



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CAMPUS-SOBRAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DÉBORA PATRÍCIA FEITOSA MEDEIROS**

**EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DO EXTRATO  
AQUOSO E DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA *Moringa oleifera* EM  
CAMUNDONGOS**

**SOBRAL – CE**

**2018**

DÉBORA PATRÍCIA FEITOSA MEDEIROS

EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DO EXTRATO AQUOSO E  
DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA *Moringa oleifera* EM CAMUNDONGOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará Campus Sobral, como requisito parcial para Obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Macromoléculas

Orientador (a): Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos de Aguiar

Coorientadora: Profa. Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo

SOBRAL – CE

2018

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)

---

- M438e Medeiros, Débora Patrícia Feitosa.  
Efeitos neurocomportamentais e bioquímicos do extrato aquoso e dos metabólitos secundários da Moringa oleifera em camundongos / Débora Patrícia Feitosa Medeiros. – 2018.  
70 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. Lissiana Magna Vasconcelos de Aguiar.  
Coorientação: Prof. Dr. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo .
1. Depressão. 2. Ansiedade. 3. Epilepsia. 4. Plantas. I. Título.

CDD 660.6

---

DÉBORA PATRÍCIA FEITOSA MEDEIROS

**EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DO EXTRATO  
AQUOSO E DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA *Moringa oleifera* EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará Campus Sobral, como requisito parcial para Obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Macromoléculas

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará/Campus Sobral

---

Profa. Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo  
Universidade Federal do Ceará/Campus Sobral

---

Prof. Dra. Maria Isabel Linhares  
Centro Universitário INTA – UNINTA

---

Prof. Dra. Hévila Oliveira Salles  
Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**“As investigações científicas revelam novas maneiras com as quais Deus trabalha e nos trazem revelações mais profundas do totalmente desconhecido.”**

**Maria Mitchell**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me deu o fôlego de vida e forças para continuar nessa caminhada e conseguir conquistar tudo aquilo que Ele sonhou para minha vida.

Aos meus pais, *Antônia e Inácio* que desde a infância nunca mediram esforços para nos dar o melhor ensino, pois eles sabiam que a melhor herança é o conhecimento e minhas irmãs *Rachel, Hérica e Vandinha* que mesmo distante sei que torcem e se alegram com minhas conquistas.

Ao meu Marido, amigo, companheiro e cúmplice sempre ao meu lado em todos os momentos, sejam eles fáceis ou difíceis, dizendo que tudo dará certo, *João Paulo* sinto no seu apoio o cuidado de Deus na minha vida.

As minhas companheiras de Mestrado *Carol, Nayara e Fheliphy* que sempre estavam ao meu lado ajudando sempre que precisava e tornando os experimentos mais leves e divertidos.

A todos nossos ICs, *Manu, Gabriel, Gustavo, Larissa, Thomas, Helenira, Marcos* e *Jonhyson*, que, mesmo com a grande rotina do curso de Medicina, encontraram tempo para nos ajudar quando precisávamos.

À nossa amiga *Cris* do programa de Ciências da Saúde pela sua ajuda e habilidade na dissecação e nossa pós-doutora *Cleane* que só veio somar em nossas pesquisas.

Ao nosso técnico de Laboratório *Francisco* que sempre está à disposição para nos ajudar e atender às nossas solicitações.

Às minhas amigas *Suélli e Bruna*, que me incentivaram e me ensinaram os protocolos e a gostar da pesquisa em neurociência.

À minha amiga *Bel*, minha irmã de coração, sua amizade foi amor à primeira vista, agradeço a Deus por você ter me ajudado a trilhar esse caminho, obrigada por todo apoio, ensinamentos, puxões de orelha e paciência. Faltam palavras para expressar o valor da sua amizade.

Ao UNINTA por cooperar com essa conquista, incentivando seus colaboradores na conquista desse título.

Aos meus amigos do UNINTA para a vida *Renata, Paty fofinha, Luiza, Patcinha, Lenny, Manuzita, Tiago, Fefe, Magda, Leilah, Mari e Anael* por me ajudarem a tornar a rotina mais leve e divertida.

Aos meus irmãos em Cristo e pastores da igreja Comunidade Manancial de Cristo pelas orações e apoio espiritual.

À prof. Dra Lissiana Vasconcelos Aguiar, minha amorosa orientadora, admiro demais você, seus conhecimentos, sua dedicação aos seus orientandos, se tornando quase uma mãe para nós e não medindo esforços para executarmos um bom trabalho.

À professora Dra. Carla Thiciane Vaconcelos de Melo pela sua co-orientação e contribuição nesse trabalho.

À Dra. Hévila por aceitar participar da minha banca de defesa, contribuindo para a melhoria do meu trabalho.

À toda equipe do Biotério que sempre esteve à disposição nos fornecendo não apenas os animais para que a pesquisa fosse concluída, mas todo seu apoio.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que me ajudaram, direta ou indiretamente, colaborando para concretização deste trabalho.

## RESUMO

Depressão, ansiedade e epilepsia são doenças que tem acometido uma parte da população e se tornado uma preocupação, pois diminui a qualidade de vida das pessoas com esses transtornos. Existem diversos tratamentos farmacológicos para tratar esses distúrbios, no entanto alguns não respondem ao tratamento. Extratos e metabólitos de plantas tem sido pesquisado como uma alternativa ao tratamento de diversas patologias, dessa forma a *Moringa oleifera* (*M.oleifera*) tem sido estudada por possuir componentes que possam auxiliar no tratamento dessa doenças. Dessa forma, o estudo teve como objetivo avaliar os efeitos comportamentais e bioquímicos do extrato aquoso (EAMO) e dos metabólitos secundários (METMO) das sementes da *M. oleifera* em modelos clássicos de depressão, ansiedade e convulsão em camundongos e o estresse oxidativo no hipocampo (HC), corpo estriado (CE) e córtex pré-frontal (CPF). O EAMO foi administrado na forma aguda nas doses de 50, 150 e 450 mg/Kg (v.o.) e realizados os testes do campo aberto, labirinto em cruz elevado (LCE) e nado forçado (NF). No pré-tratamento agudo com EAMO houve redução da atividade locomotora espontânea dos animais, não apresentou efeito ansiolítico no teste de LCE e apresentou possível efeito depressor no teste NF. A partir desses resultados foi avaliado o efeito do METMO nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg (v.o) em pré-tratamento agudo e subcrônico (14 dias) no teste convulsão induzido por pilocarpina. No agudo houve aumento da latência de convulsão na dose de 50 mg/Kg e aumento nas três doses no subcrônico. Na latência de morte houve um aumento nas doses de 50 e 100 mg/Kg no pré-tratamento agudo e aumento nas três doses no subcrônico. Ao avaliar estresse oxidativo, houve redução da peroxidação lipídica (MDA) nos tratamentos agudos do EAMO no CE (150 mg/Kg) e nas três doses no CPF e do METMO no HC na dose de 50 mg/Kg e nas três doses no CE, no subcrônico reduziu nas três doses no HC, CE e CPF. Na dosagem nitrito/nitrato, não houve alteração do EAMO e do METMO houve redução no HC nas três doses, no CE (25 e 50 mg/Kg) CPF (50 mg/Kg), no subcrônico houve redução nas três doses no HC, CE e CPF. Na dosagem de glutathiona (GSH) não houve alteração no agudo do EAMO e do METMO houve redução no subcrônico do HC (50 e 100 mg/Kg), no CE (25 e 100 mg/Kg) e nas três doses no CPF. Dessa forma, o presente estudo demonstrou um possível efeito neuroprotetor no modelo de convulsão induzida por pilocarpina que pode estar relacionado ao mecanismo de ação antioxidante desses compostos

**Palavras-chave:** Depressão; Ansiedade; epilepsia; plantas.

## ABSTRACT

Depression, anxiety and epilepsy are diseases that affect a part of the population and become a concern because it decreases the quality of life of people with disorders. They were treated pharmacologically to treat these disorders, but some did not respond to treatment. Plant extracts and metabolites have been researched as an alternative to the treatment of several diseases, so *Moringa oleifera* (*M.oleifera*) has been studied because it has components that can aid in the treatment of these diseases. The objective were neighborhood effects of neuropsychopharmacological of the aqueous extract (EAMO) and metabolized secondary (METMO) the seeds of *M.oleifera* in the classical samples of depression, anxiety and convulsion in mice and oxidative stress in the hippocampus (HC), striatum (ST) and prefrontal cortex (PFC). EAMO was administered acutely at the doses of 50, 150 and 450 mg/Kg (i.o.) and the open field, *plus maze* and forced swimming (FS) tests were performed. In the pre-treatment acute EAMO there was a reduction in the spontaneous locomotor activity of the animals, it did not present an anxiolytic effect in the *plus maze* test and presented a possible depressive effect in the forced swimming test. From these results, the effect of METMO at doses of 25, 50 and 100 (i.o) on acute and subchronic pretreatment (14 days) in the pilocarpine-induced convulsion test was evaluated. In the acute phase there was an increase in seizure latency at a dose of 50 mg/Kg and increase in the three doses in the subchronic one. In the death latency there was an increase in the doses of 50 and 100 mg/Kg in the acute pretreatment and increase in the three doses in the subchronic. When evaluating oxidative stress, there was a reduction of lipid peroxidation (MDA) in the acute treatments of EAMO in the ST (150 mg/Kg) and in the three doses in the PFC and METMO in the HC in the dose of 50 mg/Kg and in the three doses in the ST. In the subchronic reduced in the three doses in HC, ST and PFC. In the nitrate/nitrate dosage, there was no change in the EAMO and in the METMO there was a reduction in HC in the three doses, in the ST (25 and 50 mg/Kg) and PFC (50 mg/Kg) in the subchronic one there was reduction in the three doses in HC, ST and PFC. In the dosage of glutathione (GSH) there was no change in the EAMO acute and there was a reduction in the METMO subchronic of HC (50 and 100 mg/Kg), in the ST (25 and 100 mg/Kg) and in the three doses in the PFC. Thus, the present study demonstrated a possible neuroprotective effect in the pilocarpine-induced convulsion model that may be related to the mechanism of antioxidant action of these compounds

Key words: Depression; anxiety; epilepsy; plants.

## LISTA DE SIGLAS

μM	Micromolar
5-HT	Serotonina
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AD	Antidepressivo
ANOVA	Análise de Variância
BDZ	Benzodiazepínicos
BHE	Barreira hematoencefálica
CAT	Catalase
CE	Corpo Estriado
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CPF	Córtex pré-frontal
CRF	Corticotropina
DAES	Drogas antiepiléticas
DP	Dopamina
DTNB	5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico
DZP	Diazepam
EAMO	Extrato aquoso da <i>Moringa oleifera</i>
EEG	Eletroencefalograma
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
<i>et al.</i>	E colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FLUX	Fluoxetina
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GLS	Glucosinolatos
GMG	Glucomorigina
GSH	Glutationa
HC	Hipocampo
i.p	Intraperitoneal

IL	Interleucina
IMAO	Inibidores monoamina oxidase
IRSN	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina
ISRS	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina
ITC	Isotiocianatos
LCE	Labirinto de Cruz Elevada
LC-NE	Locus coeruleus-norepinefrine
MAO	Monoamina oxidase
MDA	Malonildialdeído
METMO	Metabólito Secundário da <i>Moringa oleifera</i>
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NA	Noradrenalina
NE	Norepinefrina
NEBA	Número de Entradas nos Braços Abertos
NEBF	Número de Entradas nos Braços Fechados
NF	Nado Forçado
nM	Nanomolar
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organização Mundial de Saúde
p/v	Peso/Volume
P400	Pilocarpina 400
P400	Pilocarpina 400 mg/Kg
PEBA	Percentagem de Entradas nos Braços Abertos
PTBA	Percentagem de Tempo nos Braços Abertos
PTBA	Percentagem do tempo de permanência nos braços abertos
seg	Segundos
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
V.O.	via oral

vs

WHO

Versus

World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Imagem representando as Folhas, Flores (A) e sementes (B) da <i>Moringa oleifera</i> .....	25
Figura 2 -	Protocolo Experimental para o Tratamento Agudo do EAMO nas doses de 50, 150 e 450 mg/Kg v.o. ....	31
Figura 3 -	Protocolo Experimental para o tratamento agudo do METMO nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg v.o.....	31
Figura 4 -	Protocolo Experimental para Tratamento subcrônico do METMO nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg v.o .....	31
Figura 5 -	Teste do campo aberto em camundongo .....	32
Figura 6 -	Teste de labirinto em cruz elevado em camundongo .....	34
Figura 7 -	Teste do nado forçado em camundongo .....	35
Figura 8 -	Teste de convulsão induzido pela pilocarpina .....	36
Figura 9 -	Áreas Cerebrais do camundongo utilizadas para as dosagens de Nitrito/nitrato, TBARS e Glutaciona.....	36
Figura 10 -	Efeito do tratamento agudo com EAMO sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos .....	39
Figura 11 -	Efeito do EAMO e Fluoxetina sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos segundos.....	40
Figura 12 -	Efeito do EAMO e DZP-1 no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos no NEBA (A), no TPBA (B), no PEPA (C) e no PTBA (D) .....	41
Figura 13 -	Efeito do METMO sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos .....	43
Figura 14 -	Efeito do tratamento agudo do METMO sobre a latência de convulsão (A) e latência de morte (B) no teste de convulsão induzida por pilocarpina .....	44
Figura 15 -	Efeito do tratamento subcrônico do METMO sobre a latência de convulsão (A) e latência de morte (B) no teste de convulsão induzida por pilocarpina .....	45
Figura 16 -	Efeito do tratamento agudo do EAMO sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos .....	47
Figura 17 -	Efeito do tratamento agudo do METMO sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento.....	48

Figura 18 - Efeito do tratamento subcrônico do METMO sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 14º dia de tratamento.....	49
Figura 19 - Efeito do tratamento agudo do EAMO sobre a concentração de nitrito/nitrato no hipocampo no HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos no 1º dia de tratamento ...	51
Figura 20 - Efeito do tratamento agudo do METMO sobre a concentração de nitrito/nitrato no HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento.....	52
Figura 21 - Efeito do tratamento subcrônico do METMO sobre a concentração de nitrito/nitrato HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 14º dia de tratamento.....	53
Figura 22 - Efeito do tratamento agudo do EAMO sobre a produção de GSH no HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos no 1º dia de tratamento .....	55
Figura 23 - Efeito do tratamento subcrônico do METMO sobre a produção de GSH no HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 14º dia de tratamento.....	56

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos tipos de ansiedade de acordo com Associação Americana de Psiquiatria.....	19
Quadro 2 - Tratamento Agudo do Extrato Aquoso das sementes da <i>M.oleifera</i> .....	29
Quadro 3 - Tratamento agudo e subcrônico do metabólito secundário da <i>M.oleifera</i> .....	30

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1</b>	<b>Desordens neurocomportamentais.....</b>	<b>16</b>
1.1.1	<i>Depressão.....</i>	17
1.1.2	<i>Ansiedade.....</i>	18
1.1.3	<i>Epilepsia.....</i>	20
<b>1.2</b>	<b>Modelo animal.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3</b>	<b>Estresse oxidativo.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4</b>	<b>Plantas medicinais.....</b>	<b>23</b>
<b>1.5</b>	<b><i>Moringa oleifera</i>.....</b>	<b>25</b>
1.5.1	<i>Generalidades.....</i>	25
1.5.2	<i>Bioativos.....</i>	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Aspectos éticos.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b>Material botânico.....</b>	<b>28</b>
<b>3.4</b>	<b>Drogas e preparo.....</b>	<b>28</b>
<b>3.5</b>	<b>Tratamento dos grupos experimentais.....</b>	<b>29</b>
<b>3.6</b>	<b>Protocolo experimental.....</b>	<b>30</b>
<b>3.7</b>	<b>Testes comportamentais.....</b>	<b>32</b>
3.7.1	<i>Avaliação da atividade locomotora.....</i>	32
3.7.2	<i>Avaliação da atividade ansiolítica.....</i>	32
3.7.3	<i>Avaliação da atividade antidepressiva.....</i>	34
3.7.4	<i>Avaliação da Convulsão Induzida por Pilocarpina.....</i>	35
<b>3.8</b>	<b>Dissecação das áreas cerebrais.....</b>	<b>36</b>
<b>3.9</b>	<b>Análises neuroquímicas.....</b>	<b>37</b>
3.9.1	<i>Determinação da peroxidação lipídica por medição do conteúdo de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....</i>	37
3.9.2	<i>Determinação da concentração de nitrito/nitrato.....</i>	37
3.9.3	<i>Determinação da concentração da glutatona reduzida (GSH).....</i>	38

<b>3.10</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Avaliação comportamental do Extrato <i>M.oleífera</i>.....</b>	<b>39</b>
4.1.1	<i>Avaliação da Atividade Locomotora.....</i>	39
4.1.2	<i>Avaliação da atividade antidepressiva.....</i>	39
4.1.3	<i>Avaliação da atividade ansiolítica.....</i>	40
<b>4.2</b>	<b>Avaliação comportamental do metabólito secundário da <i>M.oleífera</i>.....</b>	<b>42</b>
4.2.1	<i>Curva de Dose resposta.....</i>	42
4.2.2	<i>Avaliação da Convulsão Induzida por Pilocarpina.....</i>	43
<b>4.3</b>	<b>Avaliação do Estresse Oxidativo.....</b>	<b>45</b>
4.3.1	<i>Análise da Peroxidação Lipídica (TBARS) nas áreas cerebrais.....</i>	45
4.3.2	<i>Efeitos dos tratamentos sobre a produção de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais dos animais.....</i>	50
4.3.3	<i>Efeito do tratamento com EAMO e METMO sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos.....</i>	54
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
	<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>70</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Desordens neurocomportamentais

Dados da Organização Mundial de Saúde demonstram que a saúde mental é de grande relevância na sociedade, pois ela afeta não só a pessoa que é acometida por essa enfermidade, mas as que estão ao seu redor, além de diminuir a produtividade social. Em alguns países ocidentais, as enfermidades mentais são a principal causa de incapacidade, diminuindo até a produtividade do país. Existem dados que demonstram que a prevalência global das doenças mentais está entre 12,2% e 48,6%, sendo 70% dos casos concentrados em países de baixa renda. Transtornos neuropsiquiátricos podem causar morbidade e apesar de não levarem à morte, eles podem estimular um suicídio (WHO, 2005; TOMLINSON, 2013).

Algumas doenças como depressão, esquizofrenia, epilepsia, demência e outras doenças mentais e neurológicas e até mesmo o uso de substâncias que causam dependência como álcool representam uma prevalência de 13% no mundo (COLLINS et al., 2011). Podemos dividir essas desordens em dois grupos: depressão, ansiedade, esquizofrenia, pânico, insônia e dependência de drogas como desordens mentais e a demência, epilepsia e esclerose múltipla como desordens neurológicas e ambos os grupos podem ser classificados como desordens neuropsiquiátricas, as quais afetam o comportamento do indivíduo e sua vida social (WITTCHEN et al., 2011).

Reconhecer que esses transtornos podem ser originados por algum problema de base biológica e não somente comportamental, em decorrência de algum trauma ou por causa do processo de envelhecimento, tem proporcionado a racionalização dessas patologias, facilitando a medicalização dos pacientes (CLARK, 2014).

O avanço da tecnologia, principalmente no âmbito da biologia, tem permitido que técnicas, como imagem celular e molecular, elucidem de maneira mais evidente quais as alterações nos circuitos do cérebro possam estar relacionadas com a fisiopatologia dos transtornos emocionais e o modo de ação das drogas terapêuticas. Um possível mecanismo que possa unir depressão e ansiedade seria as modificações nos sistemas de neurotransmissão relacionados às monoaminas (desregulação dos sistemas serotoninérgicos, noradrenérgicos e alguns casos os dopaminérgicos) (NEUMANN et al., 2011).

### 1.1.1 Depressão

A depressão caracteriza-se pela alteração de humor em situações rotineiras com várias flutuações emocionais, podem estar associada à diversas doenças crônicas. Geralmente apenas 50% dos pacientes respondem ao tratamento com antidepressivos, pois o diagnóstico é baseado apenas pelos sintomas do comportamento, tornando o tratamento com as drogas pouco específicos. Dessa forma, alguns pacientes não respondem à medicação (MÉNARD; HODES; RUSSO, 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde a depressão é uma doença comum em todo o mundo e afeta mais de 300 milhões de pessoas e, aproximadamente, 800 mil pessoas morrem por suicídio todos os anos, sendo suicídio a segunda principal causa de morte entre os jovens de 15 a 29 anos. Embora existam tratamentos eficazes para a depressão, menos da metade dos afetados no mundo (em muitos países, menos de 10%) recebem esses tratamentos, seja pela falta de profissionais de saúde ou pela falha do diagnóstico (WHO, 2018).

Sua elevada e crescente prevalência mundial e seus graves impactos caracterizam essa doença como um dos grandes problemas de saúde pública do século XXI. Aproximadamente 4,3% das pessoas em todo mundo perdem anos de vida vividos por conta da doença. Em 2004 ocupou a primeira posição dentre as causas de anos vividos com incapacidade. Os impactos econômicos da depressão na sociedade também são considerados graves, chegando a 118 bilhões de euros na Europa em 2004, 1% da economia do continente (BOING et al, 2012).

As principais características da depressão podem ser percebidas através do humor triste, pelo desinteresse nas atividades diárias ou na capacidade de ter prazer com essas atividades, sendo utilizadas para diagnosticar o distúrbio. Outras alterações que podem acompanhar a depressão baseiam-se em mudanças nos padrões de sono, distúrbios do apetite e perda de interesse sexual e até mesmo sintomas cognitivos como a capacidade de refletir, de se concentrar e de tomar decisões. Esses sintomas podem variar de indivíduo e cultura (AL-BUSAIDI; ALAMRI, 2016).

A hipótese monoaminérgica, a qual envolve a monoamina oxidase (MAO), consiste em que há uma alteração nos níveis das monoaminas como serotonina (5-HT), norepinefrina (NE) e dopamina (DP) e tem sido a hipótese mais utilizada no tratamento da depressão. Esse tipo de tratamento melhora a transmissão e sinalização monoaminérgica. Os inibidores de MAO bloqueiam o transportador de norepinefrina e serotonina, o que aumenta os níveis sinápticos, aumentando a neurotransmissão (WANG et al., 2015; DESHWAL et al., 2017; LEE; BAE, 2017).

Há algumas classes químicas de antidepressivos (AD) disponíveis no mercado como inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRS), inibidores da recaptção da noradrenalina (ISRN), tricíclicos (TCA) e inibidores monoaminas oxidase (IMAO). O uso dos TCA e da IMAO iniciaram a partir de 1957. Essas medicações foram essenciais no tratamento da depressão, no entanto, apesar do desenvolvimento de várias drogas, o tratamento da depressão ainda não consegue a remissão clínica em muitos casos, além de causar alguns efeitos colaterais ( ELIWA; BELZUNG; SURGET, 2017; LEE; BAE, 2017).

### *1.1.2 Ansiedade*

A ansiedade pode ser caracterizada pela dificuldade que o indivíduo tem de lidar com seu estado emocional, prejudicando sua função social. Ela pode ser caracterizada por sintomas como medo, apreensão, irritabilidade, tensão, preocupação excessiva e dificuldades de concentração (SALT; MULVANEY; PRESTON, 2017).

Esse transtorno, geralmente, vem acompanhada do estresse, a qual consiste na resposta fisiológica do corpo a ameaças mentais ou físicas. Embora uma breve exposição ao estresse seja uma um mecanismo de enfrentamento benéfico, o estresse de longo prazo provavelmente prejudicará a saúde em um contexto geral e na complicação das doenças existentes. Protocolos de tratamento para o controle da ansiedade e a redução do estresse estão sendo continuamente buscados para mitigar o efeito desses riscos de saúde (MORGAN et al., 2014).

Estudos demonstram que anormalidades da transmissão glutamatérgica estão envolvidas na fisiopatologia da ansiedade, ou seja, os distúrbios de ansiedade são resultados do equilíbrio inibitório/excitatório no cérebro, por conta do aumento da atividade do sistema glutamatérgico excitatório (PITSIKASN, 2014). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos. Por isso, um dos primeiros tratamentos desse distúrbio foram os barbitúricos, no entanto, possui com desvantagens seu efeito hipnótico e a dependência física com crise de abstinência nos pacientes (GELFUSO et tal., 2014).

Com a descoberta dos benzodiazepínicos (BDZ) eles começaram a ser o principal medicamento prescrito para o tratamento de transtornos de ansiedade. No entanto, podem apresentar vários efeitos colaterais como a tolerância, amnésia, fraqueza, perda de desejo sexual, efeitos gastrintestinais e alterações no peso corporal, sedação, relaxamento muscular, e dependência física (MAHENDRAN et al., 2014). Após a descoberta dos ISRS, esses

medicamentos começaram a ser prescritos para os transtornos de ansiedade (GELFUSO et al., 2014).

De acordo com a Associação Americana de Psiquiatria (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014) a ansiedade pode ser caracterizada em oito tipos (Quadro 1):

Quadro 1- Classificação dos tipos de ansiedade de acordo com Associação Americana de Psiquiatria.

<b>Tipo</b>	<b>Característica</b>
Transtornos de ansiedade de separação	Indivíduo ansioso diante de situações que podem levar a perda de algo que ele seja apegado.
Mutismo Seletivo	Fracasso de falar em situações sociais que tenham a expectativa que ele fale.
Fobia Específica	Ansiosos e apreensivos e evitam coisas ou situações que lhe causem esses transtornos como animais, ambientes dentre outros.
Transtorno de ansiedade Social (Fobia Social)	Se esquivam de situações que podem ser avaliadas pelo seu comportamento, caso a avaliação seja negativa ele ficaria envergonhado.
Transtorno de Pânico	Sofrem ataques de pânico diante de alguma situação que o leva ao medo e fica apreensivo em sofrer novamente esses ataques em locais que não são familiares, evitando locais diferentes.
Agorafobia	Temem situações como pegar o transporte público, espaços abertos, lugares fechados, pegar fila e outras situações
Transtorno de ansiedade generalizado	Preocupações e ansiedade excessivas e persistentes a respeito de várias áreas e tem dificuldade de controlar. Demonstra sintomas físicos como irritabilidade
Transtornos de ansiedade induzido por substância/medicamento	Ansiedade em decorrência de intoxicação ou abstinência de uma substância ou a um tratamento medicamentoso.

Fonte: AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014

Como forma de potencializar o tratamento, o uso de medicina alternativa, principalmente remédios de ervas para tratar transtornos mentais, aumentou significativamente, uma vez que estes são também considerados eficazes e com efeitos colaterais mais amenos do que os medicamentos convencionais. Por isso a busca de tratamentos alternativos,

principalmente envolvendo plantas, para amenizar esses efeitos e melhorar a adesão do paciente ao tratamento (HAZIM et al., 2014).

### *1.1.3 Epilepsia*

A convulsão é caracterizada por uma alteração da função neurológica causada pela descarga excessiva e anormais dos neurônios no cérebro. Uma crise provocada por algum dano reversível (por exemplo, febre, hipoglicemia) não se enquadra na definição de epilepsia, porque é uma condição secundária de curta duração, não um estado crônico. A epilepsia consiste em um distúrbio cerebral ocasionado por descargas elétricas anormais, tendo como principal característica a recorrência de crises convulsivas não provocadas. Tem que ser levado em consideração diversas características clínicas que ocorrem consistentemente em conjunto como idade de desenvolvimento, achados de eletroencefalograma (EEG), fatores desencadeantes, genética, história natural, prognóstico e resposta a drogas antiepilépticas (DAEs), podendo variar sua característica fisiopatológica de acordo com a área do cérebro afetada (COSTA; CORRÊA; PARTATA, 2012; STAFSTROM; CARMANT, 2015).

Aproximadamente 50 milhões de pessoas vivem com epilepsia em todo o mundo. Estima-se que a população geral com epilepsia ativa (convulsões contínuas ou com a necessidade de tratamento) possui uma proporção entre 4 e 10 por 1000 pessoas, podendo atingir valores entre 7 e 14 por mil pessoas em países de baixa e média renda e cerca de 80% das pessoas com epilepsia vivem em países de baixa e média renda (WHO, 2018).

Neurônios que liberam glutamato ou GABA enviam e recebem a maioria das sinapses no cérebro dos mamíferos. A excitação e inibição rápidas fornecidas por essas sinapses são a base para a construção de circuitos em todo o cérebro, sendo a força relativa e o tempo dessa neurotransmissão nas sinapses que regulam o fluxo de informações através dos circuitos, ressaltando que a excitotoxicidade induzida por glutamato pode levar à morte celular neuronal. Dessa forma, as alterações patológicas na transmissão sináptica podem ser o fundamento para diversas doenças neurológicas como a epilepsia (BARROWS, et al., 2017; MAZZOCCHETTI et al., 2018).

As crises epiléticas podem ser divididas em três grupos: parciais ou focais, generalizadas e crises não classificáveis. Diagnosticar a epilepsia depende fundamentalmente do relato das crises pelo paciente, por parentes ou por testemunhas. Dessa forma, a história e o exame clínico são fundamentais (SOUZA; OLIVEIRA, 2017).

Vários antiepilépticos têm sido descritos como bons candidatos para estabilizar os neurônios e protegê-los de insultos externos, inibindo a excitabilidade neuronal através da modulação de canais iônicos, dos sistemas GABAérgico e glutamatérgico ou segundos mensageiros, no entanto, alguns pacientes que apresentam epilepsia não são controlados de forma tão eficaz com tratamentos farmacológicos convencionais, havendo, então, a necessidade da busca de tratamentos alternativos, como uso de plantas, para tratamento desses pacientes (HATTIANGADY; RÃO; SHETTY, 2008).

## 1.2 Modelo animal

Os modelos de pesquisa com uso de animais têm sido bastante utilizados como forma de prever mecanismos de doenças e formas de tratamento, mesmo que os experimentos possam ter alguma interferência durante a execução e muitas vezes demonstrar diferenças quando é realizado o ensaio clínico (TATEM et al., 2014).

Em psicopatologia, apesar de não sabermos ao certo o que acontece a nível cerebral e as diferenças entre o cérebro animal e do homem, o uso de protocolos em animais são importantes ferramentas para avanço de estudo científicos. Para um protocolo ter validade o modelo animal deve possuir: semelhantes respostas comportamentais e fisiológicas observadas em humanos, o modelo deve ser sensível a agentes farmacológicos clinicamente eficazes, possuir respostas inversas a medicação com efeito oposto e os agentes que não têm efeito na clínica não devem ter efeito nesses testes e que a etiologia do comportamento e os fatores biológicos subjacentes ao distúrbio sejam similares em animais e humanos (BOURIN, 2015).

De maneira geral, para cada objetivo de uma investigação científica há um protocolo validado que deve ser seguido. O teste do campo aberto (*open field*) foi descrito por SIELGEL (1946) e validado por ACHER (1973). Um teste relativamente simples e utilizado para medir a atividade exploratória do animal, podendo ser utilizado para avaliar a atividade locomotora e, conseqüentemente, doenças neuromusculares (TATEM et al., 2014).

O teste de labirinto de cruz elevado (*plus maze*) foi descrito por LISTER (1987) e avalia a atividade ansiolítica de agentes farmacológicos de maneira geral. O teste em animais não consegue prever todos os aspectos da ansiedade humana, mas seus estudos permitem investigações detalhadas de processos neurobiológicos e psicológicos em estados nos quais o medo pode ser inferido, como respostas a estressores aversivos agudos e repetidos (BOURIN, 2015).

O teste do nado forçado (NF) foi descrito por PORSOLT et al. (1977) e utilizado para modelos antidepressivos. Teste simples e sensível que possui como desvantagem a possibilidade de falso negativo, se a droga apresentar alguma alteração na locomoção do animal, aumentando seu tempo de imobilidade. Para evitar a ambiguidade desse resultado, geralmente associa esse teste com o do campo aberto, o qual avalia esse efeito locomotor (LIN et al., 2015).

O teste de convulsão induzida por pilocarpina consiste na administração, via sistêmica, de altas doses do agonista muscarínico pilocarpina em roedores (TURSKI et al., 1983; CAVALHEIRO, 1995). Receptores colinérgicos (M1 muscarínicos) ativam a convulsão e ativação do receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) mantem a convulsão (HAMILTON et al., 1997). A pilocarpina também contribui para a progressão das crises por danificar a barreira hematoencefálica (BHE) em decorrência dos níveis elevados de IL-1 $\beta$  (NIRWAN; VYAS; VOHORA, 2018).

### **1.3 Estresse oxidativo**

A resposta ao estresse pode ser um importante fator de risco o qual pode estimular o desenvolvimento de diversas patologias como a ansiedade, a depressão, o transtorno de estresse pós-traumático e outros transtornos afetivos ou mentais, caracterizados pela ativação do sistema locus coeruleus-norepinefrine (LC-NE). O estresse pode desencadear a atividade de disparo de neurônios noradrenérgicos no LC e, posteriormente, generalizar a transmissão NE no hipotálamo, córtex pré-frontal, tronco cerebral, cerebelo e amígdala (WANG et al, 2017).

De forma fisiológica, o estresse pode levar ao estresse oxidativo das células, podendo causar diversas patologias neurodegenerativas, por isso, já existem muitos medicamentos e estudos em plantas para o tratamento dessas doenças por meio da diminuição de radicais livres. No entanto, para que esses compostos influenciem nessas doenças, deve-se avaliar a capacidade deles de inibir ou mesmo eliminar o excesso de radicais livres em células nervosas do cérebro (AGNIESZKA; ANTKIEWICZ-MICHALUK, 2017).

A produção de radicais livres, que são espécies reativas de oxigênio (EROs), constitui a principal mediadora na cascata de inflamação, podendo causar morte celular. O aumento no estresse oxidativo reduz a Glutationa (GSH), principal molécula antioxidante presente no cérebro, podendo causar danos neurais. Além da GSH, há outros antioxidantes endógenos como o superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (SINGH et al., 2017).

A disfunção mitocondrial pode aumentar a geração de EROs e agravar a apoptose celular induzida pelo oxidante. As lesões por estresse oxidativo podem levar a um desequilíbrio entre o efeito oxidativo e o efeito antioxidante no organismo, aumentando produção de radicais livres, o que fará com que o poro de transição de permeabilidade mitocondrial se abra. Consequentemente, o citocromo-C das mitocôndrias será liberado no citoplasma e a caspase-3, induzindo a apoptose celular. As EROs, como uma espécie de molécula sinal, podem afetar as atividades de uma variedade de vias de transdução de sinal, como a Janus quinase / transdutor de sinal e ativador da via de transcrição, a via da proteína quinase C e a via da MAPK (SUN; KONG; ZHOU, 2018).

Para medir esse estresse a nível metabólico determinadas áreas do cérebro podem ser utilizadas para estimar a produção de radicais livres. Distúrbios nas enzimas da cadeia respiratória mitocondrial podem levar a diminuição da atividade da catalase no hipocampo e no cerebelo (MOTAGHINEJAD; MOTEVALIAN; SHABABB, 2016). Na depressão regiões cerebrais como hipocampo e o córtex pré-frontal são afetadas. Alguns estudos demonstraram uma diminuição no volume dessas regiões em indivíduos com depressão (HARE; GHOSAL; DUMAN, 2017).

O estresse crônico também pode alterar o sistema noradrenérgico, que integra o sistema imune e neuroendócrino. O estresse crônico aumenta a atividade da tirosina hidroxilase, aumentando a produção de NE, levando a uma reação em cadeia. A NE aumenta a liberação do fator de liberação de corticotropina (CRF) no hipotálamo, levando ao aumento de ACTH (hormônio estimulante do córtex da supra-renal) pela glândula pituitária a qual induz a glândula adrenal liberar NE e cortisol. O aumento de NE e cortisol estimula o sistema simpático, o qual libera citocinas com efeitos neurotóxicos (DEAN; KESHAVAN, 2017) . Dessa forma, vários fatores podem acarretar um estresse a nível metabólico e acarretar diversas doenças neurológicas.

#### **1.4 Plantas medicinais**

A humanidade, ao longo dos anos, tem utilizado os produtos naturais para desenvolver novos agentes terapêuticos para o tratamento de diversas doenças. Cada vez mais as pessoas têm se tornado conscientes sobre a importância do uso de fitoterápicos e seus sintéticos como fonte no desenvolvimento de novos medicamentos (CHEN et al., 2015; NIEOCZYM; SOCAŁA; WLAŹ, 2018).

As plantas podem produzir uma variedade de metabólitos bioativos, os quais estão sendo testados e usados para diversas doenças tanto fatais como crônicas. Dessa forma, descobrir o mecanismo molecular de ação desses bioativos pode contribuir para o avanço da comunidade científica, incentivando pesquisas tanto no desenvolvimento como na melhoria de abordagens terapêuticas no combate de diversas doenças como câncer, distúrbios cardiovasculares, neurodegenerativos e dentre outras (DHARAMBIR; SINGH; SHARMA, 2016).

Muitos neuromoduladores que atuam no sistema nervoso são originários de fontes botânicas. Essas substâncias derivadas de plantas modulam a atividade de receptores, canais iônicos ou transportadores em neurônios. Suas propriedades tornam as substâncias úteis para medicina e pesquisa (CHO et al, 2018).

Nos medicamentos sintéticos temos uma substância isolada conhecida, a qual exerce sua função farmacológica. Nas plantas medicinais e conseqüentemente nos medicamentos fitoterápicos há uma mistura complexa de substâncias bioativas, compostos secundários, as quais podem exercer diversas funções (FARIAS et al., 2016).

O Brasil é um país privilegiado, pois possui aproximadamente 15 a 20% da biodiversidade mundial. As plantas além de seu uso para a fabricação de medicamentos, elas também são utilizadas em práticas populares e tradicionais como remédios caseiros e comunitários. Os fitoterápicos também são alvos de interesses empresariais privados, pois constituem importante fonte de inovação em saúde, influenciando na competitividade do Complexo Produtivo da Saúde (BRASIL, 2006).

O uso de fitoterápicos pode ser utilizado por pessoas de diversos níveis econômicos. Seu uso é mais frequente em condições crônicas como depressão, ansiedade, dor e enxaquecas. Apesar de ser de origem natural, deve-se ter cuidado com as terminologias e termos utilizados para evitar o uso inadequado (CHANG et al., 2007).

Há vários relatos na literatura no uso de plantas para tratamento de diversas doenças como: *Cymbopogon citratus* e *Hypericum perforatum* poder exercer ação antidepressiva (BUKHARI; DAR, 2013; UMUKORO, 2003), *Passiflora incarnata* e *Lippia graveolens* com efeito ansiolítico (SARRIS et al., 2011; TRUJANO et al., 2017) e *Moringa oleifera* (*M.oleifera*) para diabetes (OMODANISI, ABOUA, OGUNTIBEJU, 2017) e ação antidepressiva (KAUR et al., 2015).

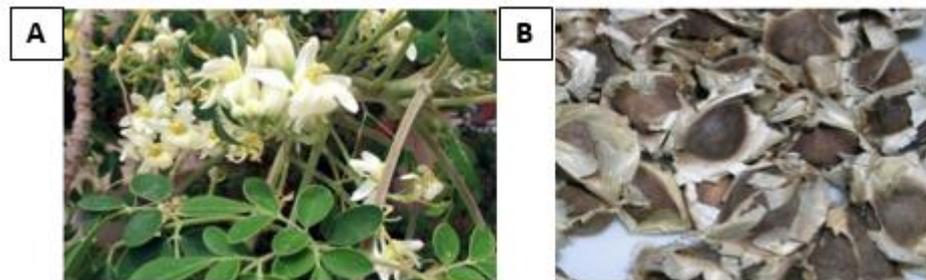
## 1.5 *Moringa oleifera*

### 1.5.1 Generalidades

*Moringa oleifera* pertence à família das Moringaceae. Ela é nativa da Índia e amplamente cultivada nos trópicos de todo o mundo, pois cresce rapidamente, sendo capaz de sobreviver em solos pobres, requerendo o mínimo de atenção em longos períodos de seca. A *Moringa oleifera* é uma planta arbórea com longas vagens verdes, sementes aladas, folhas grandes e flores brancas perfumadas. Podem crescer até 4 metros de altura, gerando flores e frutos em um ano (SANTANA *et al.*, 2010).

A planta também é utilizada como ornamentação, pesticidas e medicamentos. Partes como as folhas, sementes, cascas, flores, seiva e óleo são utilizados na medicina tradicional. As sementes já são utilizadas para limpeza de água para metais e se óleo como biocombustível. Várias preparações de *M. oleifera* têm sido preparadas com objetivos anti-inflamatórios, anti-hipertensivos, diuréticos, antimicrobianos, antioxidantes e hipoglicemiantes (STOHS; HARTMAN, 2015; KARIM *et al.*, 2016).

Figura 1: Imagem representando as Folhas, Flores (A) e sementes (B) da *Moringa oleifera*



Fonte: JESUS, *et al.*, 2013.

### 1.5.2 Bioativos

Extratos de plantas, de maneira geral, têm sido bastante utilizados por mostrar um efeito protetor e aliviar o estresse oxidativo. Muitos estudos da Moringa sugerem que ela possui potencial terapêutico em várias doenças como cancro, hipertensão e aterosclerose, pois na planta pode conter vitamina C,  $\beta$ -caroteno, flavonoides e compostos fenólicos, substâncias essas que tem demonstrado grande potencial antioxidante (KERDSOMBOON *et al.*, 2016).

Estudos também demonstram que a planta *M. oleifera* possui muitas propriedades nutricionais e terapêuticas, sendo utilizada para diversos tratamentos medicinais. Em uma caracterização química, as sementes apresentaram, como principais constituintes, o ácido oléico e ácidos graxos como, ácido linoléico, ácido linolênico, fitoquímicos como taninos, saponina, compostos fenólicos (ex: glucosinolatos), fitatos, flavonóides, terpenóides e lectinas. Além destes, gorduras, fibras, proteínas, minerais, vitaminas A, B, C e aminoácidos, os quais podem ser antioxidantes (GOPALAKRISHNAN; DORIYA; KUMAR, 2016).

Na sua classificação científica a *M.oleifera* é da ordem de Brassicales uma das plantas crucíferas, plantas dessa ordem possui como característica possuir glucosinolatos (GLS) em sua constituição (KARIM et al., 2016).

Os GLS são metabólitos secundários formados a partir da enzima mirosinase por processo de hidrólise, os quais tem sido estudados por suas propriedades antitumorais e neuroprotetoras. A glucomorigina (GMG), presente nas sementes da *M.oleifera*, pertence à família dos GLS que ao passar por esse processo de hidrólise forma tipo de ativo, a qual possui efeitos medicinais. Dessa forma, diversos estudos têm utilizado essa planta para descobrir mais efeitos como planta medicinal (GALUPPO et al., 2014).

Como forma de explorar as propriedade dessa planta, vários estudo tem sido realizado para avaliar os efeitos do extrato tanto das folhas como das sementes da *M.oleifera*, mostrando que que extrato das folhas possuem potencial contra distúrbios de ansiedade e epilepsia e extratos de sementes um grande potencial para tratamento de doenças neurodegenerativas (INGALE; GANDHI, 2016; ZHOU et al., 2018).

Como forma de contribuir para a pesquisa na busca de novos princípios ativos e testar alternativas de tratamento para melhorar a qualidade de vida dos pacientes com esses distúrbios, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos comportamentais e bioquímicos do extrato aquoso das sementes da *M.oleifera* em modelo animal de atividade locomotora exploratória, depressão e ansiedade e dos metabólitos secundários produzido a partir desse extrato aquoso.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos neurocomportamentais e bioquímicos do extrato aquoso e do metabólito secundário das sementes da *Moringa oleífera* nos modelos em camundongos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Analisar os efeitos neurocomportamentais em camundongos no tratamento agudo do extrato aquoso das sementes *M.oleífera* nos testes de campo aberto, nado forçado e labirinto de cruz elevada;

- Analisar os efeitos neurocomportamentais em camundongos no tratamento agudo e subcrônico do metabólito secundário das sementes da *M. oleífera* nos testes de campo aberto e convulsão induzida por pilocarpina;

- Determinar os efeitos antioxidantes do extrato aquoso no pré-tratamento agudo e dos metabólitos secundários das sementes da *M.oleífera* no pré-tratamento agudo e subcrônico por meio das dosagens de nitrito/nitrato e peroxidação lipídica nas áreas cerebrais do córtex pré-frontal (CFP), do corpo estriado (CE) e do hipocampo (HC);

- Determinar os níveis na produção de glutathiona reduzida (GSH) do extrato aquoso no pré tratamento agudo e dos metabólitos secundários das sementes da *M.oleífera* no pré-tratamento subcrônico nas áreas cerebrais do córtex pré-frontal (CFP), do corpo estriado (CE) e do hipocampo (HC);

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss adultos machos (20-30g) oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – UFC. Os animais foram mantidos na Hospedaria da UFC – *Campus* Sobral em caixas de polipropileno com no máximo 8 animais, em condições ambientais semelhantes, em temperatura média de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclo claro/escuro alternado de 12 horas, com luzes acesas às 06:00 horas, recebendo ração padrão e água *ad libitum*.

#### **3.2 Aspectos Éticos**

O protocolo experimental de número 09/16 (Anexo A) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC. Todos os experimentos ocorreram conforme as normas e procedimentos estabelecidos na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, também denominada de Lei Arouca 2008 (BRASIL, 2008), que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais e também em concordância com o Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 (BRASIL, 2009), o qual dispõe sobre as normas acerca do controle de experimentação envolvendo animais.

#### **3.3 Material Botânico**

O extrato aquoso e os metabólitos secundários das sementes da *M.oleífera* foram fornecidos pela Dra. Hévila Oliveira Salles responsável pelo Laboratório de Bioquímica da EMPBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) localizada na cidade de Sobral – Ce.

#### **3.4 Drogas e Preparo**

Foi utilizado Cloridrato de Pilocarpina do laboratório ALLERGAN, Diazepam da GERMED e Cloridrato de Fluoxetina da EMS. O extrato e os metabólito foram dissolvidos em água destilada, bem como os demais reagentes.

### 3.5 Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos e tratados de forma aguda com extrato aquoso das sementes da *M. oleifera* (EAMO), e aguda e subcrônico dos metabólitos secundários (METMO). INGALE e GANDHI (2016) testou extrato aquoso das folhas da *M. oleifera* nas doses de 250, 375 e 500, como forma de aproximar esses valores para as sementes, foram escolhidas para EAMO as doses de 50; 150 e 450 mg/Kg e para o METMO foram de 25, 50 e 100 mg/Kg, sendo as doses do METMO menor, pois ser mais concentrado do que o extrato e ambos foram por via oral (v.o.). No tratamento agudo os testes comportamentais foram realizados no mesmo dia da administração da droga e o subcrônico no 14º dias de tratamento.

Durante todo o período de tratamento subcrônico os animais foram pesados diariamente, pois o volume administrado da droga foi referente ao peso de cada animal no dia da pesagem.

Os testes foram realizados 1 hora após o tratamento da amostra (EAMO ou METMO). As alterações comportamentais foram avaliadas utilizando os testes de campo aberto (ARCHER,1973), labirinto em cruz elevado (LISTER, 1987), nado forçado (PORSOLT et al., 1977) para a investigação de possíveis efeitos do EAMO e Convulsão Induzida por pilocarpina (TURSKI et al., 1983; CAVALHEIRO, 1995) para avaliação do METMO.

Foram utilizados como padrões positivos para a avaliação: Fluoxetina na dose de 35 mg/Kg (v.o.) no teste de Nado Forçado (NF), Diazepam (DZP) de 1 mg/Kg (v.o.) no teste de Plus Maze, também chamado de Labirinto em Cruz Elevada (LCE) e Diazepam (DZP), 2 mg/Kg (v.o.) para o teste de Campo Aberto e Pilocarpina de 400 mg/Kg (i.p.) no teste de convulsão.

Quadro 2: Tratamento Agudo do Extrato Aquoso das sementes da *M.oleifera*

GRUPOS	TRATAMENTOS
1	Veículo (água) v.o.
2	Diazepam (DZP) 1 mg/Kg v.o.
3	Diazepam (DZP) 2 mg/Kg v.o.
4	Fluoxetina 35 mg/Kg v.o.
5	Extrato Aquoso 50 mg/Kg v.o.
6	Extrato Aquoso 150 mg/Kg v.o.
7	Extrato Aquoso 450 mg/Kg v.o.

Quadro 3: Tratamento agudo e subcrônico do metabólito secundário da *M.oleifera*

GRUPOS	TRATAMENTOS
1	Veículo (água) v.o.
2	Veículo (água) v.o. + Pilocarpina (400 mg/Kg i.p.)
3	Metabólito Secundário 25 mg/kg v.o. + Pilocarpina (400 mg/Kg i.p.)
4	Metabólito Secundário 50 mg/kg v.o. + Pilocarpina (400 mg/Kg i.p.)
5	Metabólito Secundário 100 mg/kg v.o. + Pilocarpina (400 mg/Kg i.p.)

### 3.6 Protocolo experimental

Os experimentos foram realizados durante o dia e os animais foram observados em um ambiente fechado, desprovido de barulhos externos e com temperatura constante ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Para o teste de campo aberto e labirinto de cruz elevada, foi utilizado uma iluminação de baixa densidade (luz vermelha de 15 W) e nos testes de nado forçado e convulsão foram realizados com iluminação normal. Em todos os testes, com exceção do nado forçado, após a observação de cada animal foi utilizado álcool 70% para a remoção de resíduos deixados pelo animal.

Após 1 hora do tratamento com extrato aquoso agudo (mesmo dia da administração) os animais foram levados para os testes comportamentais. Após o teste do campo aberto os animais foram levados ao teste de nado forçado, sendo utilizado o mesmo grupo de animais. Outros grupos de animais foram utilizados para o teste de labirinto em cruz elevado (LCE) (Figura 2).

No tratamento agudo com os metabólitos secundários, a convulsão induzida por pilocarpina foi realizada no mesmo dia de tratamento (Figura 3) e no décimo quarto dia de tratamento no subcrônico (Figura 4). Todos os testes foram executados uma hora após a administração via oral da droga analisada.

Figura 2: Protocolo Experimental para o Tratamento Agudo com EAMO nas doses de 50, 150 e 450 mg/Kg v.o.

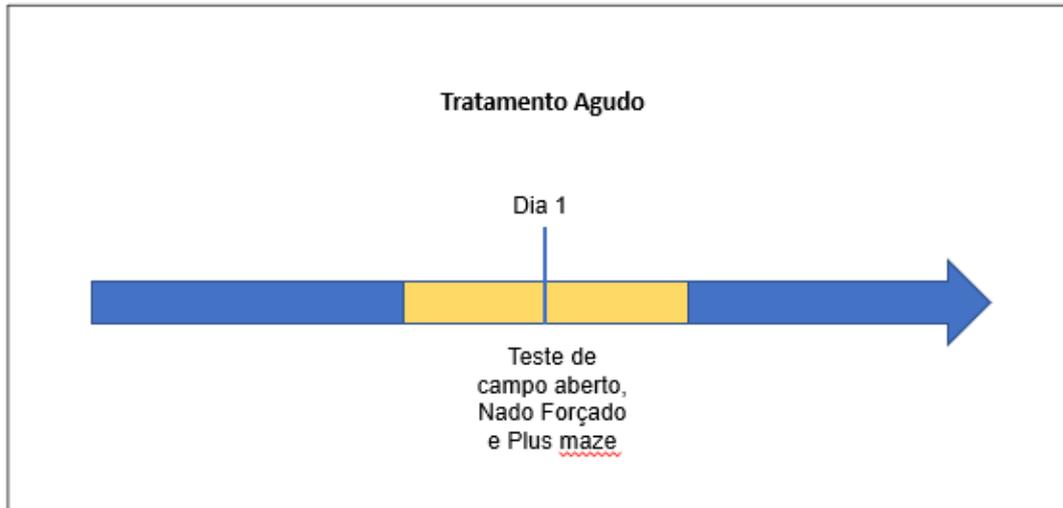


Figura 3: Protocolo Experimental para o tratamento agudo com METMO nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg v.o.

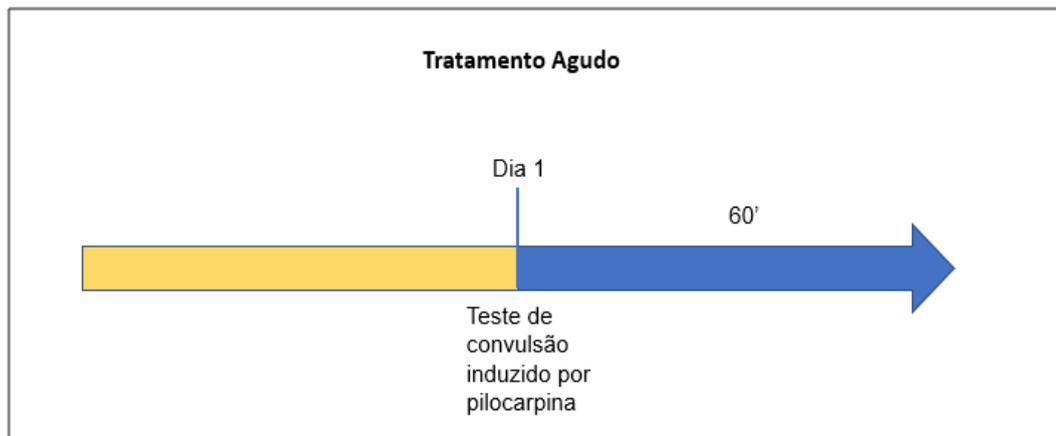
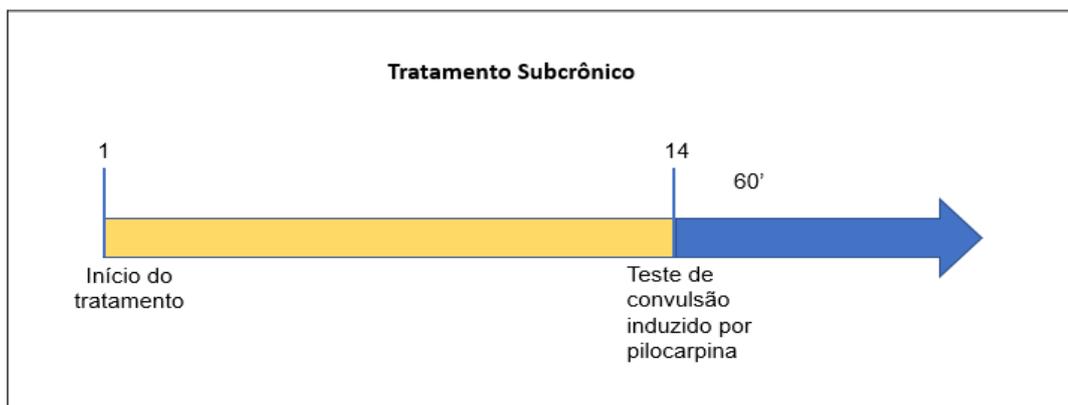


Figura 4: Protocolo Experimental para tratamento subcrônico com METMO doses de 25, 50 e 100 mg/Kg v.o.

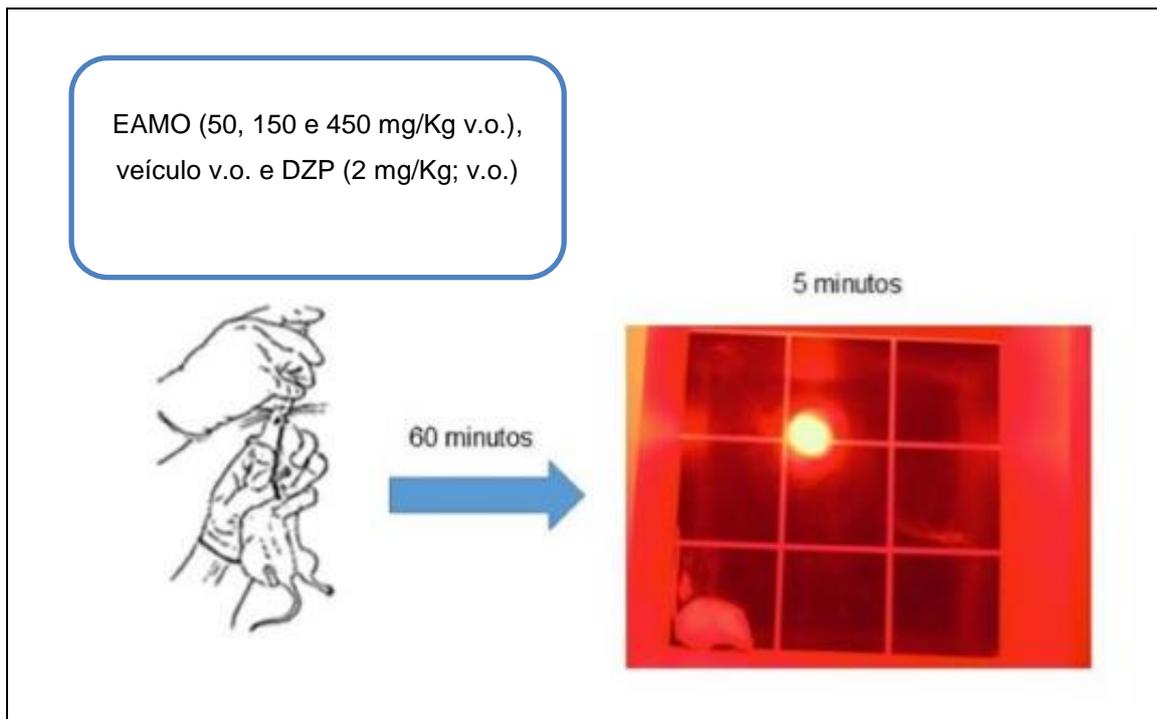


### 3.7 Testes Comportamentais

#### 3.7.1 Avaliação da atividade locomotora

O teste do campo aberto (*open field test*) foi baseado na metodologia descrita por Archer (1973). Esse protocolo foi utilizado para analisar a atividade exploratória do animal (ALE). Para esse experimento foram utilizados aparatos feitos de acrílico, contendo paredes transparentes e piso preto, com área de 30 x 30 x 15 cm e dividido em nove quadrantes iguais (Figura 5). Os parâmetros avaliados foram: número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea) registrados no tempo de 5 minutos.

Figura 5: Teste do campo aberto em camundongo.



Fonte: Adaptado de FROTA, 2015.

#### 3.7.2 Avaliação da atividade ansiolítica

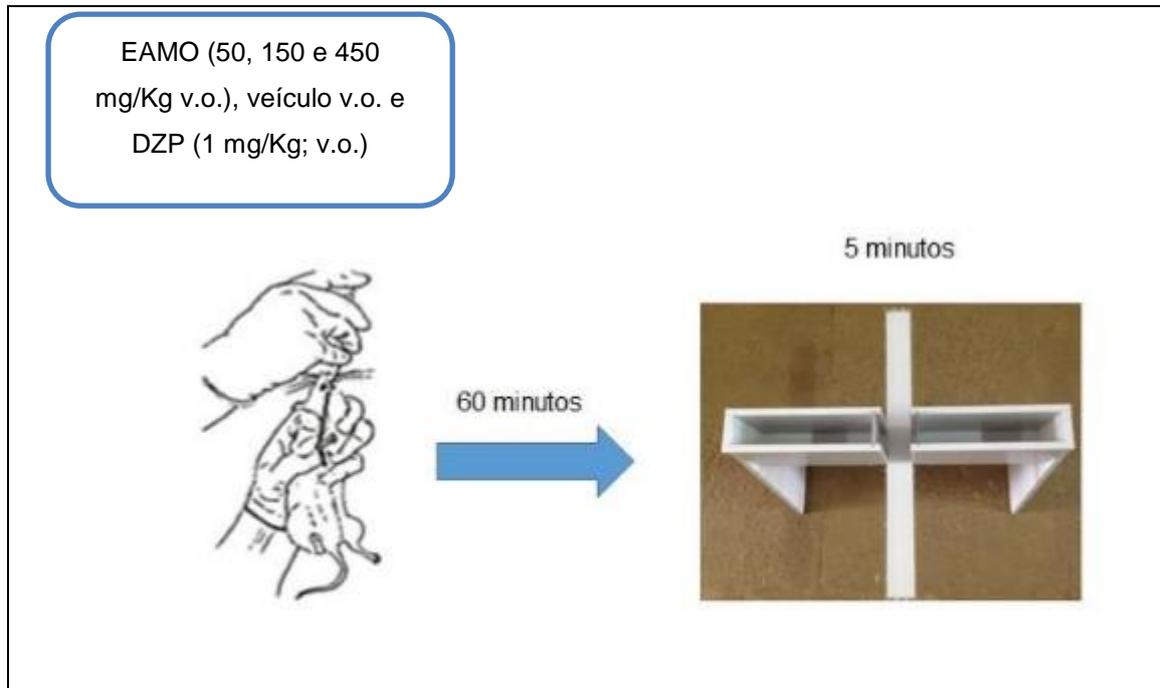
O teste o labirinto da cruz elevada (LCE) (*plus maze test*), descrito inicialmente por Lister (1987), foi utilizado como ensaio comportamental para avaliar possíveis efeitos ansiolíticos dos agentes farmacológicos, bem como para auxiliar na determinação de regiões cerebrais e mecanismos envolvidos no comportamento relacionado com a ansiedade. O animal

foi colocado no centro da junção de quatro braços elevados a 45 centímetros do chão, consistindo de dois braços abertos sem paredes (30 x 5 cm), deixando os animais expostos ao meio e dois fechados perpendiculares (30 x 5 x 25 cm) com paredes servindo com um abrigo seguro para o animal (Figura 6).

Após 1 hora do tratamento, os animais foram submetidos ao LCE e observados por um tempo de 5 minutos. Nesse tempo foi avaliados parâmetros comportamentais como: número de entradas nos braços abertos (NEBA) e fechados (NEBF) e o tempo de permanência do animal no braço aberto (TPBA) e braço fechado (TPBF). A frequência total de entradas foi obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e nos fechados. Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, as porcentagens de entradas nos braços abertos serão calculadas dividindo a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, e esse índice multiplicado por 100. De maneira semelhante foi calculada a porcentagem de tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos. Dessa forma, os parâmetros utilizados para a análise estatística foram: número de entradas no braço aberto (NEBA), tempo de permanência no braço aberto (TPBA), porcentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) e porcentagem de tempo nos braços abertos (PTBA). Para a análise estatística todos os grupos foram comparados ao grupo controle. Neste modelo, os roedores evitam os braços abertos do labirinto, restringindo a maioria de suas atividades aos braços fechados. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entradas e tempo) revela um efeito ansiolítico (PELLOW; FILE, 1986), e o inverso é verdade para compostos ansiogênicos. O número de entradas nos braços fechados avalia a atividade motora dos animais (RODGERS *et al.*, 1997).

Além dos grupos tratados e veículo, um grupo foi tratado com DZP (1 mg/Kg; v.o.) como controle positivo (ansiolítico padrão).

Figura 6: Teste de labirinto em cruz elevado em camundongo.

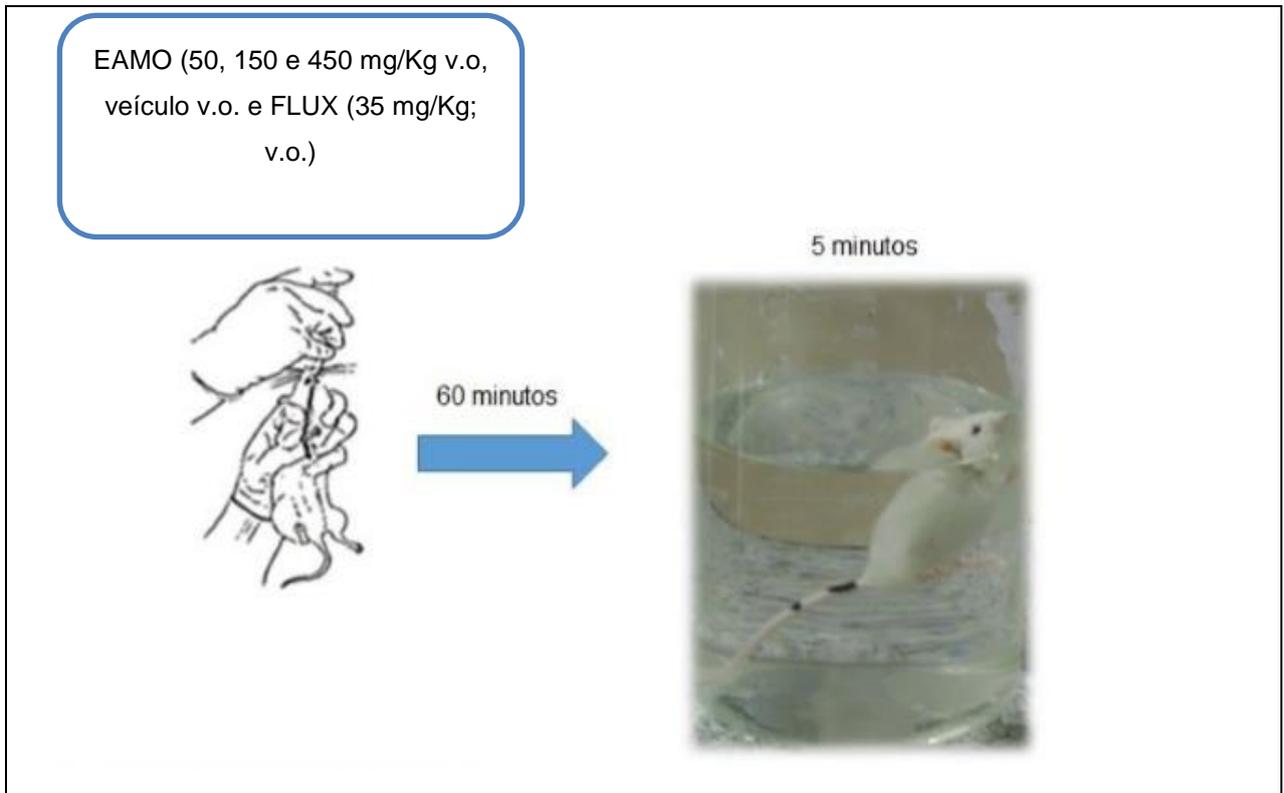


Fonte: Adaptado de FROTA, 2015.

### 3.7.3 Avaliação da atividade antidepressiva

O experimento consiste na 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 (Figura 7). Este teste consiste em avaliar uma possível atividade antidepressiva induzida por drogas, seguindo a metodologia descrita por Porsolt *et al.* (1977). A fluoxetina (35 mg/Kg; v.o.) foi utilizada como um antidepressivo padrão para controle experimental.

Figura 7: Teste do nado forçado em camundongo



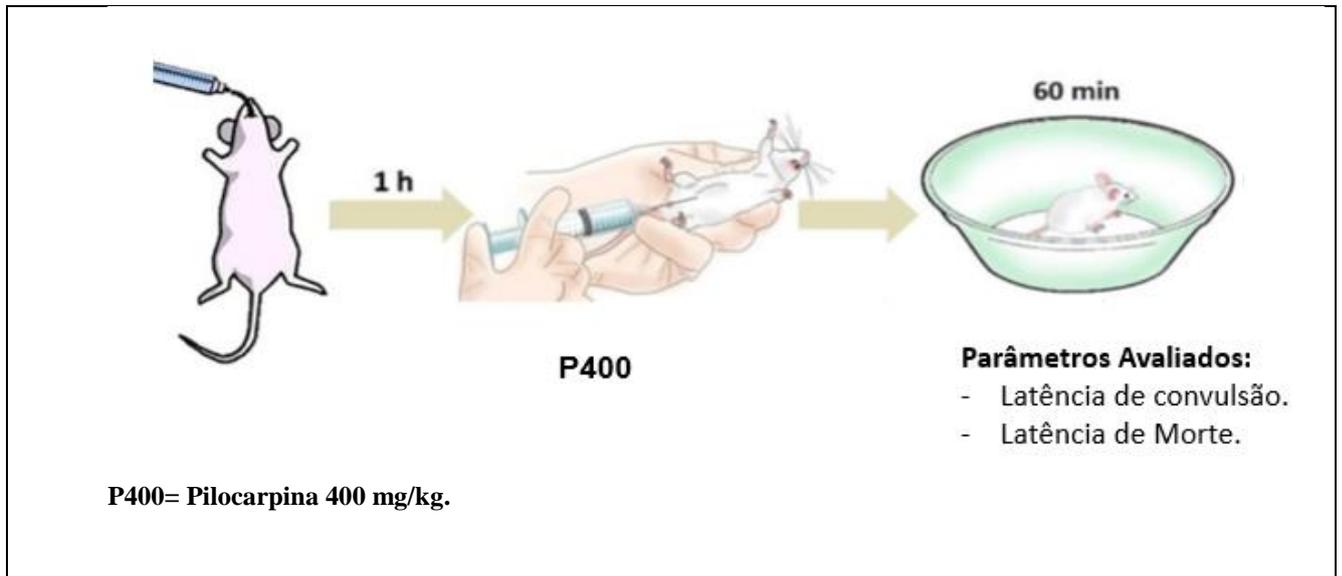
Fonte: Adaptado de FROTA, 2015.

#### 3.7.4 Avaliação da Convulsão Induzida por Pilocarpina

O teste de convulsão induzida por pilocarpina consiste na administração, via sistêmica, de altas doses do agonista muscarínico pilocarpina em roedores (TURSKI et al., 1983; CAVALHEIRO, 1995). Para este teste foram utilizados os seguintes grupos de animais: veículo (água, v.o.), METMO (25, 50, 100 mg/Kg, v.o.).

Após 60 minutos dos tratamentos, no primeiro dia (agudo) ou no décimo quarto dia (subcrônico), foi administrado pilocarpina 400 mg/kg (P400), i.p. Logo após a administração de P400, os animais foram colocados em gaiolas individuais e observados por um período de 60 minutos. Os parâmetros analisados foram: latência da convulsão, que marca o tempo entre a administração de P400 até a primeira convulsão e a latência de morte dos animais em que consiste no tempo decorrido da administração de P400 e morte dos animais em segundos (Figura 8).

Figura 8: Teste de convulsão induzido pela pilocarpina.



Fonte: PRADO, 2016.

### 3.8 Dissecação das áreas cerebrais

Após os testes comportamentais, os animais foram devidamente sacrificados por descolamento cervical e, logo em seguida, os encéfalos foram retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio numa placa de petri com gelo. Em seguida o hipocampo (HC), o corpo estriado (CE), o córtex pré-frontal (CFP) foram isolados das estruturas circunjacentes por divulsão (Figura 9). Após a dissecação, cada área foi colocada em papel alumínio sobre gelo, pesada e armazenada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Figura 9: Áreas cerebrais do camundongo utilizadas para as dosagens de nitrito/nitrato, TBARS e Glutaciona.



Fonte: PRADO, 2016.

### 3.9. Análises neuroquímicas

#### 3.9.1 Determinação da peroxidação lipídica por medição do conteúdo de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O grau de lipoperoxidação no HC, CPF e CE foi medido através da determinação das concentrações de TBARS, conforme o método de Draper e Hadley (1990). Foram preparados homogenatos das áreas cerebrais supracitadas a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl). Um volume de 0,25 mL do homogeneizado foi colocado em banho maria por 1 hora, a 37 °C. Em seguida foi precipitado com 0,4 mL de ácido perclórico a 35% e posteriormente foi centrifugado na velocidade de 5000 rotações por minuto (RPM), durante 15 minutos, sob temperatura de 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido e a ele foi adicionado 0,2 mL de ácido tiobarbitúrico 1,2%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em banho de água fervente (95-100 °C) por 30 min. O conteúdo de TBARS foi determinado em ELISA a 535 nanômetros (nm). Os resultados foram expressos em micrograma ( $\mu\text{g}$ ) de malondialdeído (MDA) por grama (g) de tecido.

#### 3.9.2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato

Para a determinação da produção de nitrito, primeiramente foi preparada uma curva padrão. Para isso, foram pesados 6,9 mg de  $\text{NaNO}_2$  e dissolvidos em 10 mL de água bidestilada (estoque-10 mM) e feitas as diluições em série (10 e 20 x), ficando 1 mM, 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$ , 0,625  $\mu\text{M}$ , 0,312  $\mu\text{M}$ . Foi realizada uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN et al., 1981). Para a determinação da concentração de nitrito em cada tecido, foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% (p/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%. Após a centrifugação na velocidade 11000 g, durante 15 minutos, na temperatura de 4 °C, os sobrenadantes foram coletados e a produção de óxido nítrico (NO) foi determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi incubada com 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess, composto por: sulfanilamida 1% em  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; naftiletenodiamino-bicloridrato 0,1% em água;  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1% e água, na proporção de (1:1:1:1), sob a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em ELISA a 570 nm. A concentração de nitrito foi expressa em milimolar (mM) de nitrito/nitrato por g de tecido.

### 3.9.3 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

A determinação da concentração de GSH baseia-se na reação do reagente de Ellman (5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzólico) – DTNB, com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. Inicialmente, prepararam-se homogenatos a 10% em EDTA 0,02 M, em seguida, foram retirados 400  $\mu$ L e adicionados 320  $\mu$ L de água destilada e mais 80  $\mu$ L de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 5000 RPM, por 15 minutos, sob temperatura de 4 °C. Posteriormente, foram recolhidos 400  $\mu$ L do sobrenadante e acrescidos 800  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,4 M (pH 8,9) e 20  $\mu$ L de DTNB (0,01 M), após um minuto da reação a leitura foi feita em ELISA a 412 nm. A concentração de glutathiona reduzida foi expressa em mcg de GSH por 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  $\mu$ g/mL. Para o branco foi utilizada água destilada (4 mL) e a cada poço das soluções de GSH foi acrescentado 250  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,4 M (pH 8,9).

### 3.10 Análise estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism versão 5.02 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California EUA (Copyright © 1992-2009 GraphPad Software, Inc). Os resultados obedeceram a uma distribuição paramétrica e foram analisados por Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student Newman Keuls (post hoc). Os valores estão apresentados pela média  $\pm$  erro padrão da média, com o número de animais entre parênteses. O critério de significância a ser utilizado será  $p < 0,05$ . Os asteriscos (\* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) caracterizam o grau de significância. Os números entre os parênteses demonstram a quantidade de animais utilizados em cada grupo.

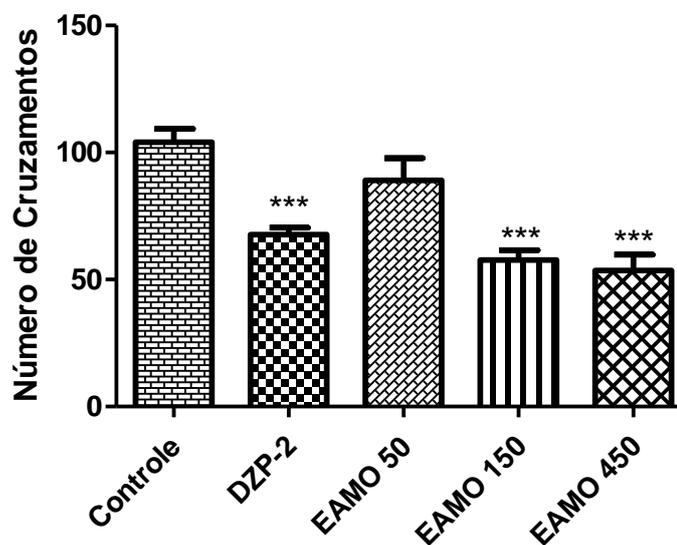
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação comportamental do extrato *M.oleifera*

#### 4.1.1 Avaliação da atividade locomotora

Foi avaliado a atividade locomotora do EAMO por meio do teste de campo aberto, sendo verificado uma diminuição do número de cruzamentos nas duas maiores doses (150 e 450 mg/Kg (Figura 10) [EAMO 50:  $89,00 \pm 8,829$  (7); EAMO 150:  $57,73 \pm 3,819$  (11); EAMO 450:  $53,50 \pm 6,314$  (12); DZP-2:  $67,67 \pm 2,813$  (6)] e no grupo controle diazepam quando comparado ao grupo controle com veículo [Controle:  $104,1 \pm 5,24$  (10)] e entre parênteses o número de animais (Figura 10).

Figura 10: Efeito do tratamento agudo com EAMO sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos.



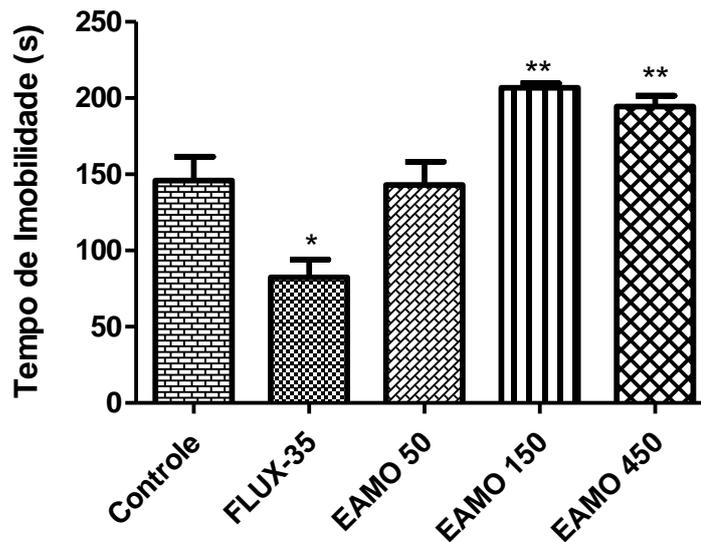
Os valores representam a média  $\pm$ EPM do número de cruzamentos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. \*\*\*  $p < 0,001$  vs Controle.

#### 4.1.2 Avaliação da atividade antidepressiva

Nesse teste foi avaliado o tempo de imobilidade do animal durante o nado forçado. No tratamento agudo do EAMO houve um aumento no tempo de imobilidade nas doses de 150 e

450 mg/Kg e redução na fluoxetina (droga antidepressiva) [EAMO 50:  $143,0 \pm 15,31$  (12); EAMO 150:  $206,8 \pm 2,975$  (8); EAMO 450:  $194,4 \pm 7,156$  (10) FLUX-35:  $82,40 \pm 11,56$  (5)] quando comparado ao controle com veículo [Controle:  $146,0 \pm 15,57$ (9)].

Figura 11: Efeito do EAMO e Fluoxetina sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos em segundos.



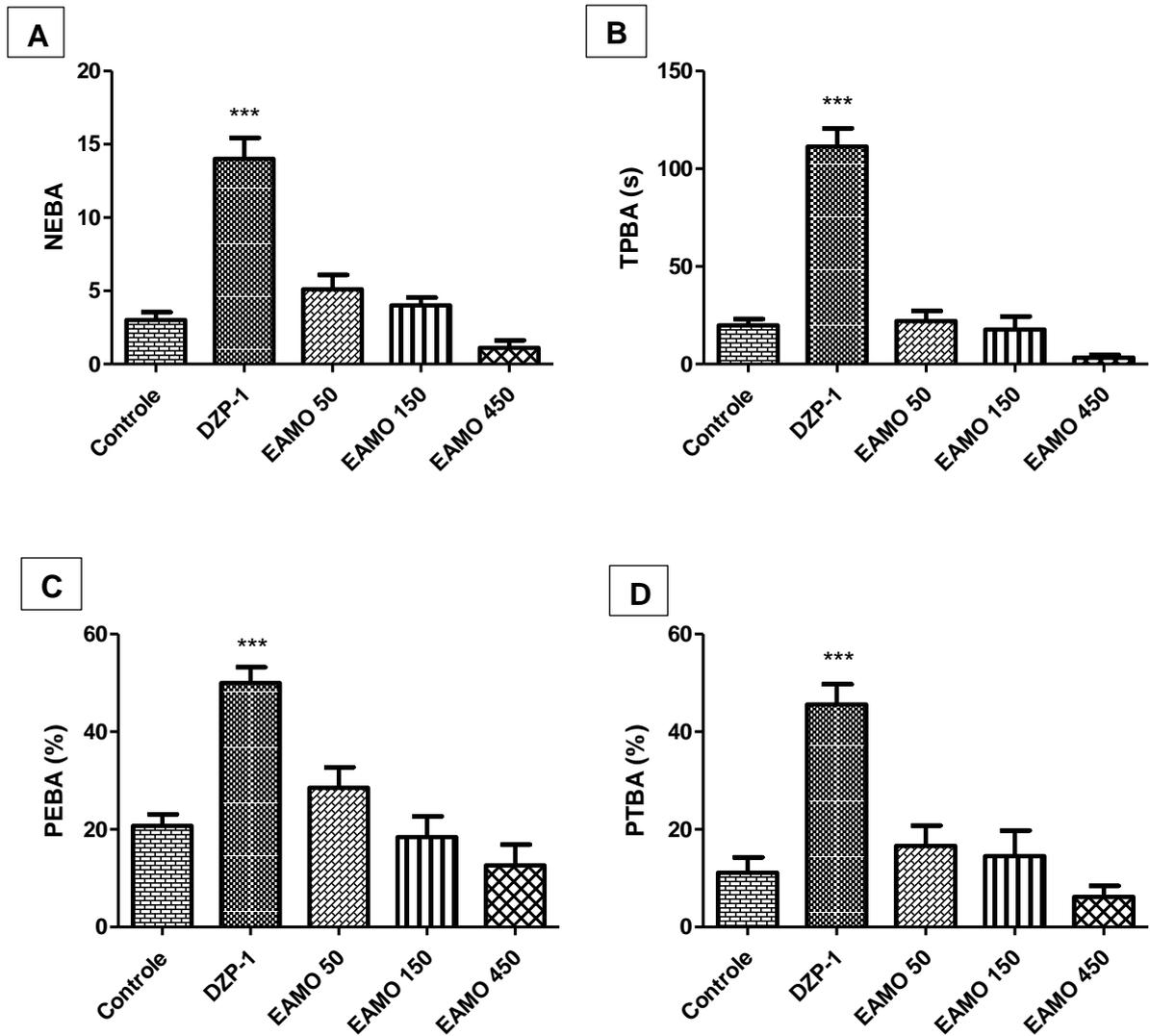
Os valores representam a média  $\pm$ EPM no tempo de imobilidade em segundos e com número de animais entre parênteses. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$  vs Controle.

#### 4.1.3 Avaliação da atividade ansiolítica

No teste do labirinto de cruz elevado (LCE) foram avaliados o número de entradas nos braços abertos (NEBA), o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), a percentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) e a percentagem de tempo nos braços abertos (PTBA) nesse modelo ansiolítico. Podemos observar que houve uma redução em todos os parâmetros nas três doses do EAMO e aumento no controle ansiolítico Diazepam [EAMO 50: NEBA  $5,111 \pm 0,9782$  (9); TPBA  $22,00 \pm 5,205$  (7); PEBA  $28,54 \pm 4,213$  (10) PTBA  $16,64 \pm 4,13$  (11); EAMO 150: NEBA  $4,0 \pm 0,5345$  (8); TPBA  $17,70 \pm 6,728$  (10); PEBA  $18,41 \pm 4,267$  (10); PTBA  $14,53 \pm 5,264$  (11); EAMO 450: NEBA  $1,11 \pm 0,5122$  (9); TPBA  $3,33 \pm 1,481$  (9); PEBA  $12,61 \pm 4,269$  (11); PTBA  $6,173$  (11); DZP-1: NEBA  $14,00 \pm 1,449$  (5) TPBA  $111,3 \pm 9,326$  (6) PEBA  $49,99 \pm 3,262$  (7); PTBA:  $45,59 \pm 4,144$  (5)] quando comparado ao controle

com veículo [Controle: NEBA  $3,0 \pm 0,5345$  (8); TPBA  $19,80 \pm 3,216$  (5) PEBA  $20,72 \pm 2,369$  (7) PTBA  $11,11 \pm 3,163$  (8)].

Figura 12: Efeito do EAMO e DZP-1 no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos no NEBA (A), no TPBA (B), no PEBA (C) e no PTBA (D).



O Controle (Veículo v.o.), o DZP-1 (Diazepam 1 mg/kg v.o.) e EAMO (50, 150 e 450 mg/kg v.o.) foram administradas 60 minutos antes de iniciar o teste. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do Número de entradas nos braços abertos – NEBA (A), no Tempo de permanência nos braços abertos – TPBA (B), na Percentagem de entradas nos braços abertos – PEBA (C) e na Percentagem de tempo nos braços abertos – PTBA (D), durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. **A, B, C e D:** \*\*\* p < 0,001 vs Controle.

## 4.2 Avaliação comportamental do metabólito secundário da *M.oleifera* (METMO)

### 4.2.1 Curva de Dose resposta

A curva dose-resposta foi realizada no teste do nado forçado, utilizado para avaliar quais doses do METMO produziram melhor resposta e escolhendo as três melhores doses para tratamento. O tempo de imobilidade do animal durante 5 minutos foi utilizado como parâmetro. É possível observar com a Tabela 1 e Figura 13 que houve uma tendência ao aumento no tempo de imobilidade nos tratamentos do METMO nas doses de 12,5; 25; 50 e 100 mg/kg, sendo as três doses maiores utilizadas nos testes.

A partir disso foi investigado se alguma dessas três doses em um efeito anticonvulsivante por apresentar essa redução do tempo de imobilidade.

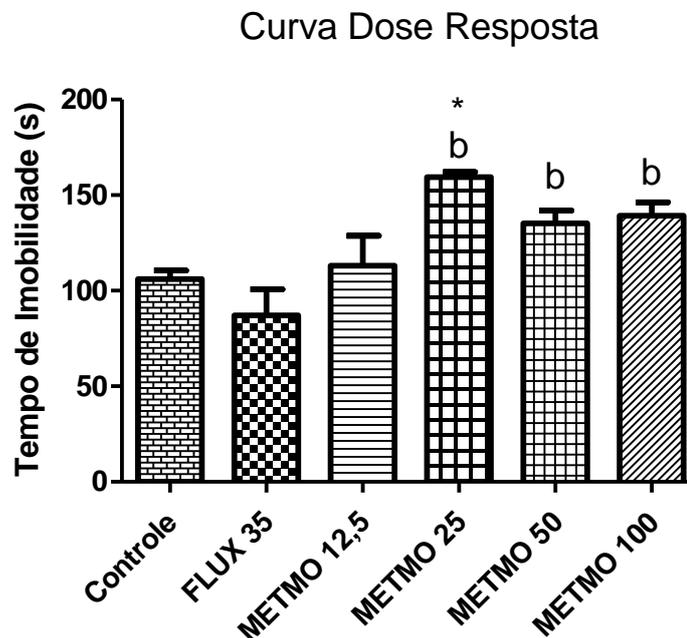
Tabela 1 – Valores dos tempos de imobilidade da curva dose-resposta do METMO no teste do nado forçado em camundongos.

Dose (mg/kg)	Tempo de Imobilidade (s)
Controle	106,0 ± 10,97 (3)
FLUX 35	87,0 ± 17,45 (4)
METMO 12,5	113,0 ± 15,79 (5)
METMO 25	159,4 ± 2,68 (5)*
METMO 50	135,3 ± 6,66 (4)
METMO 100	139,2 ± 7,02 (5)

FLUX: Fluoxetina; METMO: Metabólito secundário da *M.oleifera*

\*p<0,05 vs Controle

Figura 13: Efeito do METMO sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.



Os valores representam a média  $\pm$ EPM no tempo de imobilidade em segundos e com número de animais entre parênteses. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. \* $p < 0,05$  vs Controle; <sup>bb</sup> $p < 0,01$  METMO 25 vs FLUX 35; <sup>b</sup> $p < 0,05$  METMO 50 E METMO 100 vs FLUX 35.

O teste de Nado Forçado foi utilizado para fundamentar a escolha das melhores doses do metabólito secundário. Nesse teste o parâmetro avaliado foi o tempo de imobilidade do animal durante 5 minutos.

#### 4.2.2 Avaliação da Convulsão Induzida por Pilocarpina

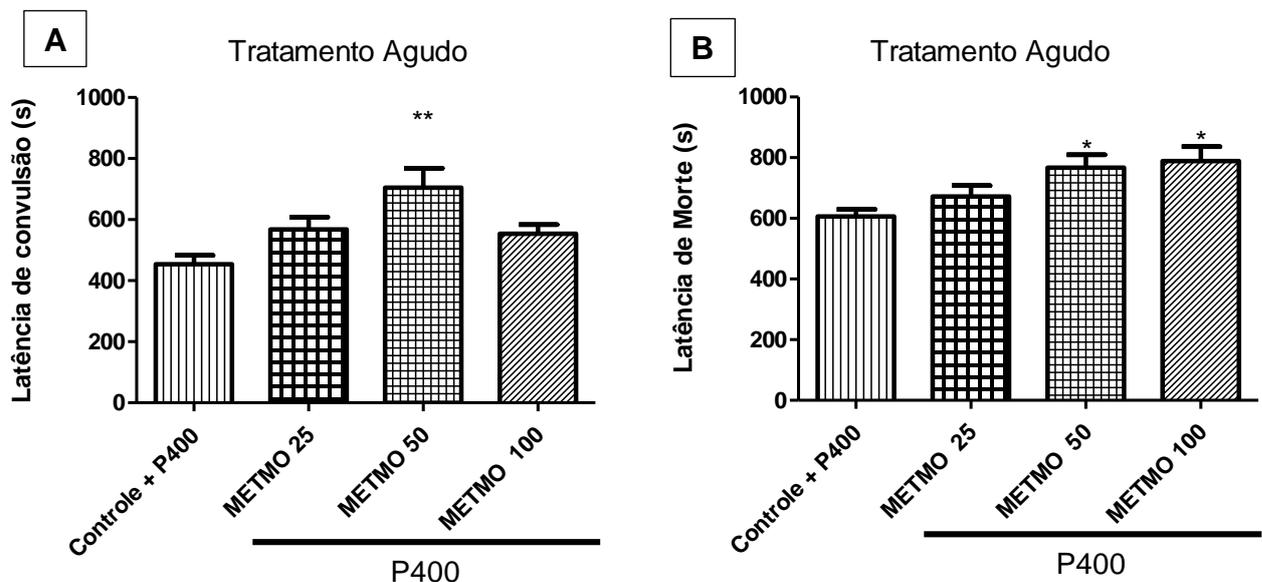
Após decorrer alguns minutos da administração da pilocarpina, 400 mg/Kg, i.p. (P400), os animais apresentaram sinais colinérgicos periféricos (miose, piloereção salivação, diarreia, diurese e tremores) e depois convulsões motoras límbicas. Esses efeitos foram observados nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg. Foram avaliadas as latências de convulsão e de morte em segundos para tratamento agudo e subcrônico, utilizando as mesmas concentrações do METMO.

No tratamento agudo, os animais tratados com METMO, foi observado um aumento na latência de convulsão (Figura 14A) na dose de 50 mg/kg [METMO 25:  $567,09 \pm 40,16$  (9); METMO 50:  $704,6 \pm 63,27$  (8); METMO 100:  $553,4 \pm 30,39$  (18)] quando comparado ao grupo da pilocarpina [Controle + P400:  $453,6 \pm 29,21$  (9)], sendo também a melhor dose dentre as três concentrações escolhidas. Na latência de morte (Figura 14B) houve um aumento nas doses de 50 e 100 mg/kg [METMO 25:  $672,5 \pm 35,33$  (11); METMO 50:  $767,3 \pm 42,22$  (10); METMO

100:  $789,0 \pm 47,08$  (14)] quando comparado ao grupo da pilocarpina [Controle + P400:  $606,0 \pm 23,24$  (8)] (Figura 14A e 14B).

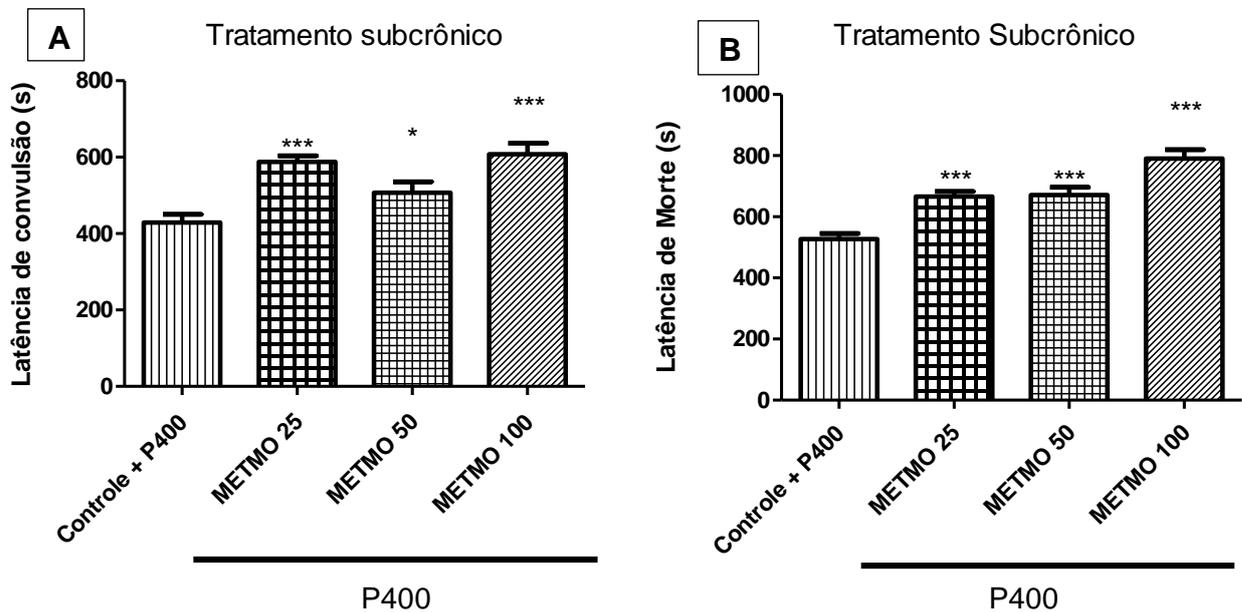
Os animais no tratamento subcrônico apresentou aumento na latência de convulsão (Figura 15A) nas três doses (25, 50 e 100 mg/Kg) [METMO 25:  $587,09 \pm 15,86$  (9); METMO 50:  $507,3 \pm 28,61$  (7); METMO 100:  $607,4 \pm 28,7$  (9)] quando comparado ao grupo da pilocarpina [Controle + P400:  $429,0 \pm 23,23$  (8)], sendo os melhores resultados observados nas doses de 25 e 100 mg/Kg. Na latência de morte (Figura 15B) também houve um aumento nas três doses [METMO 25:  $666,1 \pm 17,16$  (8); METMO 50:  $671,0 \pm 25,01$  (8); METMO 100:  $790,8 \pm 28,72$  (8)] quando comparado ao grupo da pilocarpina [Controle + P400:  $527,3 \pm 17,75$  (8)], no entanto a dose de 100 mg/kg apresentou a melhor dose.

Figura 14: Efeito do tratamento agudo do METMO sobre a latência de convulsão (A) e latência de morte (B) no teste de convulsão induzida por pilocarpina.



O Controle (veículo) e METMO (25, 50, 100 mg/kg administrados 60 min (v.o.) antes da administração de pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$ EPM da latência para o primeiro episódio de convulsão durante uma hora. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*: **A** - \*\* $p < 0,01$  vs Controle + P400; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs METMO 25; **B** - \* $p < 0,05$  vs controle + P400;

Figura 15: Efeito do tratamento subcrônico do METMO sobre a latência de convulsão (A) e latência de morte (B) no teste de convulsão induzida por pilocarpina.



Controle (veículo) e METMO (25, 50, 100 mg/kg administrados 60 min (v.o.) antes da administração de pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$ EPM da latência para o primeiro episódio de convulsão durante uma hora. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. **A** - \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs controle + P400. **B** - \*\*\* $p < 0,001$  vs controle + P400.

### 4.3 Avaliação do Estresse Oxidativo

#### 4.3.1 Análise da Peroxidação Lipídica (TBARS) nas áreas cerebrais.

Os resultados da análise da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo (HC), corpo estriado (CE) e córtex pré-frontal (CPF) foram expressas em  $\mu$ g de (malonildialdeído - MDA)/mg de tecido.

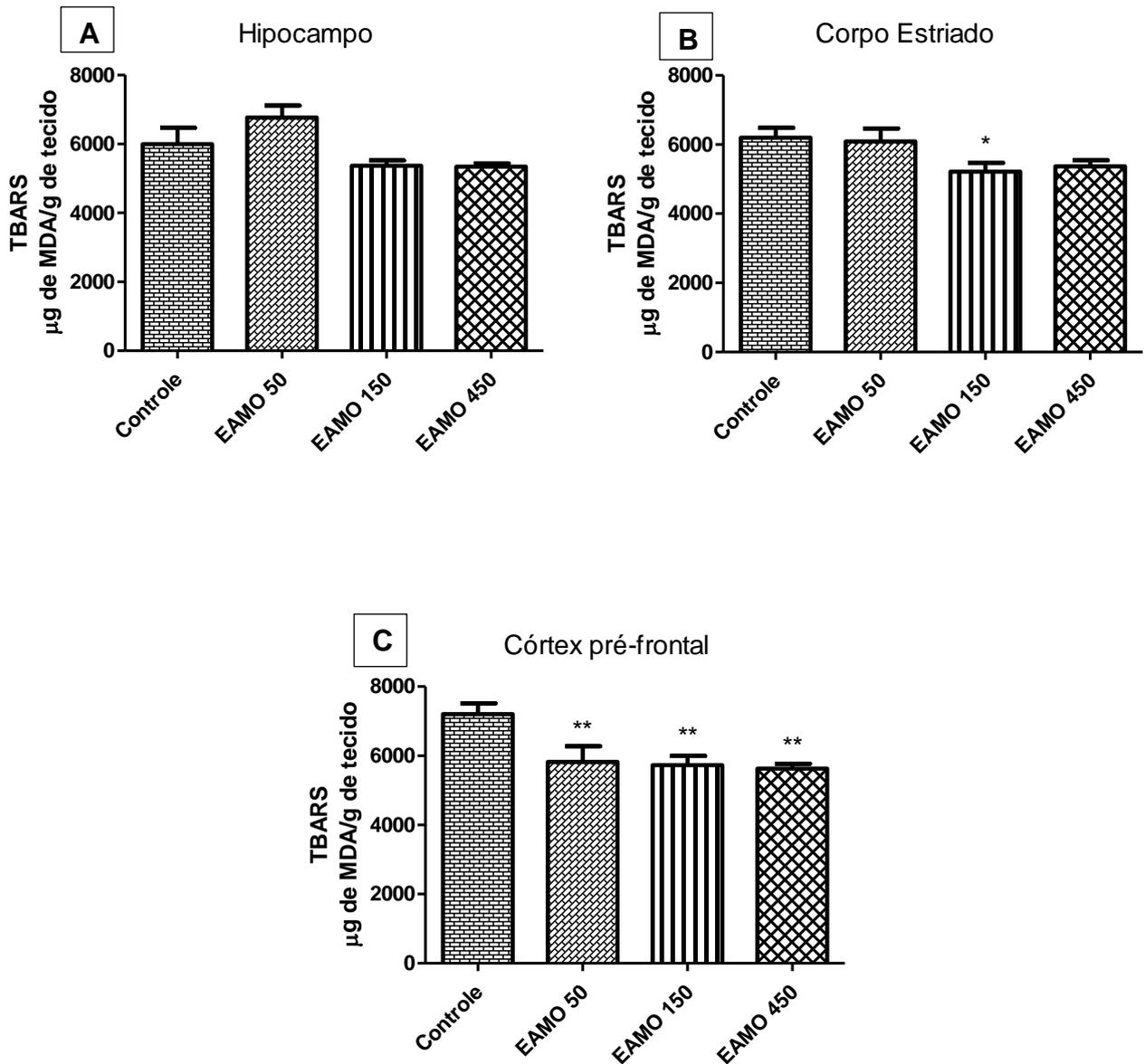
O EAMO foi utilizado no tratamento agudo dos camundongos. Não houve redução no HC (Figura 16A) na concentração de MDA, no entanto houve uma redução na dose de 150 mg/kg no CE (Figura 16B) e nas três doses no CPF (Figura 16C) [EAMO 50: HC 6771  $\pm$  343,8 (6); CE 6092  $\pm$  370,6 (5); CPF 5823  $\pm$  455,5 (10); EAMO 150: HC 5371  $\pm$  153,7 (8); CE 5214  $\pm$  257,0 (9); CPF 5729  $\pm$  266,3 (8); EAMO 450: HC 5342  $\pm$  94,92 (9) CE 5368  $\pm$  174,0 (9) CPF 5629  $\pm$  143,1 (9)] quando comparado ao controle, o qual foi administrado apenas o veículo [Controle: HC 5998  $\pm$  469,1 (8); CE 6195  $\pm$  291,2 (10); CPF 7204  $\pm$  312,7 (10)], no entanto se

comparamos entre as doses, as doses de 150 e 450 mg/Kg reduziram mais do que a dose de 150 mg/Kg no HC.

Para tratamento agudo do METMO houve redução na produção de MDA no HC (Figura 17A) na dose de 50 mg/Kg, uma redução nas três doses no CE (Figura 17B) e não houve alteração no CPF (Figura 17C) [METMO 25: HC  $6531 \pm 564,3$  (5); CE  $5088 \pm 360,8$  (6); CPF  $5350 \pm 506,8$  (5) ; METMO 50: HC  $4064 \pm 484,0$  (4) CE  $4574 \pm 259,8$  (6) CPF  $5588 \pm 468,4$  (4); METMO 100: HC  $5926 \pm 383,7$ ; CE  $5760 \pm 566,9$  (6); CPF  $6425 \pm 395,2$  (6)] quando comparado ao grupo da pilocarpina [Controle + P400: HC  $7325 \pm 418,3$  (6); CE  $12153 \pm 687,7$ ; CPF  $6697 \pm 648,2$  (6)]. Houve aumento de MDA no hipocampo (Figura 17A) na dose de 25 mg/Kg, no córtex pré-frontal (Figura 17C) na dose de 100 mg/Kg e um aumento em todas as áreas no grupo com pilocarpina quando comparado ao grupo sem pilocarpina (Figura 17A, 17B, 17C) [Controle: HC  $4839 \pm 323,3$  (5); CE  $5446 \pm 313,7$  (10) CPF  $4258 \pm 392,9$  (6)]. Comparado com as outras doses, a dose de 50 mg/Kg foi a que apresentou uma maior redução de MDA no tratamento agudo no HC e CPF comparado com grupo controle com pilocarpina..

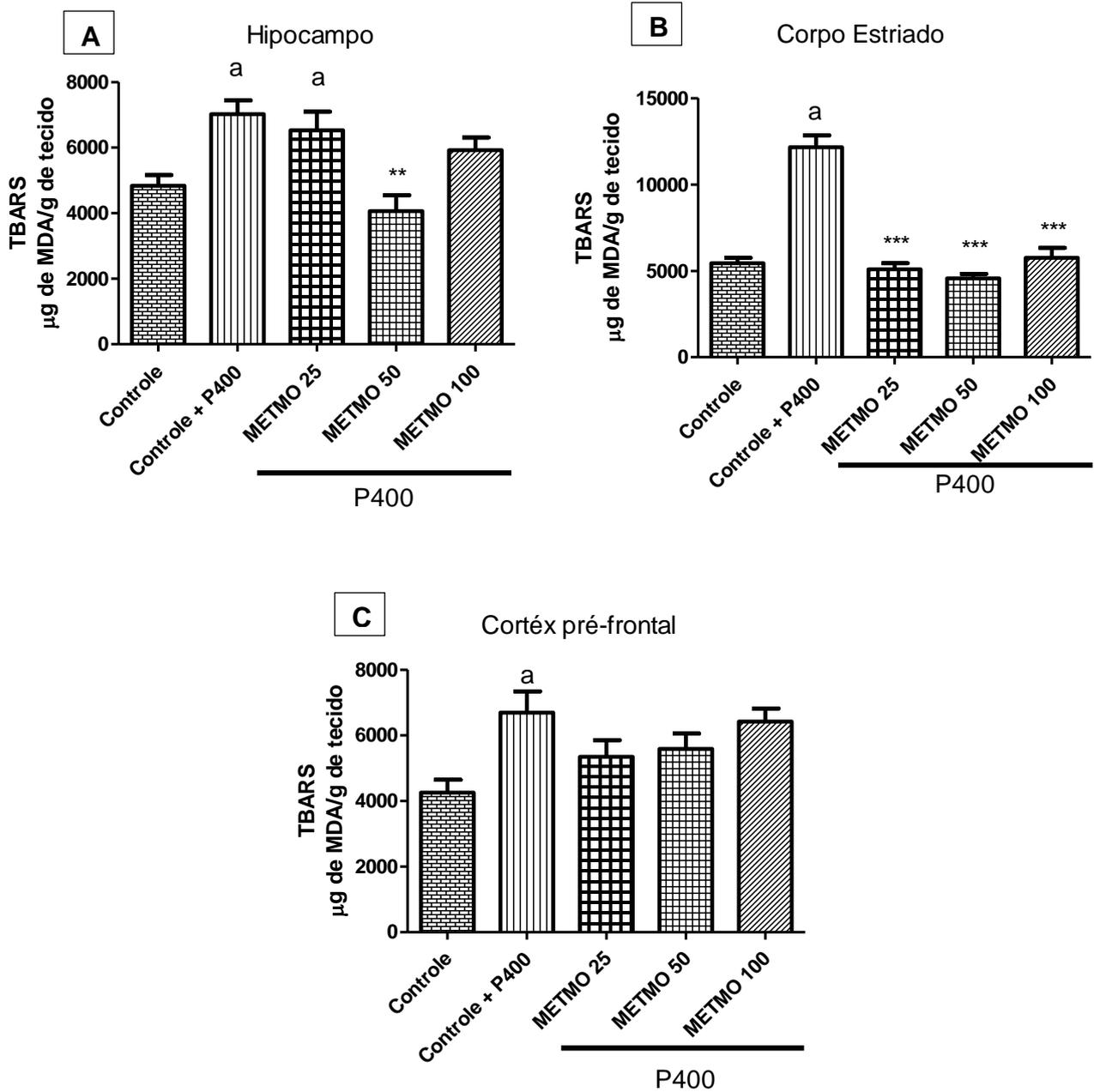
No tratamento subcrônico do METMO houve uma redução na concentração de MDA em todas as doses nas áreas de HC (Figura 18A), CE (Figura 18B) e CPF (Figura 18C) [METMO 25: HC  $4178 \pm 213,3$  (5); CE  $3984 \pm 308,2$  (5) CPF  $5523$  (5); METMO 50: HC  $4326 \pm 358,9$  (4); CE  $3492 \pm 115,5$  (5) CPF  $3822 \pm 319,2$  (4); METMO 100: HC  $3990 \pm 91,43$  (5); CE  $2864 \pm 274,7$  (5) CPF  $4312 \pm 631,3$  (5)] quando comparado com o grupo controle com pilocarpina [Controle + P400: HC  $6363 \pm 296,8$  (10); CE  $5397 \pm 329,3$  (9) CPF  $6971 \pm 336,8$  (8)]. Houve um aumento de MDA no controle com pilocarpina, mas não apresentou aumento nos grupos em que o METMO foi administrado, ocorrendo até uma diminuição do METMO 100 no CE (Figura 18B) quando comparado ao grupo sem pilocarpina, o qual foi administrado apenas o veículo [Controle: HC  $5085 \pm 360,4$  (6); CE  $4228 \pm 150,0$  (10); CPF  $4662 \pm 384,1$  (8)], sugerindo uma ação neuroprotetora maior na dose de 100 mg/Kg.

Figura 16: Efeito do tratamento agudo do EAMO sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos.



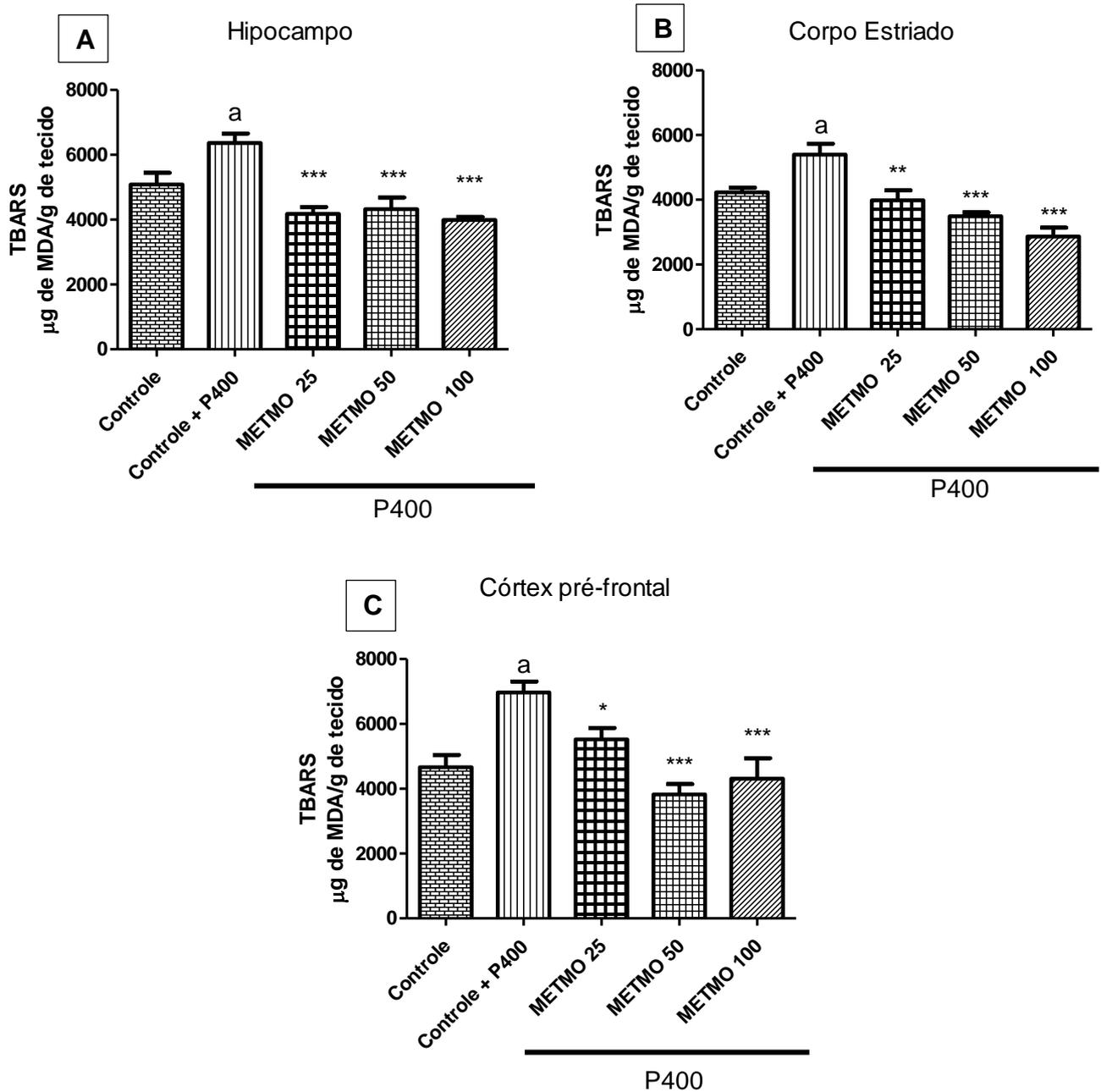
Determinação da ocorrência de peroxidação lipídica com base na concentração de MDA. Os valores representam a média  $\pm$ EPM da concentração de TBARS no Hipocampo. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls Test como teste *post hoc*. **A** - <sup>bb</sup> $p < 0,01$  EAMO 150 vs EAMO 50 e <sup>b</sup> $p < 0,05$  EAMO 450 vs EAMO 50. **B** - \* $p < 0,05$  vs Controle. **C** - \*\* $p < 0,01$  vs Controle.

Figura 17: Efeito do tratamento agudo do METMO sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento.



Determinação da ocorrência de peroxidação lipídica com base na concentração de MDA. Os valores representam a média  $\pm$ EPM da concentração de TBARS no Hipocampo. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls Test como teste *post hoc*. Valores significativos: A - <sup>\*\*</sup> $p < 0,01$  vs controle + P400, <sup>a</sup> $p < 0,01$  vs Controle; B - <sup>\*\*\*</sup> $p < 0,001$  vs Controle + P400, <sup>a</sup> $p < 0,01$  vs Controle; C - <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs Controle.

Figura 18: Efeito do tratamento subcrônico do METMO sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 14º dia de tratamento.



Determinação da ocorrência de peroxidação lipídica com base na concentração de MDA. Os valores representam a média  $\pm$ EPM da concentração de TBARS no Hipocampo. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls Test como teste *post hoc*. **A** - \*\*\* $p < 0,001$  vs controle + P400; <sup>a</sup> $p < 0,01$  vs Controle. **B** - \*\*\* $p < 0,001$  e \*\* $p < 0,01$  vs Controle + P400; <sup>a</sup> $p < 0,001$  Controle + P400 vs Controle; **C** - \*\*\* $p < 0,001$  e \* $p < 0,05$  vs Controle + P400; <sup>a</sup> $p < 0,001$  Controle + P400 vs Controle.

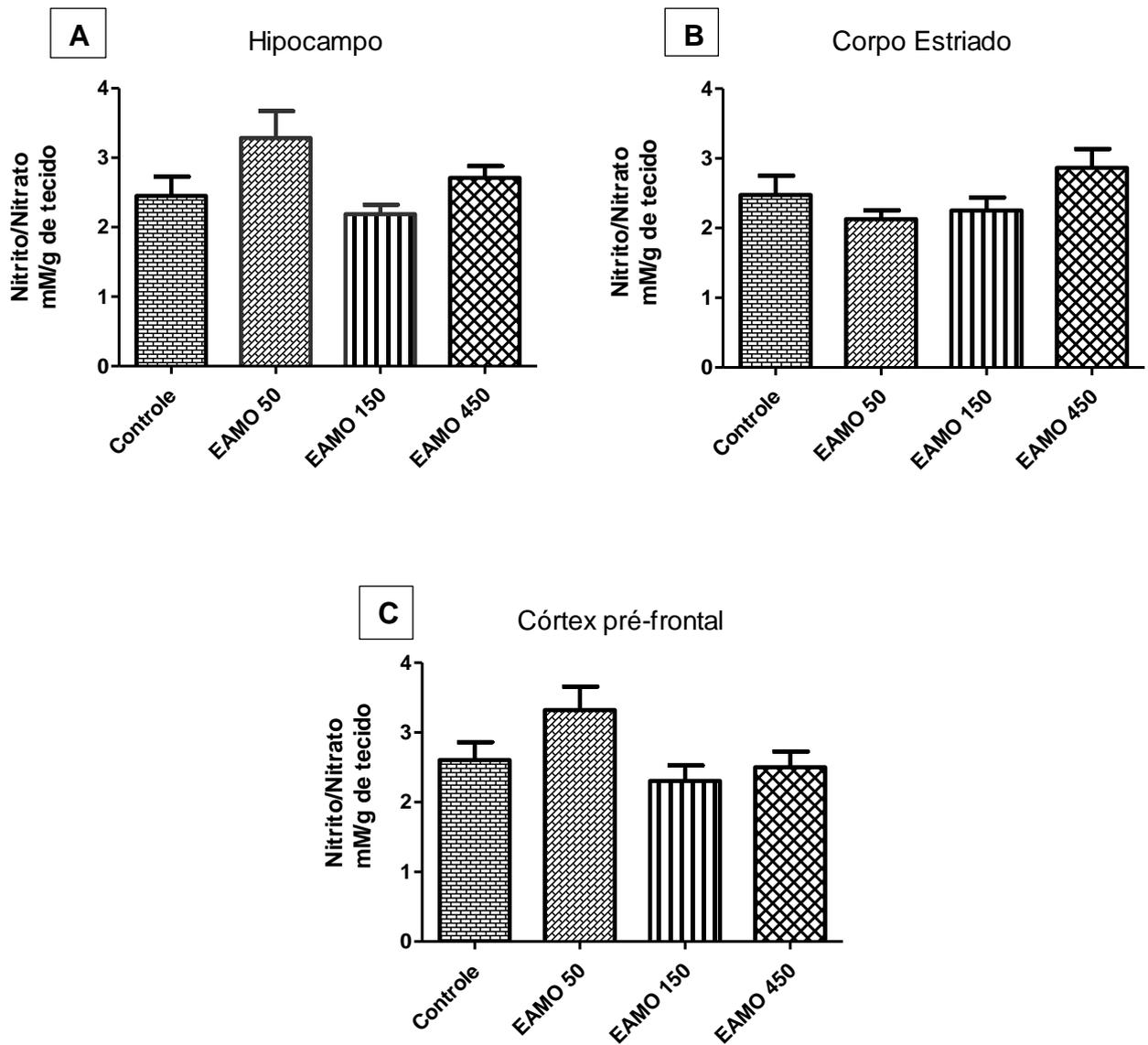
#### 4.3.2 Efeitos dos tratamentos sobre a produção de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais dos animais

No tratamento agudo do EAMO não houve alteração na produção de nitrito/nitrato em nenhuma área analisada (Figura 19A, 19B, 19C) [EAMO 50: HC  $3,286 \pm 0,3871$  (9); CE  $2,130 \pm 0,1235$  (8); CPF  $3,321 \pm 0,3363$  (11); EAMO 150: HC  $2,188 \pm 0,1377$  (14); CE  $2,251 \pm 0,1870$  (13) CPF  $2,306 \pm 0,2213$  (15); EAMO 450: HC  $2,711 \pm 0,1722$  (15); CE  $2,865 \pm 0,2704$  (13); CPF  $2,503 \pm 0,2258$  (13)] quando comparado ao controle com o veículo [Controle: HC  $2,453 \pm 0,2757$  (12); CE  $2,475 \pm 0,2782$  (13); CPF  $2,605 \pm 0,2579$  (12)].

No pré-tratamento agudo do METMO no modelo induzido por pilocarpina houve uma redução na produção de nitrito/nitrato no HC (Figura 20A) nas três doses, no CE (Figura 20B) uma redução nas doses de 25 e 50 mg/kg e apenas na dose de 50 mg/kg no CPF (Figura 20C) [METMO 25: HC  $1,465 \pm 0,1455$  (5); CE  $1,403 \pm 0,1353$  (5); CPF  $1,711 \pm 0,0956$  (4); METMO 50: HC  $1,062 \pm 0,0938$  (5); CE  $1,311 \pm 0,1236$  (6); CPF  $1,466 \pm 0,1020$  (6); METMO 100: HC  $1,158 \pm 0,0436$  (5); CE  $2,014 \pm 0,0678$  (6); CPF  $2,220 \pm 0,0907$  (6)] quando comparado ao controle com pilocarpina [Controle + P400: HC  $2,294 \pm 0,1142$  (7); CE  $1,403 \pm 0,1353$  (7); CPF  $1,826 \pm 0,1319$  (9)]. No HC houve redução de nitrito/nitrato (Figura 20A) nas três doses, aumento na dose de 100 mg/kg CE (Figura 20B) e no CPF (Figura 20C) e no grupo controle com pilocarpina houve aumento nas três áreas quando comparado com controle sem pilocarpina [Controle: HC  $1,801 \pm 0,075$  (5); CE  $1,507 \pm 0,0583$  (8); CPF  $1,43 \pm 0,0269$  (6)].

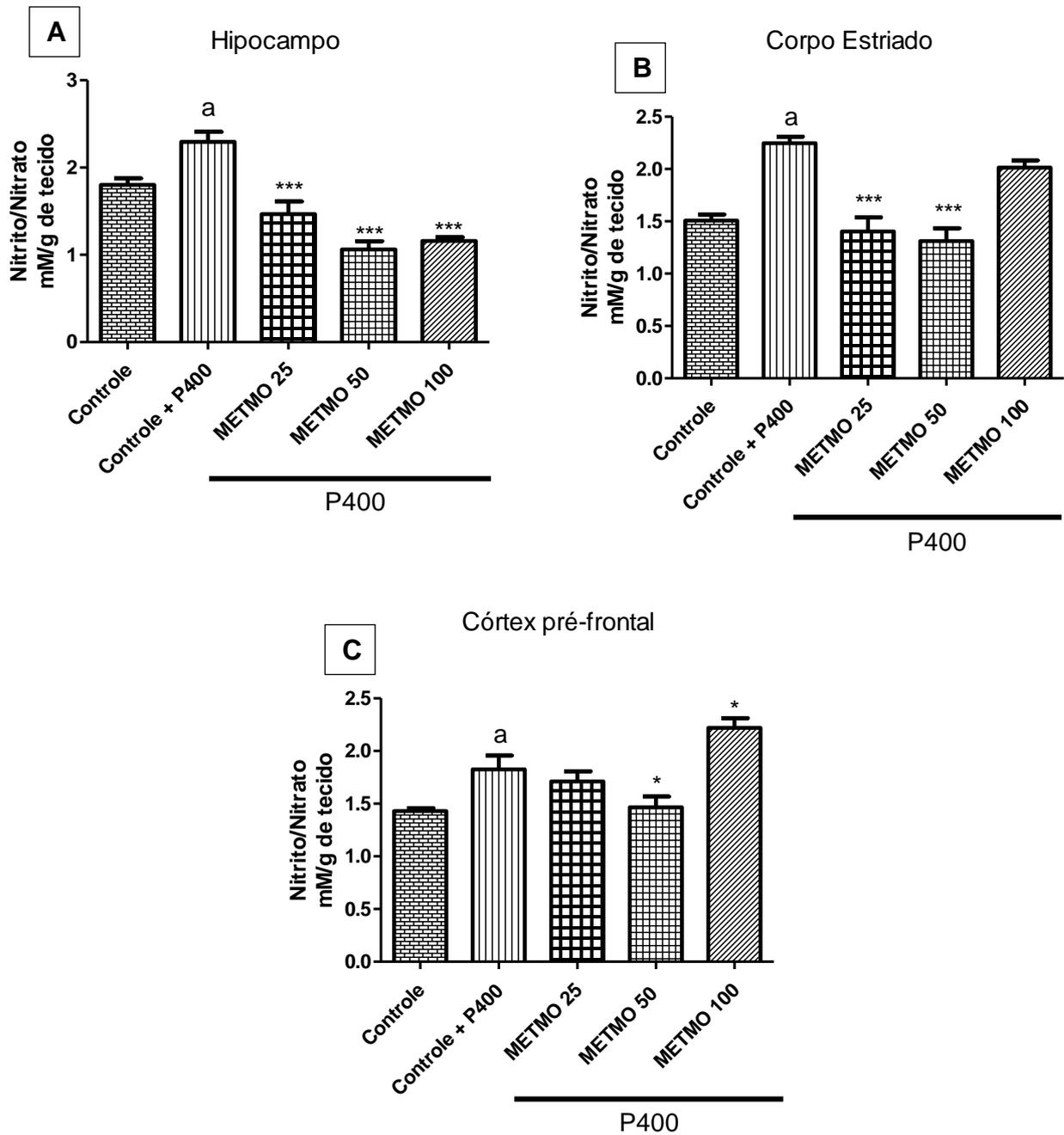
No pré-tratamento subcrônico do METMO houve redução no HC (Figura 21A), no CE (Figura 22B) e no CPF (Figura 23C) nas três doses tratadas [METMO 25: HC  $0,93 \pm 0,0745$  (5); CE  $0,9475 \pm 0,8909$  (4); CPF  $1,057 \pm 0,1014$  (6); METMO 50: HC  $1,264 \pm 0,045$  (4); CE  $0,8909 \pm 0,0794$  (4) CPF  $0,9938 \pm 0,0643$  (6); METMO 100: HC  $0,791 \pm 0,0135$  (4); CE  $1,531 \pm 0,0269$  (4); CPF  $1,581 \pm 0,1035$  (5)] quando comparado ao grupo com pilocarpina [Controle + P400: HC  $2,261 \pm 0,1204$  (7); CE  $2,247 \pm 0,0619$  (7); CPF  $2,014 \pm 0,1022$  (10)]. Houve um aumento no controle com pilocarpina nas três áreas, em consequência da convulsão, no entanto houve redução no HC (Figura 21A) e no CE (Figura 21B) nas três doses e nas doses de 25 e 50 mg/Kg no CPF (Figura 21C) quando comparado ao grupo controle sem pilocarpina [Controle: HC  $1,801 \pm 0,075$  (5) CE  $1,485 \pm 0,0818$  (4); CPF  $1,522 \pm 0,1022$  (10)].

Figura 19: Efeito do tratamento agudo do EAMO sobre a concentração de nitrito/nitrato no hipocampo no HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos no 1º dia de tratamento.



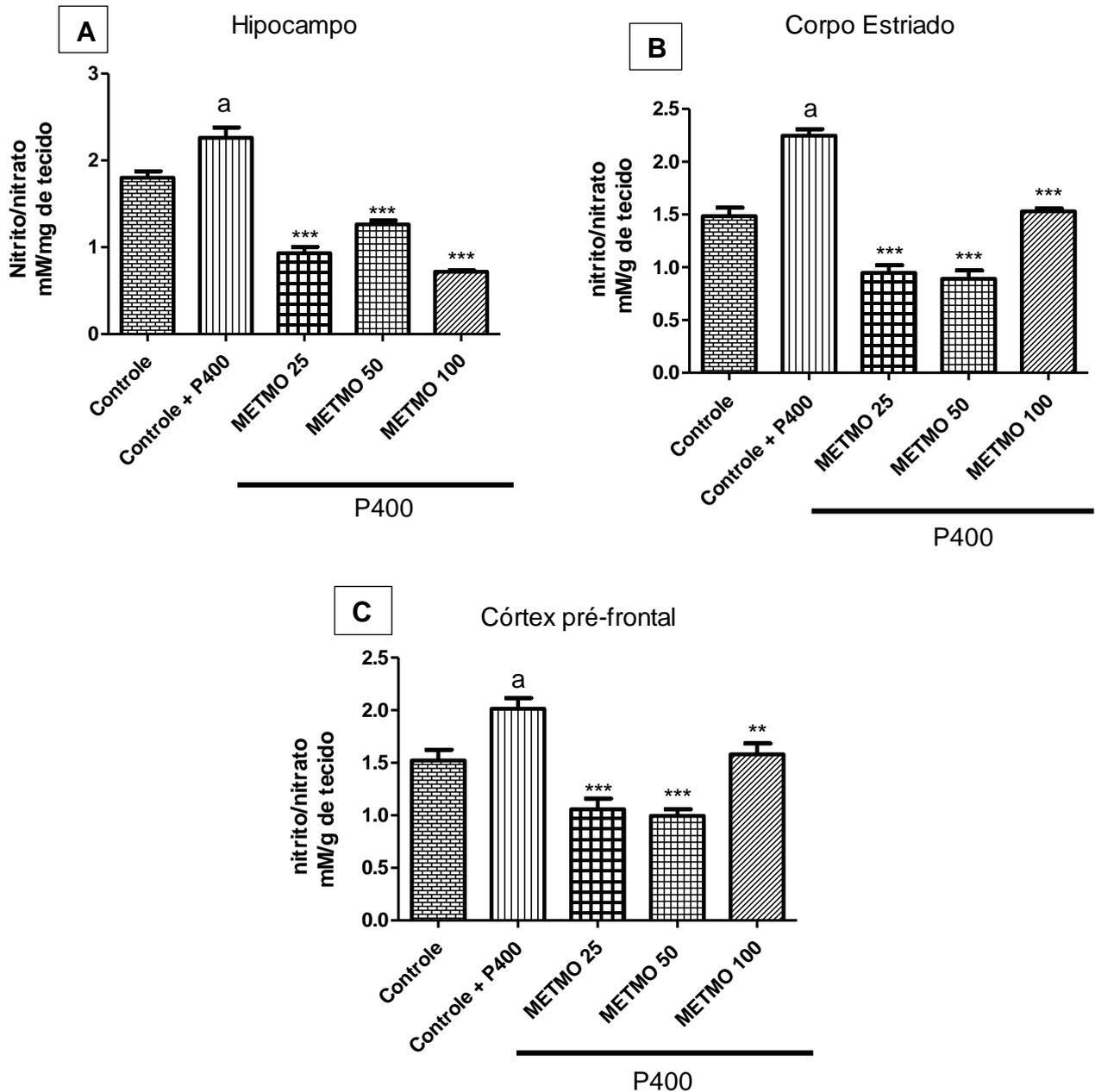
Determinação da formação de nitrato/nitrito. Os valores representam a média  $\pm$ EPM da concentração de nitrito/nitrato no hipocampo. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls Test como teste *post hoc*.

Figura 20: Efeito do tratamento agudo do METMO sobre a concentração de nitrito/nitrato no HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento.



Determinação da formação de nitrato/nitrito. Os valores representam a média  $\pm$  EPM da produção de nitrito/nitrato no hipocampo. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls Test como teste *post hoc*. Valores significativos: **A** - \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle + P400; <sup>a</sup> $p < 0,01$  vs Controle. **B** - \*\*\* $p < 0,001$  vs controle + P400; <sup>a</sup> $p < 0,001$  vs Controle; **C** - \* $p < 0,05$  vs Controle + P400; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs Controle.

Figura 21: Efeito do tratamento subcrônico do METMO sobre a concentração de nitrito/nitrato HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 14º dia de tratamento.



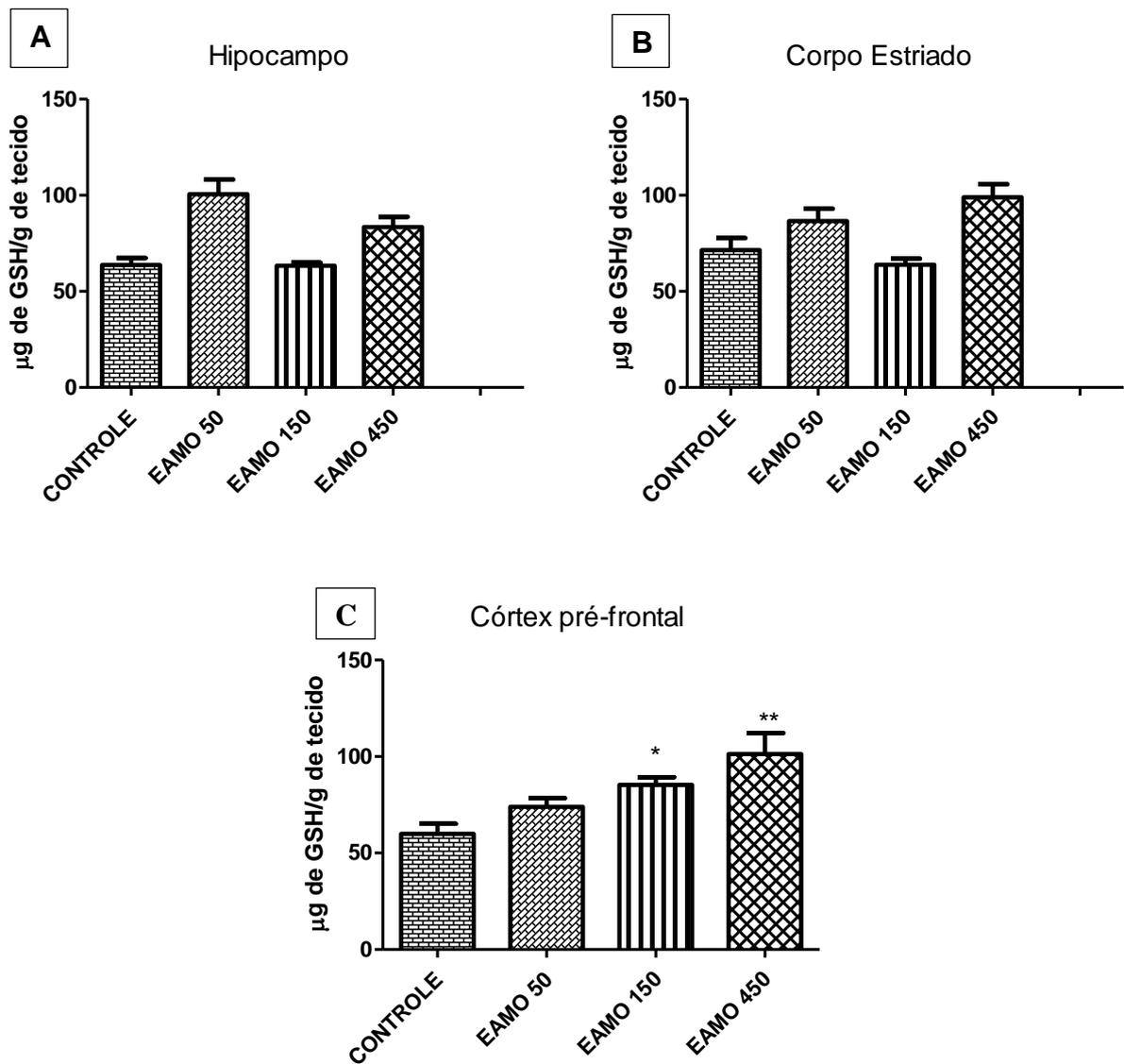
Determinação da formação de nitrato/nitrito. Os valores representam a média  $\pm$ EPM da produção de nitrito/nitrato no hipocampo. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls Test como teste *post hoc*. **A** - \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle + P400, <sup>a</sup> $p < 0,01$  Vs Controle. **B** - \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle + P400; <sup>a</sup> $p < 0,001$  vs Controle. **C** - \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,01$  vs Controle + P400; <sup>a</sup> $p < 0,01$  vs Controle.

#### 4.3.3 Efeito do tratamento com EAMO e METMO sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos

No tratamento agudo de EAMO houve um aumento de GSH no CPF (Figura 22C) nas doses de 150 e 450 mg/Kg, mas não houve produção no HC (Figura 22A) nem no CE (Figura 22B) [EAMO 50: HC  $100,6 \pm 7,59$  (4) CE  $86,53 \pm 6,428$  (5) CPF  $73,88 \pm 4,60$  (4); EAMO 150: HC  $63,26 \pm 1,63$  (5); CE  $63,82 \pm 3,156$  (5); CPF  $85,28 \pm 3,991$  (6); EAMO 450: HC  $83,38 \pm 5,465$  (5) CE  $98,94 \pm 6,773$  (5); CPF  $101,3 \pm 10,86$  (4) quando comparado ao controle [Controle: HC  $63,68 \pm 3,626$  (6); CE  $71,42 \pm 6,229$  (4); CPF  $59,92 \pm 5,252$  (5)].

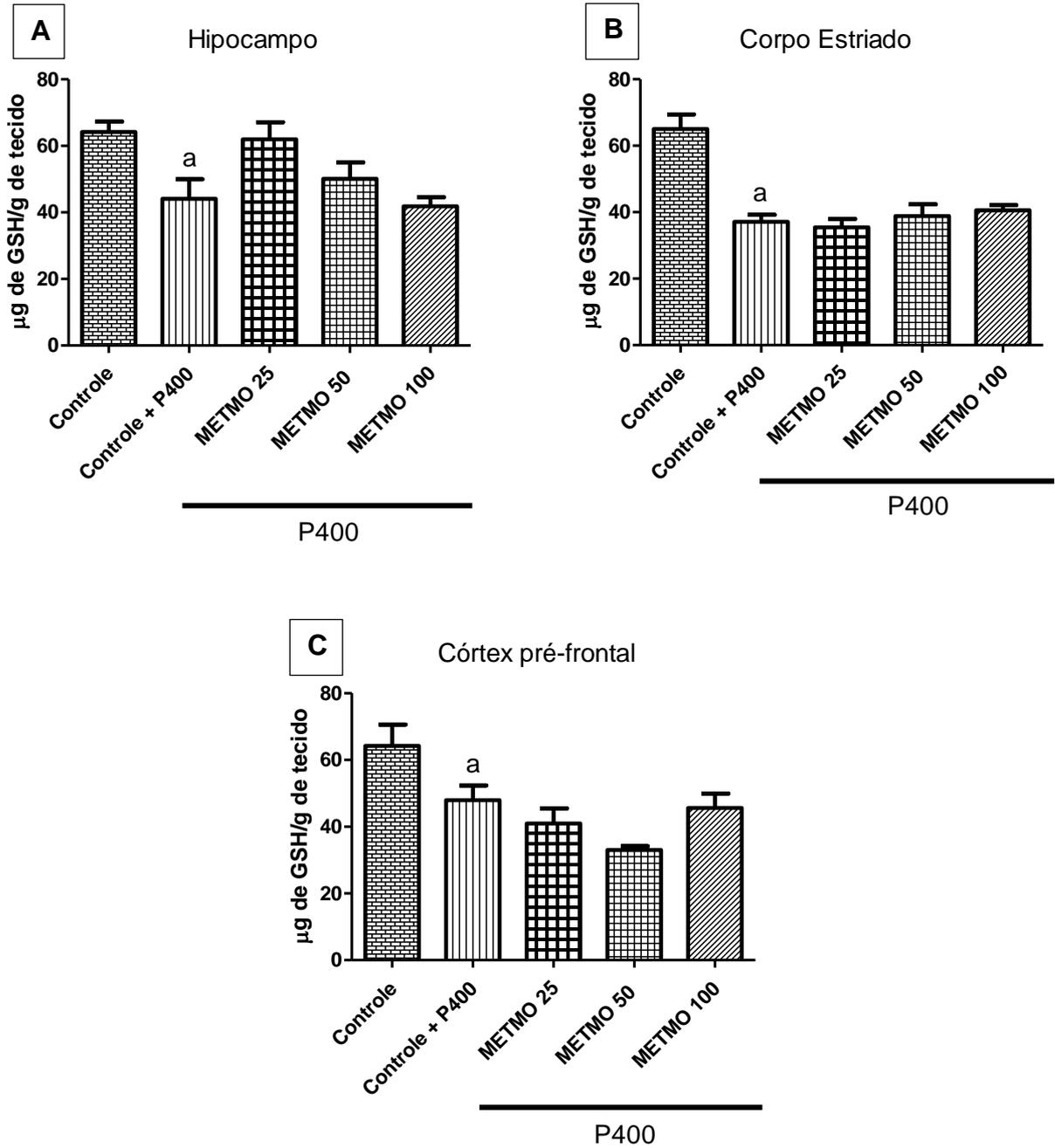
O tratamento subcrônico com METMO não houve alteração no GSH em nenhuma área cerebral (Figura 23A, 23B e 23C) [METMO 25: HC  $61,95 \pm 5,169$  (4); CE  $35,42 \pm 2,519$  (6); CPF  $40,97 \pm 4,535$  (5); METMO 50: HC  $50,10 \pm 4,957$  (6); CE  $38,82 \pm 3,56$  (6); CPF  $33,05 \pm 1,117$  (4); METMO 100: HC  $41,84 \pm 2,727$  (6); CE  $40,59 \pm 1,487$  (6); CPF  $45,63 \pm 4,302$  (5)] quando comparado ao controle com pilocarpina [ Controle + P400: HC  $44,10 \pm 5,835$  (3); CE  $37,09 \pm 2,114$  (6); CPF  $47,97 \pm 4,421$  (6)]. Com o estresse da convulsão, houve redução de GSH nas três áreas cerebrais nas três doses, exceto na dose de 25 mg/Kg no HC, a qual não houve nenhuma alteração quando comparado com controle sem pilocarpina [Controle: HC  $64,14 \pm 3,145$  (6); CE  $65,00 \pm 4,403$  (6); CPF  $64,26 \pm 6,347$  (4)].

Figura 22: Efeito do tratamento agudo do EAMO sobre a produção de GSH no HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos no 1º dia de tratamento.



Determinação na produção de GSH. Os valores representam a média  $\pm$  EPM da produção de GSH no córtex pré-frontal. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls Test como teste *post hoc*. Valores Significativos: **A** e **B** - Não houve diferença estatística. **C** - \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  vs Controle.

Figura 23: Efeito do tratamento subcrônico do METMO sobre a produção de GSH no HC (A), CE (B) e CPF (C) de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 14º dia de tratamento.



Determinação na produção de GSH. Os valores representam a média  $\pm$  EPM da produção de GSH no córtex pré-frontal. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls Test como teste *post hoc*. Valores Significativos: **A** - <sup>a</sup>p < 0,05 vs Controle. **B** - <sup>a</sup>p < 0,001 vs Controle. **C** - <sup>a</sup>p < 0,05 vs Controle.

## 5. DISCUSSÃO

Dentre as comorbidades psiquiátricas concomitantes à epilepsia, os distúrbios de ansiedade e a depressão são aquelas de maior frequência e que apresentam uma influência profunda na qualidade de vida dos pacientes com epilepsia. Existe uma crescente necessidade de novos agentes terapêuticos para o tratamento dessas doenças, isso ocorre devido ao número considerável de pacientes que são refratários ao tratamento convencional ou simplesmente não toleram alguns dos seus efeitos colaterais. Na busca por agentes que apresentem melhor eficácia e menos efeitos adversos, as plantas medicinais e os produtos naturais relacionados a elas continuam a ser uma fonte importante de potenciais agentes terapêuticos. No entanto, para utilizar estes produtos naturais no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, um passo fundamental é identificar a atividade biológica desejada (FAJEMIROY et al., 2018).

Diante disso, o presente trabalho propôs avaliar a ação neuropsicofarmacológica do extrato aquoso das sementes da *Moringa oleífera* (EAMO) e seu metabólito secundário. O extrato (EAMO) foi utilizado para avaliação da atividade locomotora exploratória no teste de campo aberto, a atividade antidepressiva no teste do nado forçado e a atividade ansiolítica no teste de labirinto de Cruz elevado (LCE) nas doses de 50, 150 e 450 mg/kg, e o metabólito secundário (METMO) foi avaliado no modelo de convulsão induzido por pilocarpina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg (tratamento agudo e subcrônico).

Foi avaliado os efeitos do EAMO no teste do Labirinto em cruz elevado (LCE). Esse teste tem como objetivo avaliar se a amostra em questão poderia ter uma possível ação ansiolítica ou ansiogênica. Dessa forma, animais sob o efeito de drogas ansiogênicas gastam menos tempo nos braços abertos e sob o efeito de drogas ansiolíticas gastam mais tempo comparado com o grupo controle. O Diazepam (DZP) constitui uma das drogas de referência bastante utilizada para tratar a ansiedade e pode ser usada como controle positivo nesse teste (HAZIM et al., 2014, COSTA et al., 2014).

No teste do LCE o EAMO nas doses de 50, 150 e 450 mg/kg não apresentou efeito ansiolítico em nenhuma das doses testadas. Embora o estudo realizado por INGALE e GANDHI (2016) utilizando extrato aquoso das folhas da *M.oleífera* tenha demonstrado efeito ansiolítico nas doses de 250, 375 e 500 mg/kg, no nosso trabalho isso não foi verificado provavelmente porque o extrato utilizado foi obtido a partir das sementes e não das folhas, portanto a diferença dos tipos e quantidade de constituintes pode ter influenciado nesse efeito (INGALE; GANDHI, 2016).

Sabe-se que apesar de haver certo padrão dos componentes encontrados na *M.oleifera*, pode-se observar variação na composição nas diferentes partes da planta e conseqüentemente o tipo e a concentração substâncias bioativas. Fatores como local e a forma do plantio, tipo de solo, uso de fertilizantes, momento da coleta do material, a parte da planta utilizada, influenciam nesse processo, sendo uma possível explicação para resultados divergentes quando comparado extrato aquoso das folhas com o da semente (GOPALAKRISHNAN; DORIYA; KUMAR, 2016).

O teste do campo aberto avalia a atividade locomotora e comportamental de camundongos, o que pode ser correlacionado com a função locomotora, também podendo ser usado, em alguns casos, para avaliar a ansiedade e comportamentos exploratórios (TATEM et al., 2014; LIU et al., 2014). No presente estudo apenas nas maiores doses (150 e 450 mg/Kg) o EAMO promoveu redução na atividade locomotora dos animais tratados. Em um estudo realizado com extrato das folhas da *M.oleifera* com concentrações variando de 200 a 2000 mg/kg demonstrou uma redução no número de cruzamentos corroborando com os resultados encontrados (BAKRE; ADERIBIGBE; ADEMOWO, 2013).

Para avaliação do efeito antidepressivo foi realizado teste do nado forçado. Nesse teste se avalia o tempo de imobilidade do animal. De maneira geral, se o animal diminui o tempo de imobilidade no nado forçado, provavelmente a substância apresenta efeito antidepressivo, mas se o tempo de imobilidade for aumentado, pode haver uma sugestão para efeitos depressores ou atividade sedativa (FAJEMIROY et al., 2018). Esse resultado corrobora com os efeitos do EAMO no teste do campo aberto, em que foi observada diminuição da atividade locomotora nas duas maiores doses quando comparas ao controle. Mostrando que o EAMO provavelmente apresenta constituintes com efeito depressor do sistema nervoso central. Esse efeito possivelmente depressor do sistema nervoso central do EAMO, nos levou a testar o efeito do metabólito secundário, fração do extrato isolada, no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

Diversas partes da *M.oleifera* possuem os isotiocianatos (ITC), estes são um grupo bem estabelecido de produtos que ocorrem naturalmente, que são produzidos pela planta e que após passar por processos enzimáticos, como a metabolização após sua ingestão por seres vivos, sendo os Glucosinolatos (GL) precursor deles. A Glucomoringina (GMG) é um membro atípico da família GL presente em vegetais tropicais pertencente à família Moringaceae, ou seja, *Moringa oleifera* Lam, principalmente nas sementes e que tem comprovada sua ampla gama de atividades biológicas, como atividade antitumoral, efeitos bactericidas e proteção contra doenças

neurodegenerativas (MATHIRON et al., 2018; SAUCEDO-POMPA et al., 2018), sendo, provavelmente, um dos principais componentes do METMO analisado nesse trabalho.

Foi observado que, no modelo de convulsão induzido por pilocarpina, nos animais tratados com METMO houve um aumento na latência de convulsão, ou seja, o tempo para ocorrer a primeira convulsão, na dose de 50 mg/Kg e aumento na latência de morte nas doses de 50 e 100 mg/kg no tratamento agudo. No tratamento subcrônico houve aumento da latência de convulsão e da latência de morte nas três doses (25, 50 e 100 mg/Kg) do METMO. Trabalhos com metabólitos originados das sementes ainda estão escassos na avaliação de convulsões. No entanto, existem trabalhos realizados com extratos de outras partes da planta bem como seu composto majoritário.

INGALE e GANDHI (2016) utilizando modelos de convulsão com pentilenotetrazol e eletrochoque e o teste do labirinto em cruz elevado, demonstraram que o extrato aquoso das folhas da *M.oleífera* (250, 375 e 500 mg/kg, i.p.) apresentou efeitos antiepilépticos e ansiolíticos significativos. Segundo esses autores o mecanismo de ação possivelmente envolveria a capacidade dos constituintes do extrato de mimetizar a ação do GABA. Muitas drogas antiepilépticas e ansiolíticas apresentam mecanismo de ação relacionado ao GABA e a modulação dos seus receptores, principalmente os receptores GABA<sub>A</sub>. Porém, estima-se que existem outros receptores GABA além daqueles que já foram descobertos, pois as características morfofuncionais da estrutura desses receptores e seus diferentes sítios de ligação são muito complexas e ainda pouco elucidadas. Atualmente tem crescido o número de estudos de novas drogas com capacidade de modular esses receptores GABA ainda desconhecidos (KALITIN et al., 2018). Esses fatores podem contribuir para a justificativa da diferença dos resultados apresentados pelo atual trabalho em que o extrato não apresentou ação ansiolítica.

Além da avaliação comportamental, também foram avaliados os efeitos do METMO sobre o estresse oxidativo. Vários estudos têm demonstrado efeito antioxidante dos isotiocionatos utilizando modelos experimentais que cursam com lesão celular, como isquemia focal/reperfusão, lesão medular e encefalomielite (GIACOPPO et al., 2015; GALUPPO et al 2014). Em 2017, GIACOPPO e colaboradores, utilizando modelo de Parkinson com MPTP, verificaram que o pré-tratamento durante sete dias com isotiocionatos originados a partir da Glucomoringina obtidos das sementes da *M.oleífera* diminuíram o estresse oxidativo, a resposta inflamatória e a apoptose de neurônios.

Uma produção excessiva de radicais livres ou algum problema nos sistemas antioxidantes endógenos, pode causar desequilíbrio entre a formação e inativação, aumentando a sua concentração, podendo acarretar dano aos tecidos e, conseqüentemente, ao organismo de

forma geral. As espécies reativas do oxigênio (EROS) são radicais livres que podem atuar sobre as mitocôndrias, promover alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, e contribuir para a apoptose dos neurônios, estando envolvidas na fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas (GANIE et al., 2016; SUN, KONG e ZHOU, 2018).

Em nosso estudo observamos que o tratamento agudo com o extrato aquoso (EAMO) não promoveu nenhuma alteração nos níveis de nitrito/nitrato e MDA, em nenhuma das doses testadas, pelo contrário, houve uma redução de MDA no CE (150 mg/Kg) e nas três doses do CPF mostrando que nessas condições não apresenta efeitos nocivos e até benéficos relacionados ao estresse oxidativo.

Após o evento da convulsão, há um aumento do estresse oxidativo em decorrência da elevação de espécies reativas não só relacionadas ao oxigênio, mas com outros radicais livres, como as espécies reativas do nitrogênio (ERNS). Por isso, geralmente os níveis de nitrito/nitrato (relacionado ao radical peroxinitrito) e MDA (relacionado com a peroxidação lipídica) aumentam em animais submetidos a convulsão (KOVAC et al., 2014; PAULETTI et al., 2017). Sabendo que essas espécies estão relacionadas ao estresse oxidativo, após a convulsão e morte do animal as áreas como hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal foram utilizadas para a determinação das concentrações de nitrito/nitrato e MDA tanto no pré-tratamento agudo como no subcrônico dos METMO.

No pré-tratamento agudo, o METMO causou redução da produção de MDA apenas na dose de 50 mg/Kg no hipocampo, nas três doses no corpo estriado e nenhuma alteração no córtex pré-frontal, enquanto no pré-tratamento sub-crônico houve redução nas três doses no hipocampo, no corpo estriado e no córtex pré-frontal.

Com relação ao nitrito/nitrato, o tratamento agudo com METMO promoveu redução das concentrações no hipocampo nas três doses (25, 50 e 100 mg/Kg), demonstrando possível efeito antioxidante nessa área cerebral. No corpo estriado redução na dose de 25 e 50 mg/Kg e no córtex pré-frontal não foi observado efeito significativo na concentração de nitrito/nitrato na dose de 25 mg/kg, porém houve redução na dose de 50 mg/kg e aumento com a maior dose (100 mg/Kg).

Isso demonstra que possivelmente o efeito agudo do METMO sobre a peroxidação lipídica e produção de nitrito/nitrato nesse modelo depende da área cerebral estudada e da dose utilizada. Porém, o tempo de tratamento parece ser uma variável mais importante para este efeito, já que no tratamento subcrônico foi observada redução da peroxidação lipídica e na produção de nitrito/nitrato com as três doses utilizadas e em todas as áreas cerebrais estudadas (HC, CE e CPF). Em tratamentos mais longos, há uma redução dos picos de concentração

plasmáticas e uma modulação neuronal. Dessa forma, pode-se alcançar resultados mais favoráveis em mais dias de tratamento (RAMAKER; DULAWA, 2017).

Esse efeito antioxidante pode estar relacionado a um possível efeito neuroprotetor, visto que no tratamento agudo, quando comparado ao grupo da pilocarpina, houve aumento na latência de convulsão e de morte apenas com a dose de 50 mg/Kg, e no tratamento subcrônico esses efeitos foram observados com as três doses testadas, corroborando com dados na literatura que demonstram possíveis efeitos neuroprotetores da Glucomorigina e seus derivados, presentes nas sementes da *M.oleifera*. Jaafaru e seus colaboradores (2018) realizaram um estudo para avaliar os efeitos dos Isotiocianatos de sementes de Moringa oleifera revelou a capacidade de neuroproteção glucomorigina de origem *M. oleifera* contra o estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Outro estudo comparou os efeitos do extrato de semente da *M.oleifera* em um edema e o isocianato isolado desse extrato apresentaram fortes propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes in vivo e in vitro, tornando-os promissores a a mitigação de distúrbios crônicos mediados por inflamação (JAJA-CHIMEDZA et al., 2017).

O presente trabalho mediu também a produção de glutatona (GSH) no pré-tratamento agudo do EAMO e para METMO subcrônico. Para o EAMO não houve alteração da GSH em nenhuma área nas três doses e METMO houve redução no hipocampo (50 e 100 mg/Kg), no corpo estriado (25 e 100 mg/kg) e nas três doses no córtex pré-frontal. O estresse oxidativo é essencialmente um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio EROs, radicais livres e mecanismos endógenos de defesa antioxidante na célula, por isso o equilíbrio pode ser avaliado medindo nitrito/nitrato, MDA (peroxidação lipídica) e glutatona (GSH), este na verdade é um antioxidante natural que pode aumentar produção em resposta ao estresse oxidativo (JIAO et al., 2017; MOTO et al., 2018). Como não houve o estresse oxidativo, pelo contrário, houve uma redução de MDA para EAMO e redução de MDA e nitrito/nitrato para METMO não foi necessário um aumento da GSH com resposta ao estresse do organismo, corroborando com nossos resultados.

Nosso estudo demonstrou um possível efeito neuroprotetor no modelo de convulsão induzida por pilocarpina que pode estar relacionado ao mecanismo de ação antioxidante desses compostos. Portanto, sugerimos que estudos para avaliar esses compostos poderiam ser promissores e favorecer na prevenção e/ou tratamento das convulsões, inclusive em associação com a terapêutica convencional.

## 6. CONCLUSÃO

A realização do presente estudo permitiu concluir que:

- O extrato aquoso das sementes da *Moringa oleífera* não apresentou efeito ansiolítico nas condições testadas
- O extrato aquoso das sementes da *Moringa oleífera* apresentou possível efeito depressor do sistema Nervoso Central na dose de 150 e 450 mg/kg.
- O METMO apresentou efeito antioxidante, pois houve a redução da peroxidação lipídica (MDA) e de nitrito/nitrato no tratamento subcrônico.
- O METMO apresentou possível efeito neuroprotetor em animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por pilocarpina, dependendo da dose e do tempo de tratamento.

## REFERÊNCIAS

- AGNIESZKA, W.; ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. The mechanism of neuroprotective action of natural compounds. **Pharmacological Reports**. v. 69, n. 5, p. 851-860, 2017.
- AL-BUSAIDI, I.; ALAMRI, Y. Poststroke Anxiety and Depression: Findings from Saudi Arabia **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 25, n. 2, p. 1653-1654, 2016.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **M294 Manual diagnóstico e estatístico de transtorno**. v. 5. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 205-235, 1973.
- BAKRE, A.G.; ADERIBIGBE, A.O.; ADEMOWO, O.G. Studies on neuropharmacological profile of ethanol extract of Moringa oleifera leaves in mice. **Journal of Ethnopharmacology** v. 149, n. 3, p. 783-789, 2013.
- BARROWS, C. M. et al. PTEN Loss Increases the connectivity of fast synaptic motifs and functional connectivity in a developing hippocampal network. **Journal of Neuroscience**. v. 37, n. 36, p.8595-8611, 2017.
- BOING, A. F. et al. Associação entre depressão e doenças crônicas: um estudo populacional. **Revista Saúde Pública**, São Paulo. v. 46, n. 4, p. 617-623, 2012.
- BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. **Dialogues Clin Neurosci**. v. 17, n. 3, p. 295-203, 2015.
- BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009**. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Diário Oficial da União, Brasília, 2009.
- BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008**. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 2008.
- BRASIL. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, p.60, 2006. Disponível em: < [http://http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nacional\\_fitoterapicos.pdf](http://http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf)>. Acesso em: 11 junho 2017.
- BUKHARI, I.A.; DAR, A. Behavioral profile of Hypericum perforatum (St. John's Wort) extract. A comparison with standard antidepressants in animal models of depression. **European Review Medical Pharmacological Sciences**. v. 17, n.8, p. 1082-1089, 2013.

CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci*, v.16, n.1-2, p.33-7, 1995.

CHANG, Z.G. et al. Pharmacists' knowledge and attitudes toward herbal medicine. *Annals of Pharmacotherapy*. v. 41, n. 7-8, p. 1272-1276, 2007.

CHEN, H. et al. Evolution in medicinal chemistry of ursolic acid derivatives as anticancer agentes. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 92, p. 648-55, 2015.

CHO, Y. S. et al. Syringaresinol suppresses excitatory synaptic transmission and picrotoxin-induced epileptic activity in the hippocampus through presynaptic mechanisms. *Neuropharmacology*. v. 131, p. 68-82, 2018.

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

CLARK, J. Medicalization of global health 2: the medicalization of global mental health. *Global Health Action*. v. 7, n. 10, 2014.

COLLINS, P.Y. *et al.* Grand challenges in global mental health. *Nature*. v. 475, n. 7354, p. 27.30, 2011.

COSTA, A. A. et al. A computational model for exploratory activity of rats with different anxiety levels in elevated plus-maze. *Journal of Neuroscience Methods*. v. 236, p. 44-50, 2014.

COSTA, A. R. D; CORRÊA, P. D. C; PARTATA, A. K. Epilepsia e os fármacos mais utilizados no seu tratamento. *Revista Científica do ITPAC, Araguaína*, v.5, n.3, Pub.4, 2012.

DEAN, J. KESHAVAN, M. The neurobiology of depression: An integrated view. *Asia Jornal of Psychiatry*. v. 217, p. 101-111, 2017.

DESHWAL, S. *et al.* Emerging role of monoamine oxidase as a therapeutic target for cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*. v. 33, p. 64-69, 2017.

DHARAMBIR, K.; SINGH, T. H.; SHARMA A. K. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sciences*. v. 146, p. 210-213, 2016.

DRAPER, H.H.; HADELY, M. Malondialdehyde determination as na índex of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, p. 421-431, v. 186, 1990.

ELIWA, H.; BELZUNG, C., SURGET, A. Adult hippocampal neurogenesis: is it the alpha and omega of antidepressant action? *Biochemical Pharmacology*. v. 141, p. 86-99, 2017.

FAJEMIROYE, O. J. et al. Evaluation of Anxiolytic and Antidepressant-like Activity of Aqueous Leaf Extract of *Nymphaea Lotus* Linn. in Mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. v. 17, n. 2, p. 613- 626, 2018.

FARIAS, D.S.D. et al. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos como forma complementar no controle da hipertensão arterial. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 12, n. 3, p. 1-13, 2016.

FROTA, A.F. Uma nova perspectiva para tratamento de distúrbios neurológicos. 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2015.

PRADO, S.M.C. Efeitos da naringenina em modelos animais de convulsão e depressão: aspectos comportamentais, envolvimento do adrenoceptor alfa-1 e estresse oxidativo. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2016.

GALUPPO, M. et al. Antiinflammatory activity of glucomoringin isothiocyanate in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Fitoterapia**. v. 95, p. 160-174, 2014.

GANIE, S. A. et al. Melatonin: A potential antioxidant therapeutic agent for mitochondrial dysfunctions and related disorders. **Rejuvenation Research**. v. 19, n.1, 2016.

GELFUSO, E.A. et al. Anxiety: A Systematic Review of Neurobiology, Traditional Pharmaceuticals and Novel Alternatives from Medicinal Plants. **CNS & Neurological Disorders - Drug Target**. v. 13, n. 3, p. 150-165, 2014.

GIACOPPO, S. et al. The Isothiocyanate Isolated from *Moringa oleifera* Shows Potent Anti-Inflammatory Activity in the Treatment of Murine Subacute Parkinson's Disease. **Rejuvenation Research**. v. 20, n. 1, p. 50-63, 2017.

GIACOPPO, S. et al. An overview on neuroprotective effects of isothiocyanates for the treatment of neurodegenerative diseases. **Fitoterapia**. v. 106, p. 12-21, 2015.

GOPALAKRISHNAN, L.; DORIYA, D.; KUMAR, D.S. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. **Food Science and Human Wellness**. v. 2, n. 2, p. 29-56, 2016.

GREEN, L. C. et al. Nitrate synthesis in the gerbil and conventional rat. **Science**. v. 212, p. 56-58, 1981.

HAMILTON, S.E. et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v.94, p.13311-16, 1997.

HARE, B. D; GHOSAL, S.; DUMAN, R.S. Rapid Acting Antidepressants in Chronic Stress Models: Molecular and Cellular Mechanisms. **Chronic Stress**. v. 1, p. 1-12, 2017.

HATTIANGADY, B. ; RAO, M. S. ; SHETTY, A. K. Grafting of striatal precursor cells into hippocampus shortly after status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy. **Experimental Neurology**. v. 212; n. 2, p. 468-481, 2008.

HAZIM, A. I. et al. Anxiolytic-like effects of mitragynine in the open-field and elevated plus-maze tests in rats. **J Physiol Sci**. V. 64, n. 3, p. 161-169, 2014.

- INGALE, S.P.; GANDHI, F.P. Effect of aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves on pharmacological models of epilepsy and anxiety in mice. **International journal of epilepsy**. v.3, n. 1, p. 12-19. 2016.
- JAAFARU, M.S. et al. Isothiocyanate from *Moringa oleifera* seeds mitigates hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and preserved morphological features of human neuronal cells. **PLoS One**. v. 13, n. 5, p. 1-17, 2018.
- JAJA-CHIMEDZA, A. et al. Biochemical characterization and anti-inflammatory properties of an isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extract. **PLoS One**. v. 12, n. 8, p. 1-20, 2017.
- JESUS, A.R.D., et al. **Dossiê Técnico do cultivo da *Moringa oleifera***. Serviço Brasileiro de Resposta Técnica, Instituto Euvaldo, 2013.
- JIAO, Y. et al. Glutathione peroxidases as oncotargets. **Oncotarget**. v. 8, n. 45, 2017.
- KALITIN, K. Y. et al. GABAergic Mechanism of Anticonvulsive Effect of Chemical Agent RU-1205. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. v. 164, n. 5, p. 629-635, 2018.
- KARIM, N.A.A. et al. *Moringa oleifera* Lam: Targeting Chemoprevention. **Asian Pac J Cancer Prev**. v. 17, n. 8, p. 3675-86, 2016.
- KAUR, G. et al. Evaluation of the antidepressant activity of *Moringa oleifera* alone and in combination with fluoxetine. **Journal of Ayurveda & Integrative Medicine**. v. 6, n. 4, p. 273-279, 2015.
- KERDSOMBOON, K. et al. Soluble *Moringa oleifera* leaf extract reduces intracellular cadmium accumulation and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 121, n.5, p. 543-549, 2016.
- KOVAC, S. et al. Seizure activity results in calcium- and mitochondriaindependent ROS production via NADPH and xanthine oxidase activation. **Cell Death and Disease**. v. 5, e1442, 2014.
- LEE, G.; BAE, H. Therapeutic Effects of Phytochemicals and Medicinal Herbs on Depression **BioMed Research International**. v. 2017, p. 1-11, 2017.
- LIN S.H. et al. A medicinal herb, *Melissa officinalis* L. ameliorates depressive-like behavior of rats in the forced swimming test via regulating the serotonergic neurotransmitter. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 175, p. 266-272, 2015.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse **Psychopharmacology**. v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.
- LIU, X. et al. Cognitive deficits and decreased locomotor activity induced by single-walled carbon nanotubes and neuroprotective effects of ascorbic acid. **International Journal of Nanomedicine**. v. 9, n. 1, p. 823-839, 2014.

- MAHENDRAN, G. et al. Evaluation of Anticonvulsant, Sedative, Anxiolytic, and Phytochemical Profile of the Methanol Extract from the Aerial Parts of *Swertia corymbosa* (Griseb.) Wight ex C.B. Clarke. **BioMed Research International**. v. 2014, p. 1-9, 2014.
- MATHIRON, D. et al. A Combined Approach of NMR and Mass Spectrometry Techniques Applied to the  $\beta$ -Cyclodextrin/Moringin Complex for a Novel Bioactive Formulation. **Molecules**. v. 23, n.7, p. 1-17, 2018.
- MAZZOCCHETTI, P. et al. Lacosamide protects striatal and hippocampal neurons from in vitro ischemia without altering physiological synaptic plasticity. **Neuropharmacology**. v. 135, p. 424-430, 2018.
- MÉNARD, C.; HODES, G.E.; RUSSO, S.J. Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies. **Neuroscience**. V.321, p. 138-162, 2016.
- MORGAN, A.P. et al. An Alternative Treatment for Anxiety: A Systematic Review of Human Trial Results Reported for the Ayurvedic Herb Ashwagandha (*Withania somnifera*). **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**. v. 20, n. 12, p. 901–908, 2014.
- MOTAGHINEJAD, M.; MOTEVALIAN, M.; SHABABB, B. Effects of chronic treatment with methylphenidate on oxidative stress and inflammation in hippocampus of adult rats. **Neuroscience Letters**. v. 619, p. 106-113, 2016.
- MOTO, F.C.O. et al. Anxiolytic and Antiepileptic Properties of the Aqueous Extract of *Cissus quadrangularis* (Vitaceae) in Mice Pilocarpine Model of Epilepsy. **Frontiers in Pharmacology**. v. 9, artigo 751, 2018.
- NEUMANN, I. D. et al. Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition?. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 1357-1375, 2011.
- NIEOCZYM D.; SOCAŁA K.; WLAŻ P. Assessment of the Anticonvulsant Potency of Ursolic Acid in Seizure Threshold Tests in Mice. **Neurochemical Research**. v. 43, n. 5, p. 995-1002, 2018.
- NIRWAN, N.; VYAS, P; VOHORA, D. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. **Reviews in the Neurosciences**. V. 29, n. 7, p. 757-770, 2018.
- OMODANISI, E. I.; ABOUA, Y. G.; OGUNTIBEJU, O. O. Assessment of the anti-hyperglycaemic, anti-inflammatory and antioxidant activities of the methanol extract of *Moringa oleifera* in diabetes-induced nephrotoxic male wistar rats. **Molecules. Pharmacognosy Reserach**. v. 9, n. 2, p. 182-187, 2017.
- PAULETTI, A. et al. Targeting oxidative stress improves disease outcomes in a rat model of acquired epilepsy. **Brain**. v. 140, n. 7, p. 1885-1889, 2017.
- PELLOW, S.; FILE, S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 24, p. 525, 1986.

PITSIKASN, N. The metabotropic glutamate receptors: Potential drug targets for the treatment of anxiety disorders? **European Journal of Pharmacology**. v. 723, p. 181-184, 2014.

PORSOLT, R. D. et al. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**. v. 266, p. 730-732, 1977.

RAMAKER, M.J.; DULAWA, S.C. Identifying fast-onset antidepressants using rodent models. v. 22, n. 5, p. 656-665, 2017.

SALT, S.; MULVANEY, C. A, PRESTON, N. J. Drug therapy for symptoms associated with anxiety in adult palliative care patients. **The Cochrane Library**. V. 5, p. 1-35, 2017.

SANTANA, C. R. *et al.* CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MORINGA (*Moringa oleifera* Lam). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande**. v. 12, n. 1, p.55-60, 2010.

SARRIS, J. et al. Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: a review of psychopharmacology and clinical evidence. **European europsychopharmacology**. v. 21, n.12, p. 841-860, 2011.

SAUCEDO-POMPA, S., et al. Moringa plants: Bioactive compounds and promising applications in food products. **Food Research International**. v. 111, p. 438-450, 2018.

SIELGE, P.S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **J.Psychol**. v.21, p.227-236, 1946.

SINGH, N. et al. Resveratrol protects against ICV collagenase-induced neurobehavioral and biochemical deficits. **Journal of Inflammation**. v. 14, n. 14, p. 1-15, 2017.

SOUZA, P. D.; OLIVEIRA, N. C. D. Conhecimento sobre epilepsia em universitários da área da saúde: revisão sistemática. **Cad. da Esc. de Saúde, Curitiba**. v.17, n.1, p. 25-29, 2017.

STAFSTROM, C. E., CARMANT, L. Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v. 5, n. 6, p. 1-18, 2015.

STOHS, S.J.; HARTMAN, M.J. Review of the safety and efficacy of *Moringa oleifera*. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 6 p.796-804, 2015.

SUN, X.; KONG, L.; LIZHOU. Protective effect of fructus corni polysaccharide on hippocampal tissues and its relevant mechanism in epileptic rats induced by lithium chloride-pilocarpine. **Experimental and Therapeutic Medicine** , v. 16, p. 445-451, 2018.

TATEM, K. S. et al. Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases. **Journal of Visualized Experiments**. v. 91, e51785, p. 1-7, 2014.

TOMLINSON, M. Global mental health: a sustainable post Millennium Development Goal? **International Health**. v.5, n. 1, p. 1-3, 2013.

TRUJANO, M.E.G. *et al.* Pharmacological evaluation of the anxiolytic-like effects of *Lippia graveolens* and bioactive compounds. **Pharmaceutical Biology**. v. 55, n. 1, p. 1569-1576, 2017.

TURSKI, W. A. *et al.* Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study, **Behav. Brain Res.**, v.9, n.3, p.315–335, 1983.

UMUKORO, S. *et al.* Evidence for the Involvement of Monoaminergic Pathways in the Antidepressant-Like Activity of *Cymbopogon citratus* in Mice. **Drug Research**. v. 12, p. 3-21, 2003.

WANG, B. *et al.* Effects of  $\alpha$ 2A Adrenoceptors on Norepinephrine Secretion from the Locus Coeruleus during Chronic Stress-Induced Depression. **Front. Neurosci.** v. 11, n. 243, 2017.

WANG, J. *et al.* Rapid-onset antidepressant efficacy of glutamatergic system modulators: the neural plasticity hypothesis of depression. **Neuroscience Bulletin**. v. 31, n. 1, p. 75–86, 2015.

WITTCHEN, H.U. *et al.* The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. **European Neuropsychopharmacology**. V.21, n. 9, p. 655–679, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2018. Disponível em <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>> Acesso em: 11 de agosto de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2018. Epilepsy, Fact sheet. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>> acesso em: 27 de março de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mental health: facing the challenges, building solutions: report from the WHO European Ministerial**, 2005. Disponível em: <http://www.euro.who.int/docum/ent/E87301.pdf>. Acesso em: 17 jun 2016.

ZHOU, J. *et al.* *Moringa oleifera* Seed Extract Alleviates Scopolamine-Induced Learning and Memory Impairment in Mice. **Frontiers in Pharmacology**. v. 9, p. 1-11, 2018.

## ANEXO A



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

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: **Avaliação dos efeitos neuropsicofarmacológicos do extrato aquoso e dos metabólitos secundários da *Moringa oleifera* em camundongos**, registrada com o nº 09/16, sob a responsabilidade de **Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 30/08/16.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	31/08/2016 até 20/03/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de animais	231
Peso/Idade	25 a 30g/1-2 meses
Sexo	♂
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 31 de agosto de 2016.

  
 Prof. Dr. Igor Iuço Castro da Silva

Vice-coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA