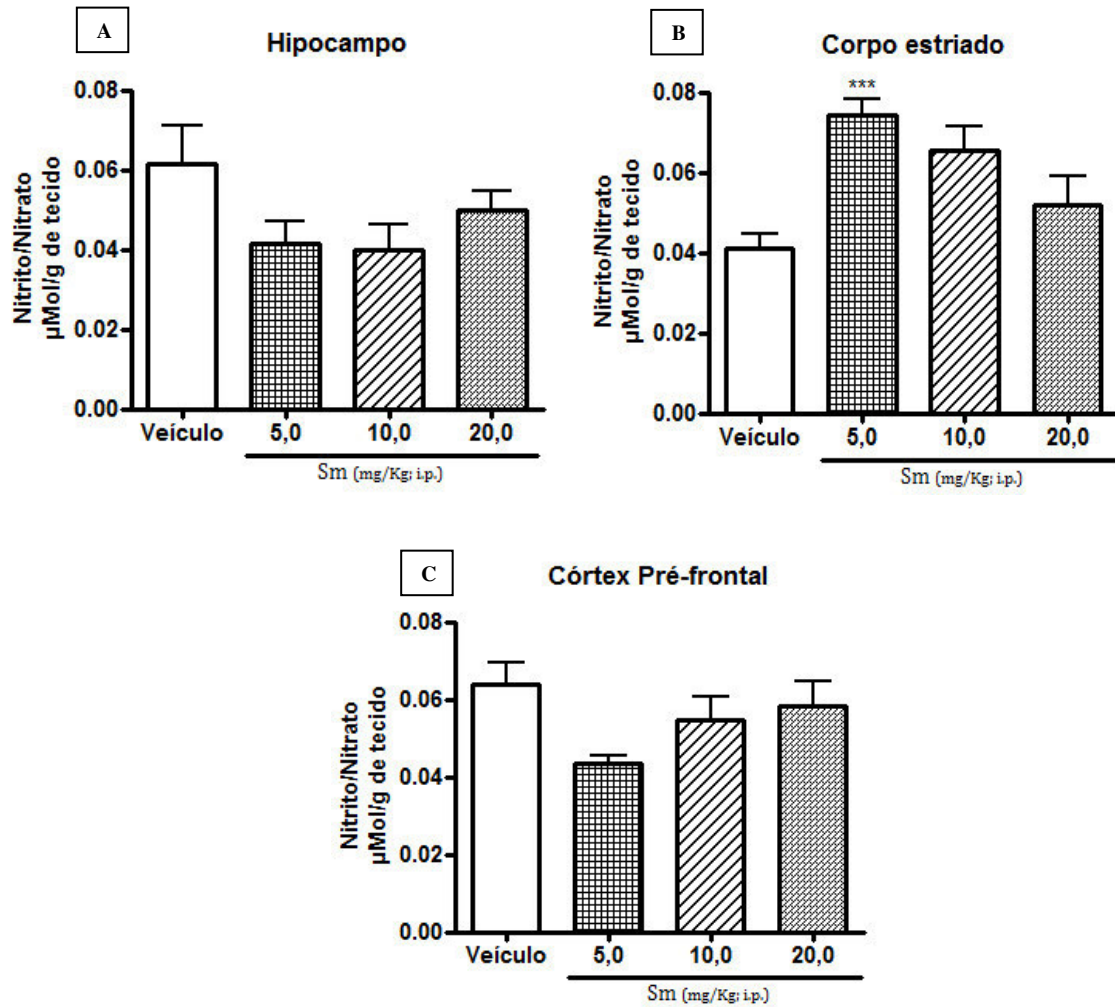


Fonte: Autora. **Legenda:** Os camundongos foram tratados com Sm (5; 10 e 20 mg/Kg; i.p., respectivamente) ou Veículo (DMSO 5%). Após as análises comportamentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e removido os encéfalos para análise neuroquímica do Hipocampo (A), Corpo estriado (B) e Córtex pré-frontal (C). Os dados são expressos em Média \pm EPM. *One-way* ANOVA seguido de Bonferroni. Valores significativos: *p<0,05 vs Veículo.

4.6.2. Determinação da Concentração de Nitrito/Nitrato

De acordo com os resultados obtidos, não foi observado nenhuma redução significativa dos níveis de nitrito/nitrato nos grupos tratados com Sm (5; 10 e 20 mg/Kg, respectivamente), em nenhuma das áreas estudadas: hipocampo (Figura 17 - A), corpo estriado (Figura 17 - B) e córtex pré-frontal (Figura 17 - C), quando comparado ao grupo controle. Porém, foi observado um aumento significativo ($p < 0,001$) na concentração de nitrito/nitrato no corpo estriado do grupo Sm 5, quando comparado ao grupo controle (Veículo: $0,04104 \pm 0,00350$; Sm 5: $0,07427 \pm 0,00391$, respectivamente) (Figura 17 - B).

Figura 17 - Análise dos níveis de Nitrito/Nitrato nas áreas cerebrais.

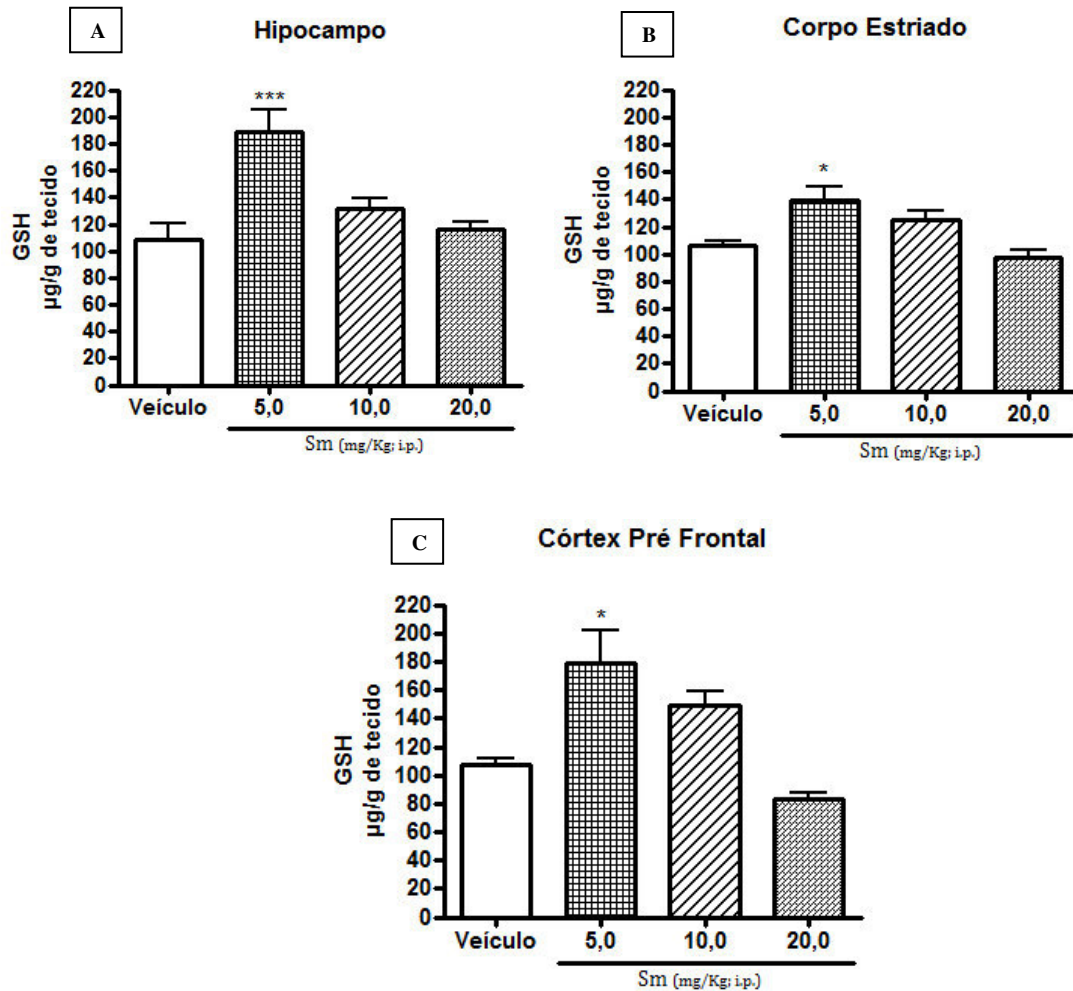


Fonte: Autora. **Legenda:** Os camundongos foram tratados com Sm (5; 10 e 20 mg/Kg; i.p., respectivamente) ou Veículo (DMSO 5%). Após as análises comportamentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e removido os encéfalos para análise neuroquímica do Hipocampo (A), Corpo estriado (B) e Córtex pré-frontal (C). Os dados são expressos em Média \pm EPM. *One-way* ANOVA seguido de Bonferroni. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs Veículo.

4.6.3. Determinação da Concentração de Glutathione Reduzida (GSH)

Neste teste, observou-se que animais tratados com Sm 5 promoveu um aumento da atividade antioxidante, via GSH em hipocampo (Figura 18 - A), corpo estriado (Figura 18 - B) e córtex pré-frontal (Figura 18 - C), ($p < 0,001$; $p < 0,05$; $p < 0,05$), respectivamente, em relação ao grupo controle. As demais doses testadas não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle.

Figura 18 - Análise dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) nas áreas cerebrais.



Fonte: Autora. **Legenda:** Os camundongos foram tratados com Sm (5; 10 e 20 mg/Kg; i.p., respectivamente) ou Veículo (DMSO 5%). Após as análises comportamentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e removido os encéfalos para análise neuroquímica do Hipocampo (A), Corpo estriado (B) e Córtex pré-frontal (C). Os dados são expressos em Média \pm EPM. *One-way* ANOVA seguido de Bonferroni. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs Veículo.

5. DISCUSSÃO

Este estudo descreve, pela primeira vez, os efeitos do extrato etanólico de *Stemodia maritima* (Sm) sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). Recentemente, *S. maritima* foi descrita como um bioativo natural, apresentando atividades antioxidante, antiviral, antimicrobiana e anti-inflamatória (SILVA et al., 2014). A partir dos dados de Silva e colaboradores (2014), sugeriu-se que o Sm poderia atuar no SNC. Desta forma, para se esclarecer seus efeitos, o presente estudo realizou investigações em via de administração i.p. utilizando diferentes modelos *in vivo* relacionados com as atividades locomotora, exploratória, ansiolítica, antidepressiva e envolvimento dos receptores noradrenérgicos, assim como seu efeito contra o estresse oxidativo e nitrosativo, através da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, nitrito/nitrato e GSH.

Foram realizadas observações preliminares, através de um protocolo descrito na literatura por estar associado a alterações no sistema nervoso e auxiliarem na identificação de ação a nível central, como estimulantes ou depressores, e/ou no sistema nervoso autônomo, resultando em alterações neurocomportamentais e fisiológicas (CARLINI, 1972; RODRIGUES; DUARTE-ALMEIDA; PIRES, 2010). Os dados obtidos indicaram que a administração de Sm (1; 10 e 100 mg/kg; i.p.) promove alterações no sistema nervoso central e autônomo (Tabela 2).

A análise do peso das amostras observadas (fígado, rins e coração), não revelou alterações significativas indicativas de toxicidade, nem alterações fisiológicas de micção e defecação (Tabela 3). Um estudo relatou uma toxicidade abortiva em ruminantes que consumiram *S. maritima*, mas nada foi comprovado cientificamente (SILVA et al., 2006). Corroborando com o nosso resultado, há relatos de avaliação toxicológica das partes aéreas de *S. foliosa*, pertencente ao mesmo gênero, que apontou ausência de efeitos adversos em bioensaios e frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach. (MOURA et al., 2006). Entretanto, análises comportamentais e fisiológicas de *S. maritima* não são relatadas. De acordo com os nossos dados, Sm apresenta uma potencial segurança farmacológica para o uso da mesma em modelos *in vivo*.

Como os resultados das observações preliminares demonstraram efeito central nas doses utilizadas (1; 10 e 100 mg/Kg; i.p.), sem efeito tóxico, optou-se por realizar análises comportamentais mais específicas apenas com doses pequenas de Sm, sendo elas: Sm (2,5; 5; 10; 20 mg/Kg; i.p.).

Os testes comportamentais realizados com animais são modelos clássicos para investigar a atividade de drogas no SNC. No presente trabalho, os efeitos de Sm, foram estudados em modelos comportamentais como: Teste de Campo Aberto; Labirinto em Cruz Elevada; Teste da Placa perfurada; Nado Forçado e Suspensão da Cauda.

O teste de Campo aberto (CA) é um modelo experimental clássico para investigações da atividade locomotora/exploratória e do comportamento emocional de roedores (GAMBERINI et al., 2015). Geralmente, substâncias que deprimem o SNC provocam uma diminuição da atividade locomotora espontânea nesse teste. Assim, o DZP na dose de 2 mg/Kg, é utilizado como droga padrão (controle positivo), por apresentar efeito sedativo, comum em benzodiazepínicos, e portanto, poder relacionar o seu efeito com novas drogas (PEREZ et al., 1998).

De acordo com os resultados obtidos, Sm (2,5; 5; 10 e 20) não foi capaz de alterar o padrão de locomoção dos animais em nenhuma das doses testadas, uma vez que não houve diferença significativa de cruzamentos entre os quadrantes, quando comparado ao controle (veículo), diferenciando do DZP e descartando assim um efeito sedativo e/ou depressor.

Além do número de cruzamentos, foram observados outros dois parâmetros no CA: *rearing* e *grooming*. O *rearing* reflete o comportamento exploratório de um animal, uma vez que este consiste no movimento de exploração vertical, onde o animal levanta-se sobre as patas traseiras (ESPEJO, 1997). O aumento desse parâmetro está relacionado com um aumento da atividade dopaminérgica e que substâncias ansiolíticas induzem um aumento na atividade ou não altera este parâmetro (SONAVANE et al., 2002). O *grooming*, que consiste no movimento de autolimpeza, está relacionado ao estresse e é observado em roedores que estão apreensivos, ao contrário do *rearing*, pesquisadores descobriram que as drogas ansiolíticas reduzem este parâmetro no campo aberto (ESTANISLAU et al., 2013). A dopamina está particularmente envolvida nessa atividade, embora vários neurotransmissores pareçam modular a expressão desse comportamento (PALM et al., 2014; SERAFIM; FELICIO, 2001). Os resultados mostraram que Sm não alterou significativamente o número de movimentos *rearing* e *grooming*, porém, houve uma tendência de aumento dose-dependente com relação ao *grooming*.

O teste de Labirinto em Cruz Elevada, há mais de duas décadas, tem sido usado como um modelo comportamental de ansiedade não condicionada. Neste modelo é observado se roedores evitam ou preferem locais abertos e elevados, e o tempo de permanência do animal em cada espaço (WALF; FRYE, 2007). Fármacos com ação ansiolítica aumentam o número de entradas nos braços abertos assim como aumentam o tempo de permanência nos

braços abertos (GUPTA; RADHAKRISHNAN; KURHE, 2014). O DZP é utilizado como droga padrão, em modelos de ansiedade, na dose de 1 mg/Kg, e como esperado, aumentou significativamente todos os parâmetros analisados, indicando sua atividade ansiolítica. Uma vez que o tratamento com Sm não alterou o número de entradas nos braços abertos, nem o tempo de permanência, em relação ao grupo controle (veículo). No presente estudo, Sm não apresentou atividade ansiolítica.

O teste da Placa Perfurada (TPP) é mencionado na literatura como um teste indicativo de comportamento exploratório relacionado à ansiedade (MAGAJI et al., 2014; MATEOS-GARCIA et al., 2015). Nosso resultado mostra que no TPP, o Sm (10 e 20) apresentou um aumento do número de *Head dips* na atividade exploratória.

Esse resultado indica uma discordância entre os dados obtidos pelo Teste do Campo Aberto e o Teste de Labirinto em Cruz elevado, onde não houve alteração na atividade exploratória e nem foi observado efeito ansiolítico, respectivamente. No entanto, o teste do Campo Aberto pode ser considerado um modelo neurocomportamental mais eficiente para avaliar a atividade locomotora. Assim, o Teste do Campo Aberto deve ser utilizado para confirmar ou refutar possíveis achados comportamentais relacionados à atividade locomotora observados em outros comportamentos. Estudos tem mostrado que as atividades locomotora e exploratória, podem variar independentemente uma da outra, apesar do teste do Campo Aberto também indicar uma possível atividade exploratória (ABEL, 1995; DHARA; PAL; NAG CHAUDHURI, 2002; DURCAN; LISTER 1989). Assim também, os índices de comportamentos de ansiedade observados no teste do Labirinto em Cruz Elevada não devem ser correlacionados com a atividade exploratória (WALF; FRYE, 2007).

A alta frequência de *head dips* é um indicativo de níveis normais de ansiedade, enquanto que a diminuição dessa atividade está relacionada a um aumento da ansiedade (DHARA; PAL; NAG CHAUDHURI, 2002). O aumento da atividade exploratória pode ser interpretado como indicativo de neofilia, o qual é definido como uma preferência pelo novo, enquanto que a diminuição dessa atividade é sugerida como baixos níveis de neofilia ou um estado de alta ansiedade pelo animal (BROWN; NEMES, 2008). Outros estudos também sugerem que a atividade exploratória pode estar relacionada com os níveis de dopamina e também com o envolvimento do sistema serotoninérgico (TAMADA et al., 2010). De acordo com estes estudos, alterações no sistema serotoninérgico são capazes de comprometer o desempenho de uma tarefa e/ou um aprendizado já adquirido significativamente, os quais podem ser concluídos por um cérebro com mecanismos serotoninérgicos normais (MOGENSEN et al., 2003).

Assim, os resultados obtidos no teste da Placa perfurada, sugerem que Sm induziu um aumento da atividade exploratória, mas que não está relacionado a uma ação ansiolítica e que Sm poderia estar atuando em vias dopaminérgicas e/ou serotoninérgicas, estimulando um comportamento exploratório dos camundongos.

Posteriormente, para avaliar uma possível ação antidepressiva, foram utilizados modelos clássicos de estresse relacionados à manifestação da depressão, esses modelos são baseados no ‘desespero comportamental’, na exposição de um animal a uma condição de estresse, pois estudos tem mostrado que condições estressantes aumentam a vulnerabilidade a esse distúrbio. Os dois testes mais utilizados em triagem para substâncias com efeito antidepressivo, são os testes de Nado Forçado e Suspensão da Cauda (ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013). Acredita-se que a imobilidade, parâmetro observado em ambos os testes, remete um desespero aos animais e reproduz uma condição similar à depressão humana. Assim, a redução do tempo de imobilidade indica um efeito antidepressivo (CAN; OZKAY; ÜÇEL, 2013; PYTKA, 2016).

Neste trabalho, no teste de Nado Forçado, Sm (10 e 20, respectivamente) diminuiu o tempo de imobilidade significativamente em relação ao grupo veículo, assemelhando-se a Imipramina (IMP), um antidepressivo utilizado como controle positivo. O mesmo resultado pode ser visto no teste de Suspensão da Cauda, indicando uma possível atividade antidepressiva para Sm. Embora a relação entre a imobilidade observada em modelos animais de depressão e a depressão em humanos permaneça controversa, há uma grande variedade de compostos que apresentam potenciais antidepressivos reduzindo o tempo de imobilidade nesses modelos. No entanto, alguns estudos descrevem que outros compostos podem alterar o tempo de imobilidade dos animais nesses testes (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005; DHIR; KULKARNI, 2007). Drogas psicoestimulantes, como derivados anfetamínicos, cocaína e cafeína, por exemplo, podem diminuir esse parâmetro por meio de um aumento da atividade locomotora, levando a resultados falso-positivos (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005). Descartando essa possibilidade, nos animais que foram submetidos ao teste de campo aberto, não foi observada qualquer alteração na locomoção espontânea dos mesmos. Portanto, sugere-se que a redução da imobilidade não advém de uma estimulação motora, e sim de uma ação específica do tipo antidepressiva do Sm.

Uma vez identificada atividade antidepressiva induzida por Sm, avaliou-se um possível mecanismo de ação envolvido. Foi reproduzido o teste de Suspensão da cauda e Nado forçado, com a dose Sm (20 mg/Kg), por esta ter apresentado um proeminente efeito antidepressivo. E investigamos o envolvimento do adrenerceptor $\alpha 1$ nesse efeito.

A neurotransmissão noradrenérgica envolvendo o adrenoceptor $\alpha 1$ é regulada pelos seus três subtipos de receptores ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1D$) e tem papel importante na regulação do comportamento animal, no entanto existem poucos estudos mostrando o papel de cada subtipo desses receptores. Um desses estudos mostra uma correlação entre a potência de antagonistas não seletivos para os subtipos de adrenoceptores $\alpha 1$ em inibir a atividade comportamental geral e suas afinidades por adrenoceptores $\alpha 1B$, mas não por subtipos $\alpha 1A$, $\alpha 1D$ (STONE et al., 2001).

A ativação de adrenoceptores $\alpha 1B$, associado ao antagonismo dos adrenoceptores $\alpha 1A$ e $\alpha 1D$ pode ser um dos mecanismos envolvidos na atividade antidepressiva de IMP e de outros antidepressivos tricíclicos, indicando assim, que o estado normal do comportamento de imobilidade é regulado pelo balanço da ativação de cada um dos três subtipos de adrenoceptores $\alpha 1$ (RIBEIRO; PUPO, 2015).

Tem sido proposto que adrenoceptores $\alpha 1$ participam da regulação de dois tipos de comportamentos relacionados à depressão e ao estresse: os comportamentos motivados por estímulos positivos e os inibidos por estresse (estímulos negativos). E que estes parecem ser responsáveis por mediar a respostas aos antidepressivos (STONE et al., 2007). Nesse contexto, a pré-administração de um antagonista de adrenoceptores $\alpha 1$, como a Prazosina (PRA), aumenta o parâmetro de imobilidade em camundongos submetidos aos testes de Nado forçado e Suspensão da cauda.

Neste estudo, foi observado que o pré-tratamento com PRA, reverteu o efeito anti-imobilidade de Sm (20 mg/Kg) e de IMP, nos testes de Nado forçado e Suspensão da Cauda, sugerindo uma importante participação dos adrenoceptores $\alpha 1$ no efeito de anti-imobilidade promovido por Sm, e sugerindo que o mecanismo de IMP atua através de receptores adrenérgicos. Corroborando com tais resultados, outros estudos mostraram que o bloqueio dos adrenoceptores $\alpha 1$, mimetiza o estado depressivo, que assim como o estresse crônico, está associado à dessensibilização desses receptores, e que o tratamento com antidepressivos aumenta a densidade e a atividade dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos no córtex frontal e hipocampo (STONE et al., 2007).

Nossos resultados estão de acordo com outros estudos, que mostram que o antagonismo de adrenoceptores $\alpha 1$ com a PRA, reduziu o efeito anti-imobilidade, por exemplo, da Creatina (*Hoodia gordonii*) e da Riparina I (*Aniba riparia*) (CITÓ et al., 2015; CUNHA et al., 2013; MARTINEZ et al., 2014). No entanto, este é o primeiro relato de atividade antidepressiva para o gênero *Stemodia*. Estudos mostram a atividade antidepressiva

de *Senna occidentalis* (MACEDO; ALAN e SILVA; SILVA, 2016), onde nesta espécie é relatado a Jaceidina, mesma flavona encontrada em Sm.

Os flavonóides constituem uma classe de metabólitos secundários pertencentes à classe dos compostos polifenólicos, são considerados nutracêuticos, devido as suas propriedades biológicas e farmacológicas (GEORGIEV; ANANGA; TSOLOVA, 2014). A ação antioxidante, anti-inflamatória e capacidade de sinalização celular dos flavonoides, são cruciais para sua aplicação na farmacologia, por exemplo, como neuroprotetores. Rendeiro e colaboradores (2015) mostraram em sua revisão que, dieta rica em flavonoides podem prevenir doenças associadas ao estresse oxidativo, tais como as doenças do SNC, como ALZHEIMER, PARKINSON e depressão.

Outras plantas contendo flavonóides vêm sendo utilizadas e investigadas quanto à atividade antidepressiva. Em 2013, Zheng e colaboradores testaram um extrato de folhas de *Apocynum venetum*, rico em flavonoides, em diferentes modelos de depressão, além de verificarem alterações dos neurotransmissores monoaminérgicos no cérebro de camundongos. A ação antidepressiva de flavonoides isolados, como quercetina, hiperosídeo, canferol, naringenina, dentre outros, também são relatadas (HAAS et al., 2011; SAH et al., 2011; YI et al., 2014).

Diante disso, possivelmente a atividade antidepressiva encontrada em Sm, pode estar relacionada com a ação antioxidante do flavonoide Jaceidina. No entanto, para confirmar qual metabólito secundário está agindo como antidepressivo, são necessários estudos específicos dos constituintes de Sm.

Como os resultados obtidos nesse trabalho mostraram atividade antidepressiva de Sm, buscou-se avaliar se esse extrato seria capaz de promover alterações neuroquímicas nas áreas cerebrais do hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal.

Estudos mostram que o hipocampo é alterado pela exposição ao estresse e parece ter um papel importante na mediação dos efeitos terapêuticos dos tratamentos antidepressivos. Está relacionado com a regulação do medo e da ansiedade em roedores. Além disso, é uma das primeiras áreas cerebrais a sofrer danos relacionados a distúrbios neurológicos, como a depressão, sendo alvo de hormônios envolvidos no estresse (cortisol, epinefrina e noradrenalina) (PERSSON et al., 2014).

O corpo estriado é uma das principais estruturas relacionadas com a atividade locomotora em animais, coordena vias de movimento e também está envolvido com processos cognitivos, como funções para execução de tarefas. Alterações no corpo estriado são responsáveis pela redução na motivação e anedonia (MALETIC, 2007; TEPPER et al., 2010).

No modelo neuroanatômico da depressão, o córtex pré-frontal possuiria conexões abrangentes com estruturas envolvidas no comportamento emocional e nas respostas a estressores, incluindo núcleos serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos do tronco cerebral (DREVETS et al., 1997).

Estudos relatam vários distúrbios oxidativos em pacientes deprimidos, incluindo dano oxidativo e diminuição dos níveis de enzimas antioxidantes. O estresse oxidativo causa danos às proteínas e ao DNA no cérebro, causando lesão e apoptose de neurônios (O'DONNELL; DO; ARANGO, 2014). Além disso, a ativação do processo de estresse oxidativo provoca peroxidação lipídica, redução da atividade antioxidante e o aumento do catabolismo de monoaminas, tudo relacionado com a fisiologia da depressão (VOLPE; PANENI, 2015).

Evidências recentes sugerem uma ligação íntima entre o estresse oxidativo e disfunção mitocondrial com o desenvolvimento da morte neuronal em diversas doenças neurológicas (ARMENTA et al., 2014).

Para avaliar a ação de Sm sobre o estresse oxidativo foram avaliados os níveis de peroxidação lipídica, nitrito/nitrato e glutathiona reduzida (GSH) nas três áreas cerebrais.

Os níveis de peroxidação lipídica foram avaliados através de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico, determinando a concentração de malondialdeído nas áreas cerebrais. O malondialdeído (MDA) é um produto de decomposição dos ácidos graxos em suas cadeias essenciais através de oxidação e é aceito como um marcador confiável de estresse oxidativo. Estudos mostram os níveis de MDA elevados na depressão (NOBRE; FONTELES; FREITAS, 2009; RYBKA et al., 2013).

De acordo com os nossos resultados, Sm não foi capaz de alterar os níveis de peroxidação lipídica no Hipocampo e Corpo estriado, no entanto, foi observado uma redução dos níveis no Córtex pré-frontal, do grupo tratado com Sm (20 mg/Kg), com relação ao grupo controle (veículo). Apesar dos animais não serem induzidos à depressão, os mesmos foram submetidos aos modelos experimentais de depressão, e como já foi citado neste trabalho, são modelos que representam um evento de estresse. O estresse agudo do Teste do Nado forçado não só aumenta a produção de espécies reativas do oxigênio como também atenua as defesas antioxidantes (ABDEL-WAHAB; SALAMA, 2011). Corroborando com o nosso resultado, já foi relatado que análogos de Estemodina, tem atividade inibidora da peroxidação lipídica *in vitro*, frente à células cancerígenas (RUSSELL et al., 2011) e Sm é composto por diterpenos do tipo estemodina, portanto, este composto pode estar relacionado com os níveis de peroxidação lipídicas aqui encontrados.

Uma elevação na formação de radicais livres pode ser acompanhada por um aumento compensatório imediato na atividade de enzimas inativadoras de radicais livres. Os organismos produzem mecanismos de defesa para proteger a si próprios contra os danos provocados por radicais livres, como por exemplo, enzimas antioxidantes, varredores de radicais livres e agentes quelantes metálicos. Geralmente existe um balanço entre a produção de radicais livres e atividade de sistema de defesa antioxidante, o estresse oxidativo só ocorre quando este balanço está alterado em favor da produção de radicais livres (TIWARI, 2011). Esses dados corroboram com os nossos resultados, onde Sm (5 mg/Kg) provocou um aumento dos níveis de nitrito/nitrato no corpo estriado e um aumento compensatório nos níveis de GSH em todas as áreas. Além disso, já é relatada a atividade antioxidante *in vitro* de Sm pelo ensaio de inibição de DPPH (SILVA et al., 2014). Diante disso, pode-se afirmar que Sm foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica no Córtex pré-frontal, e que também manteve os níveis de nitrito/nitrato no hipocampo, corpo estriado, córtex pré-frontal, excetuando-se na dose de 5 mg/Kg, onde também foi possível verificar uma aumento de GSH. Os níveis de GSH nas demais doses, não foram alterados, em relação ao grupo controle.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, Sm promoveu atividade antidepressiva com atividade antioxidante dependendo da dose e da área cerebral analisada, os quais podem estar relacionados com a ação desse extrato a nível de sistema nervoso central. Sua atividade antidepressiva está envolvida com receptores adrenérgicos do tipo $\alpha 1$. Adicionalmente, a via de administração e a modulação das doses utilizadas, demonstra uma segurança farmacológica, uma vez que não foram encontradas alterações fisiológicas e locomotoras nos parâmetros analisados em camundongos. Portanto, esse trabalho, apresenta pela primeira vez, um possível agente farmacológico com possíveis implicações para a neuropsicofarmacologia.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, B. A.; SALAMA, R. H. Venlafaxine protects against stress-induced oxidative DNA damage in hippocampus during antidepressant testing in mice. **Pharmacol Biochem. Behav.**, v. 100, p. 59-65, 2011.
- ABEL, E. L. Further evidence for the dissociation of locomotor activity and head dipping in rats. **Physiology & Behavior**, v. 57, p. 529-532, 1995.
- ABELAIRA, H. M.; RÉUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 35, p. 112-120, 2013.
- ALJANCIC, I. STANKOVIC, M.; TESEVIC, V.; VUJISIC, L.; VAJS, V.; MILOSAVLJEVIC, S. Protective effect on human lymphocytes of some flavonoids isolated from two *Achillea* species. **Nat. Pros. Commun.**, v. 5, p. 32-729, 2010.
- ALLEN, J. G.; COLEGATE, S. M.; MITCHELL, A. A.; MULDER, R. J.; RAISBECK, M. F. The bioactivity-guided isolation and structural identification of toxic cucurbitacin steroidal glucosides from *Stemodia kingii*. **Phytochem. Anal.**, v. 17, p. 226-235, 2006.
- ALLISON, B. J.; ALLENBY, M. C.; BRYANT, S. S.; MIN, J. E.; HIEROMNIMON, M.; JOYNER, P. M. Antibacterial activity of fractions from three Chumash medicinal plant extracts and in vitro inhibition of the enzyme enoyl reductase by the flavonoid jaceosidin. **Nat. Prod. Res.**, v. 6, p. 707-712, 2017.
- ALMEIDA, R. N.; NÓBREGA, F. F. F.; BRAGA, J. E. F.; OLIVEIRA, L. E. G.; SÁ, R. C. S. Modelos Animais para o estudo de Drogas Antidepressivas. Ed. **FapUnifesp**, São Paulo, Cap.10, p. 267 -287, 2011.
- ANDREWS, P. W.; BHARWANI, A.; LEE, K. R.; FOX, M.; THOMSON Jr, J. A. Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 51, p. 164-188, 2015.
- ANSCHAU, V.; IAGUER, F. Avaliação da taxa de peroxidação lipídica em ratos suplementados com óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão. **Unoesc & Ciência – ACBS**, Joaçaba, v. 2, n. 1, p. 17-30, 2011.
- ANTONIO, G. G.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Phytotherapy in primary health care. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 541- 553, 2014.
- APRIOKU, J. S. Pharmacology of free radicals and impact of reactive oxygen species on the testis. **Journal Reprod infertile**, v. 14, p.158-172, 2013.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Anim Behav**, v. 21, p. 205-235, 1973.

ARMENTA, M. M.; RUÍZ, C. N.; REBOLLAR, D. J.; MARTÍNEZ, E. R.; GÓMEZ, P. Y. Oxidative Stress Associated with Neuronal Apoptosis in Experimental Models of Epilepsy. **Oxid. Med. and Cell. Long.**, p.1-12, 2014.

ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA. **Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – DSM-5**. 5. ed. p.155-187, Washington: American Psychiatric Association, 2013.

BARNARD, M.P.; CHAPMAN, P. Are anxiety and fear separable emotions in driving? A laboratory study of behavioural and physiological responses to different driving environments. **Accident Anal. Prev.**, v.86, p. 99-107, 2016.

BENARBA, B.; BELABID, L.; RIGHI, K.; BEKKAR, A. A.; ELOUISSI, M.; ABDELKADER, K.; HAMIMED, A. Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in Mascara (North West of Algeria). **J. Ethnopharmacol.**, v. 175, p. 626-637, 2015.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista Nutrição Campinas**, p. 123-130, 1999.

BROWN, G. R.; NEMES, C. The exploratory behaviour of rats in the hole-board apparatus: Is head-dipping a valid measure of neophilia. **Behavioral Processes**, v. 78, n. 3, 442-448, 2008.

CAN, O. D.; OZKAY, U. D.; ÜÇEL, U. I. Anti-depressant-like effect of vitexin in BALB/c mice and evidence for the involvement of monoaminergic mechanisms. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 699, p. 250-257, 2013.

CARLINI, E. A. “Screening” farmacológico de plantas brasileiras. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 32, p. 265-274, 1972.

CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. Modelos animais para o estudo de drogas ansiolíticas. **Protocolos em psicofarmacologia comportamental**, São Paulo, Ed. Fap-Unifesp, 1. ed, p. 159-179, 2011.

CHAMY, M. C.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J. A.; GAMBARO, V. Stemodane diterpenoids from *Stemodia chilensis*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1719-1721, 1991.

CHEN, B. L.; WANG, Y. J.; GUO, H.; ZENG, G. Y. Design, synthesis, and biological evaluation of crenatoside analogues as novel influenza neuraminidase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 109, p. 199-205, 2016.

CHERMAT, S.; GHARZOULI, R. Ethnobotanical Study of Medicinal Flora in the North East of Algeria - An Empirical Knowledge in Djebel Zdim (Setif). **J. Mater. Sci. Eng. A**, v. 5, p. 50-59, 2015.

CHOPRA, K.; KUMAR, B.; KUHAD, A. Pathobiological targets os depression. **Expert. Opin. Ther. Targets**, v. 15, p. 379-400, 2011.

CITÓ, M. C. O.; SILVA, M. I. G.; SANTOS, L. K. X.; FERNANDES, M. L. MELO, F. H. C.; AGUIAR, J. A. C.; LOPES, I. S.; SOUSA, P. B.; VASCONCELOS, S. M.; MACEDO, D. S.; SOUSA, F. C. Anti-depressant-like effect of *Hoodia gordonii* in a forced swimming test in mice: evidence for involvement of the monoaminergic system. **Braz J. Med. Biol. Res**, v. 48, p. 57-64, 2015.

CLARK, D.A.; BECK, A.T. **Terapia cognitiva para os transtornos de ansiedade: ciência e prática**. Porto Alegre, Ed. Artmed, 2012.

CLARK, G.; KOSTER, A. G.; PERSON, D. W. **Psychopharmacology**, v. 20, p. 71-169, 1971.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 13, n. 2, p. 167-170, 1980.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, p. 571-625, 2005.

CRYAN, J. F.; VALENTINO, R. J; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressant using the modified rat forced swimming test. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, p. 547-569, 2005.

CUNHA, M. P.; PAZINI, F. L.; OLIVEIRA, A.; BETTIO, L. E. B.; ROSA, J. M.; MACHADO, D. G.; RODRIGUES, A. L. The activation of α 1-adrenoceptors is implicated in the antidepressant-like effect of creatine in the tail suspension test. **Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry**, v. 44, p. 39-50, 2013.

DENG, S.; MAY, B. H.; ZHANG, A. L.; LU, C.; XUE, C. C. Phytotherapy in the management of psoriasis: a review of the efficacy and safety of oral interventions and the pharmacological actions of the main plants. **Arch Dermatol Res**, v. 306, p. 29-2011, 2014.

DHARA, A. k.; PAL, S.; NAG CHAUDHURI, A. K. Psychopharmacological Studies on *Tragia Involucrate* Root Extract. **Phytot Herapy Research**, v. 16, p. 326-330, 2002.

DHIR, A; KULKARNI, S.K. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. **Eur. J. Pharmacol**, v. 568, p. 177-185, 2007.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 31-421, 1990.

DREVETS, W. C.; PRICE, J. L.; SIMPSON JR, J. R.; TODD, R. D.; REICH, T. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. **Nature**, v. 386, n. 6627, p. 824-827, 1997.

- DURCAN, M. J.; LISTER, R. G. Does directed exploration influence locomotor activity in a hole board test. **Behavioral and Neural Biology**, v. 51, p. 121-125, 1989.
- ESPEJO, E. F. Structure of the mouse behavior on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behav. Brain. Res.**, v. 86, p. 105-112, 1997.
- ESTANISLAU, C.; DIAZ-MORAN, S.; CANETE, T.; BLÁSQUEZ, G.; TOBENÃ, A. FERNANDEZ-TERUEL, A. Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the roman high and low-avoidance rats. **Neurosci Res.** v. 77, p.187-201, 2013.
- FERREIRA, T. S.; MOREIRA, C. Z.; CÁRIA, N. Z.; VICTORIANO, G. I.; SILVA JR, W. F.; MAGALHÃES, J. C. Phytotherapy: na intrduction to its history, use and application. **Res. Bras. Plantas med.** Botucatu, v. 16, n. 2, 2014.
- FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Canal saúde**, 2015. Disponível em: <http://www.canal.fiocruz.br/destaque/index.php?id=722>. Acesso em: 13 jan. 2017.
- FLORA DO BRASIL 2020 em construção. **Stemodia**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12926>>. Acesso em: 11 Jan. 2017.
- FROTA, A. F. ***Cimicifuga racemosa*: uma nova perspectiva para o tratamento de distúrbios neurológicos**. 2015. 177f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2015.
- GAFFORD, G.M.; RESSLER, K. J. GABA and NMDA receptors in CRF neurons have opposing effects in fear acquisition and anxiety in central amygdala vs, bed nucleus of the stria terminalis. **Horm. Behav**, v. 76, p. 136-142, 2015.
- GALLO, K. P.; COMER, J. S.; BARLOW, D. H. Diret-to-consumer marketing of psychological treatments for anxiety disorders. **J. Anxiety Disord**, v. 27, p. 793-801, 2013.
- GAMBERINI, M. T.; RODRIGUES, D. S.; RODRIGUES, D.; PONTES, V. B. Effects of the aqueous extract of *Pimpinella anisum* L. seeds on exploratory activity and emotional behavior in rats using the open fiels and elevated plus maze tests. **J. Ethnopharmacol**, v. 168, p. 45-49, 2015.
- GEORGIEV, V.; ANANGA, A.; TSOLOVA, V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients**. V. 6, p. 391-415, 2014.
- GIBLIN, F. J. Glutathione: a vital lens antioxidant. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, n. 2, p. 121-135, 2000.
- GOLAN, D. E.; TASHIJIAN, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. ed., p. 186 - 202, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- GONÇALVES, C. A.V.; MACHADO, A. L. Depressão: o mal do século, de que século? **R. Enferm. UERJ**, v. 15, p. 298-304, 2007.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos de psicofarmacologia**. Ed Atheneu, 2012.

GREEN, L. C.; TANNEMBAUN, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

GUPTA, D.; RADHAKRISHNAN, M.; KURHE, Y. Anxiolytic-like effects of alverine citrate in experimental mouse models of anxiety. **Eur. J. Pharmacol**, v. 742, p. 94-101, 2014.

HAAS, J.S.; STOLZ, E.D.; BETTI, A.H.; STEIN, A.C.; SCHRIPEMA, J.; VON POSER, G.L.; RATES, S.M.K. The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats is mediated by the D2 like receptors activation. **Planta Medica**, v. 77, p. 334-339, 2011.

HARVEY, A. L.; CLARK, R. L.; MACKAY, S. P.; JOHNSTON, B. F. Current strategies for drug discovery through natural products. **Expert Opin. Drug Discov**, v. 5, p. 559-568, 2010.

HOLMES, P. V. Rodent models of depression: reexamining validity without anthropomorphic interference. **Crit Rev Neurobiol**, v. 15, p. 142-174, 2003.

HIRSCHFELD, R. M. A. The comorbidity of major depression and anxiety disorders: recognition and management in primary care. **Prim. Care Companion J Clin Psychiatry**, v.3, p. 244-254, 2001.

HUFFORD, C. D.; BADRIA, F. A.; ABOU-KARAM, M.; SHIER, W. T.; ROGERS, R. D. Preparation, characterization and antiviral activity of microbial metabolites of stemodin. **J. Nat. Prod**, v. 54, n. 6, p. 1543-1552, 1991.

JANHSEN, K.; ROSER, P.; HOFFMANN, K. The problems os long-term with benzodiazepines and related substance. **Dtsch Arztebl Int**, v. 112, p. 1-7, 2015.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. Rio de Janeiro, Ed. **Guanabara Koogan**, 2014.

KESSLER, R. C.; WANG, P. S. *Epidemiology of depression*. **Guilford Press**, New York, p. 5- 22, 2009.

LALL, N.; KISHORE, N. J. Are plants used for skin care in South Africa fully explored. **Ethnopharmacology**, v. 153, n. 1, p. 61-84, 2014.

LISTER, R. G. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 5-180, 1987.

LIUKAITIS, V. Influence of adrenoceptors on functions of the body. **Med. Kaunas**, v.41, p.713-723, 2005.

MACEDO, E. M. S.; ALAN e SILVA, J. G.; SILVA. M. G. V. Quimiodiversidade e propriedades biofarmacológicas de espécies de *Senna* nativas do nordeste do Brasil. **Rev. Virtual Quim**, v. 8, p. 169-195, 2016.

MAGAJI, R. A.; SALEH, M. I. A.; MAGAJI, M. G.; BUHARI, I. Preliminary Central Nervous System Effects of the Aqueous Seed Extract of *Mucuna pruriens* in Mice. **Current Research in Neuroscience**, v. 4, p. 6-9, 2014.

MALETIC, V. What clinicians need to know about neuroprotective issues in bipolar disorder. **J. Clin. Psychiatry**, v. 68, n. 12, p. e29, 2007.

MARTINC, B.; GRABNAR, I.; VOVK, T. Antioxidants as a Preventive Treatment for Epileptic Process: A Review of the Current Status. **Current Neuropharmacology**, p. 527-550, 2014.

MARTINEZ, D. M.; BARCELLOS, A.; CASARIL, A. M.; SAVEGNAGO, L.; LERNARDÃO, E. J. Antidepressant-like activity of dehydrozingerone: involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 127, p. 111-117, 2014.

MATEOS-GARCÍA, A.; ROGER-SÁNCHEZ, C.; RODRIGUEZ-ARIAS, M.; MIÑARRO, J.; AGUILAR, M. A.; MANZANEDO, C.; ARENAS, M. C. Higher sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine and MDMA in High-Novelty-Seekers mice exposed to a cocaine binge during adolescence. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 1, p. 101-113, 2015.

MATTHEWS, K.; CHRISTMAS, D.; SWAN, J.; SORRELL, E. Animal models of depression: navigating through the clinical fog. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, p. 503- 513, 2005.

MAZZETTI, A. P.; FIORILE, M. C.; PRIMAVERA, A.; BELLO, M. L. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, v. 82, p. 10-18, 2015.

MOGENSEN, J.; WÖRTWEIN, G.; PLENGE, P.; MELLERUP, E. T. Serotonin, locomotion, exploration, and place recall in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 2, p. 381-395, 2003.

MOREIRA, H. J. C.; BRAGANÇA, H. B. N. Manual de identificação de plantas infestantes: Hortifrúti. São Paulo. **Agricultural Products**, p. 678-680, 2011.

MOSER, V. C. Neurobehavioral screening in rodents. **Curr Protoc Toxicol**, 2001.

MOURA, J. R. ; ROCHA, M. K. L. ; COSTA, Y. F. ; OLIVEIRA, J. C. S. ; CAMARA, C. A. G. ; SILVA, L. L. D. Avaliação da toxicidade de extratos brutos da espécie *Stemodia foliosa* sobre *Artemia salina* LEACH.. In: 29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia - SP. **Anais da Sociedade Brasileira de Química/29º Reunião Anual**, 2006.

NOBRE-JR, H. V.; FONTELES, M. M. F.; FREITAS, R. M. Acute seizure activity promotes lipid peroxidation, increased nitrite levels and adaptive pathways against oxidative stress in the frontal cortex and striatum. **Oxid. Med. Cell. Longev**, v.2, n.3, p. 130-137, 2009.

O'DONNELL, P.; DO, K. Q.; ARANGO, C. Oxidative/Nitrosative stress in psychiatric disorders: are we there yet?. **Schizophrenia Bull**, v. 40, n. 5, p. 960-962, 2014.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). **The World Health Report - Mental Health: New Understanding, New Hope**, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/depression-anxiety-treatment/en/>> Acesso em: 19 de janeiro de 2017.

OVERMIER, J. B.: On the nature of animal models of human behavioral dysfunction. In: HAUG, M.; WHALEN, R. E.; WASHINGTON, D.C. **Animal models of human emotion and cognition**: American Psychological Association, p. 15-24, 1999.

ÖZDEMİR, E., ALPINAR, K. An ethnobotanical survey of medicinal plants in western part of central Taurus Mountains: Aladaglar (Nigde–Turkey). **J. Ethnopharmacol**, v. 166, p. 53-65, 2015.

PALAZIDOU, E. The neurobiology of depression. **British Medical Bulletin**, p.1-19, 2012.

PALM, S.; MOMENI, S.; LUNDBERG, S.; NYLANDER, I.; ROMAN, E. Risk assessment and risk-taking behavior predict potassium and amphetamine induced dopamine response in the dorsal striatum of rats. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, p. 236, 2014.

PARIMELAZHAGAN, T. Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products. **Progress In Research Drugs**, Biomedical Research Centre, Sheffield, v. 71, 2016.

PARKER, G.; BROTHIE, H. Gender differences in depression. **Int. Rev. Psychiatry**, v. 22, p. 429-436, 2010.

PASQUINI, M.; BERARDELLI, I.; BIONDI, M. Ethioopathogenesis of depressive disorders. **Clin Pract Epidemiol Ment Health**, v. 19, n. 10, p. 166-171, 2014.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci Methods**, v. 14, p. 67-149, 1985.

PEREZ, R. M. G.; PEREZ, J. A.; GARCIA, L. M.; SOSSA, H. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. **J. Ethnopharmacol**, v. 62, p. 43-48, 1998.

PERSSON, A.; SIM, S. C.; VIRDING, S.; ONISHCHENKO, N.; SCHULTE, G.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Decreased hippocampal volume and increased anxiety in a transgenic mouse model expressing the human CYP2C19 gene. **Mol. Psychiatry**, v.19, p. 733-741, 2014.

PETTERS, R. M.; SOMMER, J. R. Transgenic animals as models for human disease. **Transgenic Res**, v. 9, p. 347-351, 2000.

PIRES, L. F.; FREITAS, R. M.; RODRIGUES, A. C. T. Efeito antidepressivo e atividade serotoninérgica da Curcumina em modelos animais de depressão. **Revista de Farmacologia de Chile**, v. 6, n. 1, 2013.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JAFRE, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur. J. Pharmacol**, v. 47, p. 79-339, 1978.

- PYTKA, K. The role of serotonergic, adrenergic and dopaminergic receptors in antidepressant-like effect. **Pharmacol. Rep.**, v. 68, p. 263-274, 2016.
- RABIEI, Z.; HOJJATI, M.; RAFIEIAN-KOPAEIA, M.; ALIBABAEI, Z. Effect of *Cyperus rotundus* tubers ethanolic extract on learning and memory in animal model of Alzheimer. **Bio & Aging Pathol.**, v. 3, p. 185–191, 2013.
- RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**. 7. ed. Elsevier, 2016.
- RAMOS, E. H. S.; DUARTE, H. S. D.; JIMENEZ, G. C. Perfil toxicológico das fases II e III do exsudato extraído do fruto de *Mangifera indica* L. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n.1, p. 75-87, 2015.
- RAUPP, I. M. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. **J. Ethnopharmacol.**, v. 118, p. 295-299, 2008.
- RIHMER, Z.; GONDA, X.; DÖME, P. Depression in Parkinson's disease. **Ideggyogy Sz.**, v. 30, n. 67, p. 36-229, 2014.
- REN, Y.; ZHU, C.; WU, J.; ZHENG, R.; CAO, H. Comparison between herbal medicine and fluoxetine for depression: A systematic review of randomized controlled trials. **Complement. Ther. Med.**, v. 23, p. 674-684, 2015.
- RENDEIRO, C.; RHODES, J. S.; SPENCER, J. P. E. The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. **Neurochemistry International**, v. 89, p. 126-139, 2015.
- RIBEIRO, C. A. S.; PUPO, A. S. Involvement of α_{1B} -adrenoceptors in the anti-immobility effect of imipramine in the tail suspension test. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 750, p. 39-42, 2015.
- RODAN, L. H.; GIBSON, K. M.; PEARL, P.L. Clinical use of CSF neurotransmitters. **Pediatr. Neurol.**, v. 53, p. 277-286, 2015.
- RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Braz J Med Biol Res.**, v. 30, p. 289-304, 1997.
- RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. **Rev. bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 6, 2010.
- RODRIGUES, F. E. A.; LIMA, J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; VASCONCELOS, J. N.; SANTIAGO, G. M. P.; MAFEZOLI, J.; BRAZ-FILHO, R.; ARRIAGA, A. M. C. Diterpene and other constituents from *Stemodia maritima* (Scrophulariaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 8, p. 1581-1586, 2010.
- RUSSELL, F. A.; MULABAGAL, V.; THOMPSON, D. R.; SINHGH-WILMOT, M. A.; REYNOLDS, W. F.; NAIR, M. G.; LANGER, V.; REESE, P. B. Stemodin-derived analogues with lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumour cell proliferation inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 72, p. 2361–2368, 2011.

- RYBKA, J.; KEDZIORA-KORNATOWSKA, K.; CARVALHO, L. A.; CATTANEO, A.; ANACKER, C.; KEDZIORA, J. Interplay between the pro-oxidant and antioxidant systems and proinflammatory cytokine levels, in relation to iron metabolism and the erythron in depression. **Free. Radic. Boil. Med.**, v. 63, p. 187-194, 2013.
- SAH, S.P.; TIRKEY, N.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Effect of quercetin on lipopolysaccharide induced-sickness behavior and oxidative stress in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43, p. 192–196, 2011.
- SALGADO, H.; KOHR, G.; TREVINO, M. Noradrenergic “tone” determines dichotomus control of cortical spike timing-dependent plasticity. **Scientific reports**, v. 417, p. 1-7, 2012.
- SANDERS-BUSH, E.; HAZELWOOD, L. 5-Hidroxitriptamina (serotonina) e dopamina. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. McGraw Hill, p. 335-351, 2012.
- SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **The American Journal of Psychiatry**, v. 122, p. 509-520, 1965.
- SCHOLZ, R. W.; GRAHAM, K. S.; GUMPRICHT, E.; REDDY, C.C. Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation. *Ann NY Acad Sci* 1989;570:514-7. Hughes RE. Reduction of dehydroascorbic acid by animal tissues. **Nature**, v. 203, p. 9-1068, 1964.
- SCHUFFENHAUER, A.; VARIN, T. Rule-Based Classification of Chemical Structures by Scaffold. **Mol. Inf.**, v. 47, p. 646–664, 2011.
- SCHWEIZER, E.; RICKELS, K. Benzodiazepine dependence and withdrawal: a review of the syndrome and its clinical management. **Acta Psychiatr**, p. 95–101, 1998.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total protein-bound, and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, V. 25, p. 192-205, 1968.
- SERAFIM, A. P.; FELICIO, L. F. Dopaminergic modulation of grooming behavior in virgin and pregnant rats. **Braz J Med Biol Res**. n. 34, v. 11, p. 1465-1470, 2001.
- SHANKMAN, S. A.; NELSON, B. D.; HARROW, M.; FAULL, R. Does physical anhedonia play a role in depression? A 20-year longitudinal study. **J. Affect. Disord**, v. 120, p. 170-176, 2010.
- SIELGEL, P. S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **J. Psychol**, v. 21, p. 227-236, 1946.
- SILVA, D. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; OLIVEIRA, O. F. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesq. Vet. Bras**, v. 24, n. 4, p. 223-236, 2006.
- SILVA, F. R. L.; RODRIGUES, F. E. A.; GOMES, A. R. S.; ARRIAGA, A. M. C.; MAFEZOLI, J.; LEMOSA, T. L. G.; ALMEIDA, M. C. S.; SANTIAGO, G. M. P.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; COUTINHO, H. D. M. Phytochemical

study, antioxidante and antibacterial activities of *Stemodia marítima*. **Quim. Nova**, v. 37, n. 9, p. 1474-1478, 2014.

SILVA, L. L. D. da; NASCIMENTO, M. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Antibacterial activity of labdane diterpenoids from *Stemodia foliosa*. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 1291-1293, 2008.

SILVA, W. M. B.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Acylated manoyl oxide diterpenes of *Stemodia trifoliata*. **Magn. Reson. Chem.**, v. 48, p. 486-489, 2010.

SONAVANE, G. G.; SARVEIYA, V.P.; KASTURE, V. S.; KASTURE, S. B. Anxiogenic activity of *Myristica fragrans* seeds. **Pharm. Biochem. Behav.** v. 71, p. 239-244, 2002.

SOUSA, F. C. F.; OLIVEIRA, I. C. M.; FERNANDES, M. L. Advances in the research of essential oils: Anxiolytic and sedative activity in medicinal essential oils. **Nova Biomedical**, p. 123-135, 2012.

STONE, E. A.; QUARTERMAIN, D.; LIN, Y.; LEHMANN, M. L. Central alpha 1-adrenergic system in behavioral activity and depression. **Bioche. Phar.**, v. 73, p. 1063-1075, 2007.

STONE, E. A.; LIN, Y.; ITTERA, A.; QUARTERMAIN, D.; Pharmacological evidence for the role of central alpha 1B-adrenoceptors in the motor activity and spontaneous movement of mice. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 2, p. 254-261, 2001.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 85, p. 367-370, 1985.

TABASSUM, N.; HAMDANI, M. Plants used to treat skin diseases. **Pharmacognosy Reviews**, v. 8, n. 15, p. 52-60, 2014.

TAMADA, K.; TOMONAGA, S.; HATANAKA, F.; NAKAI, N.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T.; NAKATANI, J.; TAKUMI, T. Decreased exploratory activity in a mouse model of 15q duplication syndrome; implications for disturbance of serotonin signaling. **PLoS One**, v. 5, n. 12, 2010.

TECOTT, L. H.; NESTLER, E. J. Neurobehavioral assessment in the information age. **Nature Neuroscience**, v. 7, p. 462-466, 2004.

TEPPER, J. M.; TECUAPETLA, F.; KOÓS, T.; IBÁÑEZ-SANDOVAL, O. Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. **Front. Neuroanat**, 2010.

TIWARI, A. K. Imbalance in antioxidant defense and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. **Current Science**, p. 1179-1187, 2011.

TUTTOLOMONDO, T.; LICATA, M.; LETO, C.; SAVO, V.; BONSANGUE, G.; GARGANO, M.L.; VENTURELLA LA BELLA, G.S. Ethnobotanical investigation on wild medicinal plants in the Monti Sicani Regional Park (Sicily, Italy). **J. Ethnopharmacol**, v. 153, p. 568-586, 2014.

VAN DER FELTZ-CORNELIS, C. M.; NUYEN, J.; STOOP, C.; CHAN, J.; JACOBSON, A. M.; KATON, W. Effect of interventions for major depressive disorder and significant depressive symptoms in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **Gen. Hosp. Psychiatry**, v. 32, p. 380-395, 2010.

VOLPE M.; PANENI F. Shooting vascular oxidative stress: new hopes for stroke patients? **Eur Heart J**, p. 1573–1575, 2015.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, p. 322-328, 2007.

WHITE, J. D.; SOMERS, T. C.; Construction of the stemodane nucleus by a hydroxyl-directed intramolecular ene reaction. Total synthesis of (\pm)-2-desoxystemodinone. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 116, n. 22, p. 9912-9920, 1994.

WILLNER, P. Behavioral models in psychopharmacology. In: WILLNER, P. **Behavioral Models in Psychopharmacology: Theoretical, Industrial and Clinical Perspectives**. Cambridge, UK: Cambridge Univ, p. 3-18, 1991.

YI, L.; LIU, B.; LI, J.; LUO, L.; LIU, L.; GENG, D.; TANG, Y.; XIA, Y.; WU, D. BDNF signaling is necessary for the antidepressant-like effect of naringenin. **Prog. In Neuropsy. & Bio. Psychiatry**, v. 48, p. 135-141, 2014.

ZHENG, A.; FAN, Y.; SHI, D.; LIU, C. Antidepressant-like effect of flavonoids extracted from *Apocynum venetum* leaves on brain monoamine levels and dopaminergic system. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, p. 108-113, 2013.

ZIPCODEZOO. **Genus Stemodia**. Disponível em:
<<http://zipcodezoo.com/index.php/Stemodia>>. Acesso em: 11 Jan. 2017.

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Av. Comte. Maurocélia Rocha Pontes, 100, Derby
CEP: 62.042-280 Sobral-CE
Fone/Fax: (88) 3611.8000

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 15/15, sobre o projeto intitulado: **Avaliação dos efeitos neuropsicofarmacológicos de *Stemodia marítima* em camundongos**, de responsabilidade da Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional na Ciência e Experimentação Animal (CONCEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), em reunião realizada em 08 de setembro de 2015.

Sobral, 06 de outubro de 2015

Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA