



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

IRIS CRISTINA MAIA OLIVEIRA

**EFEITOS CENTRAIS DA RIPARINA I DE *Aniba riparia* (NEES) MEZ
(LAURACEAE) EM MODELOS COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE,
DEPRESSÃO, SONO E CONVULSÃO EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA-CE

2012

IRIS CRISTINA MAIA OLIVEIRA

**EFEITOS CENTRAIS DA RIPARINA I DE *Aniba riparia* (NEES) MEZ
(LAURACEAE) EM MODELOS COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE,
DEPRESSÃO, SONO E CONVULSÃO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

FORTALEZA-CE

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

O47e

Oliveira, Iris Cristina Maia.

Efeitos centrais da riparina I de aniba riparina (NEES) mez (Lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade, depressão, sono e convulsão em camundongos. / Iris Cristina Maia Oliveira. – 2012.

118 f.: il. color., enc.; 30 cm.

Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Neurofarmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.

1. Lauraceae. 2. Ansiolíticos. 3. Depressão. 4. Ansiedade. I. Título.

CDD 616.8527

IRIS CRISTINA MAIA OLIVEIRA

**EFEITOS CENTRAIS DA RIPARINA I DE *Aniba riparia* (NEES) MEZ (LAURACEAE)
EM MODELOS COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE, DEPRESSÃO, SONO E
CONVULSÃO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em 27/11/2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo
Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

Profa. Dra. Paula Matias Soares
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre presente na minha vida, me iluminando e ajudando a tornar possível os meus sonhos.

À minha orientadora Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa que me acolheu com imenso carinho no laboratório de Neurofarmacologia. Agradeço pelo encorajamento, pela disponibilidade dispensada em todas as situações e por suas sugestões que foram importantes para a concretização deste projeto e para o meu aprendizado.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, nas pessoas do Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho e Prof. Stanley Juan Chávez Gutierrez, que nos cederam a substância isolada e colaboraram com esta pesquisa.

Às professoras Thiciane Vasconcelos e Paula Matias por terem gentilmente aceito o convite para participar da Banca Examinadora desta dissertação.

Aos professores do curso de pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, em especial, Prof. Hélio Rola, Profa., Profa. Silvânia Vasconcelos, Profa. Dra. Danielle Macêdo, Profa. Geanne Matos pelos conhecimentos transmitidos e dedicação permanente aos alunos e ao programa de pós-graduação.

Ao meu amigo, Advane, por me incentivar a não esmorecer e acima de tudo por acreditar e confiar em mim.

Aos estudantes de iniciação científica do LNF, Joaquim, Carol, Raquell pela dedicação e seriedade na execução dos experimentos.

Aos amigos, Joaquim , Carol, Thiciane, Fernando, Nyrton, Emiliano, Alyne e Leonardo cujo apoio foi imprescindível no início da minha caminhada no Laboratório de Neurofarmacologia.

Aos técnicos do Laboratório de Neurofarmacologia, Vilani, Lena, Arnaldo e Nágira pela companhia constante e animadora no laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Aura Rhanes, Márcia, Fernando, Aauto e Haroldo pela dedicação ao trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Cláudio e Ozilene, e meu irmão Davi, pelo apoio incondicional, força, incentivo e amizade sem igual.

Agradeço a todos que fizeram parte deste caminho de crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

A Riparina I é uma alcanida isolada do fruto não maduro da *Aniba riparia*. Estudos prévios demonstraram que dois de seus análogos estruturais, as Riparinas II e III, desencadeiam ações ansiolíticas e antidepressivas em modelos animais clássicos. A fim de contribuir com a busca por melhores alternativas terapêuticas para os tratamentos da ansiedade, depressão e convulsão em humanos, investigou-se os efeitos centrais da Riparina I em camundongos. Para tanto, utilizou-se modelos clássicos de triagem de agentes sedativo/hipnóticos, antidepressivos e anticonvulsivantes: Campo Aberto (CA), Rota Rod (RR), Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Placa Perfurada (PP), Suspensão da Cauda (SC), Nado Forçado (NF), Tempo de Sono induzido por Pentobarbital (TSP) e Convulsão induzida por Pentilenotetrazol (CP). Para estes testes, os animais receberam administração aguda de Riparina I, doses 25 ou 50 mg/kg, por vias oral ou intraperitoneal. Demonstrou-se que a administração da substância teste nas doses de 25 e 50 mg/kg produziu um efeito ansiolítico, anticonvulsivante e potencializador do tempo de sono barbitúrico e que nestas mesmas doses não apresentou efeito estimulante motor ou relaxante muscular. Além disso, a Riparina I causou um efeito antidepressivo em dois modelos animais clássicos preditivos de propriedades antidepressivas (TSC e TNF), não relacionado a um efeito psicoestimulante, e que parece ser mediado, pelo menos em parte, por uma interação com os sistemas dopaminérgico (receptores D_1 e D_2), noradrenérgico (receptores α_1 e α_2) e serotoninérgico (receptores 5-HT_{2A/2C}). Esse estudo fornece evidências experimentais e abre perspectivas para estudos posteriores que podem culminar com uma futura utilização terapêutica da Riparina I no tratamento da depressão, ansiedade, insônia e convulsão. Entretanto, estudos posteriores mais aprofundados far-se-ão necessários para confirmar os mecanismos envolvidos nos efeitos apresentados.

Palavras-chave: 1. Lauraceae. 2. Ansiolíticos. 3. Depressão. 4. Ansiedade.

ABSTRACT

Riparin I is an alkamide isolated from green fruit of *Aniba riparia*. Previous studies have shown that two of its structural analogs, the Riparins II and III, they trigger anxiolytic and antidepressant actions in animal classical models. In order to contribute to the search for better therapeutic alternatives for the treatment of anxiety, depression and convulsion in humans, we investigated the central effects of Riparin I in mice. Therefore, we used classical models of screening sedative / hypnotics, antidepressants and anticonvulsants drugs: Open Field (OP), Rota Rod (RR), Elevated Plus Maze (EPM), Perforated Plate (PP), Tail Suspension (TS), Forced Swim (FS), pentobarbital-induced sleep time (PST) and pentylenetetrazol-induced convulsion (PC). For these tests, the animals received acute administration of Riparin I, doses 25 and 50 mg / kg, by oral or intraperitoneal administration. It has been shown that the administration of the test substance in doses of 25 and 50 mg/kg produced anxiolytic and anticonvulsant effects and it potentiated barbiturate-induced sleep time and that these same doses didn't cause motor effect. Furthermore, Riparin I caused an antidepressant effect in two predictive classical animal models of antidepressant properties (TS and FS) which seems to be mediated, at least in part, by an interaction with the dopaminergic (D_1 and D_2 receptors), noradrenergic (α_1 and α_2 receptors) and serotonin (receptors $5-HT_{2A/2C}$) systems. This study provides experimental evidence and opens perspectives for further studies that may lead to future therapeutic use of Riparin I in the treatment of depression, anxiety, insomnia and seizures. However, further studies far more depth will be needed to confirm the mechanisms involved in the effects reported.

Keywords: Lauraceae. Anxiolytic. Anxiety. Depression.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	<i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez (folhas).	20
FIGURA 2	Estrutura química das riparinas I, II, III e IV.	22
FIGURA 3	Circuitos neuronais da ansiedade	25
FIGURA 4	Ansiedade patológica: hiperativação de circuitos ligados à amígdala	26
FIGURA 5	Receptor GABA _A	28
FIGURA 6	Correspondência entre sintomas depressivos e circuitos	30
FIGURA 7	Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto.	61
FIGURAS 8	Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o número de <i>rearing</i> no teste do campo aberto.	62
FIGURAS 9	Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o número de <i>grooming</i> no teste do campo aberto.	63
FIGURAS 10	Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B) sobre o tempo de permanência no Teste do <i>Rota Rod</i> .	65
FIGURA 11	Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o número de <i>head dips</i> no teste da placa perfurada (<i>hole board test</i>).	67
FIGURA 12	Efeito da riparina I, via intraperitoneal, sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) (A) e tempo de permanência no teste do labirinto em cruz elevado (B).	70
FIGURA 13	Efeito da riparina I, via intraperitoneal, sobre a porcentagem do número de entradas nos braços abertos (A) e a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (B) no teste do labirinto em cruz elevado.	71
FIGURA 14	Efeito da riparina I, via oral, sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) (A) e o tempo de permanência no teste do labirinto em cruz elevado (B).	72
FIGURAS 15	Efeito da riparina I, via oral, sobre a porcentagem do número de entradas nos braços abertos (A) e a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (B) no teste do labirinto em	73

	cruz elevado.	
FIGURAS 16	Efeito da riparina I, via oral, sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) (A) e tempo de permanência no teste do labirinto em cruz elevado (B).	74
FIGURA 17 -	Efeito da riparina I, via oral, sobre a porcentagem do número de entradas nos braços abertos (A) e a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (B) no teste do labirinto em cruz elevado	75
FIGURA 18	Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda.	77
FIGURA 19	Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado.	80
FIGURA 20	Efeito do pré-tratamento de camundongos com SUL (50 mg / kg, i.p.) (A) ou SCH23390 (15 ug / kg, i.p.) (B) sobre a redução do tempo de imobilidade induzida pelo tratamento com rip I (50 mg / kg, v.o.) no TNF	81
FIGURA 21	Efeito do pré-tratamento de camundongos com PZS (1 mg/kg, i.p.) (A) ou IOI (1mg/kg, i.p.) (B) sobre a redução do tempo de imobilidade induzida pelo tratamento com rip I (50 mg / kg, v.o.) no TNF.	82
FIGURA 22	Efeito do pré-tratamento com PCPA (100 mg / kg, i.p.) (A) ou ritanserina (4 mg / kg, i.p.) (B) ou WAY 100625 (0,1 mg / kg, i.p.) (C) ou ondansetran (0,1 mg / kg, i.p.) (D) sobre a redução do tempo de imobilidade induzida pelo tratamento com rip I (50 mg / kg, v.o.) no TNF.	83
FIGURA 23	Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a latência do sono, em segundos, no teste do tempo de sono induzido por Pentobarbital.	85
FIGURA 24	Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a duração do sono, em segundos, no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital.	86

FIGURA 25	Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a latência das convulsões, em segundos, no Teste da Convulsão induzida por Pentilenotetrazol.	88
FIGURA 26	Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a latência de morte no Teste da Convulsão induzida por Pentilenotetrazol.	89

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1.	Vias de sinalização, localização e farmacologia de subtipos de receptor NA	32
QUADRO 2.	Vias de sinalização, localização e farmacologia de subtipos de receptor 5-HT	33
QUADRO 3.	Receptores dopaminérgicos	34
QUADRO 4.	Drogas e Reagentes	45
QUADRO 5.	Equipamentos	46

QUADRO 6.	Esquema do Teste do Campo Aberto	49
QUADRO 7.	Esquema do Teste do do <i>Rota Rod</i>	50
QUADRO 8.	Cálculo dos parâmetros PEBA e PTBA do LCE	51
QUADRO 9.	Esquema do Teste do Labirinto em Cruz Elevado.	52
QUADRO 10.	Esquema do Teste da Placa Perfurada.	53
QUADRO 11.	Esquema do Teste da Suspensão da Cauda	54
QUADRO 12.	Esquema do Teste do Teste do Nado Forçado	56
QUADRO 13	Esquema do Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital	57
QUADRO 14	Esquema do Teste da Convulsão Induzida por Pentilenotetrazol.	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 O poder terapêutico dos produtos naturais	17
1.2 A Família Lauraceae	18
1.3 <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez	19
1.4 Potencial Terapêutico das Alcamidas Naturais de <i>Aniba riparia</i>	22
1.5 Toxicidade	23
1.6 Ansiedade	23
1.7 Depressão	29
1.7.1 Receptores Monoaminérgicos	
1.8 Epilepsia e convulsão	26
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral	41

3.2	Objetivos Específicos	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	Material Botânico	44
4.2	Extração e Isolamento da riparina I	44
4.3	Animais	46
4.4	Preparo de Drogas	47
4.5	Tratamento dos Grupos Experimentais	47
4.6	Protocolo Experimental	47
4.7	Avaliação da Atividade Ansiolítica	48
4.7.1	Teste do Campo Aberto	48
4.7.2	Teste do <i>Rota Rod</i>	52
4.7.3	Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	53
4.7.4	Teste da Placa Perfurada	55
4.8	Avaliação da Atividade Antidepressiva	56
4.8.1	Teste da Suspensão da Cauda	56
4.8.2	Teste do Nado Forçado	57
4.9	Avaliação da Atividade Sedativa/Hipnótica e Anticonvulsivante	59
4.9.1	Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital	59
4.9.2	Teste da Convulsão Induzida por Pentilenotetrazol	58
4.12	Análise Estatística	58
5	RESULTADOS	59
5.1	Avaliação da Atividade Motora e Ansiolítica	60
5.1.1	Teste do Campo Aberto	60
5.2	Avaliação da Atividade Relaxante Muscular	64
5.2.1	Teste do <i>Rota Rod</i>	64
5.3	Avaliação da Atividade Ansiolítica	66
5.3.1	Teste da Placa Perfurada	66
5.3.2	Teste da Convulsão Induzida por Pentilenotetrazol	68
5.4	Avaliação da Atividade Antidepressiva	76
5.4.1	Teste Suspensão da Cauda (TSC)	76
5.4.2	Teste do Nado Forçado (TNF)	81
5.5	Avaliação da Atividade Hipnótica e Anticonvulsivante	84
5.5.1	Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital	84
5.5.2	Teste da Convulsão induzida por Pentilenotetrazol	87
6	DISCUSSÃO	90
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
8	CONCLUSÕES	104
9	REFERÊNCIAS	106

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 O poder terapêutico dos produtos naturais

Desde o surgimento da medicina, compostos derivados de animais, plantas e microorganismos (produtos naturais) têm sido utilizados como agentes terapêuticos. Antes dos anos 1800, os princípios ativos de grande parte dos medicamentos, em geral à base de plantas, eram desconhecidos. Até que em 1817, Friedrich Sertürner isolou o primeiro composto puro e farmacologicamente ativo, a morfina, a partir de uma planta, a *Papaver somniferum* e, com o sucesso terapêutico do novo fármaco, aumentou o interesse da comunidade científica sobre o poder terapêutico das plantas (NEWMAN; CRAGG, 2010).

A pesquisa farmacêutica expandiu-se ainda mais após a Segunda Guerra Mundial, com um maior número de pesquisas com microorganismos por causa da descoberta da penicilina. A investigação dos produtos naturais como fonte de novos fármacos atingiu o seu auge na indústria farmacêutica ocidental durante o período de 1970-1980 (NEWMAN *et al.*, 2003). Em 1990, cerca de 80% dos medicamentos eram produtos naturais ou análogos inspirado neles, mas esse percentual caiu ao longo dos anos, e em 2009 cerca de 40% dos agentes terapêuticos eram derivados de fontes biológicas (LI; VEDERAS, 2009).

Os desafios para a descoberta de drogas a partir de fontes naturais podem estar relacionados à dificuldade de acesso as espécies, às dificuldades de se examinar o material, ao tempo e investimento que demanda o processo e às limitações de técnicas na identificação de novos compostos com atividade desejável. No entanto, o acompanhamento do declínio no número de candidatos a novos medicamentos reacendeu o interesse na busca por agentes relacionados aos produtos naturais (LI; VEDERAS, 2009).

A análise dos produtos naturais revela uma considerável diversidade em termos de estrutura e propriedades físico-químicas e biológicas. Esta diversidade permite as “moléculas da natureza” atingir um número quase ilimitado de macromoléculas biológicas, muitas vezes de forma altamente seletiva. Com relação a isso, tem-se acreditado que em comparação aos sintéticos, os compostos naturais tendem a ser muito superiores em termos de diversidade, eficiência e especificidade de ligação e propensão para interagir com alvos biológicos (CARLSON, 2010).

Essas características despertam o interesse sobre a possibilidade da utilização de produtos naturais em estudos que vão além da identificação de potenciais agentes terapêuticos, e que estão relacionados à exploração e entendimento dos sistemas biológicos e aplicações na tecnologia farmacêutica (PUCHEAULT, 2008).

Certamente novos conhecimentos e novas necessidades encontrarão no reino vegetal soluções através da descoberta e desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica (MELO, 2006) e, diante da vasta quantidade e variedade de espécies, há muito a ser investigado. O número de espécies de plantas superiores é estimado entre 300.000 e 400.000, no total, e destas menos de 15% foram quimicamente investigadas e analisadas em termos de bioatividade (BEUTLER *et al.*, 2009).

1.2 A Família Lauraceae

As espécies vegetais da família Lauraceae são árvores ou arbustos encontrados em florestas tropicais e subtropicais, sendo comuns na América e na Austrália. No total, estão catalogadas 2.500 espécies relacionadas a 50 gêneros (WERFF; RICHTER, 1996). No Brasil, ocorrem 19 gêneros e cerca de 390 espécies que habitam, em sua maior parte, as florestas pluviais e também as restingas e os cerrados (BARROSO, 1978).

Os principais gêneros incluem *Aniba* (40 spp.), *Ocotea* (300-400 spp.), *Persea* (150 spp.), *Cinnamomum* (250 spp.), *Litsea* (400 spp.), *Neolitsea* (80 spp.), *Lindera* (100 spp.), *Laurus* (2 spp.) e *Cryptocarya* (200-250 spp.). Algumas espécies são utilizadas pelas indústrias para a fabricação de diversos produtos, porém, a maioria das espécies tem seu uso restrito às comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas (MARQUES, 2001).

A família Lauraceae destaca-se entre as demais famílias por sua importância econômica. Algumas espécies são usadas na culinária (*Persea americana*, *P. gratissima*, *Laurus nobilis*), na marcenaria (*O. organensis*, *Aniba firmula*, *A. terminalis*), na construção civil (*Ocotea acutifolia*, *O. acyphylla*, *O. catharinensis*), na fabricação de papel (*Ocotea puberula*, *O. elegans*), na indústria de perfumaria, na indústria química (*A. roseadora*, *A. carnellita*, *A. parviflora*) e, ainda, na medicina popular (*Ocotea acyphylla*, *O. spectabilis*, *O. pulchella*, *O. teleiandra*, *Laurus nobilis* e *Aniba riparia*) (MARQUES, 2001). Essa importância econômica que a família

Lauraceae apresenta e a inexistência de programas efetivos de manejo florestal são alguns dos fatores que colocam em risco de extinção a maior parte de suas espécies (ARAÚJO, 1994).

1.3 *Aniba riparia* (Nees) Mez e Riparinas

O gênero *Aniba* compreende cerca de 40 espécies de arbustos e árvores de planície, com o centro da sua diversidade na Amazônia e nas Guianas, podendo estender-se para os Andes, as montanhas do norte da Venezuela e leste e sul do Brasil (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000).

A espécie *Aniba riparia* (Nees) Mez , popularmente denominada “louro”, “louro-faia” ou “pau-rosa” (MARQUES, 2001), apresenta folhas cartáceas, foscas em ambas as faces, reticulação aureolada, ramos de 3 mm de espessura, marrons e lenticelados, pecíolo canaliculado, engrossado na base e gema terminal menor que 4 mm (VICENTINI *et al.*, 1999) (**Figura 1**).

Figura 1 – *Aniba riparia* (Nees) Mez



Fonte: <http://www.bio.uu.nl/~herba/Guyana/VTGG/Lauraceae/Aniba/slides/Aniba%20riparia%201.html>.

Através da análise química das cascas do caule da *Aniba riparia* detectou-se a presença de alguns flavonóides, benzilbenzoatos e benzaldeídos (FERNANDES *et al.*, 1978; FRANÇA *et al.*, 1976). Além disso, Barbosa-Filho e colaboradores (1987), constataram no fruto verde da planta a presença de uma grande variedade de substâncias, cujas principais são neoglicanas, benzilbenzoatos, feniletilaminas (O-metil-tiramina) e alguns alcalóides, mais especificamente alcanidas (feniletilamidas de ácido benzóico).

As alcanidas naturais constituem uma classe especial de alcalóides contendo uma função amida restrita a poucos representantes na natureza (CATÃO *et al.*, 2005). Do ponto de

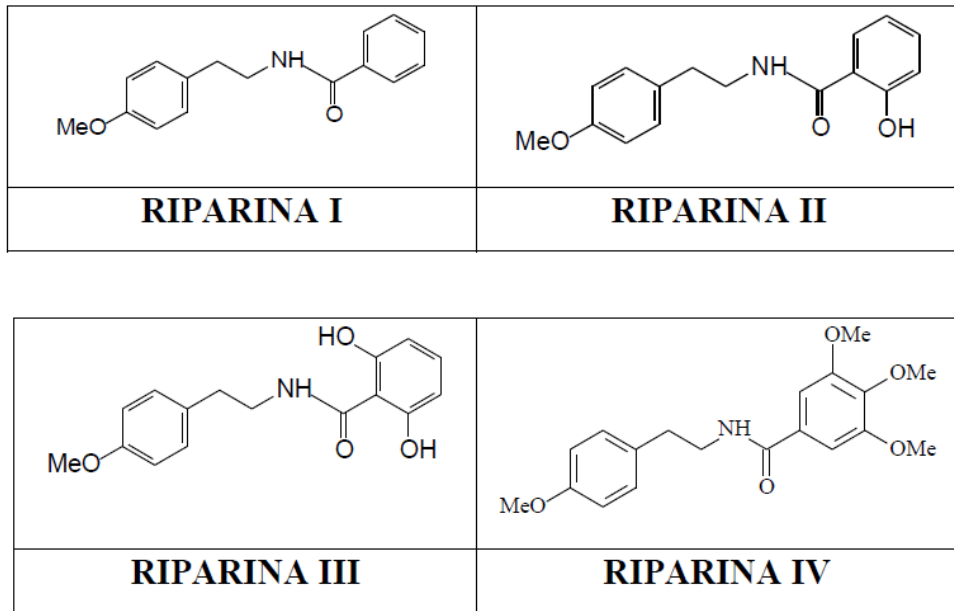
vista biogênico, as alcanidas representam uma classe distinta de produtos naturais que se forma ao serem conjugadas nas diferentes rotas metabólicas, sendo, portanto, metabólitos secundários, cuja estrutura geral se origina da condensação de um ácido graxo insaturado e uma amina, formando assim, uma amida (alcanida) (HOFER *et al.*, 1986).

O grupo funcional amida encontra-se em todos os organismos vivos constituindo as uniões peptídicas, isto é, uma união entre os aminoácidos para a formação da estrutura primária de uma proteína, base funcional da vida. As amidas como produtos naturais, por outro lado, não são tão abundantes. No entanto, as alcanidas são consideradas compostos bioativos, isto é, uma pequena quantidade desses compostos apresenta uma resposta notável nas células receptoras (TORRES; CHAVEZ, 2001).

As alcanidas podem ser formadas a partir de feniletilaminas naturais, como a tiramina e a dopamina, com ácidos orgânicos. A tiramina tem sido freqüentemente encontrada em conjugados formando alcanidas em algumas plantas, como por exemplo, na forma de N-trans-coumaroil-tiramina na espécie *Piper sanctum* (MATA *et al.*, 2004), na forma de N-feruloil-tiramina na *Piper argyrophyllum* (SINGH *et al.*, 1996) e na forma de N-benzoil-tiramina na *Aniba riparia* (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987), além de seus análogos.

A partir do fruto não maduro da planta *Aniba riparia* foram isoladas algumas alcanidas, tais como o éter metílico de N-benzoil-tiramina (riparina I), assim como alguns de seus análogos substituídos, (O-metil)-N-2-hidroxibenzoil-tiramina (riparina II) e (O-metil)-N-2,6-dihidroxibenzoil-tiramina (riparina III), sendo que o principal composto isolado do fruto verde de *Aniba riparia* foi a alcanida riparina III, que representou 34% de todos os componentes extraídos (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987). Essas alcanidas naturais, denominadas riparinas em homenagem a planta (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1997), posteriormente, foram sintetizadas por Barbosa-Filho *et al.* (1990). A riparina IV, por sua vez, é uma substância sintética que possui o mesmo núcleo das riparinas isoladas da *Aniba riparia* (**Figura 2**).

Figura 2 - Estrutura química das riparinas I, II, III e IV



Fonte: CASTELO-BRANCO, 1992.

1.4 Potencial Terapêutico das Alcamidas Naturais de *Aniba riparia*

O uso tradicional da planta *Aniba riparia* (Nees) Mez não se encontra registrado na literatura. No entanto, alguns efeitos biológicos foram demonstrados por estudos farmacológicos recentes realizados tanto com extrato dos frutos e cálices quanto com constituintes isolados, as riparinas I, II e III, e o análogo sintetizado, a riparina IV, conforme descrito a seguir.

No estudo de Marques (2001), o extrato dos frutos e dos cálices persistentes de *Aniba riparia* apresentam efeitos antimicrobianos contra *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Em outro estudo, as riparinas I e III, individualmente, mostraram-se eficazes contra cepas de microorganismos multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (CATÃO *et al.*, 2005).

Além da ação antimicrobiana, as riparinas I e III foram capazes de desencadear um efeito relaxante sobre a musculatura lisa, sendo a III duas vezes mais potente que a I (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000). Em recentes estudos do nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado também o efeito antinociceptivo das riparinas I (ARAÚJO *et al.*, 2012), II (CARVALHO, 2011) e IV (DIAS *et al.*, 2012) em modelos animais.

À nível de Sistema nervoso central (SNC), as riparinas II e III foram capazes de desencadear efeitos ansiolíticos e antidepressivos em modelos animais de ansiedade e depressão (SOUSA *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2011).

1.5 Toxicidade

Estudos de toxicidade aguda evidenciaram que a administração das riparinas I, II e III, por via oral (v.o.), em doses de até 1 g/kg, não causam morte de camundongos dentro de um período de 48h. Da mesma forma as administrações das riparinas I e II por via intraperitoneal (i.p.), em doses semelhantes, também não foram letais. Contudo, a administração de riparina III causa mortes com valor de DL50 de 104,2 mg/kg (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000).

Testes hipocráticos realizados com as três alcamidas indicaram que nas doses de 500 mg/kg essas substâncias não provocam alterações significantes nas funções centrais, autonômicas ou musculares (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000).

1.6 Ansiedade

A ansiedade é uma emoção difusa e desagradável que faz parte da reação de sobrevivência evolutiva de “luta e fuga”, sendo desencadeada em situações de ameaça (KEELEY; STORCH, 2009; STAHL, 2010); o fenômeno é complexo e envolve várias estruturas do encéfalo. Dentre as estruturas envolvidas, a amígdala representa a estrutura chave do fenômeno, visto que a hiperatividade dos circuitos ligados a ela determina o surgimento dos sintomas ansiosos (STAHL, 2010).

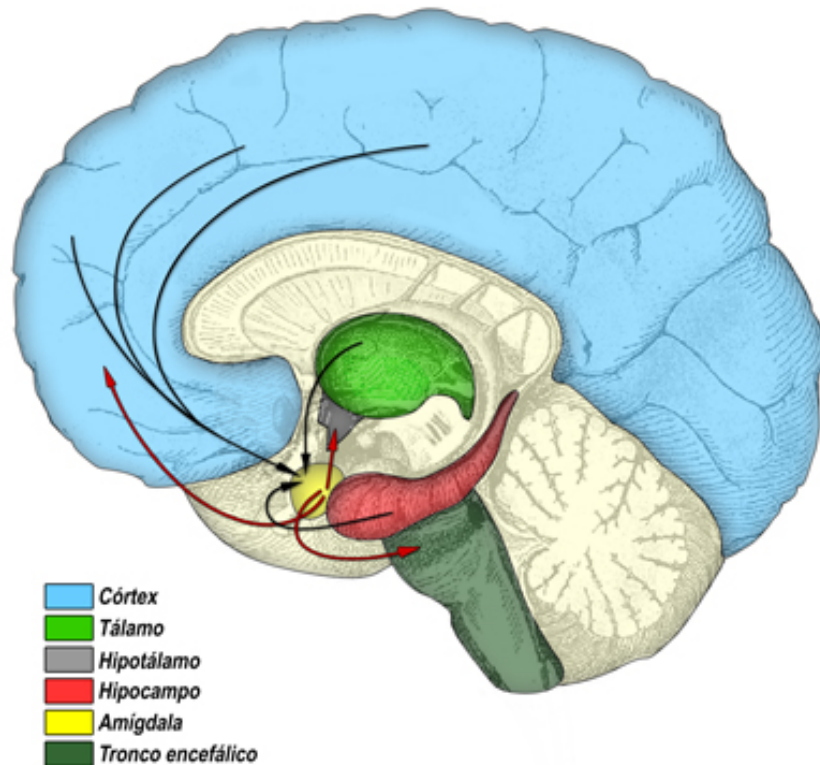
As informações sensoriais chegam à amígdala através de projeções aferentes provenientes do tálamo, córtex e hipocampo, e nela as informações sensoriais são processadas em seus diferentes núcleos, partindo do núcleo lateral para o basolateral até alcançar o núcleo central, sua principal via de saída (BRANDÃO, 2008).

As eferências partem do núcleo central da amígdala em direção a diferentes áreas cerebrais responsáveis pela geração de respostas fisiológicas, comportamentais, autonômicas e hormonais relacionadas à ansiedade (BRANDÃO, 2008) (**Figura 3**). As conexões entre a amígdala, o córtex orbitofrontal e o cíngulo anterior regulam a resposta emocional (sentimento

de medo), enquanto que as conexões entre a amígdala e a área cinzenta periaquedutal do tronco cerebral regulam as respostas motoras associadas ao medo que podem ser de luta, fuga ou congelamento (STAHL, 2010).

As reações endócrinas, por sua vez, (como, por exemplo, a elevação dos níveis de cortisol) são devidas as conexões entre a amígdala e o hipotálamo, enquanto que o aumento da frequência respiratória e as respostas autonômicas (como, por exemplo, o aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial) são mediadas, respectivamente, por conexões entre a amígdala e o núcleo parabraquial no tronco cerebral e entre a amígdala e o *locus coeruleus* (onde se concentram corpos celulares noradrenérgicos). Finalmente, a ansiedade pode ser desencadeada por memórias traumáticas armazenadas no hipocampo e ativadas por suas conexões com a amígdala (STAHL, 2010).

Figura 3 - Circuitos neuronais da ansiedade

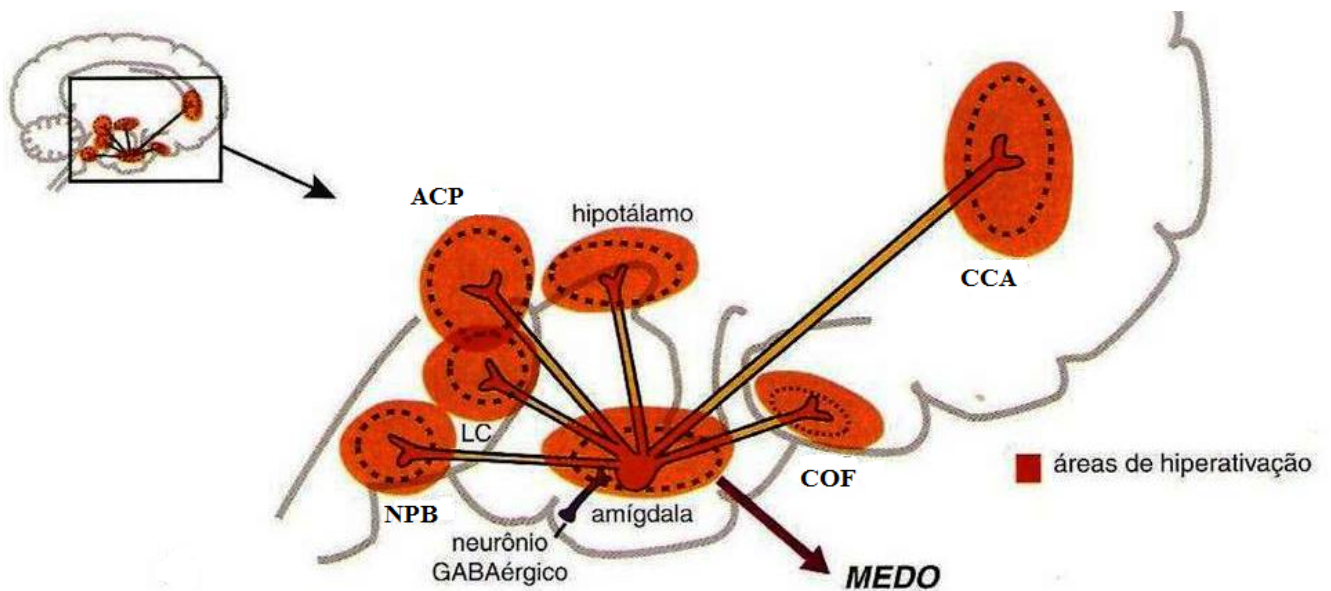


Fonte: http://www.inec-usp.org/cursos/cursoIII/circuitaria_neuronal_ansiedade.htm

Nota: Estímulos aferentes (setas pretas) e eferentes (setas vermelhas) relacionados à amígdalas.

A ativação excessiva dos circuitos ligados à amígdala pode desencadear a ansiedade patológica em várias circunstâncias (BRANDÃO, 2008). Sabe-se que as alterações nesses circuitos têm origem neuroquímica, estando associadas com um estado de excessiva excitabilidade do SNC e/ ou prejuízos dos sistemas GABAérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos, entre outros (CALINE; MENDES, 2011) (**Figura 4**).

Figura 4 - Ansiedade patológica: hiperativação de circuitos ligados à amígdala



Fonte: STAHL, 2010.

Nota: Siglas: CCA: córtex cingulado anterior; COF: córtex orbitofrontal; ACP: área cinzenta pareaquedutal do tronco cerebral; LC: *lócus coeruleus*; NPB: núcleo parabraquial.

As respostas psicológicas, comportamentais e fisiológicas que caracterizam a ansiedade podem assumir muitas formas como, por exemplo, ansiedade generalizada, síndrome do pânico, fobias, distúrbio de estresse pós-traumático e transtorno obsessivo-compulsivo (CALINE; MENDES, 2011). Embora haja critérios diagnósticos diferentes para os diferentes transtornos ansiosos, considera-se que todos tenham sintomas superpostos de ansiedade/medo associados com preocupação. Enquanto a ansiedade e os sintomas de medo (por exemplo, fobias e pânico) são regulados por um circuito centrado na amígdala, a preocupação é regulada por uma alça corticoestriada-talâmica-cortical (CSTC) (STAHL, 2010).

Com relação à epidemiologia dos transtornos ansiosos, o de ansiedade generalizada é o mais comum; seguido de fobias específicas, agorafobia, fobia social, transtorno de estresse pós-traumático e transtorno obsessivo-compulsivo (KONNOPKA *et al.*, 2009). Nos últimos anos, tem sido cada vez mais reconhecida a alta prevalência de pelo menos um transtorno ansioso entre a

população mundial adulta, com uma prevalência estimada ao longo da vida e ao longo de 12 meses de 16,6% e 10,6%, respectivamente (SOMERS *et al.*, 2006).

No tocante ao tratamento, a farmacoterapia combinada à psicoterapia são formas efetivas de controle. No caso de transtornos generalizados de ansiedade, fobia social e síndrome do pânico são amplamente prescritos os benzodiazepínicos com o intuito de suprimir a excitabilidade neuronal em áreas cerebrais chaves (CALINE; MENDES, 2011).

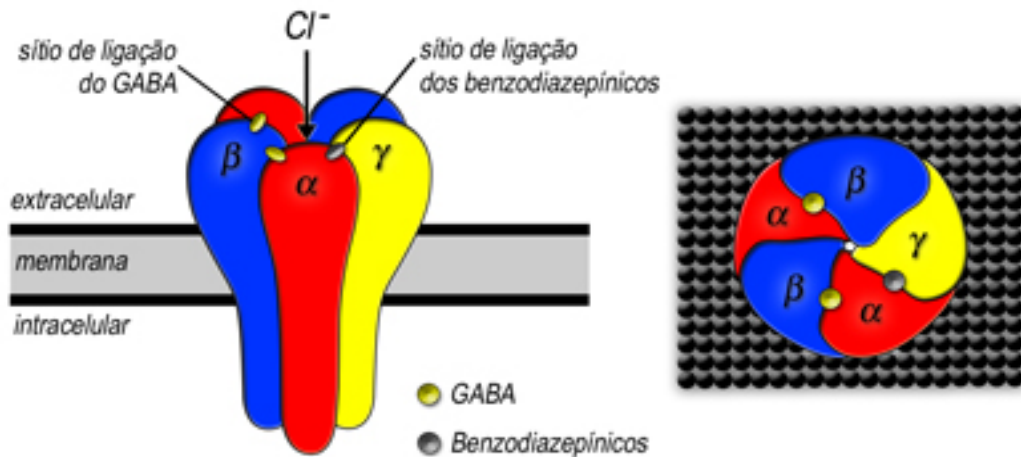
Os benzodiazepínicos são moduladores alostéricos de receptores GABA_A e agem estimulando as ações do ácido γ -aminobutírico (GABA) na amígdala e no córtex pré-frontal nas alças CSTC. O GABA é um dos neurotransmissores-chaves envolvidos na ansiedade e na ação ansiolítica de muitas drogas usadas para tratar o espectro de transtornos ansiosos. É o principal neurotransmissor inibitório no SNC de vertebrados tendo sua ação mediada pelos receptores GABA_A, GABA_B e GABA_C (STAHL, 2010).

Os receptores GABA_A são canais iônicos sensíveis a ligantes, com estrutura pentamérica em cujo centro há um canal de cloreto. Tipos diferentes de isoformas (subunidades) (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , ρ_{1-3} , θ , ε , π , δ_{1-3}) podem se combinar para formar um receptor deste tipo, portanto há muitos subtipos diferentes de receptor GABA_A, dependendo das subunidades presentes (ALLEN *et al.*, 2009).

A atividade do receptor GABA_A é mediada por um grande número de ligantes químicos, que atuam em diferentes sítios do receptor (GALOFRÉ *et al.*, 2009). Sabe-se que os receptores GABA_A sensíveis aos benzodiazepínicos devem apresentar duas subunidades β e a subunidade γ_2 ou γ_3 , e duas unidades α , do subtipo α_1 , α_2 ou α_3 e têm localização pós-sináptica (STAHL, 2010).

Após ligar-se à região entre as subunidade $\gamma_{2/3}$ e $\alpha_{1/2/3}$, os benzodiazepínicos aumentam a afinidade entre o GABA e seu receptor e medeiam um tipo de inibição no neurônio pós-sináptico que é fásica, ocorrendo em surtos de inibição desencadeados por concentrações máximas de GABA liberado na sinapse. Supostamente a combinação de benzodiazepínicos e GABA aumenta a frequência de abertura dos canais de cloro inibitórios (STAHL, 2010) (**Figura 5**).

Figura 5 - Receptor GABA_A



Fonte: http://www.inec-usp.org/cursos/cursoIII/circuitaria_neuronial_ansiedade.htm.

Conforme dito anteriormente, nem todos os receptores do tipo GABA_A são iguais. Aqueles sensíveis aos benzodiazepínicos com subunidades α_1 são mais importantes para a regulação do sono e são alvos de drogas hipnótico-sedativas. Por outro lado, os com subunidades α_2 e/ou α_3 parecem ser os mais importantes para a regulação da ansiedade e são os alvos presumíveis dos ansiolíticos benzodiazepínicos. Os benzodiazepínicos disponíveis atualmente, porém, não são seletivos para receptores GABA_A com subunidades diferentes. Há, no entanto, pesquisa contínua de drogas seletivas $\alpha_{2/3}$ que podem ser utilizadas no tratamento de transtornos de ansiedade em seres humanos. Essas drogas seriam teoricamente ansiolíticas sem ser sedativas. Os agonistas parciais seletivos para subunidades $\alpha_{2/3}$ causariam, hipoteticamente, menos euforia, menos reforço e seriam menos passíveis de abuso, causariam menos dependência e menos problemas quanto a interrupção (STAHL, 2010).

1.7 Depressão

A depressão é uma doença de curso crônico e recorrente, debilitante e que apresenta uma alta incidência e prevalência (GALDINO *et al.*, 2009). Parece ser mais prevalente entre mulheres, pessoas com baixa escolaridade e economicamente desfavorecidas, e tende a se manifestar inicialmente entre os 20 e 40 anos, embora também seja possível a ocorrência de depressão na infância (MARTIN *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 1999).

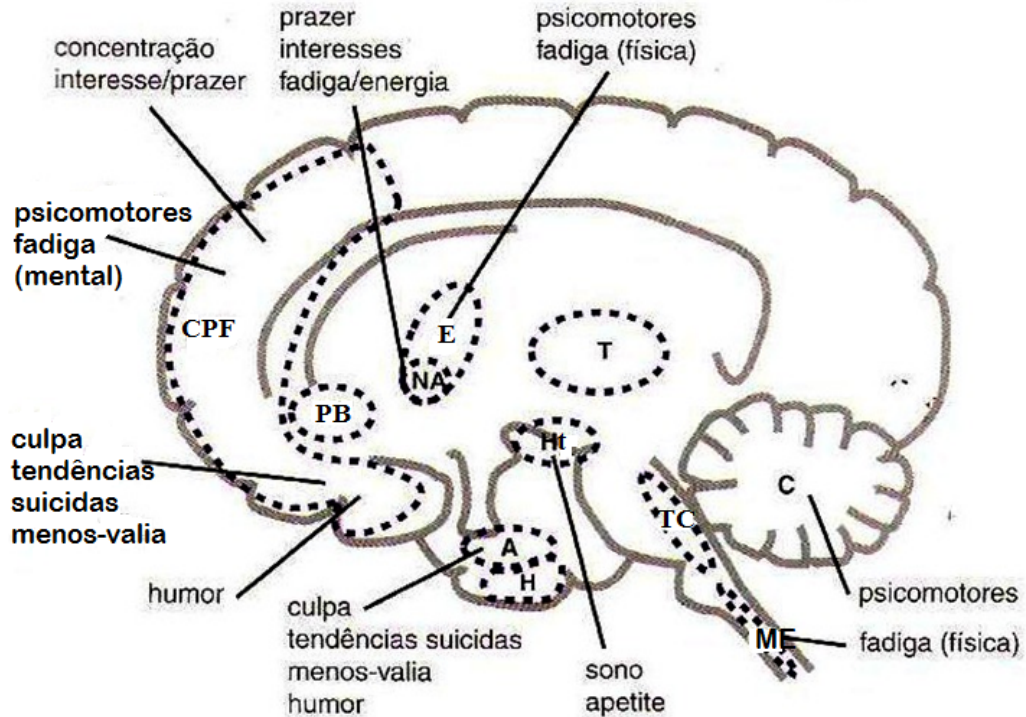
Segundo a Organização Mundial de Saúde houve um aumento vertiginoso dos casos da doença a partir da segunda metade do século XIX. Estima-se que há no mundo aproximadamente 121 milhões de portadores do transtorno com perspectivas de incremento deste quantitativo nos próximos 20 anos (OMS, 2011).

Os sintomas depressivos podem incluir humor deprimido, apatia, alterações do apetite, distúrbios do sono, agitação ou retardo psicomotor, fadiga, culpa, baixa auto-estima, disfunção executiva e ideação suicida (STAHL, 2010).

A delimitação dos sintomas dentro de um espaço de tempo forma os critérios diagnósticos necessários para a classificação do transtorno depressivo em transtorno depressivo maior, transtorno depressivo menor, distímia ou depressão induzida por substância ou devida a uma condição clínica (DSM-IV, 1994).

Ainda com relação aos sintomas depressivos, considera-se que cada um deles está associado hipoteticamente à deficiência do processamento de informações em circuitos cerebrais específicos (**Figura 6**). O circuito do humor deprimido, por exemplo, envolve uma transmissão monoaminérgica deficiente à nível de amígdala e córtex pré-frontal ventromedial, enquanto que o circuito da baixa auto-estima envolve as mesmas áreas cerebrais, mas está associado principalmente a uma transmissão serotoninérgica deficiente (STAHL, 2010).

Figura 6 - Correspondência entre sintomas depressivos e circuitos



Fonte: STAHL, 2010.

Nota: Siglas: CPF: córtex pré-frontal; PB: prosocéfalo basal; E: estriado; NA: *nucleus accumbens*; T: tálamo; HP: hipotálamo; H: hipocampo; A: amígdala, ME: medula espinhal e C: cerebelo.

Nos últimos anos, muito esforço foi direcionado para melhorar o entendimento sobre a fisiopatologia da doença. Até o momento, tem-se convicção da participação de fatores biológicos, psicológicos e sociais no desencadeamento da doença (ANSSEAU *et al.*, 2009).

Devido à heterogeneidade clínica e etiológica dos transtornos depressivos, tem sido difícil elucidar por completo a fisiopatologia da depressão. As teorias disponíveis são baseadas em estudos que investigam o estresse psicossocial e os hormônios do estresse, os neurotransmissores (serotonina, noradrenalina, dopamina, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA)), os neurocircuitos, os fatores neurotróficos e o ritmo circadiano (HASLER, 2010).

Considera-se que as teorias da depressão se aplicam aparentemente a apenas alguns tipos de pacientes deprimidos, mas não a outros, e, além disso, tem-se observado que a fisiopatologia

depressiva pode variar consideravelmente em todo o curso da doença. Diante dessas evidências, defende-se que não há uma hipótese unificada que explique todos os casos de depressão. Como consequência, os tratamentos antidepressivos, incluindo abordagens psicológicas e biológicas, devem ser adaptados de acordo com o indivíduo e o estado de doença (HASLER, 2010).

Dentre as teorias sobre a etiologia biológica da depressão, a teoria clássica propõe a hipótese de que a doença se deve à deficiência dos neurotransmissores monoamínicos: noradrenalina (NA), dopamina (DA) e serotonina (5-HT). Segundo esse pensamento, o sistema neurotransmissor trimonoaminérgico pode estar disfuncional em diversos circuitos cerebrais, com diferentes neurotransmissores envolvidos, dependendo do perfil de sintomas do paciente, podendo provavelmente ser secundária a um evento primário (STAHL, 2010; HASLER, 2010).

As evidências diretas da hipótese monoaminérgica ainda são insuficientes. Mas alguns estudos apresentam como resultado de investigação baixos níveis de metabólitos monoaminérgicos no liquor cefalorraquidiano de pacientes deprimidos. Estes achados estão em conformidade com a observação da efetividade clínica dos antidepressivos que agem aumentando a sinalização monoaminérgica (NUTT, 2002; LEONARD, 2000).

A teoria clássica foi levada a um passo adiante quando formularam a hipótese dos receptores monoaminérgicos. Esta hipótese sugere que a depleção dos neurotransmissores verificada nos pacientes deprimidos seria responsável por uma supra-regulação compensatória dos receptores pós-sinápticos. As evidências diretas disso ainda são escassas, mas estudos *post mortem* mostraram consistentemente o aumento no número de receptores de serotonina no córtex pré-frontal de pacientes que cometem suicídio e, além disso, estudos de neuroimagem identificaram anormalidades nos receptores de serotonina em pacientes deprimidos (STAHL, 2010).

Todos os antidepressivos eficazes reforçam a ação sináptica de uma ou mais monoaminas (NA, DA, 5-HT) e, dessa forma, reverterem, teoricamente, a supra-regulação compensatória dos receptores ao longo do tempo. Esse fenômeno é mediado provavelmente pelo processo de sub-regulação de genes relacionados com a síntese dos receptores. Vale destacar ainda que as alterações na expressão gênica também podem incluir o aumento de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), importantes reguladores da sobrevivência, desenvolvimento, função e plasticidade neuronal (STAHL, 2010). Diante desse fato, faremos uma breve revisão da influência dos receptores no processo terapêutico focalizando as vias de sinalização, localização e farmacologia dos diferentes subtipos de receptores.

1.7.1 Receptores Monoaminérgicos

Os neurônios noradrenérgicos são regulados por uma multiplicidade de receptores classificados como $\alpha_{1A/B/C}$, $\alpha_{2A/B/C}$, β_1 , β_2 , β_3 . Todos eles podem ser pós-sinápticos, mas somente os receptores α_2 tem localização pré-sináptica e agem como autorreceptores, ou seja, reconhecem a NA e desativam sua liberação adicional (STAHL, 2010).

Os adrenoceptores α_1 e α_2 (**Quadro 1**) parecem estar envolvidos com a geração de respostas antidepressivas à drogas (KASTER *et al.*, 2007). A administração crônica de antidepressivos e a electroconvulsoterapia aumentam a densidade e atividade funcional de adrenoceptores α_1 em estruturas cerebrais de indivíduos deprimidos, tais como o córtex pré-frontal e hipocampo (STONE *et al.*, 2003). Além disso, o tratamento crônico com antidepressivos causa uma regulação gradual e para baixo no número de autoreceptores α_2 , o que parece ser de extrema importância terapêutica, tendo em vista que o número destes receptores estão elevados tanto nos pacientes deprimidos quanto naqueles estressados (FLÜGGE *et al.*, 2003).

Quadro 1 - Vias de sinalização, localização e farmacologia de subtipos de receptor NA

Receptor	Via de sinalização principal	Localização neuronal	Localização regional
α_1	\uparrow IP ₃ e DAG	Pós-sináptico	Córtex frontal, <i>Locus coeruleus</i> , hipocampo.
α_2	AMPC \downarrow	Pré-sináptico/ Pós-sináptico	Córtex frontal, <i>Locus coeruleus</i> , amígdala, hipocampo, hipotálamo.

Fonte: Adaptado de <http://www.acnp.org/g4/GN401000034/CH034.html>.

Nota: AMPC - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico ; IP₃ – trifosfato de inositol; DAG - D-1,2-Diacilglicerol.

Drogas que antagonizem os receptores do tipo α_2 nos neurônios noradrenérgico e serotoninérgico (por exemplo, mirtazapina, risperidona), aumentam a liberação de NA e 5-HT, respectivamente, intensificando essas transmissões (STAHL, 2010).

Com relação à via serotoninérgica, estudos em modelos animais de depressão oferecem pistas da participação de seus receptores no processo terapêutico. Efeitos antidepressivos semelhantes aos produzidos pela administração de Inibidores Seletivos da Recaptação de

serotonina (ISRS) têm sido mediado por agonistas dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₄ e 5-HT₆, e antagonistas de 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₆, e 5-HT₇ em roedores (GREGORY; LUCKI, 2011). Informações sobre os diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos estão dispostas no **Quadro 2**.

Quadro 2 - Vias de sinalização, localização e farmacologia de subtipos de receptor 5-HT

Receptor	Via de sinalização principal	Localização neuronal	Localização regional
5-HT _{1A}	AMPC↓	Autorreceptor somático/pós-sináptico	Núcleo da rafe / hipocampo, córtex
5-HT _{1B}	AMPC↓	Autorreceptor terminal/pós-sináptico	Striatum, <i>nucleus accumbens</i> , área tegmental ventral
5-HT _{2A}	IP ₃	Pós-sináptico	Córtex frontal
5-HT _{2C}	IP ₃	Pós-sináptico	Córtex frontal
5-HT ₃	Canal iônico	Pós-sináptico	Córtex, amígdala
5-HT ₄	AMPC↑	Pós-sináptico	Striatum, <i>nucleus accumbens</i> , córtex
5-HT ₆	AMPC↑	Pós-sináptico	Hipocampo, córtex
5-HT ₇	AMPC↑	Pós-sináptico	Núcleo supraquiasmático, córtex

Fonte: CARR; LUCKI, 2011.

Nota: AMPC - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico ; IP₃ – trifosfato de inositol.

Partindo do conhecimento de que a NA regula os neurônios serotoninérgicos e, reciprocamente, a 5-HT também regula os neurônios noradrenérgicos, podemos entender as consequências terapêuticas de moduladores destas vias. A mirtazapina, por exemplo, é um antidepressivo muito efetivo cujas ações terapêuticas são mediadas por suas propriedades antagonistas de α_2 e de 5-HT_{2C}. Ao causar desinibição da liberação de serotonina, pelo primeiro mecanismo (antagonismo de α_2), a droga estimula principalmente receptores 5-HT_{1A}, haja vista a ação antagonista potente da mirtazapina sobre outros receptores serotoninérgicos (5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} e 5-HT₃). A estimulação de 5-HT_{1A}, por sua vez, acarreta liberação de dopamina, e isso seria, teoricamente,

útil para a depressão e a cognição. Pelo segundo mecanismo de ação (antagonismo de 5-HT_{2C}), a droga causa a desinibição de noradrenalina e serotonina no córtex pré-frontal (STAHL, 2010).

Quanto a terapêutica com outras classes de drogas, tem-se demonstrado em estudos recentes que antipsicóticos atípicos podem atuar como adjuvantes no tratamento da depressão. A olanzapina (antagonista 5-HT_{2A}) combinada com a fluoxetina melhoram significativamente sintomas depressivos em comparação a pacientes tratados apenas com olanzapina ou fluoxetina (TRIVEDI et al. 2009).

Os receptores dopaminérgicos (D₁, D₂, D₃, D₄ e D₅) estão distribuídos em duas classes diferentes, denominadas D₁-símile e D₂-símile, que foram originalmente distinguidas por sua capacidade de ativar (D₁-símile) ou inibir (D₂-símile) a adenilato ciclase (**Quadro 3**).

Quadro 3 - Receptores dopaminérgicos.

Distribuição	Papel Funcional	Tipo D ₁		Tipo D ₂		
		D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
Córtex	Reatividade, Humor	+++	-	++	-	+
Sistema límbico	Emoção, Comportamento Estereotipado	+++	+	++	+	
Estriado	Controle motor	+++	+	++	+	+
Hipotálamo ventral e adeno- hipófise	Secreção de prolactina	-	-	++	+	-
Transdução de sinais		↑AMPc	↑AMPc	↓AMPc e/ou ↑IP ₃	↓AMPc e/ou ↑IP ₃	↓AMPc e/ou ↑IP ₃
Efeito		Inibição pós- sináptica	Inibição pós- sináptica	Inibição pré- e pós- sináptica	Inibição pré- e pós- sináptica	Inibição pré- e pós- sináptica
				Ativação/ inibição da secreção de hormônios	Ativação/ inibição da secreção de hormônios	Ativação/ inibição da secreção de hormônios

Fonte: Rang et al., 2003.

Nota: AMPc - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico ; IP₃ – trifosfato de inositol.

Os receptores D₂ desempenham um papel importante na regulação da transmissão DA (KEBABIAN; CALNE, 1979). Vários estudos clínicos têm demonstrado a eficácia terapêutica de antagonistas de D₂ (sulpirida e raclopride) nos diferentes tipos de depressão. De fato, tem-se sugerido que a administração de sulpirida em baixas doses (100-300 mg/dia) pode ser eficaz em pacientes com depressão leve, incluindo aqueles que sofrem de depressão endógena (NISKANEN *et al.*, 1975; BENKER; HOLSBOER, 1984). O mecanismo de ação antidepressiva da sulpirida parece envolver o bloqueio do sistema dopaminérgico, mais especificamente, o bloqueio de receptores pré-sinápticos dopaminérgicos do tipo D₂/D₃ e uma possível sensibilização de receptores D₁ e D₂ na área mesolímbica (TSUKAMOTO *et al.*, 1994). Esta área tem provável participação no desenvolvimento do comportamento motivacional, haja visto que a hipofunção do sistema dopaminérgico mesolímbico pode mediar a anedonia e a apatia, dois sintomas depressivos (WILLNER, 1995).

Ainda com relação à sulpirida, se administrada em doses mais altas, perde a especificidade para os receptores pré-sinápticos e passa a bloquear também os receptores D₂/D₃ pós-sinápticos, causando assim depressão (WILLNER, 2002).

Com relação à participação dos receptores D₁ nos transtornos afetivos, esta tem sido demonstrada pela administração do antagonista seletivo de D₁ (SCH23390). Estudos mostram que após a administração deste antagonista em camundongos, foi impossível observar efeito antidepressivo da bupropiona no teste do nado forçado (YAMADA *et al.*, 2004).

O aripiprazol é um agente antipsicótico testado na terapia da depressão. Este fármaco tem um mecanismo de ação complexo: atua como um agonista parcial D₂, agonista do receptor 5-HT_{1A} e antagonista 5-HT_{2A}. Parece um agente promissor para o tratamento da depressão, por duas razões. Em primeiro lugar, o tratamento de curto e longo prazo com este composto aumenta a neurotransmissão serotoninérgica por aumentar a descarga espontânea de neurônios 5-HT devido a uma dessensibilização inicial de autoreceptores 5-HT_{1A} (CHERNOLOZ *et al.*, 2009). Em segundo lugar, uma série de estudos tem relatado que agonistas parciais dos receptores

D₂ são adjuvantes eficazes no tratamento de pacientes resistentes (CASSANO *et al.*, 2004; GOLDBERG *et al.*, 2004) e potencializam o efeito do ISRS (SHEFFRIN *et al.*, 2009). Tem sido demonstrado que o aripiprazol é bem tolerado e eficaz para melhorar as taxas de resposta de pacientes com transtorno depressivo maior que mostram uma resposta incompleta à terapia com antidepressivos (BERMAN *et al.*, 2007).

1.8 Epilepsia e convulsão

A epilepsia é um distúrbio neurológico crônico caracterizado por crises que assumem várias formas e decorrem de descargas neuronais recorrentes e imprevisíveis. O tipo da crise depende da área afetada e varia de um breve lapso de atenção a uma convulsão completa com duração de alguns minutos, bem como sensações ou comportamentos estranhos (RANG; DALE, 2007).

Os sintomas especiais produzidos dependem da função cerebral afetada. As convulsões, por exemplo, estão relacionadas ao envolvimento do córtex motor, enquanto que as descarga autônoma periférica e à perda de consciência estão associadas com uma disfunção à nível de hipotálamo e formação reticulada na parte alta do tronco encefálico, respectivamente (RANG; DALE, 2007).

A epilepsia é a condição neurológica mais comum que afeta pessoas de todas as idades, raças e classes sociais. Há uma estimativa de que existam cerca de 50 milhões de pessoas com epilepsia no mundo, das quais até 75% vivem em países com poucos recursos, acesso precário aos serviços médicos e ao tratamento (MEINARDI *et al.*, 2001; NGUGI *et al.*, 2010).

Em geral, a incidência da epilepsia nos países desenvolvidos é de 50 casos por 100.000 habitantes (uma média de 40-70 para cada 100.000 / ano) , enquanto a incidência da epilepsia em países pobres é geralmente mais elevada, em média de 100-190 casos por 100.000 / ano (SANDER *et al.*, 2003; HEANEY *et al.*, 2008). Fatores socioeconômicos podem contribuir para essa disparidade ao expor os indivíduos à doenças desencadeadoras de epilepsia tais como parasitoses, particularmente neurocisticercose, HIV, trauma, morbidade perinatal e consanguinidade (WHO, 2005).

Conforme percebemos, vários fatores podem desencadear convulsões, desde infecções, neoplasias, traumas e até hereditariedade. A farmacoterapia é o principal tratamento para a epilepsia, sendo sua abordagem voltada para o controle das crises. Embora exista um arsenal de drogas antiepilépticas disponíveis (fenitoína, carbamazepina, gabapentina e pregabalina, por exemplo), cerca de 20-25% dos pacientes com epilepsia não consegue obter um controle satisfatório das crises com esses fármacos, devido aos efeitos colaterais significativos e a farmacoresistência (LAZAROWSKI *et al.*, 2004).

Novos fármacos anticonvulsivantes estão sendo pesquisados. Um estudo recente destaca o potencial anticonvulsivante de plantas empregadas na medicina popular ou mesmo na medicina tradicional, que poderiam ser mais bem estudadas pela comunidade científica (QUINTANS-JUNIOR *et al.*, 2008). Algumas espécies de plantas testadas em modelos experimentais tem apresentado resultados promissores, como a *Lippia alba* (ZÉTOLA *et al.*, 2002).

A pesquisa em epilepsia tem focado largamente os compostos que agem através de um dos três mecanismos a seguir: aumento de transmissões inibitória GABAérgica e/ou adenosinérgica, diminuição da transmissão excitatória glutamatérgica ou modificação das condutâncias iônicas de Ca^+ , Na^+ e K^+ (PORTER; MELDRUM, 2007).

RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

As Riparinas I, II e III são produtos naturais cuja estrutura química mostrou-se interessante para que testes neurocomportamentais fossem iniciados. O interesse advém do fato de essas substâncias apresentarem em sua estrutura química uma molécula com reconhecida atividade central, a tiramina, o que aponta para uma possível ação central das Riparinas.

Em estudos anteriores realizados no laboratório de Neuropsicofarmacologia da UFC, as Riparinas II e III, separadamente, foram testadas em camundongos machos quanto aos possíveis efeitos centrais. A partir da análise comportamental e neuroquímica dos resultados, foi sugerido que tais substâncias desencadeiam alterações sugestivas de atividades ansiolítica e antidepressiva, tendo

sido detectada, respectivamente, a possível participação dos sistemas gabaérgico e monoaminérgico nesses efeitos (SOUSA et al., 2004; MELO *et al.*, 2011; SOUSA et al., 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Devido à comprovada atividade central das Riparinas II e III em modelos animais, e sendo a Riparina I um análogo estrutural dessas substâncias, tornou-se interessante a investigação do seu potencial farmacológico em modelos comportamentais clássicos de ansiedade, depressão, sono e convulsão, bem como o estudo dos possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos.

A relevância do presente estudo é contribuir com as buscas por melhores alternativas terapêuticas para os tratamentos da ansiedade, da depressão e da convulsão, a fim de assegurar a qualidade de vida e a adesão farmacológico de pacientes, tendo em vista as limitações da terapêutica atual que se configuram em demora terapêutica, efeitos adversos, recidiva e, até mesmo, resistência farmacológica, em alguns casos.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar as ações centrais da riparina I, isolada da *Aniba riparia* (Nees) Mez, através da análise comportamental de camundongos expostos à modelos padronizados de ansiedade, depressão, indução do sono e convulsão.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar possíveis alterações na atividade motora e possível efeito relaxante muscular utilizando os testes do campo aberto e do *rota rod*, respectivamente;
- Verificar a atividade da riparina I em modelos de ansiedade utilizando os testes labirinto em cruz elevado e placa perfurada;
- Investigar a possível participação dos receptores GABA_A/Benzodiazepínicos no mecanismo de ação ansiolítico da riparina I, caso este seja demonstrado;
- Determinar a ação da riparina I em modelos comportamentais de depressão utilizando os testes da suspensão da cauda e do nado forçado;
- Investigar a possível participação do sistema monoaminérgico no mecanismo de ação antidepressivo da riparina I, caso este seja demonstrado;

Avaliar a atividade sedativa/hipnótica da riparina I no modelo de tempo de sono induzido por pentobarbital;

- Avaliar a atividade anticonvulsivante da riparina I no modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol (PTZ);

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material Botânico

A planta *Aniba riparia* (Nees) Mez foi identificada pelo botânico Klaus Kubitzki da Universidade de Hamburgo/Alemanha (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987). As frutas verdes de *Aniba riparia* (material botânico) foram coletadas por Dr. Hipólito F. Paulino-Filho (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”) na região de Humaitá, estado do Amazonas, Brasil (BARBOSA-FILHO *et al.* 1987). O material (frutas verdes) foi cedido ao Prof. Dr. José Maria Barbosa-Filho do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba.

A extração e isolamento foram feitos por Stanley Juan Chavez Gutierrez, Prof. da Universidade Federal do Piauí, conforme descrito abaixo sob a orientação e supervisão do Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho que gentilmente nos cedeu a substância isolada.

4.2 Extração e Isolamento da riparina I

As frutas verdes (5 kg) foram moídas e extraídas em etanol (temperatura ambiente). A solução foi então filtrada e o filtrado foi evaporado. O resíduo (380 g) foi redissolvido numa solução aquosa de etanol 60%. A solução foi extraída primeiro com hexano e depois com clorofórmio (CHCl_3). Os solventes foram evaporados e o extrato hexânico (88 g) foi cristalizado com metanol dando triglicerídeos (79 g). A água mãe foi evaporada e o resíduo foi submetido a cromatografia (sílica gel). A eluição com solvente de polaridade crescente deu na ordem benzilbenzoatos (1 g) e sitosterol (75 mg). O extrato de CHCl_3 (59 g) foi cristalizado com benzeno (C_6H_6) dando riparina III (17 g). A água mãe foi evaporada e o resíduo tratado da mesma maneira deu na ordem riparina III (3 g), riparina I (305 mg) e riparina II (427 mg), entre outros compostos (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987).

A seguir, estão listados nos quadros 4 e 5 as outras substâncias utilizadas nos estudos comportamentais além da riparina I, bem como os equipamentos disponibilizados, respectivamente.

Quadro 4 - Drogas e Reagentes

Drogas/Reagentes	Origem
Álcool etílico P.A.	Quimex, Brasil
Bupropiona	Zyban®, Glaxo-Wellcome
Diazepam	União Química Brasil
Flumazenil	Sigma
Imipramina	Imipra®, Cristália
Pentilenotetrazol	Sigma
Pentobarbital	Abbot
SCH 23390	Sigma
Sulpirida	Equilid®, Aventis Pharma
Ioimbina	Sigma
Prazosina	Sigma
PCPA	Sigma
Ritanserina	Sigma
WAY 100625	Sigma
Ondansetron	Sigma
Tween 80 – Polyoxyethylene Sorbitan Mono-oleate	Sigma

Quadro 5 – Equipamentos

Equipamentos	Origem

Balança Analítica	Modelo H5, Mettler, Suíça
Balança para animais	Filizola, Brasil
Campo Aberto	
Cronômetro	Incoterm, Brasil
Deionizador	USF, Elga, USA
Equipamento da Placa Perfurada	Ugo Basile, Italy
Equipamento do <i>Rota Rod</i>	Ugo Basile, Italy
Labirinto em cruz elevado	
Pipetas Automáticas	H.E., Dinamarca
Cubas de acrílico para o Nado Forçado	
Sonicador	Modelo PT 10-35. Brinkmann Instruments Inc., USA
Vidriarias	Pirex, Brasil

4.2 Animais

Em todos os experimentos foram utilizados camundongos albinos da espécie *Mus musculus* da variedade *Swiss*, adultos, do sexo masculino, pesando entre 20-25 g (n= 8 ou 10, por grupo), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas de propileno em uma sala com a temperatura de 25 ± 1 °C e submetidos ao ciclo claro/escuro de 12 em 12 h onde receberam ração do tipo Purina e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) desta universidade, sendo 14/2012 o número do referido protocolo.

4.4 Preparo das drogas

A riparina I foi dissolvida em Tween 80 a 3% e diluída em água destilada, obtendo-se a concentração final de 2,5 e 5,0 mg/mL para ser administrada nas doses 25 e 50 mg/kg, respectivamente. Os grupos controles receberam veículo (água destilada emulsificada a 3% com Tween 80). As demais drogas utilizadas nos experimentos foram dissolvidas e diluídas diretamente em água destilada.

4.5 Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram tratados agudamente com riparina I nas doses de 25 e 50 mg/kg através das vias oral (v.o.) e intraperitoneal (i.p.), e submetidos aos testes comportamentais 30 ou 60 minutos (min) depois das administrações i.p. ou v.o, respectivamente. As drogas utilizadas como padrões positivos durante a avaliação da atividade antidepressiva foram: imipramina 10 ou 30 mg/kg, i.p., bupropiona 30 mg/kg, i.p., fluoxetina 35 mg/kg, i.p nos teste da suspensão da cauda ou do nado forçado. Como referência ansiolítica foi utilizado diazepam 1 mg/kg, i.p., nos testes do labirinto em cruz elevado e placa perfurada, e, diazepam 2 mg/kg, i.p., no campo aberto e no *rota rod*, como padrão positivo para atividade sedativa e relaxante muscular, respectivamente. O diazepam 1 mg/kg, i.p., foi utilizado ainda nos modelos de tempo de sono induzido por pentobarbital e convulsão induzida por pentilenotetrazol como padrão positivo para atividade sedativa/hipnótica e anticonvulsivante, respectivamente.

4.6 Protocolo Experimental

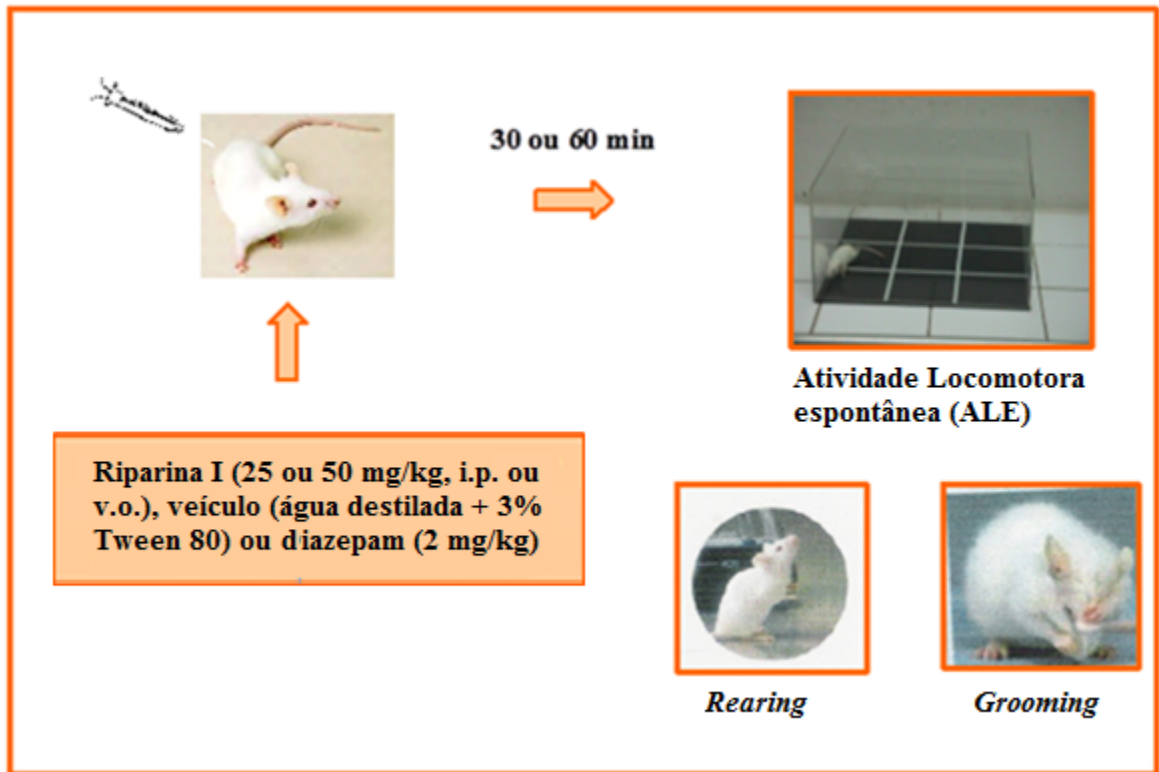
Os experimentos foram realizados durante o período da manhã e os animais foram observados em um ambiente fechado, silencioso e à temperatura constante de aproximadamente $24 \pm 1^\circ \text{C}$. Para os testes do campo aberto e do labirinto em cruz elevado foi utilizado iluminação de baixa densidade (lâmpada vermelha de 15 W) para reduzir a influência ambiental no comportamento exploratório. Os demais experimentos foram realizados com iluminação normal. Todos os testes comportamentais foram realizados com diferentes grupos de animais e em dias distintos. Em todos os testes, com exceção apenas do nado forçado e da suspensão da cauda, após a observação de cada animal, foi utilizado álcool 10% (v/v) para a remoção de resíduos e odor do animal do aparato, após a observação de cada animal.

4.7 Avaliação da Atividade Ansiolítica

4.7.1 Teste do Campo Aberto

Este teste foi realizado para avaliar a atividade exploratória do animal (ARCHER, 1973). O aparato para camundongos é feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em 9 quadrantes iguais. Após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente, os animais, um por vez, foram colocados no centro do campo aberto onde foram registrados o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea; ALE), número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*), sem se encostar nas paredes, durante um tempo de 5 minutos.

QUADRO 6 - Esquema do Teste do Campo Aberto

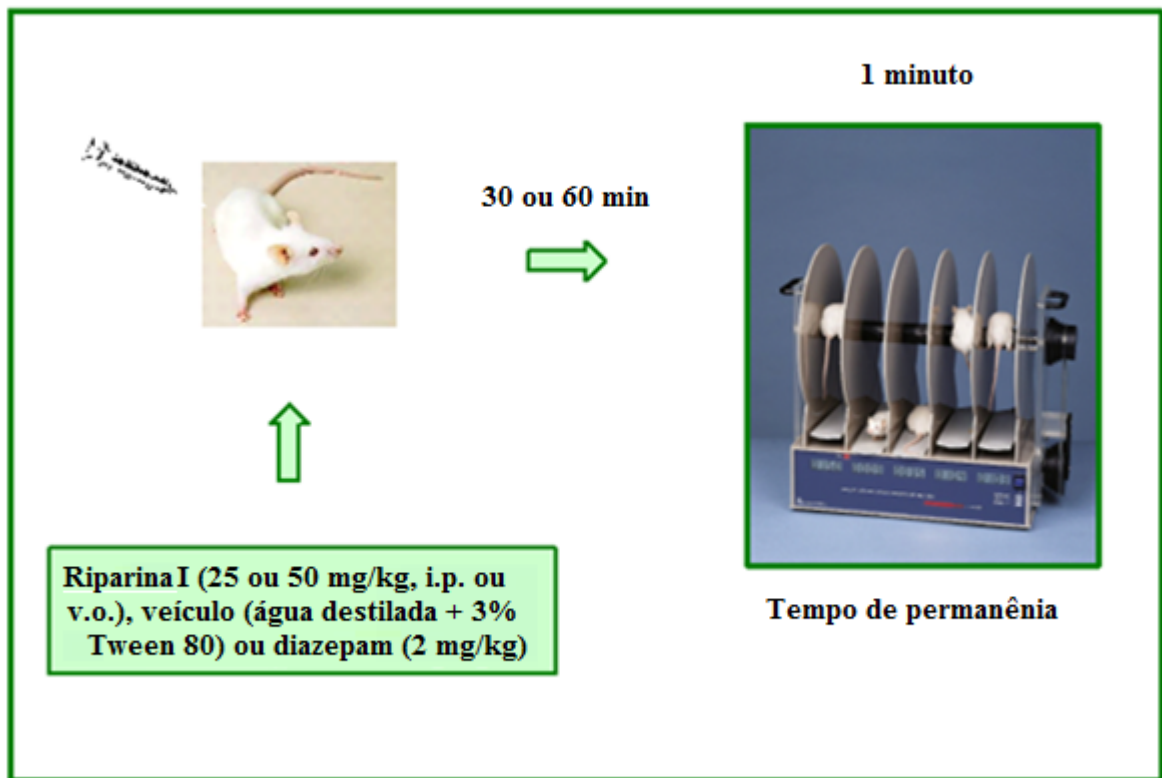


Fonte: adaptado de Melo, 2006.

4.7.2 Teste da Barra Giratória (*Rota Rod*)

O teste do *rota rod* avalia o efeito de relaxamento muscular ou incoordenação motora produzidos por drogas em animais (CARLINI; BURGOS, 1979). Para este teste, os camundongos foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 12 rpm, por um período de 1 minuto. Foi registrado o tempo de permanência na barra giratória, em segundos (s) (DUNHAM; MIYA, 1957).

QUADRO 7 - Esquema do Teste do *Rota Rod*



Fonte: adaptado de Melo, 2006.

4.7.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (*Plus maze*)

O método do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), proposto por Lister e colaboradores (1971), nos permite inferir sobre o potencial efeito ansiolítico ou ansiogênico de uma substância. O LCE consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão. Após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente, os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por 5 minutos. As medidas comportamentais registradas durante o experimento foram: número de entradas e o tempo despendido em ambos os braços, abertos e fechados.

Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, são considerados apenas os parâmetros relacionados aos braços abertos. Para isso, a percentagem de entradas nos braços abertos é calculada dividindo-se o número (frequência) de entradas nos braços abertos pelo número (frequência) total de entradas (obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e nos fechados). Esse índice obtido é multiplicado por 100. De maneira semelhante, é calculada a percentagem do tempo em que os animais permanecem nos braços abertos (**Quadro 8**).

Dessa forma, os parâmetros levados em consideração para análise estatística são:

- Número de entradas nos braços abertos (NEBA);
- Número de entradas nos braços fechados (NEBF);
- Tempo de permanência nos braços abertos (TPBA);
- Tempo de permanência nos braços fechados (TPBF);
- Percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA);
- Percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA).

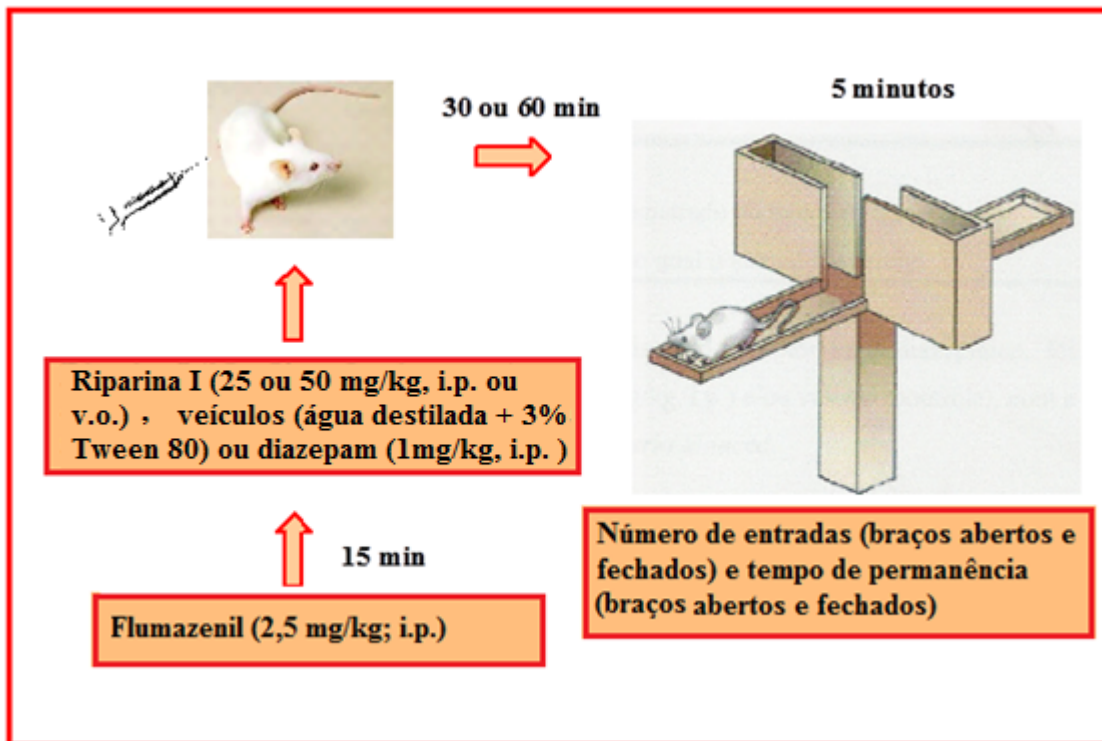
Quadro 8 - Cálculo dos parâmetros PEBA e PTBA do LCE

Cálculo do PEBA e PTBA	
% entrada nos braços abertos (PEBA)	% tempo de permanência nos braços abertos (PTBA)
$PEBA = \frac{NEBA \times 100}{(NEBA + NEBF)}$	$PTBA = \frac{TPBA \times 100}{(TPBA + TPBF)}$

Posteriormente, com a finalidade de investigar o possível envolvimento do receptor GABA_A/ Benzodiazepínico no efeito ansiolítico da droga teste, pré-tratamos os animais com flumazenil (FLU) 2,5 mg/kg, i.p., um antagonista do receptor GABA_A/ Benzodiazepínico. Em seguida, agrupamos os animais em dois grupos diferentes. Enquanto um grupo recebeu veículo v.o. (FLU-2,5 + veículo) 15 minutos depois do pré-tratamento, outros dois receberam riparina I 25 ou 50 mg/kg v.o. (FLU-2,5 + RipI-25/50). Após 60 min, os dois grupos experimentais foram

conduzidos ao labirinto. Para análise estatística, o grupo (FLU-2,5 + RipI-25/50) foi comparado com o grupo RipI-25/50, v.o., enquanto que os demais grupos foram comparados aos respectivos controles.

QUADRO 9 - Esquema do Teste do Labirinto em Cruz Elevado

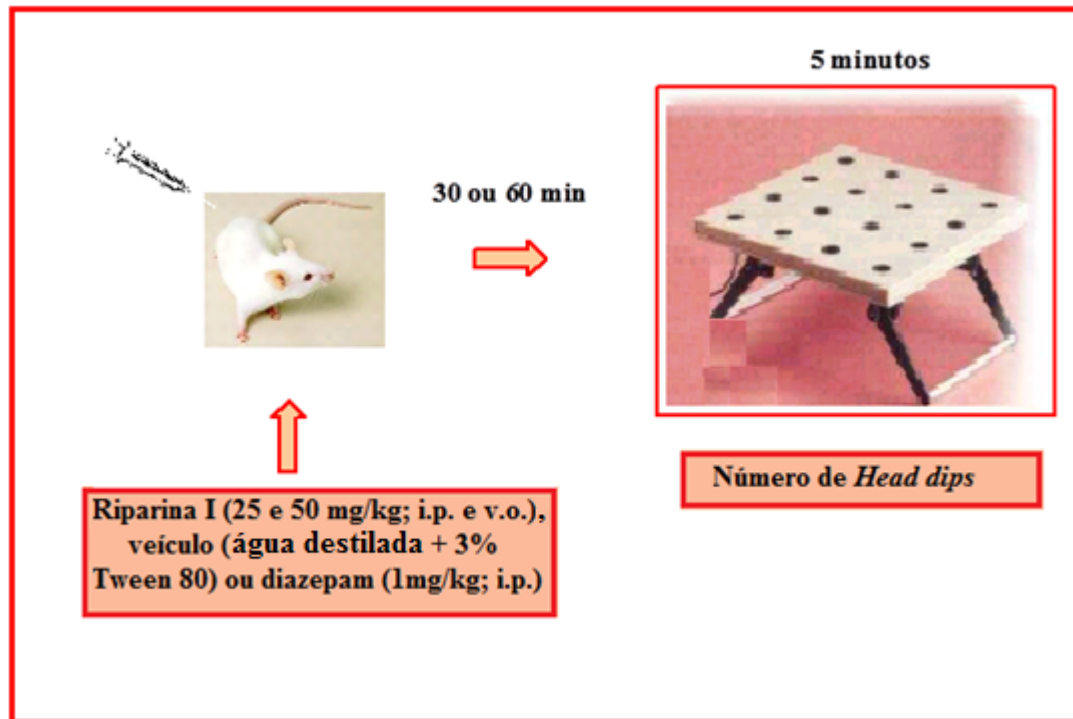


Fonte: adaptado de Melo, 2006.

4.7.4 Teste da Placa Perfurada (*Hole Board Test*)

O método da placa perfurada proposto por Clark *et al.* (1971) nos permite contar o número de *head dips*, ou seja, número de imersões nos orifícios da placa, durante 5 minutos. O teste tem como aparato a placa perfurada (60 x 30 cm) com 16 buracos espaçados uniformemente. Em nosso experimento, os animais, um por vez, foram colocados na plataforma após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente.

QUADRO 10 - Esquema do Teste da Placa Perfurada



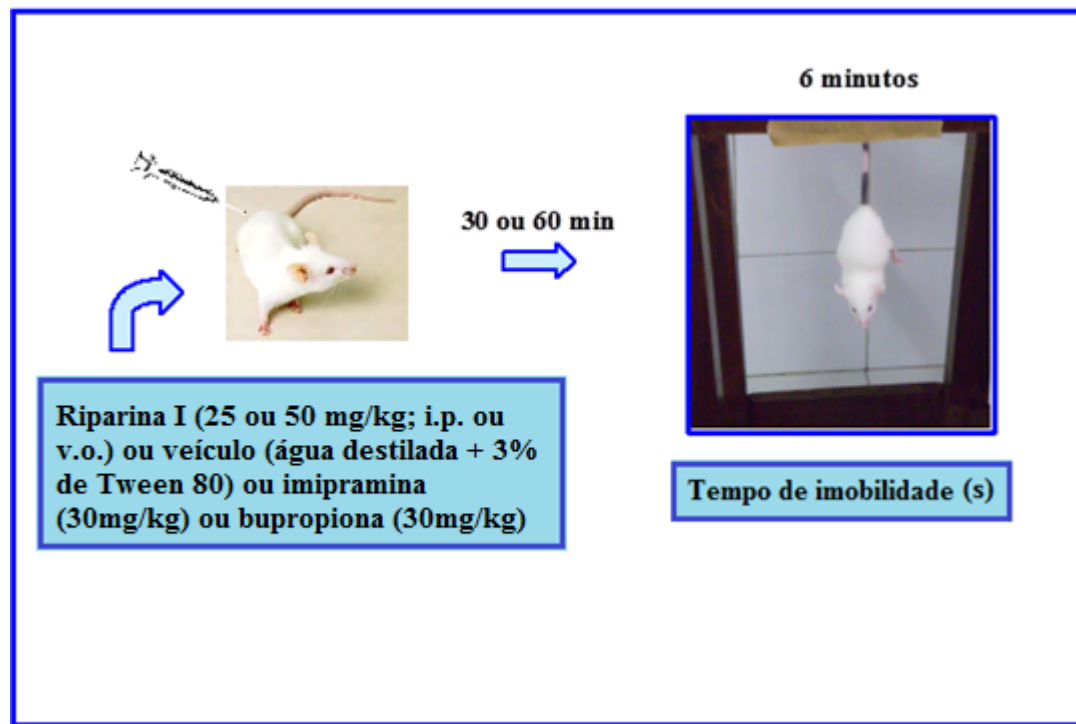
Fonte: adaptado de Melo, 2006.

4.8 Avaliação da Atividade Antidepressiva

4.8.1 Teste da Suspensão da Cauda (TSC)

O Teste da Suspensão da Cauda (TSC) proposto por Steru *et al.* (1985) nos permite medir o tempo de imobilidade animal. Para este experimento foram utilizados os seguintes grupos: imipramina (30 mg/kg, i.p.), bupropiona (30 mg/kg, i.p.), veículo (i.p. ou v.o.) ou riparina I (25 e 50 mg/kg; i.p. ou v.o.). Após 30 min do tratamento i.p., ou 60 min do tratamento v.o., os animais, um por vez, foram suspensos, presos com uma fita adesiva a cerca de 1 cm da ponta da cauda, numa plataforma 58 cm acima da bancada, durante 6 minutos. O parâmetro observado foi o tempo de imobilidade do animal, em segundos.

QUADRO 11 - Esquema do Teste da Suspensão da Cauda



Fonte: adaptado de Melo, 2006.

4.8.2 Teste do Nado Forçado (TNF)

O Teste do Nado Forçado (TNF) proposto por Porsolt *et al.* (1977) nos permite avaliar o tempo de imobilidade animal. Para o experimento foram utilizados tanques de 22 cm de diâmetro e 40 cm de altura contendo água fresca a $23 \pm 1^\circ \text{C}$ até a metade do tanque, cerca de 20 cm. Após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente, os animais foram colocados, um por vez, no tanque onde o tempo de imobilidade, em segundos, foi contado durante cinco minutos. O animal foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando na água, fazendo apenas movimentos suaves necessários para manter a cabeça acima da água.

Investigação de possíveis mecanismos relacionados ao efeito antidepressivo da

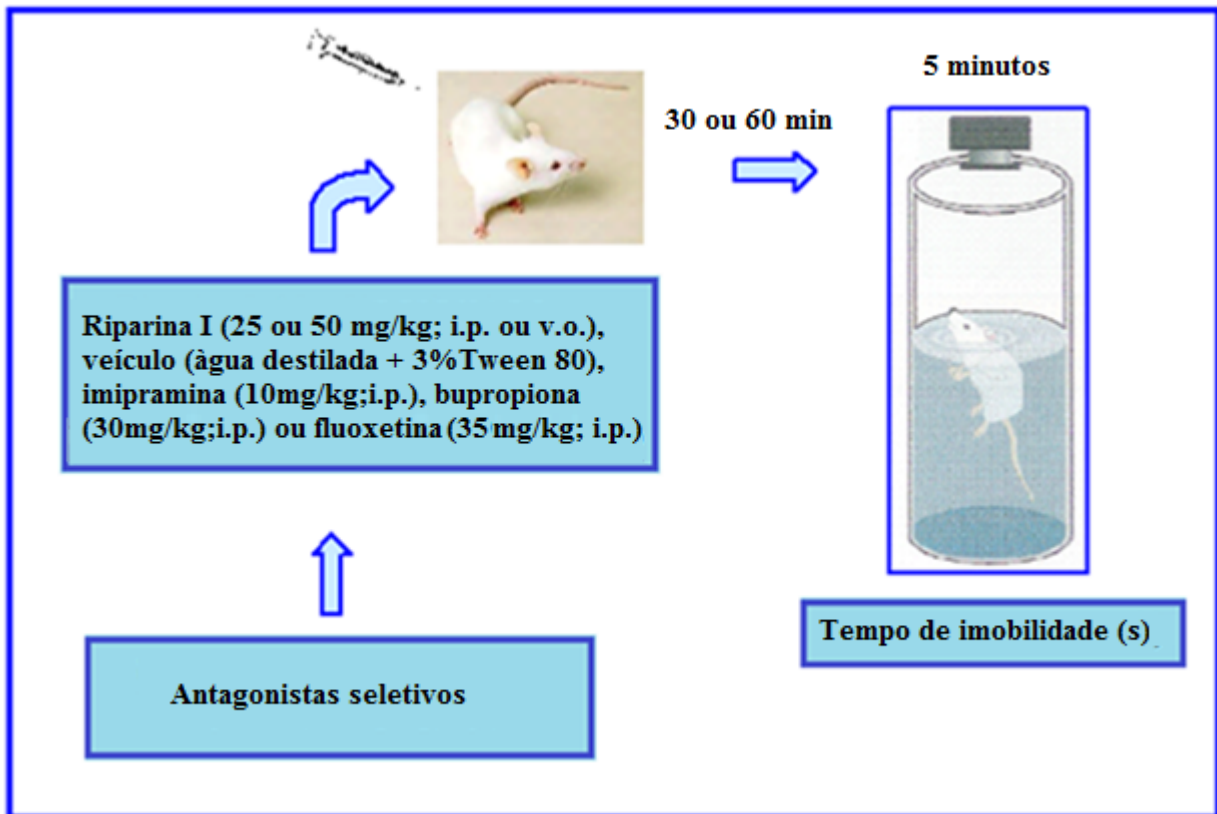
riparina I no teste do nado forçado.

Para investigar o possível envolvimento dos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico no efeito antidepressivo da droga teste, os animais foram pré-tratados com o SCH23390 (15 µg / kg, i.p., um antagonista do receptor dopaminérgico D₁), sulpirida (50 mg / kg, ip, um antagonista do receptor dopaminérgico D₂), prazosina (1 mg / kg, i.p., um antagonista do receptor adrenérgico-α₁) ou ioimbina (1 mg / kg, i.p., um antagonista do receptor adrenérgico α₂), e após 30 min, receberam a riparina I (50 mg / kg, v.o.) ou o veículo. Passados 60 minutos, os animais foram avaliados no TNF .

Para a investigação do possível envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito anti-imobilidade da riparina I, os animais foram pré-tratados com p-clorofenilalanina (PCPA) (100 mg/kg, um inibidor da síntese da serotonina), ou veículo, uma vez por dia, durante 4 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última injeção de veículo ou de PCPA, os animais foram tratados com rip I (50 mg / kg, v.o.) ou veículo e 60 minutos depois foram testados no TNF.

Em outra série de experimentos, também foi investigado o envolvimento do sistema serotoninérgicos sobre o efeito da riparina I no TNF. Para tanto, os animais foram pré-tratados com WAY 100625 (0,1 mg / kg, i.p., um antagonista do receptor 5-HT_{1A}), ritanserina (4 mg / kg, i.p., um antagonista do receptor 5-HT_{2A/2C}), ondansetron (0,1 mg / kg, i.p., um antagonista do receptor 5-HT₃), ou veículo. Após 30 minutos, receberam riparina I (50 mg / kg, v.o.) ou veículo v.o. e 60 minutos depois eles foram avaliados no TNF.

QUADRO 12 - Esquema do Teste do Nado Forçado (TNF)



Fonte: adaptado de Melo, 2006.

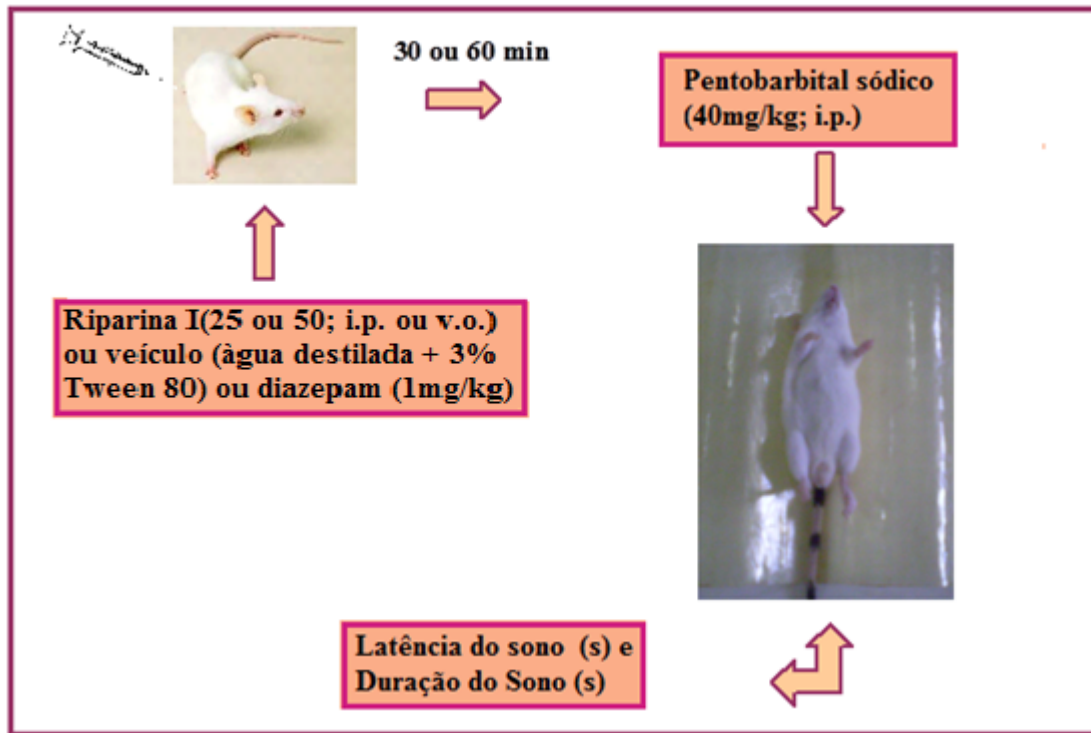
4.9 Avaliação da Atividade Sedativa/Hipnótica e Anticonvulsivante

4.9.1 Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital

Após os tratamentos com riparina I, via i.p. ou v.o., foi administrado pentobarbital sódico (PTB), 30 ou 60 minutos depois, na dose de 40 mg/kg, via i.p. O tempo desde a administração do PTB até a perda do reflexo de endireitamento foi registrado como latência do sono, em segundos. Após terem adormecido, os animais foram colocados na posição de decúbito dorsal, e o tempo decorrido entre a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento foi registrado como duração do sono, em segundos (WAMBEBE, 1985; ROLLAND *et al.*, 1991). A perda do reflexo de endireitamento é a incapacidade que o animal apresenta de voltar à posição normal quando colocado em decúbito dorsal. O critério para a recuperação do reflexo em questão

foi fixado quando o animal saiu da posição por três vezes consecutivas (CARLINI *et al.*, 1986; MATTEI *et al.*, 1998). Portanto, os parâmetros avaliados neste teste foram a latência do sono e a duração do sono cujo tempo máximo (*cut off*) foi de 240 minutos.

QUADRO 13 - Esquema do Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital



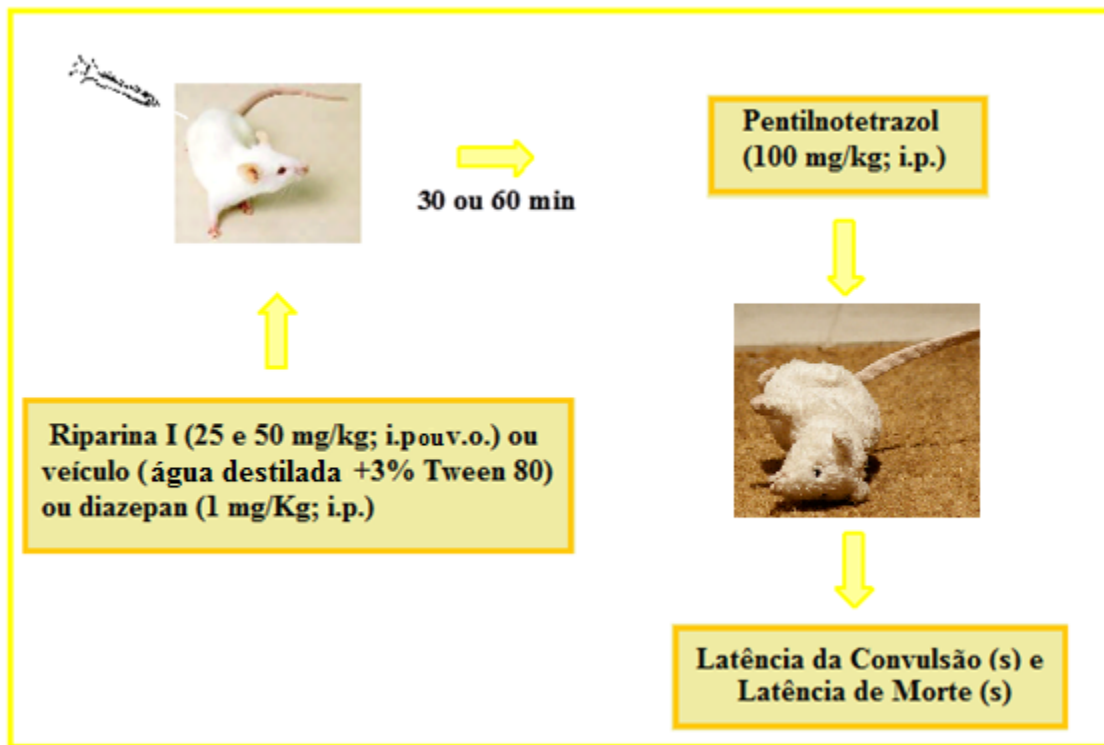
Fonte: adaptado de Melo, 2006.

4.9.2 Teste da Convulsão Induzida por Pentilenotetrazol

Neste teste, foi administrado pentilenotetrazol (PTZ) 100 mg/kg, i.p. 60 min após a administração da riparina I (25 e 50 mg/kg) e 30 min após a administração de diazepam (1 mg/kg, i.p.). Em seguida, os animais foram colocados em gaiolas individuais e observados por um período de 20 minutos. Os parâmetros analisados foram: latência da convulsão (tempo entre a administração do PTZ até a primeira convulsão clônica ou tônico-clônica), em segundos, e, a

latência de morte dos animais (tempo decorrido da administração do PTZ até a morte), em segundos, seguindo a metodologia de SWINYARD *et al.* (1952).

QUADRO 14 - Esquema do Teste da Convulsão Induzida por Pentilenotetrazol



Fonte: adaptado de Melo, 2006.

4.10 Análise Estatística

Todos os resultados são apresentados como a Média \pm Erro Padrão da Média (E.P.M.). Os dados foram analisados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Student-Newman-Keuls *post hoc*. Os resultados considerados significativos apresentaram $p < 0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da Atividade Motora e Ansiolítica

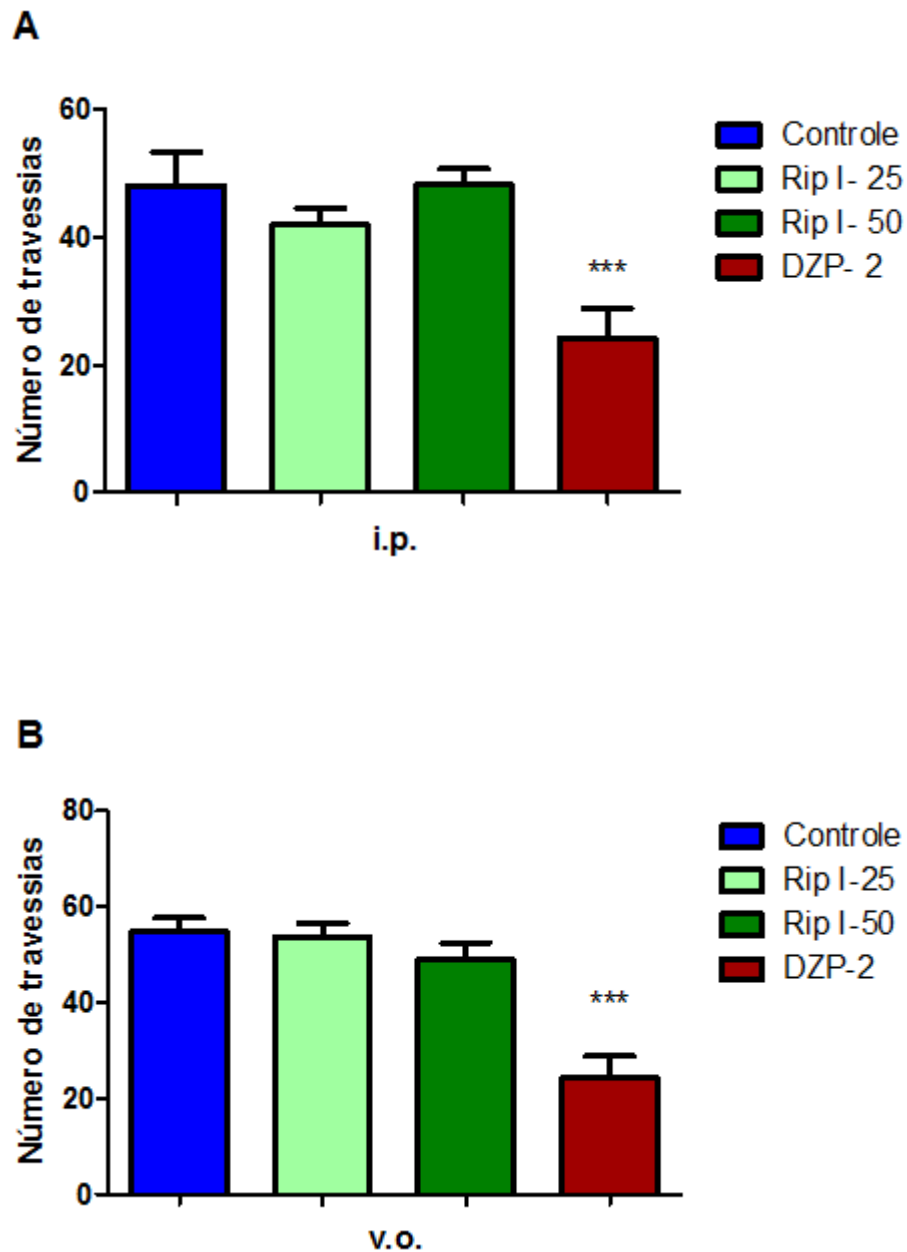
5.1.1 Teste do Campo Aberto

Neste teste os resultados foram expressos como número de cruzamentos, de *rearing* e de *grooming*. Na **figura 7 (A e B)**, observou-se que os grupos que receberam a administração de riparina I, nas doses de 25 ou 50 mg/kg, tanto por via oral quanto por via intraperitoneal, não sofreram alteração da atividade locomotora espontânea (ALE) em comparação aos grupos controles [(i.p.) Controle: $48,13 \pm 5,25$ (13); Rip I-25: $42 \pm 2,51$ (10); Rip I-50: $48,22 \pm 2,49$ (12)] e [(v.o.) Controle: $54,89 \pm 2,88$ (15); Rip I-25: $53,78 \pm 2,77$ (10); Rip I-50: $48,81 \pm 3,71$ (8)]. A administração de diazepam 2 mg/kg, i.p., entretanto reduziu este parâmetro comportamental em relação aos grupos controles i.p. e v.o. [(i.p.) DZP-2: $24,14 \pm 3,68$; $p < 0,001$].

Conforme apresentado na **Figura 8 (A e B)**, o comportamento de *rearing* não foi alterado em nenhuma das doses utilizadas comparado com os respectivos controles [(i.p.) Controle: $7,6 \pm 6,7$ (13); Rip I-25: $7,8 \pm 0,71$ (10); Rip I-50: $8,10 \pm 0,61$ (11)] e [(v.o.) Controle: $8,4 \pm 0,88$ (14); Rip I-25: $8,0 \pm 0,71$ (8); Rip I-50: $8,90 \pm 0,76$ (10)]. O diazepam 2 mg/kg, i.p., contudo, reduziu este parâmetro comportamental em relação aos grupos controles i.p. e v.o. [(i.p.) DZP-2: $3,10 \pm 0,31$; $p < 0,001$].

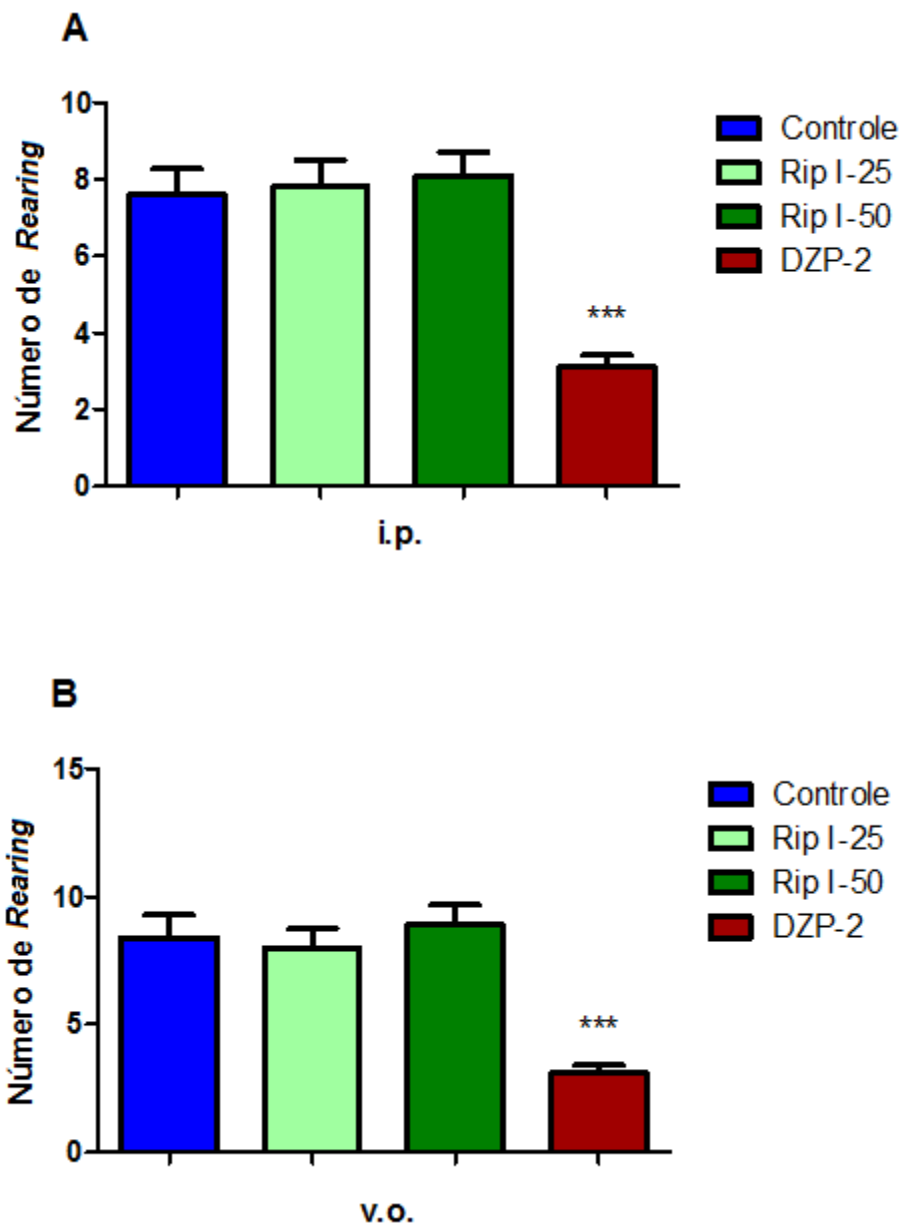
Na **Figura 9 (A e B)** nota-se que o comportamento de *grooming*, em ambas as vias e doses administradas, foi reduzido de maneira significativa [(i.p.) Controle: $4,3 \pm 0,53$ (12); Rip I-25: $3,12 \pm 0,39$ (9), $p < 0,05$; Rip I-50: $3,0 \pm 0,26$ (9), $p < 0,05$] e [(v.o.) Controle: $4,8 \pm 0,61$ (14); Rip I-25: $3,2 \pm 0,25$ (8), $p < 0,05$; Rip I-50: $3,2 \pm 0,45$ (8), $p < 0,01$] **Figura 9 (A e B)**. A redução deste parâmetro também foi observada após o tratamento com diazepam, sendo constatado uma diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos controles i.p. e v.o. [(i.p.) DZP-2: $1,5 \pm 0,81$; $p < 0,001$].

FIGURA 7 - Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto.



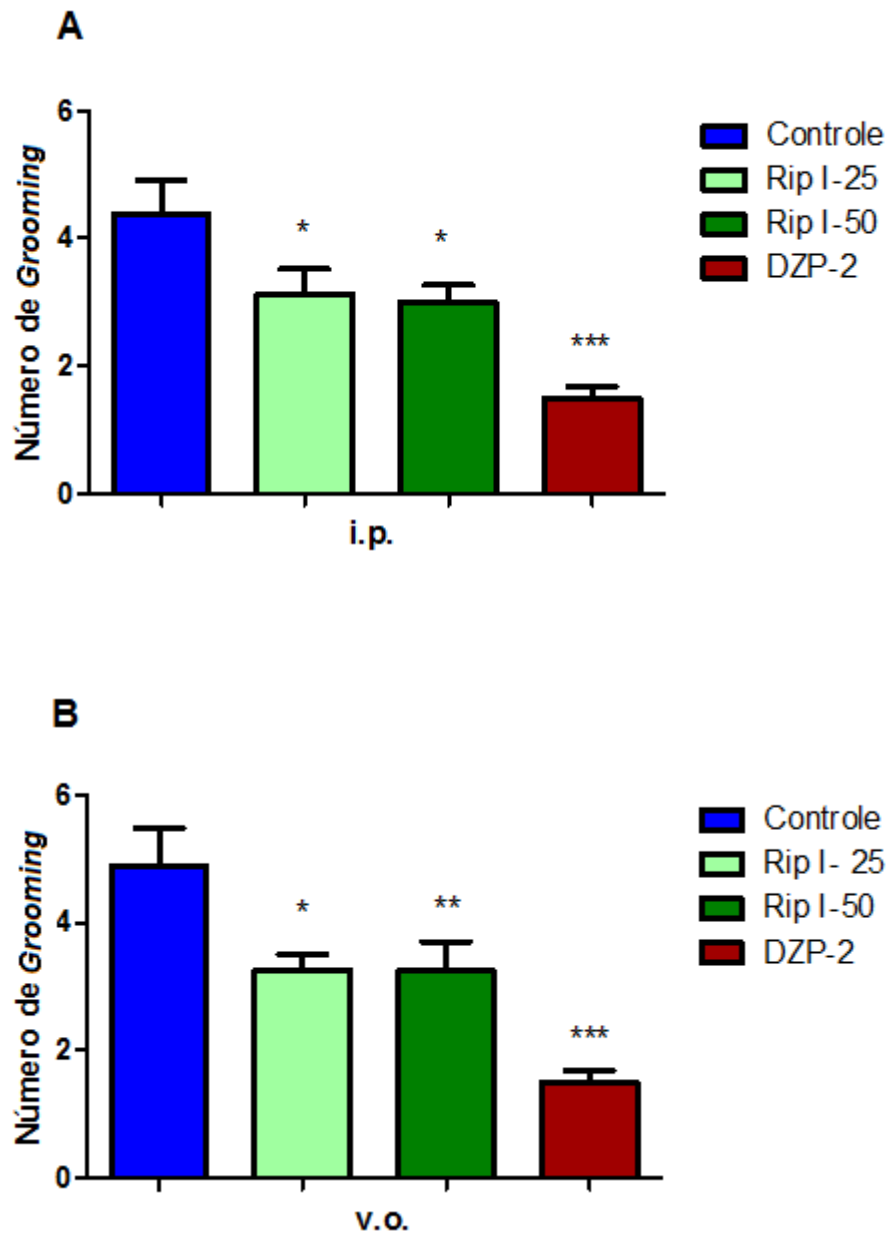
Veículo/ Controle (água destilada em 3% de Tween 80), riparina I (RipI; 25 e 50 mg/kg) ou diazepam (DZP; 2 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média \pm EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (***) $p < 0,001$ vs controle).

FIGURAS 8 - Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o número de rearing no teste do campo aberto.



Veículo/ Controle (água destilada em 3% de Tween 80), riparina I (RipI; 25 e 50 mg/kg) ou diazepam (DZP; 2 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média \pm E.P.M. do número de *rearing* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (***) $p < 0,001$ vs controle).

FIGURAS 9 - Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o número de *grooming* no teste do campo aberto.



Veículo/ Controle (água destilada em 3% de Tween 80), riparina I (RipI; 25 e 50 mg/kg) ou diazepam (DZP; 2 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média \pm E.P.M. do número de *grooming* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001vs controle).

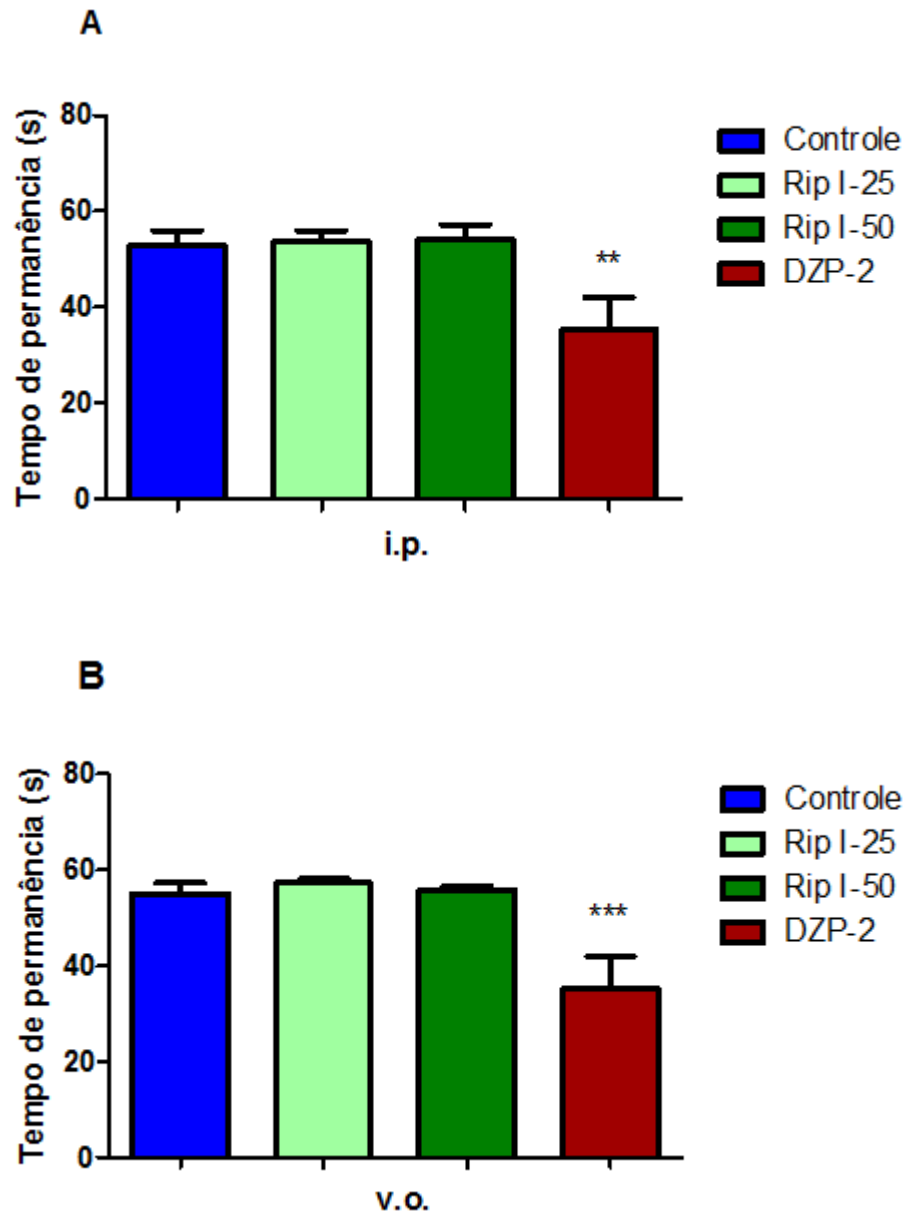
5.2 Avaliação da Atividade Relaxante Muscular

5.2.1 Teste do *Rota Rod*

A administração de riparina I tanto por via intraperitoneal quanto por via oral, nas doses de 25 e 50 mg/kg, não gerou alterações significativas no tempo de permanência (TP) sobre a barra giratória em relação ao grupo controle [i.p.(TP) Controle: $52,92s \pm 3,05$ (10); Rip I-25: $53,77s \pm 2,22$ (13); Rip I-50: $54,08s \pm 3,13$ (13)] (**Figura 10 A**); [v.o. (TP) Controle: $55s \pm 2,27$ (10); RipI-25: $57,22s \pm 0,81$ (9); Rip I-50: $55,89s \pm 0,75$ (9)] (**Figura 10 B**).

O diazepam 2 mg/kg, i.p., diminuiu o tempo de permanência na barra [$35,25 \pm 6,68$ (8), $p < 0,05$] quando comparado aos grupos controles (**Figuras 10**).

FIGURA 10 - Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o tempo de permanência no Teste do Rota Rod.



Veículo/ Controle (água destilada em 3% de Tween 80), riparina I (RipI; 25 e 50 mg/kg) ou diazepam (DZP; 2 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média \pm E.P.M. do número de quedas e tempo de permanência durante 1 minuto. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

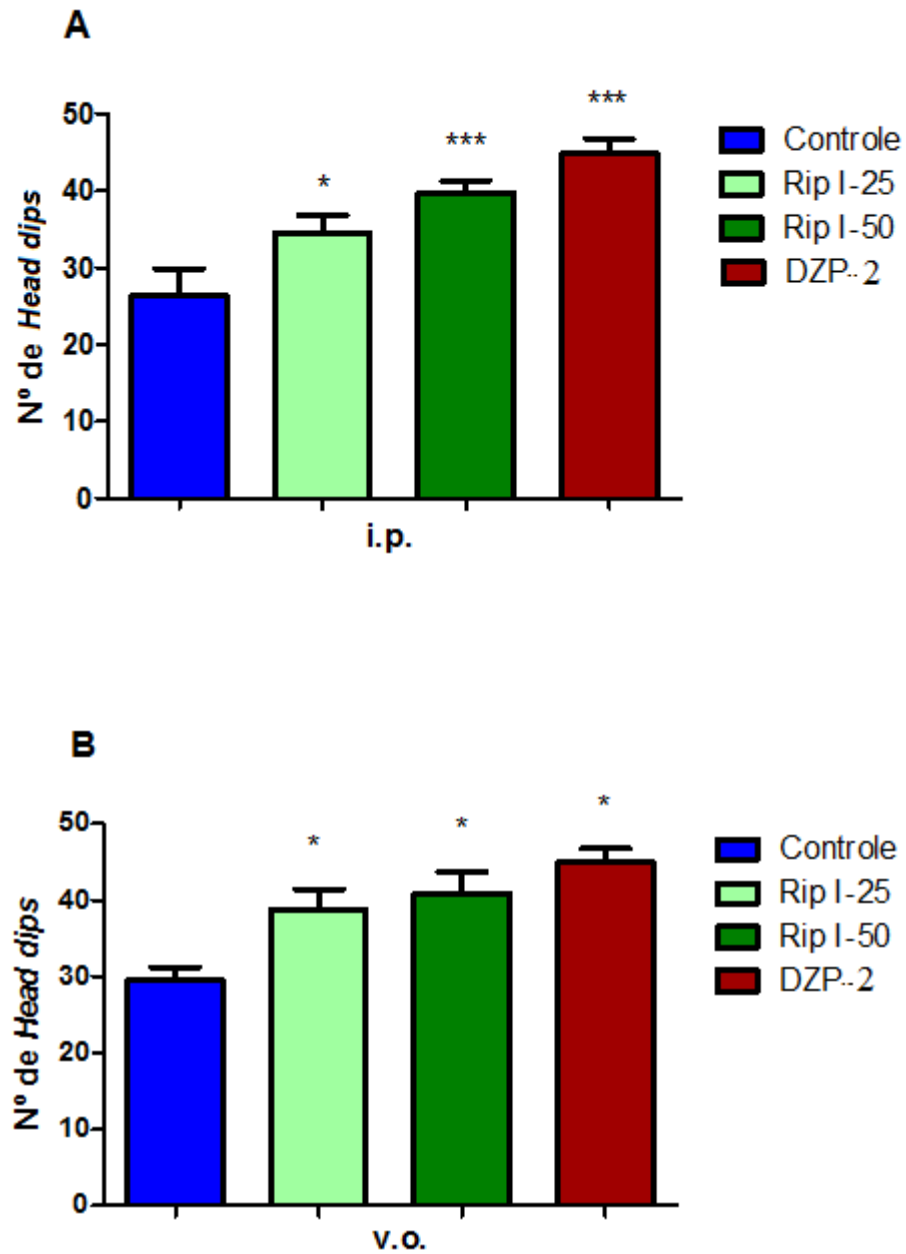
5.3 Avaliação da Atividade Ansiolítica

5.3.1 Teste da Placa Perfurada (*Hole Board Test*)

Neste modelo experimental, após a administração aguda de riparina I nas doses de 25 e 50 mg/kg, foi observado um significativo aumento do número de imersões na placa perfurada (*head dips*), tanto no grupo que recebeu administração i.p. quanto naquele que recebeu administração v.o. da droga teste, quando comparado aos respectivos grupos controles [(i.p.) Controle: $26 \pm 3,39$ (11); Rip I-25: $34,5 \pm 2,17$ (10), $p < 0,05$; Rip I-50: $39,76 \pm 1,58$ (17), $p < 0,001$] e [(v.o.) Controle: $29,4 \pm 1,71$ (10); Rip I-25: $38,6 \pm 2,8$ (8), $p < 0,05$; Rip I-50: $40,94 \pm 2,81$ (17), $p < 0,05$] (**Figuras 11 A e B**).

O efeito do diazepam (DZP) 2 mg/kg, i.p., administrado 30 min antes do teste da placa perfurada é também mostrado nas **Figuras 11 (A e B)**. Comparado aos grupos controle (i.p. e v.o.), os animais tratados com diazepam 2 mg/kg, i.p. manifestaram um aumento do número de *head dips*, [DZP-2: $44,88 \pm 1,83$ (8), $p < 0,05$].

FIGURA 11 - Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o número de *head dips* no teste da placa perfurada (*hole board test*).



Veículo/ Controle (água destilada em 3% de Tween 80), riparina I (RipI; 25 e 50 mg/kg) ou diazepam (DZP; 2 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média \pm E.P.M. do número de *head dips* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle).

5.3.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (*Plus Maze*)

Neste modelo experimental, a administração aguda de riparina I nas doses de 25 e 50 mg/kg, por via intraperitoneal, aumentou de maneira significativa o número de entradas nos braços abertos (NEBA) e o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) em relação ao grupo controle [(NEBA) Controle: $2,8 \pm 0,35$ (9); Rip I-25: $7,6 \pm 0,6$ (10), $p < 0,001$; Rip I-50: $8,000 \pm 0,5560$ (11), $p < 0,001$] (**Figura 12A**), [(TPBA) Controle: $48,11s \pm 8,917$ (9); Rip I-25: $135,7s \pm 11,21$ (10) $p < 0,001$; Rip I-50: $122,7s \pm 7,774$ (11) $p < 0,001$] (**Figura 12B**). No tocante a porcentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) e porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA), verificou-se um aumento significativo destes parâmetros em comparação ao grupo controle [(PEBA) Controle: $30,29 \pm 3,034$ (9); Rip I-25: $52,63 \pm 1,807$ (10), $p < 0,001$; Rip I-50: $52,53 \pm 1,661$ (11), $p < 0,001$] (**Figura 13A**), [(PTBA) Controle: $21,17s \pm 2,992$ (9); Rip I-25: $56,62s \pm 4,586$ (10), $p < 0,001$; Rip I-50: $53,20s \pm 2,950$ (11), $p < 0,001$] (**Figura 13B**).

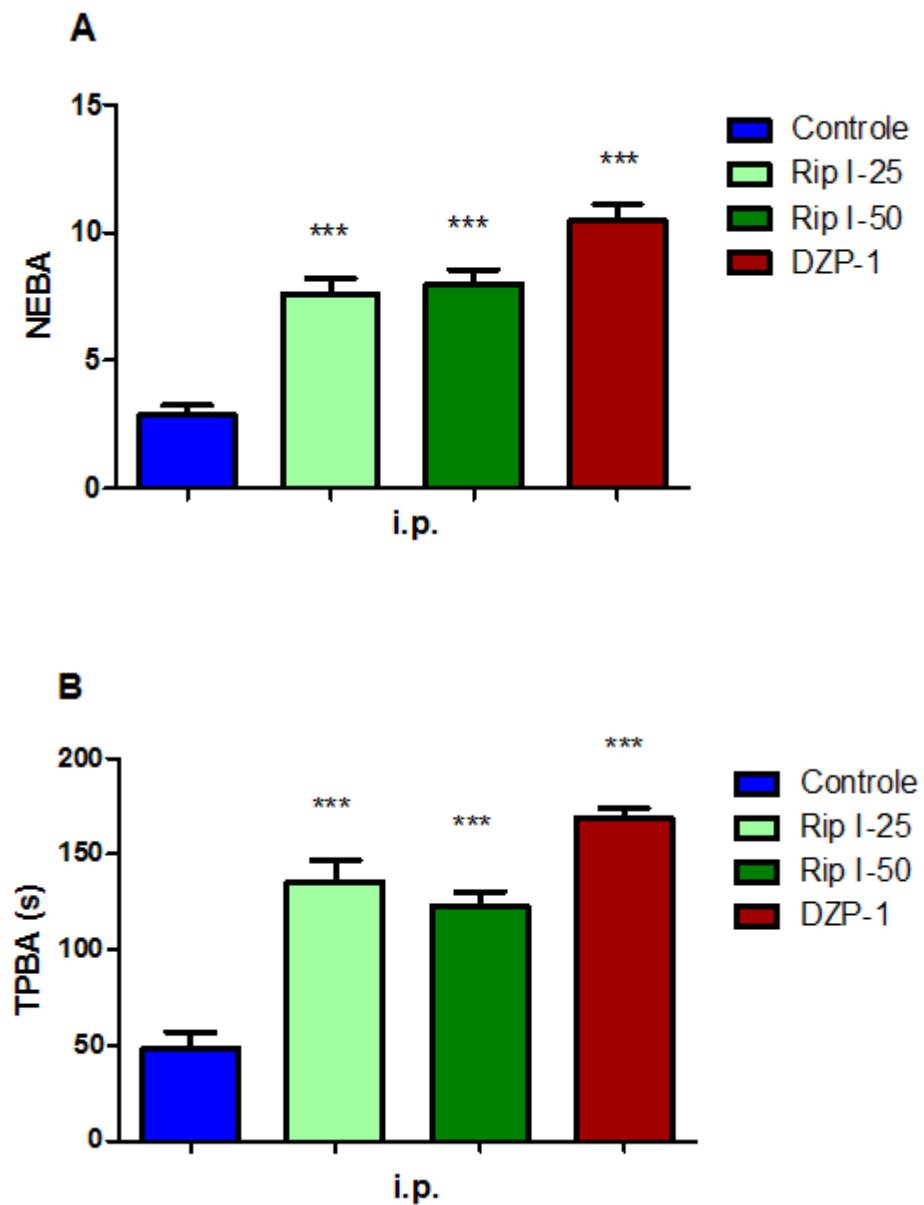
Com relação à administração oral da droga teste nas doses de 25 e 50 mg/kg, observou-se um aumento significativo o número de entradas (NEBA) e o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) em relação ao grupo controle [(NEBA) Controle: $4,4 \pm 0,49$ (15); Rip I-25: $8,8 \pm 0,61$ (10), $p < 0,001$; Rip I-50: $7,8 \pm 0,46$ (10) , $p < 0,001$] (**Figura 14A**), [(TPBA) Controle: $52,00s \pm 7,760$ (15); Rip I-25: $134,4s \pm 5,78$ (10) , $p < 0,001$; Rip I-50: $139,9s \pm 8,4$ (12) , $p < 0,001$] (**Figura 14B**). No tocante a porcentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) e porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA), verificou-se um aumento significativo destes parâmetros em comparação ao grupo controle [(PEBA) Controle: $32,34 \pm 3,21$ (15); Rip I-25: $52,31 \pm 1,97$ (10) , $p < 0,001$; Rip I-50: $51,58 \pm 2,14$ (10) , $p < 0,001$] (**Figura 15A**), [(PTBA) Controle: $26,28s \pm 3,30$ (15); Rip I-25: $52,40s \pm 1,9$ (10) , $p < 0,001$; Rip I-50: $52,02s \pm 2,91$ (11) , $p < 0,001$] (**Figura 15B**).

Por sua vez, a administração da droga padrão positivo, o diazepam, na dose de 1 mg/kg, i.p., aumentou os quatro parâmetros acima discutidos de forma significativa ($p < 0,001$) em relação aos controles [(NEBA) DZP: $10,46 \pm 0,64$] , [(TPBA) DZP: $168,7s \pm 5,36$], [(PEBA) DZP: $63,56 \pm 2,59$], [(PTBA) $61,27s \pm 2,97$] (**Figuras 12 - 15**).

Em seguida, dada a apresentação do efeito ansiolítico da riparina I, foi realizada a investigação sobre o possível envolvimento dos receptores benzodiazepínicos do tipo GABA_A/Benzodiazepínico neste efeito, através da administração de flumazenil. Desta forma foi observado que os grupos previamente tratados com flumazenil e que em seguida receberam riparina I 25 ou 50 mg/kg, por v.o., não apresentaram efeito ansiolítico, enquanto que os grupos tratados apenas com a riparina I mostraram-se menos ansiosos em relação ao controle. Nas figuras 15 a 18 estes resultados são demonstrados. Veja os parâmetros: GRUPOS (FLU-2,5 + RipI-25 e FLU-2,5 + RipI-50) - [(NEBA) FLU + Rip I-25: $5,889 \pm 1,369$ (9); FLU + Rip I-50: $4,778 \pm 0,4938$ (9); $p < 0,05$] (**Figura 16A**), [(TPBA) FLU + Rip I-25: $30,53s \pm 5,448$ (9); FLU + Rip I-50: $139,9s \pm 8,402$; $p < 0,001$ (9)] (**Figura 16B**), [(PEBA) FLU + Rip I-25: $32,34 \pm 3,21$ (15); FLU + Rip I-50: $31,18 \pm 4,340$; $p < 0,001$ (9)] (**Figura 17A**), [(PTBA) FLU + Rip I-25: $32,56s \pm 6,879$ $p < 0,01$ (9); FLU + Rip I-50: $27,21s \pm 4,748$ $p < 0,001$ (9)] (**Figura 17B**). GRUPOS (Controle, RipI-25 e RipI-50) - [(NEBA) Controle: $4,4 \pm 0,49$ (15); Rip I-25: $8,8 \pm 0,61$ (10), $p < 0,001$; Rip I-50: $7,8 \pm 0,46$ (10) , $p < 0,001$] (**Figura 14A**), [(TPBA) Controle: $52,00s \pm 7,760$ (15); Rip I-25: $134,4s \pm 5,78$ (10) , $p < 0,001$; Rip I-50: $139,9s \pm 8,4$ (12) , $p < 0,001$] (**Figura 14B**). [(PEBA) Controle: $32,34 \pm 3,21$ (15); Rip I-25: $52,31 \pm 1,97$ (10) , $p < 0,001$; Rip I-50: $51,58 \pm 2,14$ (10) , $p < 0,001$] (**Figura 15A**), [(PTBA) Controle: $26,28s \pm 3,30$ (15); Rip I-25: $52,40s \pm 1,9$ (10) , $p < 0,001$; Rip I-50: $52,02s \pm 2,91$ (11) , $p < 0,001$] (**Figura 15B**).

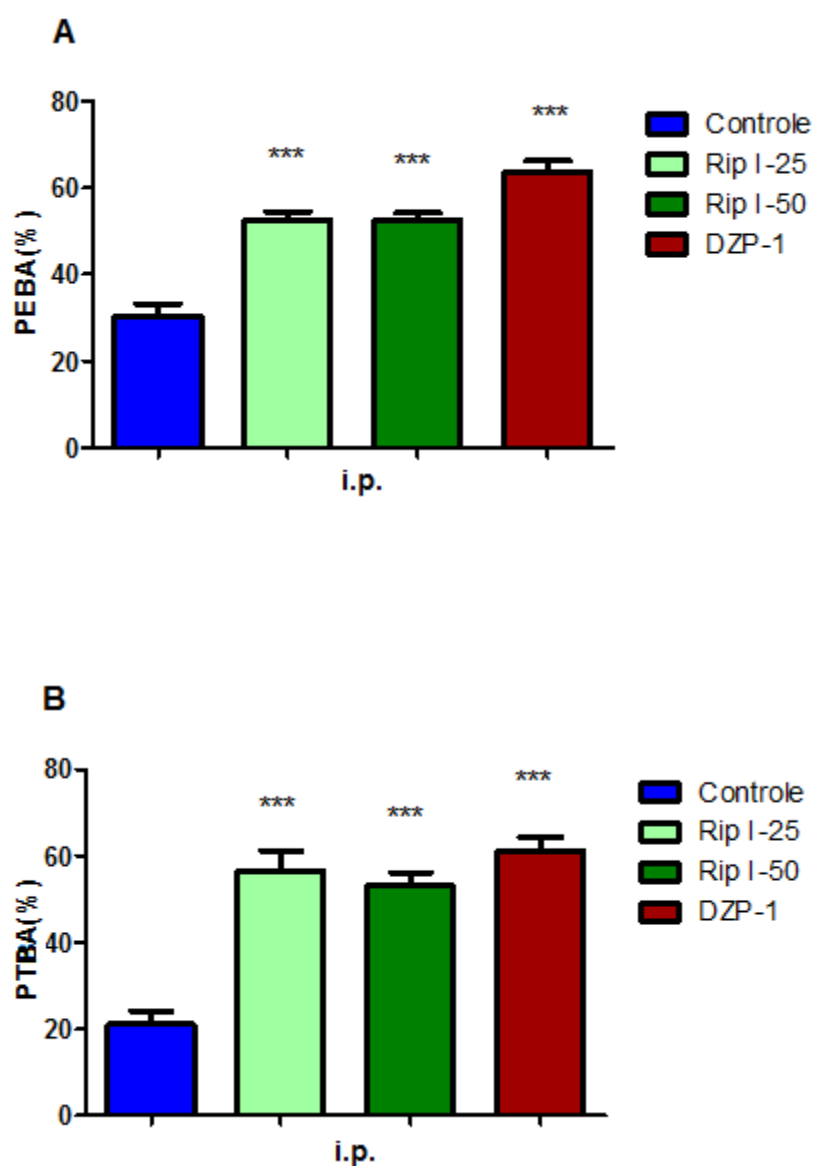
De maneira semelhante, a associação (FLU-2,5 + DZP-1) impediu a expressão do efeito ansiolítico do diazepam administrado isoladamente: [(NEBA) DZP: $10,46 \pm 0,6466$ (13); FLU + DZP: $5,900 \pm 0,6904$ (10); $p < 0,001$] , [(TPBA) DZP: $168,7s \pm 5,366$ (13); FLU + DZP: $79,60s \pm 6,515$ (10); $p < 0,001$] , [(PEBA) DZP: $63,56 \pm 2,594$ (13); FLU + DZP: $41,31 \pm 4,532$ (10); $p < 0,001$], [(PTBA) DZP: $61,27s \pm 2,974$ (13); FLU + DZP: $29,41s \pm 2,476$ (10); $p < 0,001$] (**Figura 16 e 17**).

FIGURA 12 - Efeito da riparina I, via intraperitoneal, sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) (A) e tempo de permanência no teste do labirinto em cruz elevado (B).



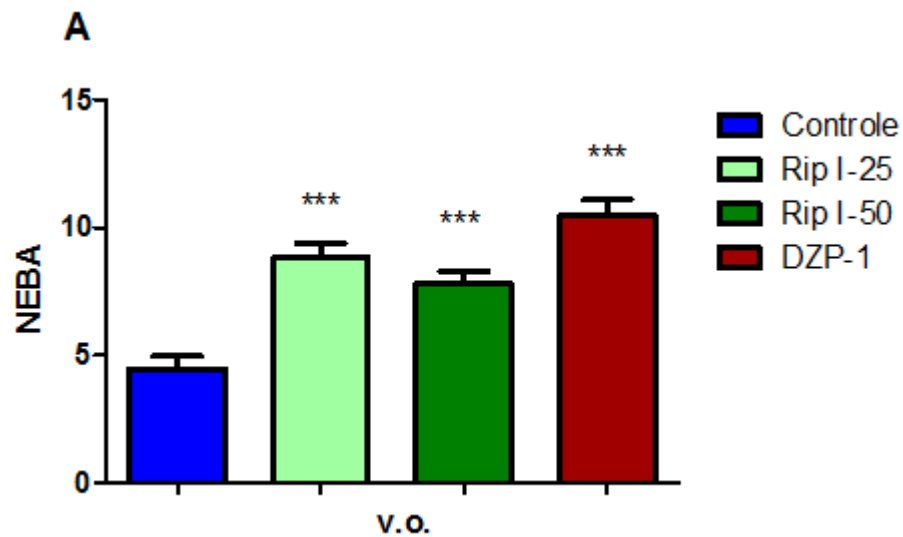
Veículo/ Controle (água destilada em 3% de Tween 80), riparina I (RipI; 25 e 50 mg/kg) ou diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média \pm EPM dos dois parâmetros analisados durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (*** $p < 0,001$ vs controle).

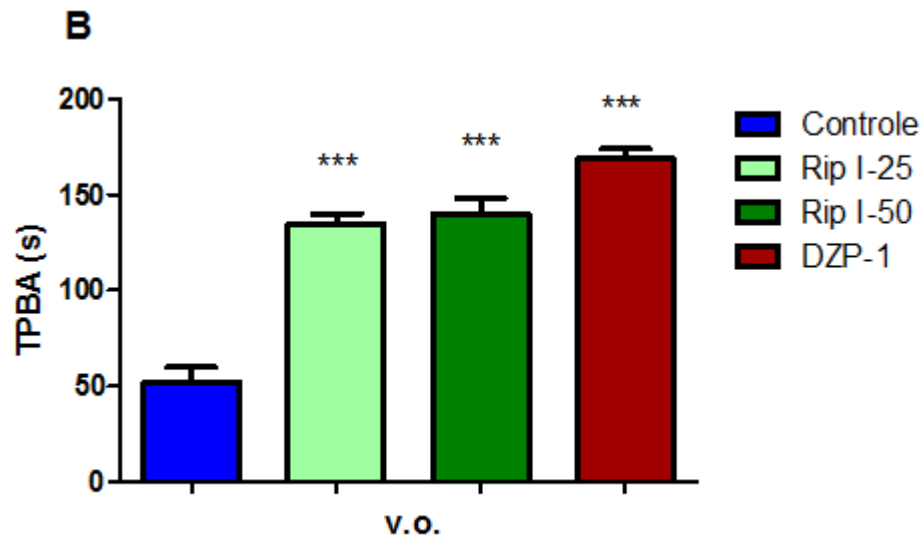
FIGURA 13 - Efeito da riparina I, via intraperitoneal, sobre a porcentagem do número de entradas nos braços abertos (A) e a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (B) no teste do labirinto em cruz elevado.



Veículo/ Controle (água destilada em 3% de Tween 80), riparina I (RipI; 25 e 50 mg/kg) ou diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média \pm EPM dos dois parâmetros analisados durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (***) $p < 0,001$ vs controle).

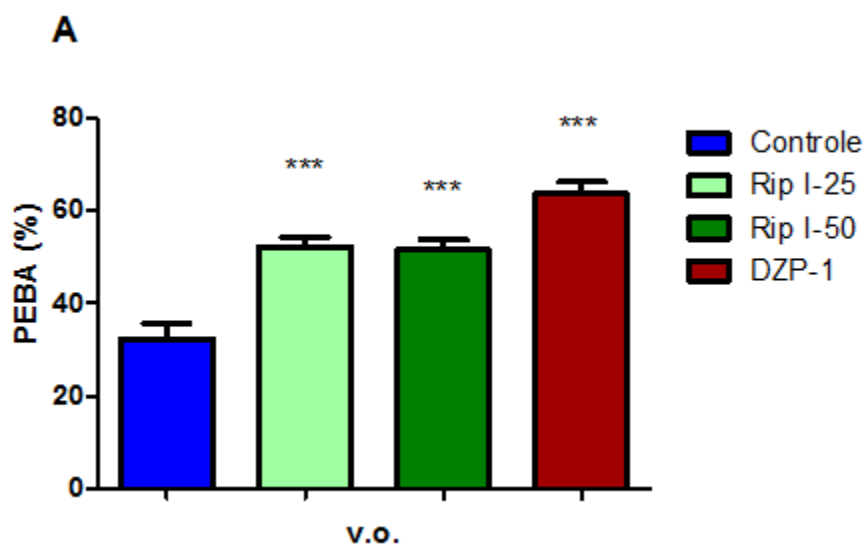
FIGURA 14 - Efeito da riparina I, via oral, sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) (A) e tempo de permanência no teste do labirinto em cruz elevado (B).

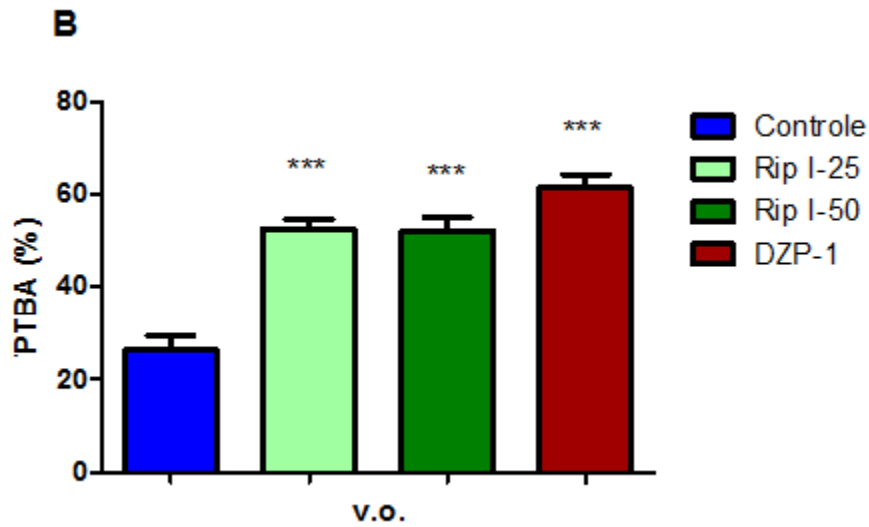




Veículo/ Controle (água destilada em 3% de Tween 80), riparina I (RipI; 25 e 50 mg/kg) ou diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média \pm EPM dos dois parâmetros analisados durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (***) $p < 0,001$ vs controle).

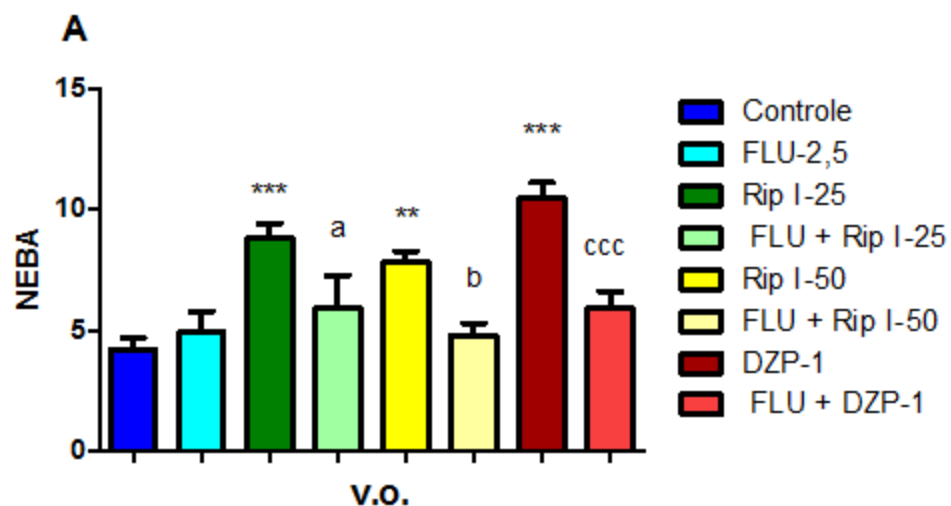
FIGURA 15 - Efeito da riparina I, via oral, sobre a porcentagem do número de entradas nos braços abertos (A) e a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (B) no teste do labirinto em cruz elevado.

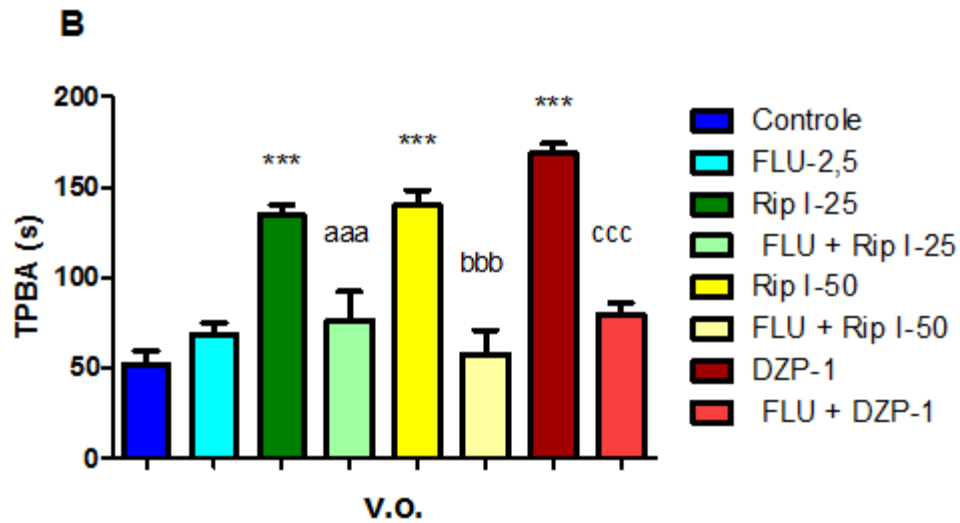




Veículo/ Controle (água destilada em 3% de Tween 80), riparina I (RipI; 25 e 50 mg/kg) ou diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média \pm EPM dos dois parâmetros analisados durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (***) $p < 0,001$ vs controle).

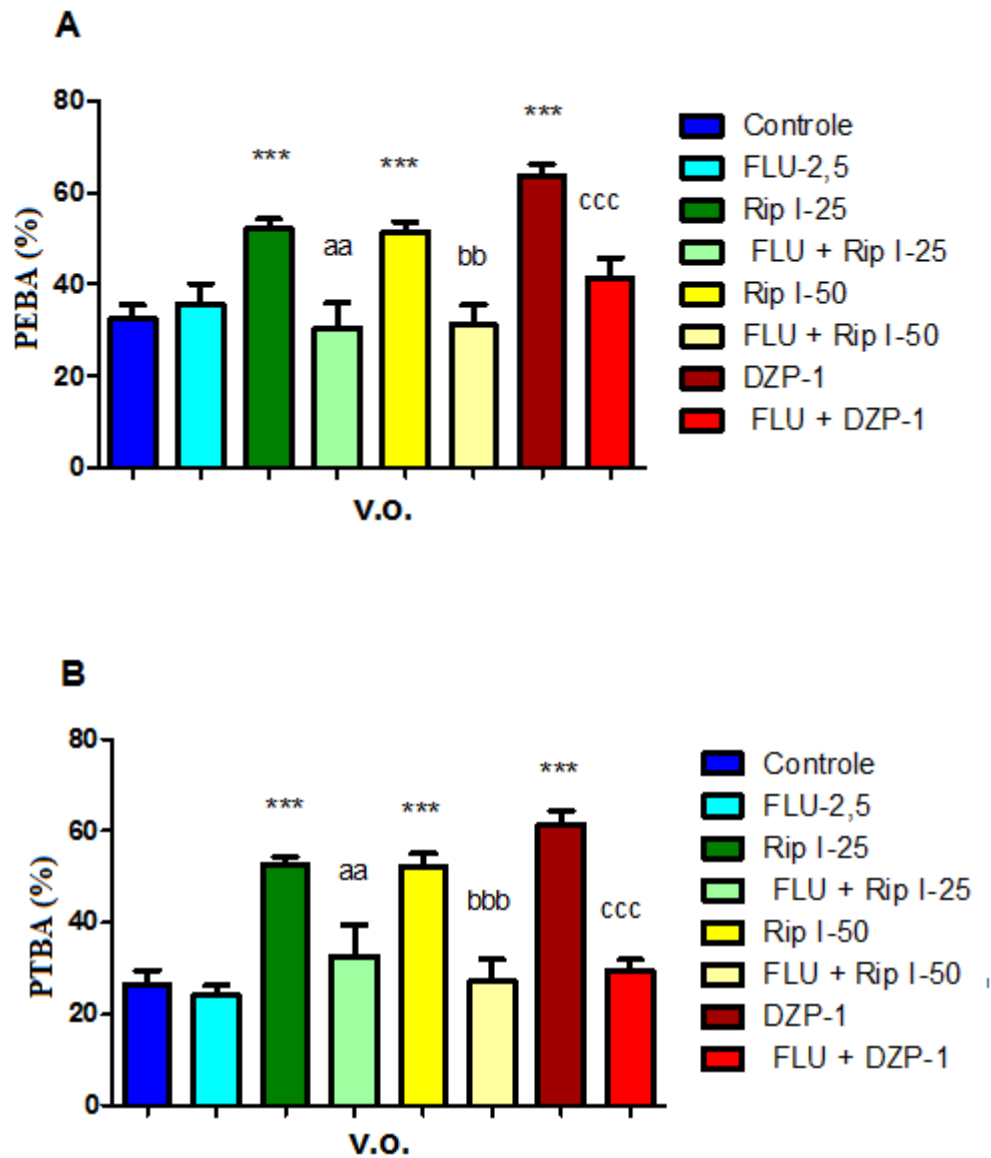
FIGURA 16 - Efeito da riparina I, via oral, sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) (A) e tempo de permanência no teste do labirinto em cruz elevado (B).





Os valores numéricos representam a Média \pm EPM dos dois parâmetros analisados durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (*** $p < 0,001$ vs controle; ^{aaa} $p < 0,001$ vs Rip I-25, ^{bbb} $p < 0,001$ vs Rip I-50, ^{ccc} $p < 0,001$ vs DZP-1).

FIGURA 17 - Efeito da riparina I, via oral, sobre a porcentagem do número de entradas nos braços abertos (A) e a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (B) no teste do labirinto em cruz elevado.



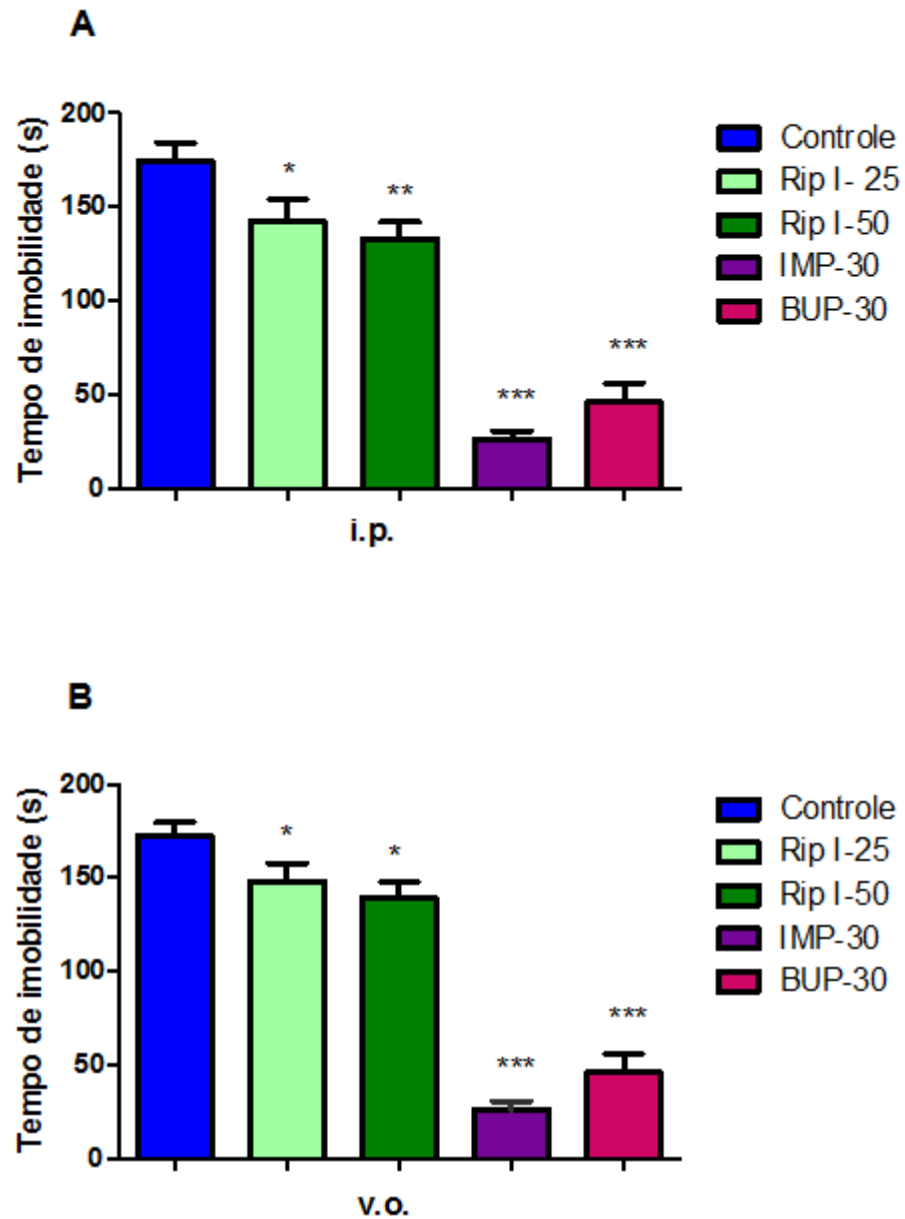
Os valores numéricos representam a Média \pm EPM dos dois parâmetros analisados durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (*** $p < 0,001$ vs controle; ^{aa} $p < 0,01$ vs Rip I-25, ^{bbb} $p < 0,001$ vs Rip I-50, ^{ccc} $p < 0,001$ vs DZP-1).

5.4 Avaliação da Atividade Antidepressiva

5.4.1 Teste Suspensão da Cauda (TSC)

Os efeitos das administrações intraperitoneal e oral de rip I (25 e 50 mg / kg) sobre o tempo de imobilidade no TSC são mostrados na **Figura 18 (A e B)**, respectivamente. Por via intraperitoneal, a administração da droga teste reduziu significativamente o tempo de imobilidade em relação ao controle [Controle: $174,5 \pm 9,82(11)$; Rip I-25: $142,1 \pm 11,91 (10)$, $p < 0,05$; Rip I-50: $132,9 \pm 8,98 (11)$, $p < 0,01$] (**Figura 18A**). De modo similar, a administração oral da droga teste, em ambas as doses, também diminuiu o tempo de imobilidade daquele grupo de animais comparados ao grupo controle [Controle: $172 \pm 7,546 (11)$; rip I- 25: $148,3 \pm 9,341 (9)$, $P < 0,05$; rip I-50: $139,1 \pm 8,80 (8)$, $P < 0,05$] (**Figura 18B**). Conforme o esperado, a administração intraperitoneal de imipramina ou bupropiona (padrões positivos) foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade em relação aos grupos controles oral e intraperitoneal [IMP-30: $26,0 \pm 4,56 (10)$, $P < 0,001$], [BUP: $45,88 \pm 10,03 (9)$, $P < 0,001$].

FIGURA 18- Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda.



Veículo/Controle (água destilada em 3% de Tween 80), riparina I (Rip I; 25 e 50 mg/kg), imipramina (IMI; 30 mg/kg) e bupropiona (BUP; 30 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média \pm EPM do tempo de imobilidade (s) durante 6 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (* $p < 0,01$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle).

5.4.2 Teste do Nado Forçado (TNF)

Neste modelo, a administração intraperitoneal e oral de riparina I diminuiu significativamente o tempo de imobilidade dos animais tratados em relação aos não tratados. Além disso, a administração oral da droga teste nas doses de 25 e 50 mg/kg diminuiu o tempo de imobilidade dos camundongos de forma dose dependente [(i.p.) Controle: 110.9 ± 6.79 (7), Rip I-25: 69.29 ± 2.71 (7), $p < 0.001$; Rip I-50: 65.71 ± 3.24 (7), $p < 0.001$] (**Figura 19 A**) e [(v.o.) Controle: 102 ± 4.22 (8), RipI-25: 72.14 ± 7.93 (7), $p < 0.001$; Rip I-50: 46.63 ± 4.06 (8), $p < 0.001$] **Figura 19 B**. Um perfil similar de ação foi observado nos grupos tratados intraperitonealmente com bupropiona [BUP-30: 41.17 ± 6.92 (6), $P < 0.001$], imipramina [IMP-10: 16.86 ± 2.80 (7), $P < 0.001$] e fluoxetina [FLU-35: 49.46 ± 4.17 (13), $P < 0.001$] (**Figura 19 A e B**).

Investigação de possíveis mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo da riparina I no TNF.

5.4.2.1 Envolvimento do sistema dopaminérgico

O efeito anti-imobilidade observado após a administração de riparina I sozinha (50 mg / kg, v.o.) foi significativamente inibido pelo pré-tratamento dos camundongos com sulpirida (50 mg / kg, ip) (**Figura 20A**) e SCH23390 (15 μ g / kg, ip) (**Figura 20B**) [Rip I-50: $46,63 \pm 4,066$ (8) ; SUL-50 + Rip I-50: $157,3 \pm 18,50$ (9) $p < 0,001$; SCH-15 + Rip I-50: $140,0 \pm 5,332$ (8); $p < 0,001$].

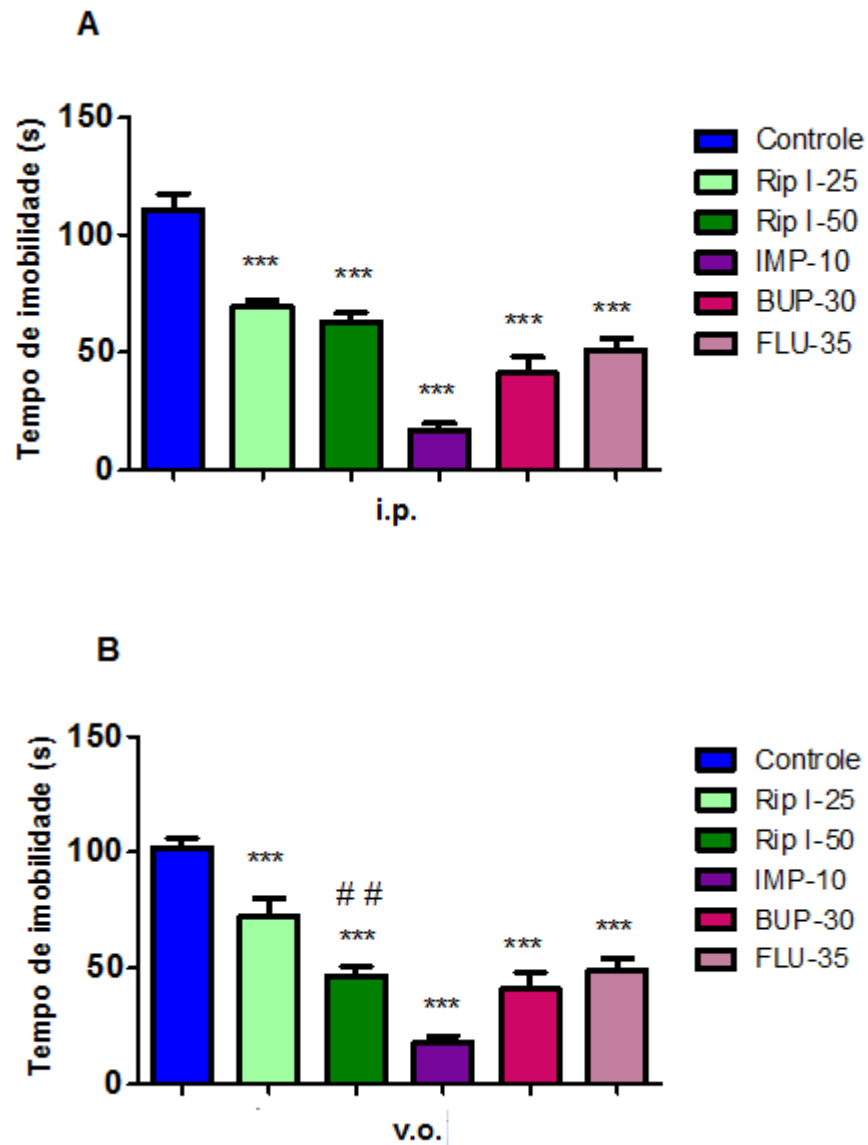
5.4.2.2 Envolvimento do sistema noradrenérgico

Na **Figura 21** observou-se que o pré-tratamento dos camundongos com prazosina (1 mg / kg, i.p.) foi capaz de impedir o efeito antidepressivo observado após o tratamento com riparina I isoladamente (**Figura 21A**). Resultado similar ocorreu após o pré-tratamento com o antagonista ioimbina (1 mg / kg, ip) (**Figura 21B**): [Rip I-50: $46,63 \pm 4,066$ (8) ; PZS-1 + Rip I-50: $78,57 \pm 9,502$ (9); IOI-1 + Rip I-50: $106,3 \pm 6,625$ (7); $p < 0,001$].

5.4.2.3 Envolvimento do sistema serotoninérgico

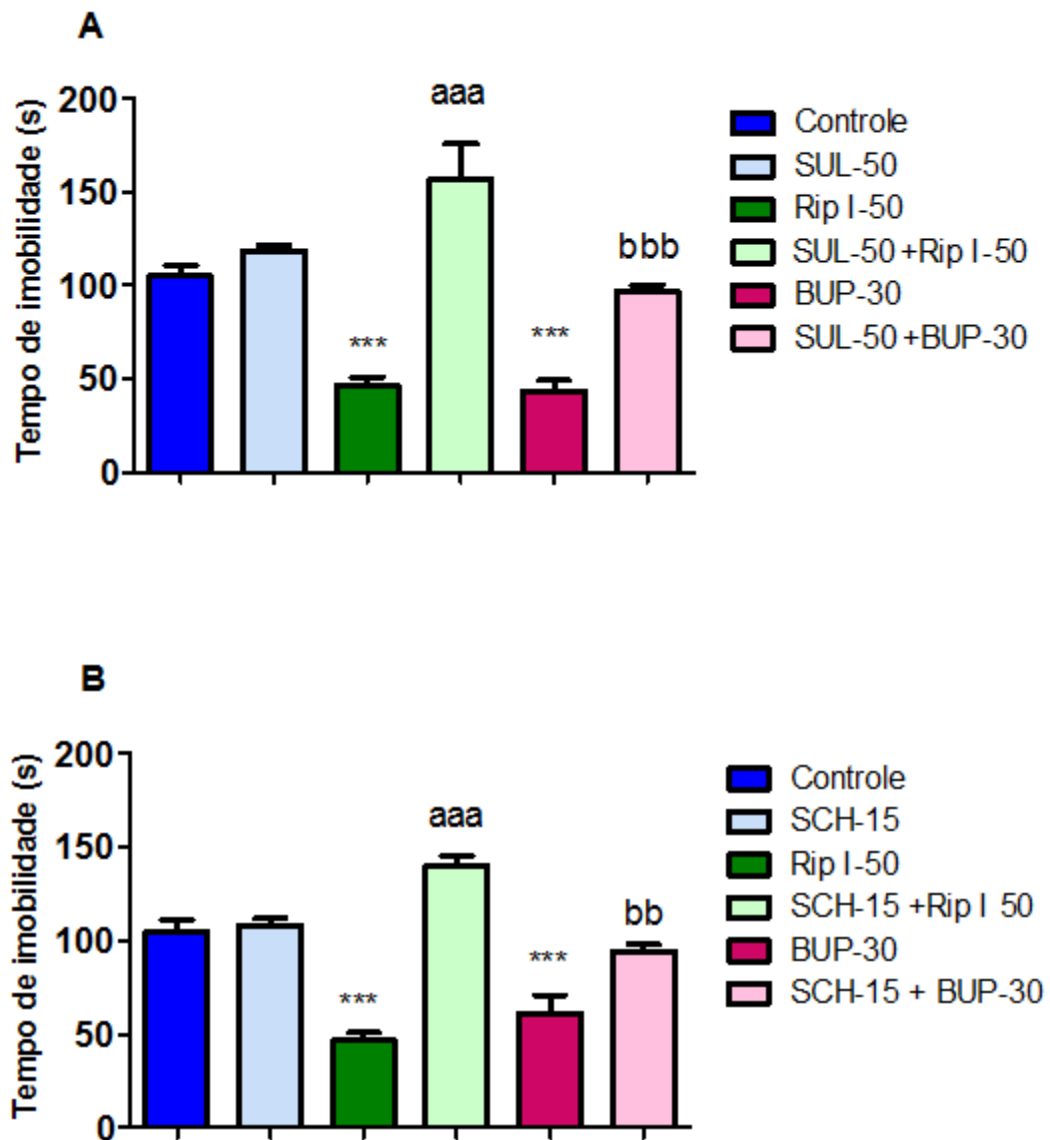
O pré-tratamento com o PCPA (100 mg / kg, i.p., uma vez por dia durante quatro dias consecutivos) preveniu significativamente a diminuição do tempo de imobilidade observado após a administração de riparina I sozinha (**Figura 22A**). De forma semelhante, o pré-tratamento com ritanserina (4 mg / kg, i.p.) também preveniu o efeito antidepressivo desencadeado pela administração da droga teste sozinha (**Figura 22B**). A análise da **Figura 22 (C e D)**, mostrou que os pré-tratamentos com WAY 100625 (0,1 mg / kg, i.p.) e ondansetron (0,1 mg / kg, i.p.) não afetaram o desencadeamento do efeito antidepressivo observado após a administração de riparina I sozinha [Rip I-50: $46,63 \pm 4,066$ (8) ; PCPA + Rip I-50: $96,00 \pm 11,03$ (10); RIT-4 + Rip I-50: $113,2 \pm 10,94$ (7); $p < 0,001$] ; [WAY + Rip I: $52,33 \pm 4,039$ (8); OND + Rip I-50: $57,20 \pm 10,37$ (9); $p > 0,05$].

FIGURA 19- Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado.



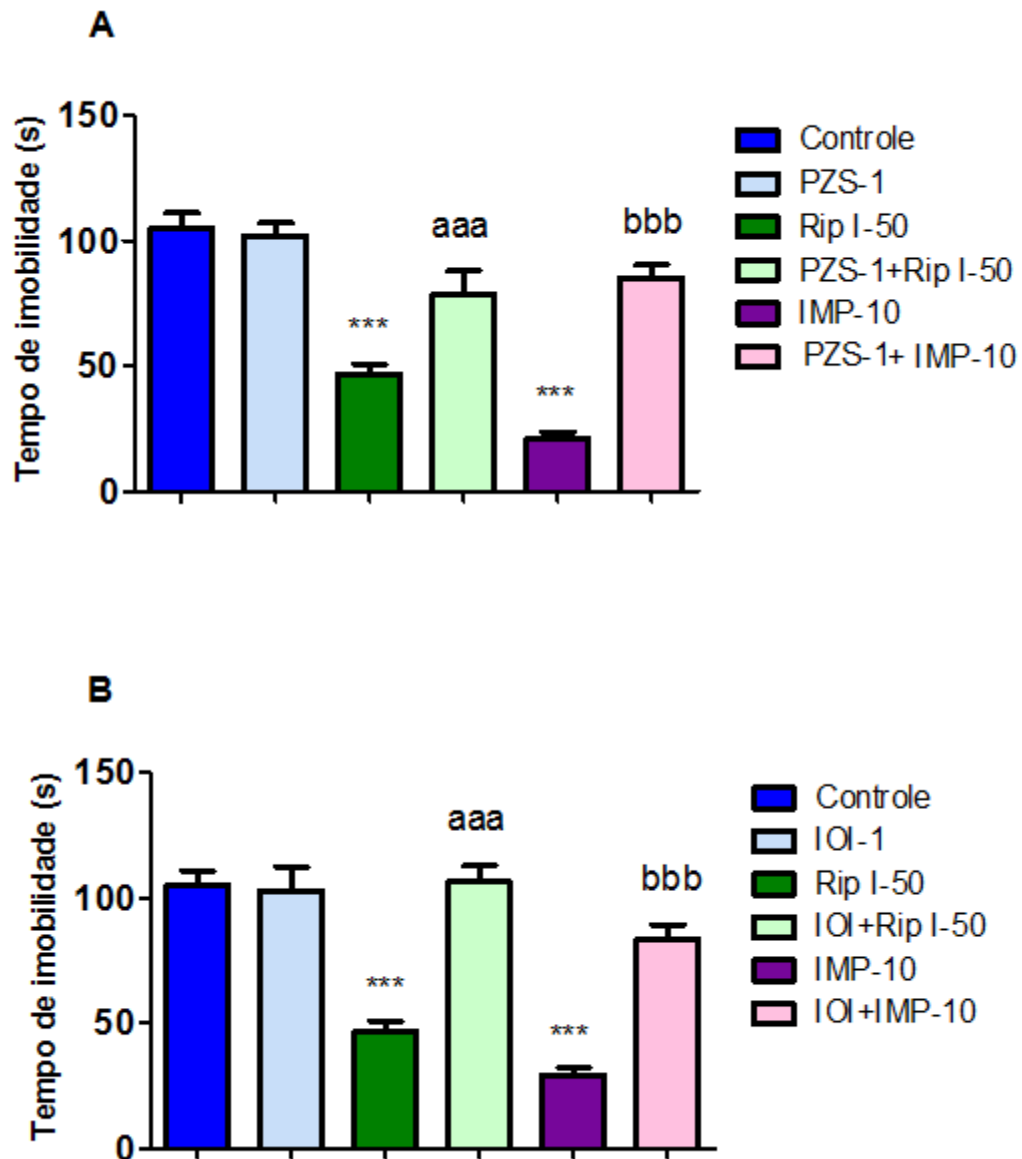
Veículo/Controle (água destilada em 3% de Tween 80), riparina I (Rip I; 25 e 50 mg/kg), imipramina (IMI; 30 mg/kg), bupropiona (BUP; 30 mg/kg) e fluoxetina (FLU; 35 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a média \pm E.P.M. do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (***) $p < 0,001$ vs controle; ## $p < 0,01$ vs Rip I-25).

FIGURA 20. Efeito do pré-tratamento de camundongos com SUL (50 mg / kg, i.p.) (A) ou SCH23390 (15 ug / kg, i.p.) (B) sobre a redução do tempo de imobilidade induzida pelo tratamento com rip I (50 mg / kg, v.o.) no TNE.



Os valores numéricos representam a Média (s) \pm E.P.M. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste post hoc. (*** p <0,001 vs controle; ^{aaa}p <0,001 vs ripI-50; ^{bb}p <0,01; ^{bbb}p <0,001 vs BUP-30).

FIGURA 21. Efeito do pré-tratamento de camundongos com PZS (1 mg/kg, i.p.) (A) ou IOI (1mg/kg, i.p.) (B) sobre a redução do tempo de imobilidade induzida pelo tratamento com rip I (50 mg / kg, v.o.) no TNE.



Os valores representam a Média (s) \pm E.P.M. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. (*** $p < 0.001$ vs controle; ^{aaa} $p < 0.001$ vs ripI-50; ^{bbb} $p < 0.001$ vs IMP-10).

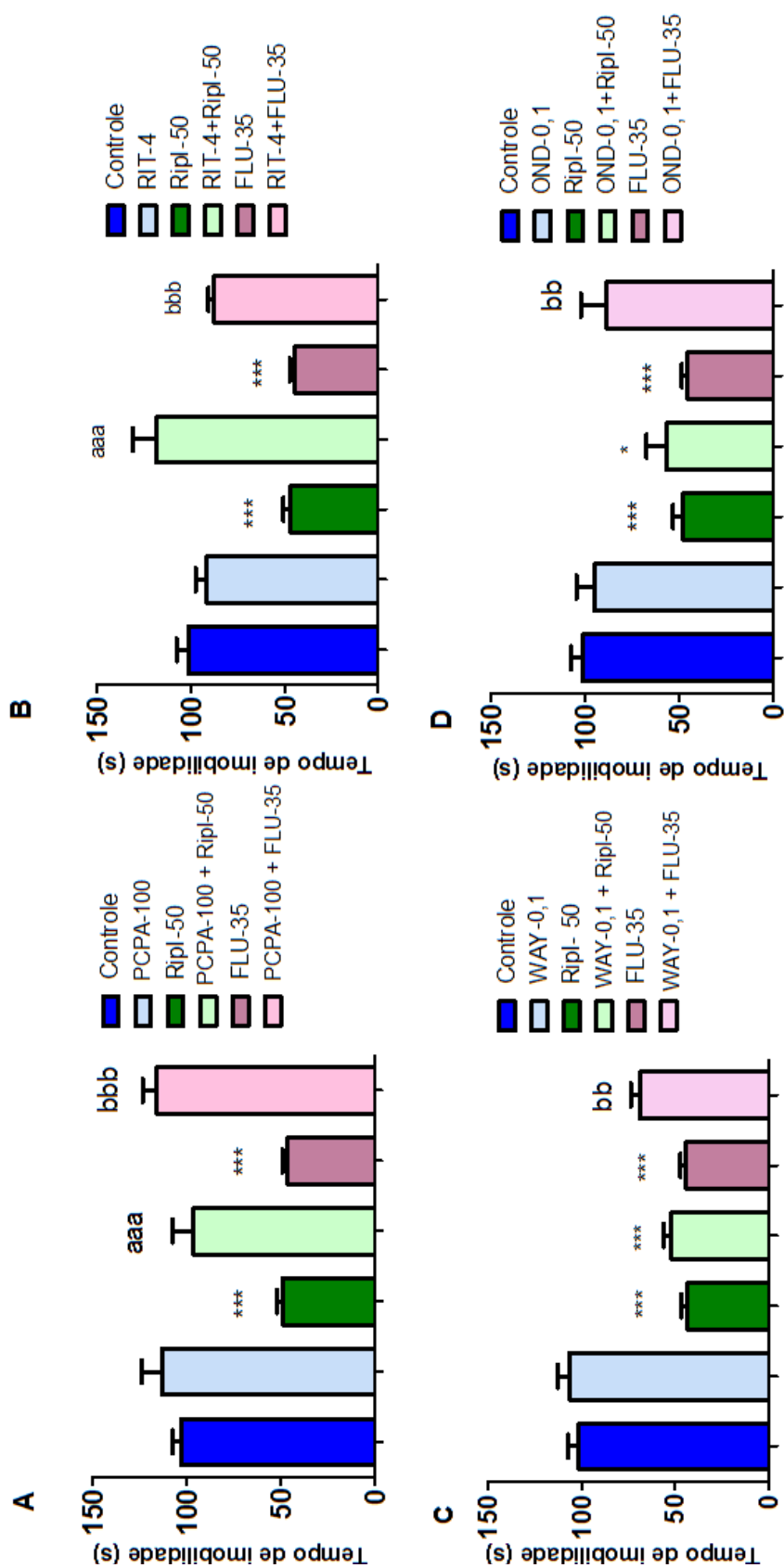


FIGURA 22. Efeito do pré-tratamento com PCPA (100 mg / kg, i.p.) (A) ou ritanserina (4 mg / kg, i.p.) (B) ou WAY 100625 (0,1 mg / kg, i.p.) (C) ou ondansetran (0,1 mg / kg, i.p.) (D) sobre a redução do tempo de imobilidade induzida pelo tratamento com rip I (50 mg / kg, v.o.) no TNF. Os valores numéricos representam a Média (s) ± E.P.M. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. (***) $p < 0.001$ vs controle; ^{aaa} $p < 0.001$ vs Ripl-50 e ^{bbb} $p < 0.001$ vs FLU-35).

5.5 Avaliação do Efeito Sedativo e Anticonvulsivante

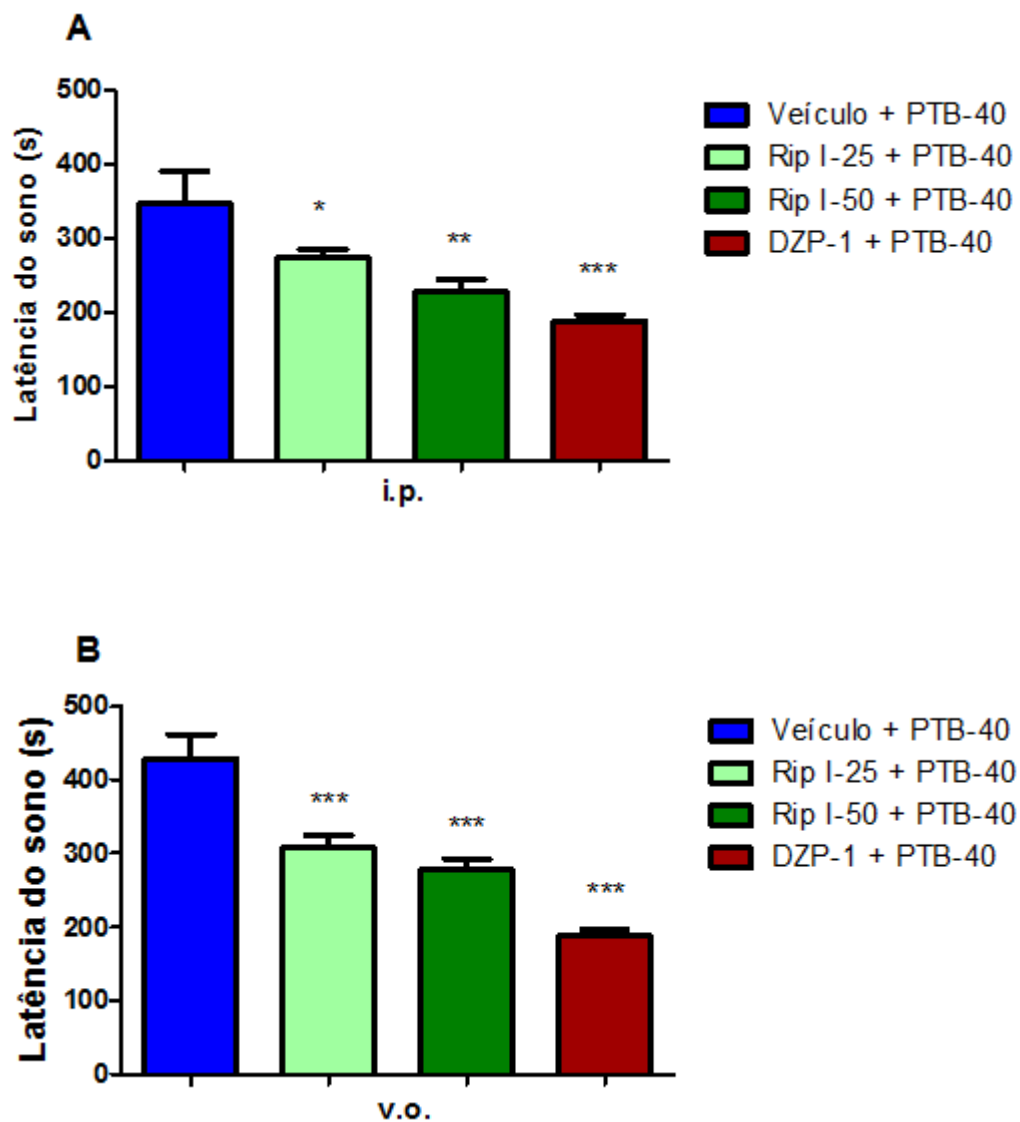
5.5.1 Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital

Neste experimento foram observados os parâmetros tempo de latência do sono (LS) e duração do sono (DS). Os grupos de animais que receberam a administração intraperitoneal de riparina I, nas doses de 25 ou 50 mg/kg, seguida da administração de pentobarbital, apresentaram um menor tempo de latência do sono e um maior tempo de duração do sono em comparação ao grupo controle: [(LS) Veículo + PB-40: $346,4 \pm 45,13$ (10); Rip I-25+ PB-40: $274,0 \pm 11,40$ (10), $p < 0,05$; Rip I-50 + PB-40: $228,1 \pm 16,72$ (8), $p < 0,01$] (**Figura 23 A**) e [(DS) Veículo + PB-40 2114 ± 272 , (10); Rip I-25 + PB-40: $3324 \pm 433,7$ (10), $p < 0,05$; Rip I-50 + PB-40: $3979 \pm 259,8$ (10), $p < 0,01$] (**Figura 24 A**).

Da mesma forma, os grupos de animais que receberam a administração oral de riparina I, nas doses de 25 ou 50 mg/kg, seguida da administração de pentobarbital, apresentaram um menor tempo de latência do sono e um maior tempo de duração do sono em comparação ao grupo controle: [(LS) Veículo + PB-40 $429 \pm 32,61$ (10); Rip I-25 + PB-40: $307,5 \pm 17,76$ (12); Rip I-50 + PB-40: $277,9 \pm 15,17$ (12), $p < 0,001$] (**Figura 23 B**) e [(DS) Veículo + PB-40 $1564 \pm 157,9$, (8); Rip I-25 + PB-40: $2539 \pm 301,5$ (10), $p < 0,05$; Rip I-50 + PB-40: $2805 \pm 309,4$ (8), $p < 0,05$] (**Figura 24 B**).

Conforme o esperado, a administração de diazepam, 1 mg/kg, i.p., seguida de pentobarbital, alterou os parâmetros de forma significativa, reduzindo o tempo de latência de sono [DZP-1+ PB-40: $187,6 \pm 9,24$ (10)] e aumentando a duração do sono [DZP-1 + PB-40: $4327,0 \pm 435,9$ (10)] em relação aos grupos controle i.p. e v.o (**Figuras 23 e 24**).

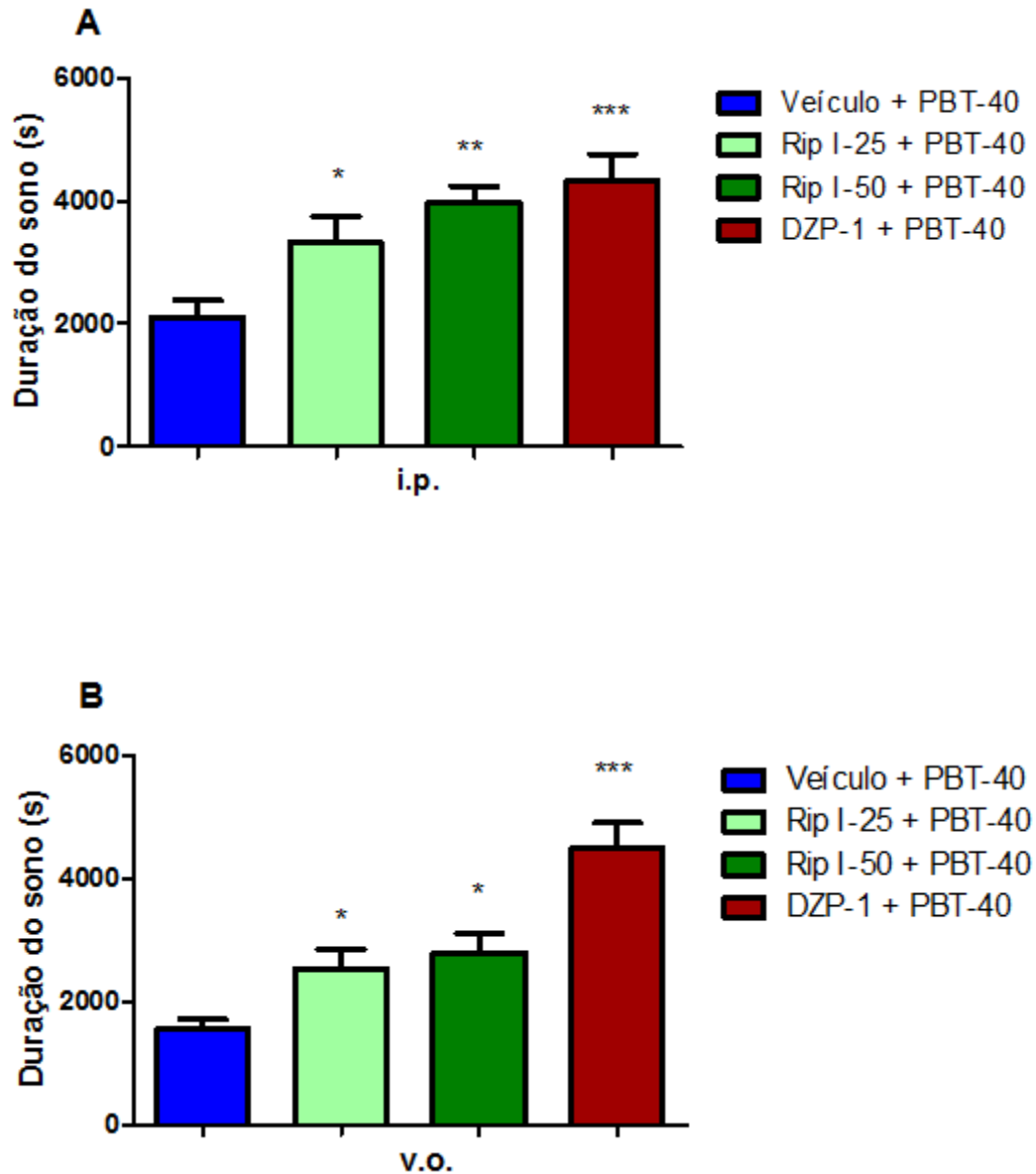
FIGURA 23 - Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a latência do sono no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital.



Veículo /controle (água destilada em 3% de Tween 80), riparina I (RipI; 25 e 50 mg/kg) e diazepam (DZP; 1 mg/kg) administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores representam a média \pm

EPM da latência do sono (s). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle).

FIGURA 24 - Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a duração do sono no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital.



Veículo/controle (água destilada em 3% de Tween 80), riparina I (RipI; 25 e 50 mg/kg) e diazepam (DZP; 1 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média \pm E.P.M. da duração do sono (s). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle).

5.5.2 Teste da Convulsão induzida por Pentilenotetrazol

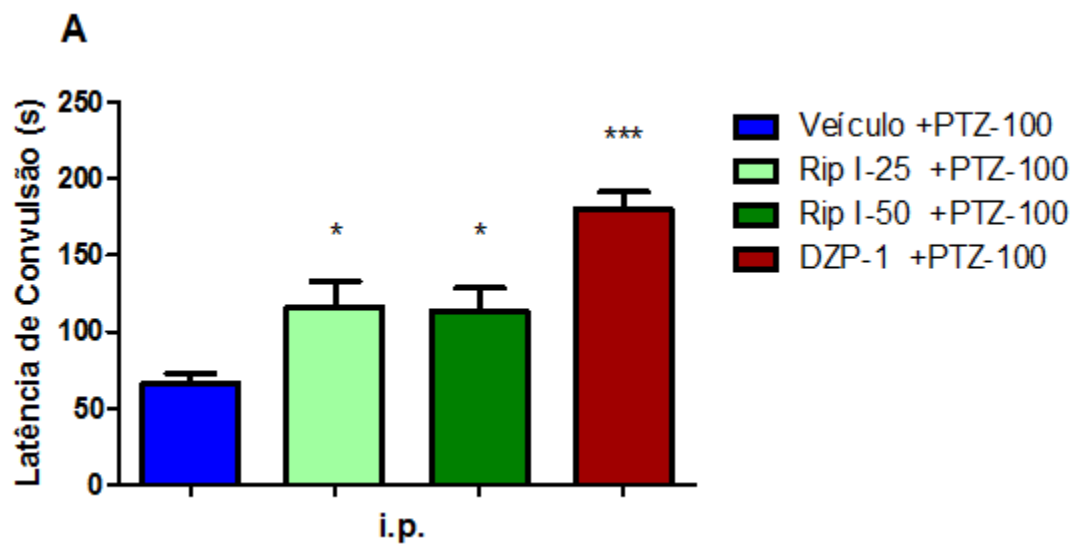
O pré-tratamento de animais com riparina I, em ambas as doses e vias, promoveu um aumento significativo da latência das convulsões (LC) em comparação ao pré-tratamento de camundongos com veículo : [i.p.:(LC) Veículo + PTZ: $66,38 \pm 6,030$ (9); Rip I-25 + PTZ: $116,1 \pm 16,31$ (12), $p < 0,05$; Rip I-50 +PTZ: $113,7 \pm 14,79$ (11), $p < 0,05$] e [v.o.:(LC) Veículo + PTZ: $60,78 \pm 7,084$ (12); Rip I-25 + PTZ: $90,45 \pm 5,141$ (7), $p < 0,05$; Rip I-50 +PTZ: $89,00 \pm 5,247$ (8), $p < 0,05$] (**Figura 25 A e B**).

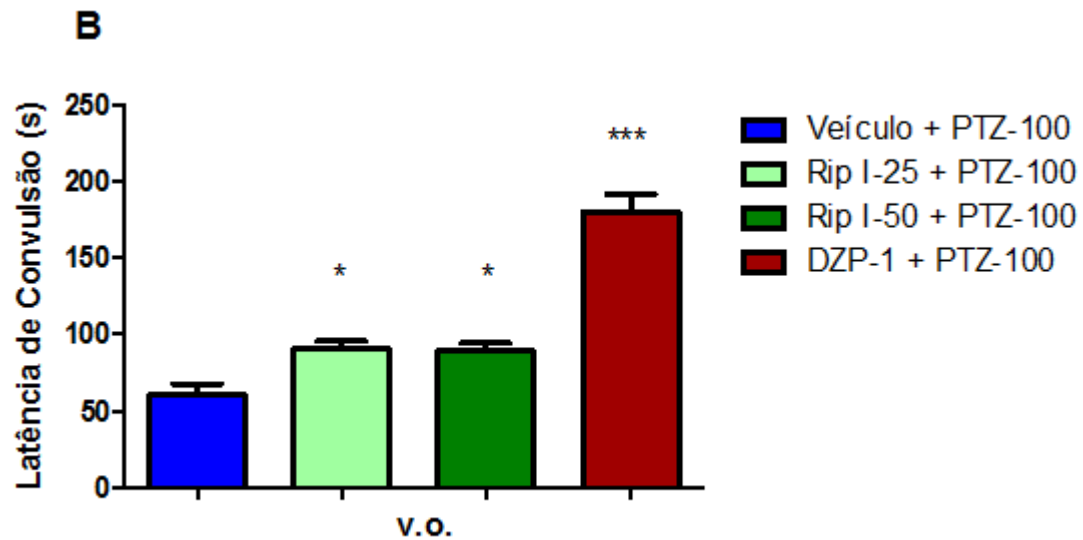
Por sua vez, o pré-tratamento com riparina I, em ambas as doses e vias, induziu o aumento significativo da latência de morte [i.p. :(LM): Veículo + PTZ: $418,0 \pm 45,37$ (10); Rip I-25 + PTZ: $949,1 \pm 177,1$ (12), $p < 0,05$; Rip I-50 +PTZ: $1252 \pm 221,9$ (11), $p < 0,01$] e [v.o.: (LM): Veículo + PTZ: $127,5 \pm 16,36$ (12); Rip I-25 + PTZ: $222,2 \pm 28,41$ (7), $p < 0,05$; Rip I-50 +PTZ: $237,2 \pm 27,90$ (8), $p < 0,05$] (**Figura 26 A e B**).

De acordo com o esperado, o diazepam, 1 mg/kg, aumentou a latência da convulsão [DZP-1: $180,1 \pm 11,16$ (10)] comparando com os controles i.p. e v.o. (**Figuras 25 e 26**).

A percentagem de sobrevivência dos animais tratados com riparina I, por via intraperitoneal, foi de 20% na dose de 25 mg/kg e de 50% na dose de 50 mg/kg . Contudo, os animais tratados por via oral não sobreviveram, contrastando com o alto índice de sobrevivência do grupo tratado com diazepam, ou seja, 100% .

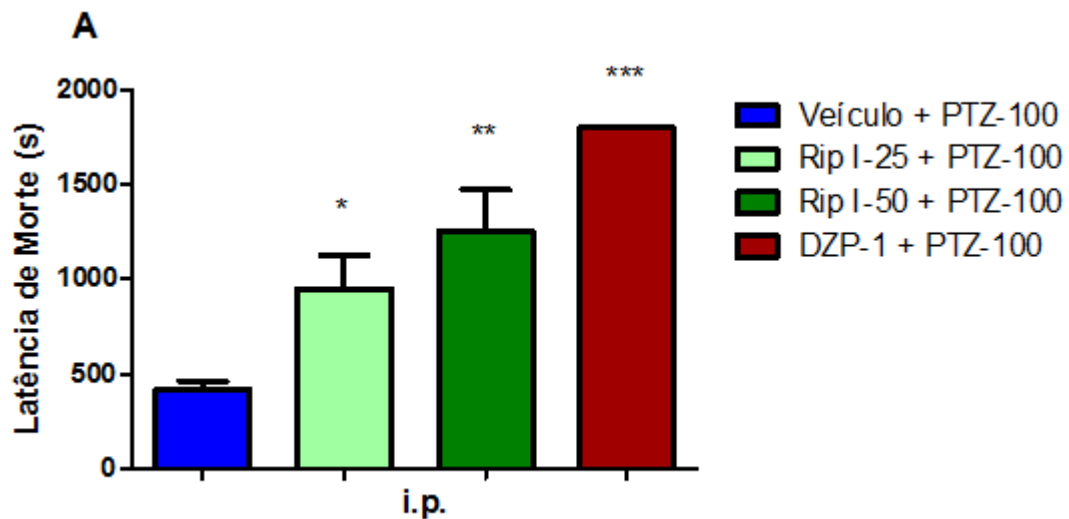
FIGURA 25 - Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a latência das convulsões no Teste da Convulsão induzida por Pentilenotetrazol.

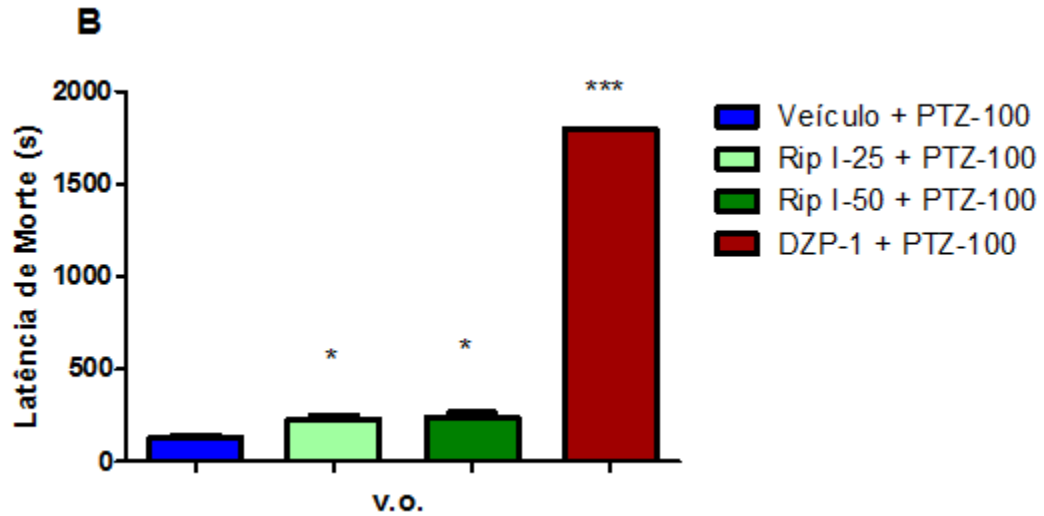




Veículo/controle (água destilada em 3% de Tween 80), riparina I (RipI; 25 e 50 mg/kg) e diazepam (DZP; 1 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média \pm E.P.M. da latência da convulsão (s). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle).

FIGURA 26 - Efeito da riparina I, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a latência de morte no Teste da Convulsão induzida por Pentilenotetrazol.





Veículo (controle), riparina I (RipI; 25 e 50 mg/kg) e diazepam (DZP; 1 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a média \pm E.P.M. da latência de morte (s). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A medicina popular, baseada no uso de plantas, desfruta de uma posição respeitável, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a disponibilidade de serviços de saúde modernos é limitado (AGRA *et al.*, 2007). Conforme Silva (2010) e Calixto, (2003), considerável porcentagem da população utiliza plantas medicinais nos cuidados primários de saúde, o que torna perceptível o acentuado interesse na incorporação do uso destas pela medicina convencional.

Mas as supostas propriedades terapêuticas desses produtos precisam possuir validade científica para serem prescritos pela comunidade médica como produtos fitoterápicos, sendo, portanto imprescindíveis a investigação científica e a comprovação de segurança e eficácia (SANTOS *et al.*, 2007). Diante do exposto, é de fundamental importância que haja estudos pré-clínicos de *screening* para investigação de novas substâncias, e posteriormente que sejam

realizados estudos mais aprofundados com relação ao potencial farmacológico e segurança da droga.

O interesse do Laboratório de Neurofarmacologia em pesquisar compostos biologicamente ativos aliado ao fato das riparinas apresentarem em sua estrutura química a tiramina, uma amina simpaticomimética de ação indireta, levou-nos a testar os efeitos centrais da ripárina I em modelos animais comportamentais de ansiedade, depressão, sono e convulsão.

Embora não se possa provar que o animal vivencie a ansiedade da mesma maneira que o ser humano, diferentes modelos comportamentais em roedores permitem avaliar padrões comportamentais bem esclarecidos na literatura. Através da observação de mudanças comportamentais e periféricas, induzidas por situações estressantes, é possível detectar e comparar a ansiedade entre grupos de animais (OHL, 2001). Por isso, ratos e camundongos são expostos a estímulos externos (p.ex. novos ambientes) ou internos (p.ex. substâncias ansiogênicas) capazes de causar comportamentos defensivos que se traduzem por uma inibição comportamental que podem assumir a forma de imobilidade ou de supressão de uma resposta normal (PRUT, 2003; JUNG *et al.*, 2002).

O aparecimento dos benzodiazepínicos (BZP) há mais de quatro décadas contribuiu para uma melhor compreensão das bases neurológicas da ansiedade e mostrou-se efetivo em muitos casos, mas alguns fatores tem direcionado a pesquisa para novos e melhores agentes ansiolíticos. É geralmente aceito que a efetividade dos BZP se restringe apenas aos transtornos generalizados de ansiedade, fobia social e síndrome do pânico, além disso, a administração desse tipo de fármaco pode induzir amnésia anterógrada, tolerância e dependência física (KAPLAN; SADOCK, 2005).

Vários fármacos, provenientes de diversas classes terapêuticas, têm comprovada eficácia no manejo de transtornos ansiosos, entretanto, todas essas substâncias apresentam inconvenientes que também justificam a busca por novos compostos ansiolíticos. Para ilustrar essa situação, ressalta-se a baixa adesão à terapia com antidepressivos entre portadores de transtornos ansiosos, sendo um problema comum e multifatorial, que pode estar associada, por exemplo, à demora do efeito terapêutico e à disfunção sexual (NEMEROFF *et al.*, 2003). A literatura na área apresenta muitos estudos pré-clínicos e clínicos sobre a efetividade de plantas medicinais/fitoterápicos nos transtornos ansiosos (FAUSTINO *et al.*, 2010).

Drogas que reduzem a atividade serotoninérgica central, tais como, a buspirona (agonista parcial do receptor 5-HT_{1A}) e o ondansetron (antagonista 5-HT₃) apresentam efeitos ansiolíticos, mas não causam indução do sono, desviando assim, um pouco a atenção dos benzodiazepínicos clássicos. Por outro lado, outros estudos sugerem que drogas que reduzem a ativação glutamatérgica poderiam ter utilidade em intervenções imediatas sendo possivelmente desprovidos de efeitos sedativos ou indutores de dependência (CAROBREZ *et al.*, 2003).

No presente trabalho foi executado inicialmente uma avaliação do comportamento animal no teste do campo aberto, visto que a literatura demonstra que através dessa análise pode-se inferir a respeito da influência da droga teste sobre o nível de excitabilidade do SNC e dessa forma, visa-se reduzir a probabilidade de resultados falso-positivos em teste posteriores (MANSUR *et al.*, 1971).

Sabe-se, por exemplo, que a diminuição da ALE pode estar relacionada à sedação resultante da depressão do SNC (OZTURK *et al.*, 1996; PEREZ *et al.*, 1998) , enquanto que o aumento desse parâmetro pode estar associado a um efeito psicoestimulante. Substâncias psicoestimulantes, tais como a anfetamina e a cafeína, promovem aumento da ALE em animais e humanos gerando resultados falso-positivos em testes para avaliação de atividades ansiolítica e antidepressiva (PELLOW *et al.*, 1985; MUELLER *et al.*, 1989).

Diante do exposto, pode-se enfatizar que no presente estudo os efeitos observados após a administração de riparina I nos testes comportamentais de ansiedade e depressão não são resultado de interferência sobre a atividade locomotora, visto que a administração da substância teste não alterou a ALE dos animais no teste do campo aberto. Diferentemente disso, o diazepam, na dose de 2 mg/kg diminuiu a ALE no teste do campo aberto mostrando seu potencial efeito sedativo nesta dose. Vale ainda ressaltar que o fato dos efeitos ansiolíticos e antidepressivos da riparina I não serem acompanhados de um efeito sedativo no campo aberto, aumenta o interesse sobre essa substância, visto que a sedação é uma característica comum e indesejável da maioria dos ansiolíticos disponíveis.

Além da ALE, o *rearing* e o *grooming* também foram observados no teste do campo aberto. A atividade de *rearing* em roedores é descrita como um comportamento estereotipado complexo (DANDIYA *et al.*, 1969), sendo um parâmetro de interpretação variável na literatura. Alguns autores descrevem que o *rearing* reflete um comportamento exploratório do animal

(JOHANSSON; AHLENIUS, 1989) e, portanto a administração de substâncias ansiolíticas poderiam induzir um aumento da atividade de *rearing* ou não alterá-la (YOUNG; JOHNSON, 1991). Por outro lado, alguns estudiosos relacionam tal parâmetro com os níveis de excitabilidade do SNC e sugerem que a administração de agentes ansiolíticos e sedativos diminuem o *rearing* (CUNHA; MASUR, 1978; HUGHES, 1972).

Neste trabalho, a administração de riparina I nas doses e vias testadas não reduziu o número de *rearing*. Enquanto que a administração de diazepam na dose de 2 mg/kg reduziu esse parâmetro, demonstrando que em uma dose sedativa este parâmetro é significativamente diminuído. Desse modo, nossos resultados nos fazem sugerir que o efeito induzido pela riparina I no LCE e placa perfurada não são sedativas o suficiente para alterar o comportamento de *rearing* no campo aberto.

Com relação ao *grooming*, a literatura refere que o aumento deste comportamento pode ser observado em roedores apreensivos (ARCHER, 1973), e em um grande número de estudos, pesquisadores observaram que a administração de drogas ansiolíticas reduzem este parâmetro no teste do campo aberto (BARROS *et al.*, 1994; DUNN *et al.*, 1981; MOODY *et al.*, 1993). Em nosso estudo, houve uma redução significativa do número de *grooming* induzida pela administração de riparina I, em ambas as doses e vias utilizadas, sugerindo a atividade ansiolítica da riparina I.

A fim de reduzir viés, adotaram-se no presente estudo algumas medidas durante a execução do teste do campo aberto que tem como premissa a aversão de roedores à ambientes desconhecidos e desprotegidos (BARNETT, 1975; TREIT; FUNDYTUS, 1989). Tendo em vista que nos experimentos onde há uma área definida, como no campo aberto, os roedores tipicamente começam a explorar a região próxima às paredes, evitando a parte aberta, iniciou-se o teste colocando o animal no centro da área. Outro ponto causador de estresse é o nível de iluminação do ambiente, sendo uma área clara mais aversiva para roedores, portanto produzindo uma aversão mais pronunciada do que uma área escura. Dessa maneira, em nossos experimentos, os animais foram colocados em uma sala fechada fracamente iluminada com uma luz vermelha de 15W.

Considerando que um déficit na coordenação motora poderia afetar o desempenho dos animais nos modelos de ansiedade e depressão, foi também investigado os efeitos da riparina I no teste da barra giratória, *rota rod*. Este teste proposto por Dunham e Miya, (1957) avalia o

potencial efeito de relaxamento muscular ou incoordenação motora de substâncias (CARLINI; BURGOS, 1979). Quanto mais intenso for o efeito relaxante muscular menos tempo o animal conseguirá se equilibrar sobre a barra giratória. Ressalta-se, no entanto, que se trata de um método não-específico, uma vez que mede indistintamente, efeitos neurológicos, estimulantes e depressores sobre a coordenação motora, aos quais também é atribuído o termo neurotoxicidade (DALLMEIER; CARLINI, 1981).

No presente estudo, a riparina I não alterou a coordenação motora no teste do *rota rod*, nas doses e vias utilizadas, diferenciando-se do diazepam, que na dose de 2 mg/kg apresentou significativo efeito relaxante muscular, visto que diminuiu o tempo de permanência na barra (PEREZ *et al.*, 1998; AMOS *et al.*, 2001). Estes resultados indicam que as ações da riparina I, provavelmente, são desprovidas de efeito relaxante muscular, mas resultantes de uma possível ação central.

A investigação sobre o potencial efeito ansiolítico da riparina I teve sequência com a exposição de camundongos aos aparatos labirinto em cruz elevado (LCE) e placa perfurada (PP). A premissa desses testes basea-se na aversão que roedores têm a locais elevados, abertos e desconhecidos, o que tende a afastá-los, pois são considerados instintivamente locais potencialmente perigosos. Portanto, quanto mais os animais se expõem a situações consideradas perigosas, isto é, aos braços abertos do LCE e aos orifícios da placa perfurada, supõe-se que menos “ansiosos” estarão. (TREIT *et al.*, 1993; BOISSIER; SIMON, 1962).

No teste da placa perfurada avaliamos o comportamento exploratório dos roedores através do parâmetro número de imersões (*head dips*). Neste modelo, doses não-sedativas de benzodiazepínicos e outras drogas ansiolíticas, aumentam o número de *head dips* dos camundongos. Por outro lado, a redução do comportamento de *head dip* pode refletir um estado ansiogênico do animal. Dessa forma, ambos os estados ansiolítico e ansiogênico podem ser avaliados usando o referido teste comportamental (CRAWLEY, 1985; FILE; WARDILL, 1975; TAKEDA *et al.*, 1998).

O LCE foi usado para confirmar o efeito ansiolítico da riparina I evidenciado anteriormente nos teste do campo aberto e da placa perfurada. No referido modelo, é esperado que animais não tratados com ansiolíticos gastem mais tempo nos braços fechados devido a ansiedade filogeneticamente determinada (TREIT *et al.*, 1993). O modelo em questão é mais

popular para pesquisas de novos agentes ansiolíticos do tipo benzodiazepínicos, haja vista sua sensibilidade em detectar efeitos ansiolíticos de drogas que agem no receptor $GABA_A$ /Benzodiazepínico. De fato, vários estudos demonstram diferenças de resultados entre o diazepam, um benzodiazepínico, e a bupirona, um agonista serotoninérgico parcial, sobre o aparato LCE. Enquanto que o DZP produz efeitos ansiolíticos sobre no referido teste, a bupirona apresenta resultados muito variáveis (PELOW *et al.*, 1985; RODGERS *et al.*, 1997; ZANGROSSI *et al.*, 1997).

Em nosso estudo, conforme o esperado, o diazepam, aumentou de forma significativa todos os parâmetros indicativos de efeito ansiolítico e a administração de riparina I em ambas as doses e vias testadas promoveu um efeito ansiolítico no LCE e na PP que não é influenciado por alterações na atividade locomotora, conforme evidenciado anteriormente no teste do campo aberto, descartando a possibilidade de falsos positivos nestes testes.

Considerando o potencial efeito ansiolítico da riparina I apresentado no LCE e PP, resolvemos investigar o possível envolvimento do sistema gabaérgico neste efeito. Para isto escolheu-se pré-tratar os animais com flumazenil e utilizar o aparato LCE por este ser mais sensível na triagem de drogas ansiolíticas do tipo benzodiazepínicas (PELOW *et al.* 1985; RODGERS *et al.* 1997). De acordo com trabalhos anteriores, a administração de flumazenil, antagonista competitivo do receptor $GABA_A$ /Benzodiazepínico, é capaz de prevenir no LCE os efeitos ansiolíticos do diazepam e de drogas com mecanismos de ação similares (MELO *et al.*, 2009; DE ALMEIDA *et al.*, 2012).

A análise dos resultados indicou que o flumazenil reverteu o efeito ansiolítico da riparina I em todos os parâmetros analisados, do mesmo modo que reverteu os efeitos do diazepam, sugerindo assim, que a administração de riparina I desencadeia um efeito ansiolítico, e, este efeito parece estar relacionado com o sistema gabaérgico, mais especificamente com os receptores $GABA_A$ /Benzodiazepínico.

Segundo a literatura, os benzodiazepínicos agem como ansiolíticos e anticonvulsivantes em doses mais baixas do que àquelas necessárias para gerar um efeito hipnótico e relaxante muscular (ONAIVI *et al.*, 1992; WOLFFGRAMM *et al.*, 1994). Em nosso estudo, foram utilizadas doses mais elevadas (2 mg/kg) de diazepam nos testes do campo aberto e do *rota Rod* por causar efeito sedativo e interferir na atividade locomotora causando relaxamento muscular.

Nos testes da placa perfurada e LCE, a dose utilizada foi de 1 mg/kg para evidenciar o seu efeito ansiolítico. Baseado no fato de que o diazepam possui efeito ansiolítico e também apresenta efeito sedativo, resolvemos verificar o efeito sedativo/hipnótico da riparina I no teste do tempo do sono induzido por pentobarbital e o efeito anticonvulsivante no teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol.

O teste do tempo de sono induzido por pentobarbital nos permite verificar se determinada droga teste é capaz de potencializar o efeito depressor do pentobarbital sódico. Na literatura consta que a diminuição da latência do sono e o aumento da duração do sono são desencadeados classicamente por drogas depressoras do SNC (WILLIANSO *et al.*, 1996). Entretanto este teste não é específico visto que drogas desprovidas de ação central também apresentem resultados positivos nesse teste, como por exemplo a adrenalina e a histamina, ou mesmo inibidores do metabolismo do pentobarbital como o dactylyne, extraído da *Aplysia dactylomela* (RILEY; SPINKS, 1958; KAUL; KULKARNI, 1978).

No presente trabalho foi detectado que após a administração da riparina I, em ambas doses e vias testadas, e de pentobarbital houve uma diminuição da latência do sono e um aumento da duração do sono em relação ao grupo controle, indicando que neste teste possivelmente houve uma somatória de efeitos depressores centrais desencadeados pelas duas substâncias. No entanto, a administração isolada de riparina I, nas doses de 25 e 50 mg/kg, parece não deprimir o SNC a ponto de causar efeito hipnótico, é o que sugere nossos resultados do campo aberto, onde foi constatado que a riparina I não altera a atividade locomotora espontânea em relação ao controle. Assim, é possível que a riparina I, por si só, não apresente um potencial hipnótico nas doses administradas, mas como se trata, provavelmente, de uma droga que age em receptores GABA_A/Benzodiazepínico esta interação pode ter contribuído para uma potenciação do efeito depressor central induzido pelo pentobarbital.

As convulsões são resultado de descargas neuronais excessivas e sincrônicas provocadas por estímulo excitatório, mediado principalmente pelo glutamato, o principal neurotransmissor excitatório, mas também podem ser devidas a uma insuficiente inibição mediada pelo neurotransmissor inibitório GABA (YACUBIAN, 2008). Àquelas do tipo tônico-clônica generalizadas podem ser observadas em animais após a administração de drogas convulsivantes com o objetivo de auxiliar na triagem de substâncias anticonvulsivantes (SWINYARD, 1949; SWINYARD *et al.*, 1952).

O PTZ é um derivado tetrazólico com ação convulsivante extensamente utilizado no rastreamento de agentes anticonvulsivantes em animais. Essa substância atua de forma semelhante a bicuculina, induzindo convulsões por inibir canais de íons cloreto associados a receptores GABA_A (LOWSON et al., 1991; STONE, 1970). De maneira geral, o PTZ permite a identificação eficaz de compostos contra crises de ausência e permite uma avaliação genérica do potencial anticonvulsivante de uma droga que atue em receptores GABA_A (KUPFERBERG; SCHMUTZ, 1997), como o diazepam, por exemplo.

No presente trabalho, como esperado, o tratamento com diazepam aumentou a latência da convulsão e gerou 100% de sobrevivência dos animais, confirmando seu efeito anticonvulsivante. A administração de riparina I aumentou a latência da convulsão e a latência de morte, em ambas vias e doses utilizadas, e gerou uma percentagem de sobrevivência de 20% na dose de 25 mg/kg e de 50% na dose de 50 mg/kg, por via intraperitoneal, indicativos de um possível efeito anticonvulsivante. Este efeito pode estar relacionado com o sistema gabaérgico, como nos fez sugerir a análise dos dados obtidos no teste do labirinto em cruz elevado quando confirmamos o envolvimento do receptor GABA_A/Benzodiazepínico após a administração de flumazenil.

Adiante, investigamos o possível efeito antidepressivo da riparina I nos testes suspensão da cauda e nado forçado. Essa investigação foi impulsionada por três motivos: o primeiro está relacionado à alta incidência mundial de casos de depressão; o segundo, à heterogeneidade da resposta clínica às drogas antidepressivas e estabilizadoras do humor atualmente disponíveis e, o terceiro, à susceptibilidade aos efeitos adversos (LERER; MACCIARDI, 2002).

Os dois modelos animais em questão, TSC e TNF, são os mais amplamente utilizados para *screening* de drogas com efeito antidepressivo (BASSO et al., 2009; FRANKOWSKA et al., 2007), e apresentam facilidade de uso, confiabilidade, especificidade e sensibilidade à administração aguda de antidepressivos (HENNINGSEN *et al.*, 2009).

Nestes modelos, os animais são expostos a situações estressantes e inescapáveis que geram um comportamento inicial de luta/fuga. Esse comportamento tende a diminuir ao longo do experimento, sendo alternado com períodos de imobilidade. Considera-se que esta imobilidade está relacionada a um comportamento de desespero e depressão mental. Portanto, a diminuição significativa do tempo de imobilidade de um grupo padrão-positivo ou teste em relação ao grupo controle, sugere uma resposta antidepressiva (STERU *et al.* 1985).

Estudos têm demonstrado que a exposição a eventos estressantes aumentam a vulnerabilidade a depressão. Aparentemente, a exposição ao estresse tem por consequência um efeito neurotóxico sobre o hipocampo, provavelmente mediado pelo aumento de glicocorticóides, que predispõe ao desenvolvimento da depressão (MCEWEN, 2000, BROWN *et al.*, 1999, HENNINGSEN *et al.*, 2009).

Os modelos agudos de depressão são induzidos rapidamente em uma ou duas sessões e podem responder à administração aguda ou subcrônica de antidepressivos (KITADA *et al.*, 1981). Em nosso estudo, assim como outros (MELO *et al.*, 2011, GOMES *et al.*, 2011) a depressão foi induzida em apenas uma sessão.

Embora permaneça controversa a relação entre a imobilidade animal desencadeada nos modelos e a depressão humana, uma grande variedade de compostos antidepressivos e com potencial antidepressivo reduzem o tempo de imobilidade nos testes de TSC e TNF (MELO *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011). Além disso, demonstrou-se em outro estudo que camundongos geneticamente modificados que apresentavam supressão da enzima monoamino oxidase (MAO) tiveram uma diminuição significativa no tempo de imobilidade no TNF em relação aos animais do grupo controle, fato que fortalece a relação entre a imobilidade animal e a depressão humana (CASES *et al.*, 1995).

Em nosso estudo, demonstrou-se no TSC que a administração de riparina I, em ambas as doses e vias utilizadas, diminuiu de forma significativa o tempo de imobilidade indicando o potencial efeito antidepressivo da substância teste. Para corroborar com esses resultados, foi realizado o TNF.

O TNF parece ser mais sensível em detectar drogas com atividade antidepressiva que o TSC, pois doses menores de antidepressivos, como imipramina 10mg/kg e fluoxetina 35 mg/kg, são suficientes para desencadear um efeito antidepressivo (THIERRY *et al.*, 1986; CRYAN *et al.*, 2005).

No presente estudo, a administração de riparina I diminuiu significativamente o tempo de imobilidade em ambas as vias e doses utilizadas no TNF, confirmando o efeito antidepressivo observado no TSC. A imipramina (10 mg/kg) usada como padrão positivo também desencadeou diminuição do tempo de imobilidade nesse teste, conforme o esperado.

A redução do tempo de imobilidade desencadeado pela administração da substância teste nos modelos TSC e TNF parece não estar relacionada com um aumento da atividade locomotora,

mas sim com um efeito antidepressivo, pois nessas doses não foi observado alteração da atividade locomotora espontânea dos animais no teste do campo aberto.

A fim de se investigar o possível envolvimento do sistema monoaminérgico no efeito antidepressivo disparado pela droga teste, submetemos os animais ao TNF após a administração combinada de riparina I com antagonistas farmacológicos da transmissão monoaminérgica. A dose de riparina I escolhida para a realização dos estudos dos mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo foi a de 50 mg/kg, visto que as duas doses da substância teste desencadearam efeitos antidepressivo semelhantes.

Sabe-se que o sistema monoaminérgico é um dos mais importantes alvos na fisiopatologia e tratamento da depressão. Esta desordem tem sido associada à deficiência funcional da neurotransmissão monoaminérgica e, atualmente, a maioria dos antidepressivos usados na clínica exercem seus efeitos primários através de regulação das concentrações sinápticas desses neurotransmissores (KULKARNI *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2009).

Estudos demonstram que o sistema dopaminérgico desempenha um papel na regulação do humor (DAILLY *et al.*, 2004) e que a potenciação da neurotransmissão dopaminérgica induzida por tratamentos antidepressivos crônicos pode contribuir para o seu efeito terapêutico (D'AQUILA *et al.*, 2000). Além disso, há também uma quantidade considerável de evidências farmacológicas sobre a eficácia dos antidepressivos com efeitos dopaminérgicos no tratamento da depressão (PAPAKOSTAS, 2004).

Para verificar a possível participação do sistema dopaminérgico na mediação do efeito antidepressivo da riparina I, pré-tratamos diferentes grupos com SCH23390 (antagonista dos receptores dopaminérgicos do tipo D₁) ou com sulpirida (antagonista dos receptores dopaminérgicos do tipo D₂) e, posteriormente, administramos nestes mesmos grupos de animais a riparina I, por via oral. Pode-se observar em seguida que o tempo de imobilidade no TNF foi significativamente maior naqueles grupos pré-tratados com os antagonistas dos receptores D₁ ou D₂ do que nos grupos tratados apenas com riparina I. A análise deste resultado nos faz sugerir que o efeito antidepressivo da riparina I, assim como o da bupropiona, depende da disponibilidade dos receptores D₁ e D₂. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que indicam que ambos os receptores D₁ e D₂ podem desempenhar um papel na depressão (YAMADA *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Em paralelo com o sistema dopaminérgico, o sistema noradrenérgico também tem sido alvo valioso de antidepressivos. A depressão parece estar associada, pelo menos em parte, a uma hipofunção do sistema noradrenérgico, e alguns antidepressivos agem aumentando a disponibilidade sináptica de norepinefrina (ELHWUEGI, 2004; TAYLOR, 2005). Estudiosos demonstraram uma possível participação dos adrenorreceptores α_1 e α_2 na mediação de respostas à drogas antidepressivas em modelos de depressão (KITADA *et al.*, 1983; DANYSZ *et al.*, 1986; MASUDA *et al.*, 2001, MELO *et al.*, 2011). No presente estudo, o pré-tratamento de camundongos com prazosina (antagonista α_1 -adrenérgico) e ioimbina (antagonista α_2 -adrenérgico) foi capaz de reverter o efeito antidepressivo da riparina I. Estes resultados indicam que a droga teste pode exercer o seu efeito no TNF, pelo menos em parte, ao interagir com adrenorreceptores α_1 e α_2 .

Conforme o grande número de estudos experimentais e clínicos demonstra, o sistema serotoninérgico está fortemente associado à regulação neural do humor e, anormalidades na neurotransmissão serotoninérgica estão presentes na patofisiologia da depressão (WONG; LICINIO, 2001). De fato, drogas que afetam a neurotransmissão serotoninérgica, como os inibidores da recaptação de 5-HT nos terminais nervosos e os inibidores do metabolismo das monoaminas (Inibidores da MAO) são eficazes no tratamento da depressão (WONG; LICINIO, 2001; ELHWUEGI, 2004). Neste sentido, decidimos também elucidar o possível envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo de riparina I.

O PCPA, inibidor da triptofano hidroxilase, foi administrado por quatro dias consecutivos, na dose de 100 mg/kg. Estudos têm demonstrado que a administração do PCPA em camundongos reduz as reservas endógenas de 5-HT em 60%, sem alterar os níveis de noradrenalina e dopamina (WANG *et al.*, 2008).

Em nosso estudo, o pré-tratamento dos animais com PCPA, reverteu o efeito anti-imobilidade da riparina I no TNF. Devido a este resultado, sugerimos que a ação antidepressiva da substância teste está relacionada, pelo menos em parte, com a ativação central de receptores serotoninérgicos. Diante do exposto, investigamos a possível participação de alguns receptores serotoninérgicos no efeito anti-imobilidade observado no TNF.

Dessa forma, demonstrou-se que o efeito anti-imobilidade induzido pela droga teste foi bloqueado pelo pré-tratamento com ritanserina (antagonista do receptor 5-HT_{2A/2C}) mas não pelo pré-tratamento com WAY (antagonista do receptor 5-HT_{1A}) ou com ondansetron (antagonista

receptor 5-HT₃). Este resultado indica que os receptores 5-HT_{2A/2C} estão envolvidos no mecanismo de ação da riparina I, mas não os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₃. Outras pesquisas também mostraram evidências do envolvimento de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/C} no efeito antidepressivo de substâncias corroborando com nossos resultados (ELHWUEGI, 2004; JESSE *et al.*, 2010).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação dos efeitos farmacológicos centrais relacionados à administração aguda de riparina I em camundongos permitiu elaborar as seguintes considerações finais:

- ✓ No teste do campo aberto, não alterou a atividade locomotora espontânea dos animais e nem o *rearing*, mas diminuiu o *grooming*, sugerindo ação ansiolítica.

- ✓ No teste do *rota rod*, foi desprovida de efeito relaxante muscular.

- ✓ No teste do labirinto em cruz elevado e placa perfurada, testes clássicos para o estudo de substâncias com potencial ansiolítico, aumentou todos os parâmetros analisados sugerindo uma possível ação ansiolítica, corroborando com o resultado do *grooming*.

- ✓ A ação ansiolítica, desprovida de ação sedativa, parece estar relacionada com o receptor GABA_A/Benzodiazepínico, visto que este efeito foi revertido pelo flumazenil, antagonista benzodiazepínico.

- ✓ Apresentou um efeito antidepressivo em dois modelos animais clássicos preditivos de propriedades antidepressivas: teste do nado forçado e teste da suspensão da cauda.

- ✓ O efeito antidepressivo não está relacionado com um efeito psicoestimulante e parece ser mediada, pelo menos em parte, por uma interação com os sistemas dopaminérgico (receptores D₁ e D₂), noradrenérgico (receptores α_1 e α_2) e serotoninérgico (receptor 5-HT_{2A/2C}).

- ✓ No teste do tempo de sono induzido por pentobarbital, reduziu o tempo de latência de sono e aumentou a duração do sono, sugerindo uma ação potencializadora do efeito do

barbitúrico. Entretanto, acerca deste teste, mais estudos devem ser realizados, considerando sua inespecificidade.

✓ No teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol, a riparina I aumentou as latências de convulsão e de morte, sugerindo assim um possível efeito anticonvulsivante, que pode estar relacionado com o sistema gabaérgico devido a sua interação com o receptor GABA_A/Benzodiazepínico, como visualizado no teste do labirinto em cruz elevado.

*CONCLUSÕES***8 CONCLUSÕES**

Em suma, através da análise comportamental apresentada no presente trabalho, demonstrou-se que a administração da riparina I nas doses de 25 e 50 mg/kg produziu um efeito ansiolítico, anticonvulsivante e potencializador do tempo de sono barbitúrico e que nestas mesmas doses não apresentou efeito estimulante motor ou relaxante muscular. Além disso, a riparina I demonstrou um efeito antidepressivo em dois modelos animais clássicos preditivos de propriedades antidepressivas (TSC e TNF) e esta ação não está relacionada a um efeito psicoestimulante, mas parece ser mediada, pelo menos em parte, a interação com os sistemas dopaminérgico (receptores D_1 e D_2), noradrenérgico (receptores α_1 e α_2) e serotoninérgico (receptores 5-HT_{2A/2C}).

Esse estudo, portanto, fornece evidências experimentais e abre perspectivas para estudos posteriores que podem culminar com uma futura utilização terapêutica da riparina I no tratamento em quadros de depressão, ansiedade, insônia e convulsão. Entretanto, estudos posteriores mais aprofundados far-se-ão necessários para confirmar os mecanismos envolvidos nos efeitos apresentados pela riparina I, como por exemplo, dosagem da concentração de monoaminas e metabólitos e também estudos de *binding*, entre outros.

REFERÊNCIAS

- ALLEN K.L., WALDVOGEL H.J., GLASS M., FAULL R.L. Cannabinoid (CB(1)), GABA(A) and GABA(B) receptor subunit changes in the globus pallidus in Huntington's disease. **J Chem Neuroanat.** V.37(4), pp. 266-81, 2009.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders - DSM-IV. 4 th ed. Washington, DC: APA; 1994.
- AMOS, S.; ADZU, B.; BINDA, L.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Neuropharmacological effect of the aqueous extract of *Sphaeranthus senegalensis* in mice. **J. Ethnopharmacology**, v. 78, p. 33-37, 2001.
- ANSSEAU M., DEMYTTENAERE K., HEYRMAN J., MIGEOTTE A., LEYMAN S., MIGNON A. Objective: remission of depression in primary care. **The Oreon Study. European Neuropsychopharmacology**, v. 19 (3), pp. 169-176, 2009.
- ARAÚJO F. L. O., MELO C. T. V., ROCHA N. F. M, MOURA B. A., LEITE C. P., AMARAL J. F., BARBOSA-FILHO J. M., GUTIERREZ S. J. C., VASCONCELOS, S. M. M., VIANA, G. S. B, SOUSA F.C.F.. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 380, pp.337-344. 2012.
- ARAÚJO, I.A. *Beilschmiedia Nees* (Lauraceae) do Estado do Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 59p, 1994.
- ARNT J. Behavioural stimulation is induced by separate dopamine D-1 and D-2 receptor sites in reserpine-pretreated but not in normal rats. **Eur J Pharmacol.** 113(1):79-88, 1985.
- BARBOSA-FILHO, J. M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana. **Cad.Farm.**, v. 13(2), p. 85-102, 1997.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. The tyramines of *Aniba riparia*: transformation into models of natural products. **Ver. Latinoamr. Quim.**, v. 21, p. 5-7, 1990.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R.; BARBOSA, R.C.S.B.C.; GIESBRECHT, A.M.; YOUNG, C.M. Benzoyl Esters and Amides, Styrylpyrones and Neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**. v. 26, p. 2615-7, 1987.
- BARROSO, G.M.; GUIMARÃES, E.F.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; PEIXOTO, A. L. Sistemática das Angiospermas do Brasil. EDUSP, São Paulo, (1ª ed.), v.1., 255p, 1978.
- BASSO A.M., BRATCHER N.A., HARRIS R.R., JARVIS M.F, DECKER M.W., RUETER L.E. Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders. **Behav Brain Res.** 2;198(1):83-90; 2009.
- BERMAN RM, MARCUS RN, SWANINK R, ET AL. The efficacy and safety of aripiprazole as adjunctive therapy in major depressive disorder: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J Clin Psychiatry**; v. 68(6), pp. 843-53; 2007.

BEUTLER, J. A. Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. **Curr Protoc Pharmacol**.v. 46, pp. 1–30, . 2009.

BRANDÃO, M.L. As Bases Biológicas do Comportamento: Introdução à neurociência, 2008.

BROWN ES, RUSH AJ, MCEWEN B. Hippocampal remodelling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders. **Neuropsychopharmacol**; 21(4):474-84, 1999.

CALIXTO, JB. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc. Cult*, v.55, 3, 2003.

CARLINI, E. A., MENDES, F. R. Modelos animais para o estudo de drogas ansiolíticas. In ____ Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental. 1ª. Ed. São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011, Cap.6. P159-179.

CARLINI, E.A.; BURGOS, V. *Screening* farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v. 1, p. 25-31, 1979.

CARLSON E.E. Natural Products as Chemical Probes. **ACS Chem Biol**, v. 5, pp. 639–653, 2010.

CAROBREZ, Antonio de Pádua. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, 2003 .

CARR, G.V.; LUCKI, I. The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies. **Psychopharmacol** (Berl); v. 213(2-3), pp. 265–287. 2011.

CARVALHO, Alyne Mara Rodrigues de. Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatório da riparina II (O-Metil-N-2-Hidroxi-Benzoil Tiramina) em modelos experimentais. 91 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2011.

CASES O, SEIF I, GRIMSBY J, GASPAR P, CHEN K, POURNIN S, MÜLLER U, AGUET M, BABINET C, SHIH JC, et al. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. **Science**. 23;268(5218):1763-6, 1995.

CASSANO P, LATTANZI L, SOLDANI F, NAVARI S, BATTISTINI G, GEMIGNANI A, CASSANO GB. Depression: an extended follow-up. **Depress anxiety**; v. 20 (3), pp.131-8, 2004.

CASTELO-BRANCO, U.J.V. Estudos Farmacológicos do Éter Metílico de N-(2,6-dihydroxibenzoyl)-tyramine. Dissertação (Mestrado – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1992.

CASTELO-BRANCO, U.J.V.; THOMAS, G.; ARAÚJO, C.C.; BARBOSA-FILHO, J.M. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v.19(3), p. 197-202, 2000.

CATÃO, R.M.R; BARBOSA-FILHO, J.M; GUTIERREZ, S.J.C.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multiresistentes. **RABC**, v. 34 (4), pp.247-249, 2005.

CHERNOLOZ O, EL MANSARI M, BLIER P. Electrophysiological studies in the rat brain on the basis for aripiprazole augmentation of antidepressants in major depressive disorder. **Psychopharmacol** (Berl); v. 206, pp. 335-44, 2009.

CLARK, G.; KOSTER, A.G.; PERSON, D.W. *Psychopharmacology*, v. 20, p. 169-71, 1971.
CRAWLEY, J.N. Exploratory behavior models of anxiety in mice. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 9, p. 37-44, 1985.

CRYAN J.F., PAGE M.E., LUCKI I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. Psychopharmacol. V182, 3 , 335-344, 2005.

D'AQUILA P.S., COLLU M., GESSA G.L., SERRA G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. **Eur. J. Pharmacol.** V 405, 365–373, 2000.

DAILLY E., CHENU F., RENARD C.E., BOURIN M. Dopamine, depression and antidepressants. **Fundam. Clin. Pharmacol.** V18, pp 601–607 , 2004.

DALLMEIER, K.; CARLINI, E.A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. **Pharmacol**, v. 22, p. 113-127, 1981.

DE ALMEIDA A.A, COSTA J.P, DE CARVALHO R.B, DE SOUSA D.P, DE FREITAS R.M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. Brain Res. 2012.

DETKE, M.J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behavior in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacol**, v. 121, p. 66-72, 1995.

DIAS, M.L. Atividade antinociceptiva da riparina IV: participação dos receptores TRPV1, TRPM8, receptores glutamatérgicos e do óxido nítrico. Dissertação (mestrado) – Programa de pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

Double-blind, placebo-controlled trial of pramipexole added to mood stabilizers for treatment-resistant bipolar depression. **Psychiatry**; v. 161(3), pp. 564-6, 2004.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v. 46(3), p. 208, 1957.

- ELHWUEGI A.S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**. V28, pp 435–451, 2004.
- ELISABETSKY E. Traditional medicines and the new paradigm of psychotropic drug action. In: Iwu MM, Wootton J, editors. **Ethnomedicine and drugdiscovery**. Amsterdam: Elsevier Science BV; p.133-44, 2002.
- EVANS, W.C. Orders and families of medicinal plants; animal-derived drugs. In: Evans, W.C. Pharmacognosy. (Ed.) Trease and Evans pharmacognosy. 14th ed. Philadelphia: wB Saunders, cap. 2, p.28-55, 1996.
- FAUSTINO, T. T.; ALMEIDA, R. B. de; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v. 32, n. 4, 2010.
- FERNANDES, J.B.; GOTTHEB, O.R.; XAVIER, L.M. Biochem. Syst. Ecol. v. 6, 55p, 1978. FILE, S.E.; WARDILL, A.G. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified holr-board. **Psychopharmacol.**, v. 44, p. 53-59, 1975.
- FLÜGGE G, VAN KAMPEN M, MEYER H, FUCHS E. α 2A and α 2C-adrenoceptor regulation in the brain: α 2A changes persist after chronic stress. *Eur J Neurosci*;v. 17, PP. 917–28, 2003.
- FRANÇA, N.C.; GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, M.T.; MENDES, P.H.; MAIA, J.G.S.; SILVA, M.L.; GOTTLIEB, H.E. **Phytochemistry**, v. 15, p. 572, 1976.
- FRANKOWSKA M., FILIP M., PRZEGALIŃSKI E. Effects of GABAB receptor ligands in animal tests of depression and anxiety. **Pharmacol Reports**, 59, 645-655, 2007.
- GALDINO P.M., NASCIMENTO M.V., SAMPAIO B.L., FERREIRA R.N., PAULA J.R., COSTA E.A. Antidepressant-like effect of Lafoensiapacari A. St.-Hil. ethanolic extract and fractions in mice. **J Ethnopharmacol**. V.124 (3), pp.581-585, 2009.
- GALOFRÉ M., [BABOT Z.](#), GARCÍA D.A., IRAOLA S., RODRÍGUEZ-FARRÉ E., FORSBY A., SUÑOL C. GABA_A receptor and cell membrane potential as functional endpoints in cultured neurons to evaluate chemicals for human acute toxicity. **Neurotoxicol Teratol**. V. 32(1), pp.52-61, 2010.
- GOLDBERG JF, BURDICK KE, ENDICK CJ. PRELIMINARY RANDOMIZED, GOMES B., FEITOSA M., et al. Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice. **Pharmacol Biochem Behav**. 2010.
- HASLER, G. Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians? **World Psychiatry**; v.9, pp. 155-161, 2010.

HEANEY DC, BELL GS, SANDER JW. The socioeconomic, cultural, and emotional implications of starting or withholding treatment in a patient with a first seizure. **Epilepsia**; v.49, pp. 35-9, 2008.

HENNINGSSEN K, ANDREASEN J.T., BOUZINOVAE. V. B., JAYATISSAM. N, JENSEN M. S., REDROBE J. P., WIBORG, O. Cognitive deficits in the rat chronic mild stress model for depression: Relation to anhedonic-like responses. **Behavioural Brain Research**. V 198, 1, pp 136–141, 2009.

HOFER, O.; GREGER, H.; ROBIEN, W.; WERNER, A. ¹³C NMR and ¹H lanthanide induced shifts of naturally occurring alkaloids with cyclic amide moieties: amides from *Achillea falcata*. *Tetrahedron Lett*, v. 42, p. 2707–2716, 1986.

HSICH, M.T.; PENG, W.H.; HSICH, C.C. Effects of DL-tetrahydropalmatine on motor activity and the brain monoamine concentration in rats. **Chin. J. Physiol.**, v. 37, p. 79-82, 1994.

KEBABIAN, J. W.; CALNE, D. B. Multiple receptors for dopamine, *Nature*, v. 277, pp. 93–96, 1979.

JESSE C.R., WILHELM E.A., BORTOLATTO C.F., W. NOGUEIRA C.W. Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT_{2A/C} and 5-HT₃ receptors in the antidepressant-like effect caused by oral administration of bis selenide in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v34, pp 294–302. 2010.

JOHANSSON, C.; AHLENIUS, S. Evidence for the involvement of 5-HT_{1A} receptors in the mediation of exploratory locomotor activity in the rat. **J. Psychopharmacol.**, v. 3, p. 32-35, 1989.

JUNG E.; SHIM I. Differential DAergic Control of D1 and D2 Receptor Agonist Over Locomotor Activity and GABA Level in the Striatum. **Exp Neurobiol**. 20(3):153-157. 2011.

JUNG, M.E.; GATCH, M.B. The discriminative stimulus effects of pentylenetetrazole as a model of anxiety: recent developments. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, p. 429- 439, 2002.

KAPLAN HI, SADOCK BJ. *Comprehensive textbook of psychiatry*. New York:Lippincot Williams and Wilkins. 2005.

KASTER M.P., RAUPP I., BINFARÉ R.W., ANDREATINI R., RODRIGUES A.L.S. Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: evidence for the involvement of the noradrenergic system. **Eur J Pharmacol**. V. 565, pp. 119–24, 2007.

KAUL, P.N.; KULKARNI, S.K. New drug metabolism inhibitor of marine origin. **J. Pharmaceut. Sci.**, v. 67, p. 1293-1296, 1978.

KEELEY, M. L.; STORCH, E. A. Anxiety disorders in youth. **Journal of Pediatric Nursing**, v. 24, (1), pp. 26-40, 2009.

KITADA Y, MIYAUCHI T, SATOH A, SATOH S. Effects of antidepressants in the rat forced swimming test. **Eur J Pharmacol.** 1981 Jun 19;72(2-3):145-52..

KITADA Y., MIYAUCHI T., KANAZAWA Y., NAKAMICHI H., SATOH S. Involvement of alpha- and beta 1-adrenergic mechanisms in the immobility-reducing action of desipramine in the forced swimming test. **Neuropharmacology**, v 22, pp 1055–1060, 1983.

KONNOPKA A, LEICHSENRING F, LEIBING E, KÖNIG HH. Cost-of-illness studies and cost-effectiveness analyses in anxiety disorders: a systematic review. **J Affect Disord.** V. 114(1-3), pp.14-31, 2009.

KULKARNI SK, BHUTANI MK, BISHNOI M. Antidepressant activity of curcumin: involvement of serotonin and dopamine system. **Psychopharmacology (Berl)**. ;201(3):435-42. 2008.

KUPFERBERG, H.J.; SCHMUTZ, M. Screening of new compounds and the role of the pharmaceutical industry. In: ENGEL, J.; PEDLEY, T. (ed.). **Epilepsy: a comprehensive textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 1417-34, 1997.

LAZAROWSKI A, RAMOS AJ, GARCÍA-RIVELLO H, BRUSCO A, GIRARDI E.
Neuronal and glial expression of the multidrug resistance gene product in an experimental epilepsy model. Cell Mol Neurobiol ; v. 24(1), pp.77-85, 2004.

LEONARD B.E.: Evidence for a biochemical lesion in depression. **J Clin Psychiatry**, v. 61, pp.12-17, 2000.

LERER, B.; MACCIARDI, F. Pharmacogenetics of antidepressant and mood-stabilizing drugs: a review of candidate-gene studies and future research directions. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 5(3), p. 255-75, 2002.

LI J.W.H, VEDERAS J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**. V.325, pp.161–165, 2009.

LIMA, M. S. Epidemiologia e impacto social. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, 1999.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.

LOPEZ A.D., MATHERS C.D., EZZATI M. et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. **Lancet**; v.367, pp. 1747-57, 2006.

LOWSON, S.; GENT, J.P.; GOODCHILD, C.S. Convulsive thresholds in mice during the recovery phase from anesthesia induced by propofol, thipentone, methohexitone and etomidate. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 102, p. 879-82, 1991.

MACHADO DG, BETTIO LE, CUNHA MP, CAPRA JC, DALMARCO JB, PIZZOLATTI MG, RODRIGUES AL. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 33(4):642-50. 2009.

MANSUR, J.; MARTZ, R.M.W.; CARLINI, E.A. Effects of acute and chronic administration of cannabis sativa and (-) 9-trans tetrahydrocannabinol on the behaviour of rats in open field arena. **Psychopharmacol.**, v. 19, p. 338-397, 1971.

MARQUES, C.A. Importância econômica da família Lauraceae. *Lindl. Florest. e ambiente*, v.8, n.1, p. 195-206, 2001.

MASUDA Y., OHNUMA S., SUGIYAMA T. α 2-adrenoceptor activity induces the antidepressant-like glycolipid in mouse forced swimming. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.** v 23, pp. 19– 21, 2001.

MATA, R.; MORALES, J.; PÉREZ, O.; RIVERO-CRUZ, I.; ACEVEDO, L.; ENRIQUES-MENDOZA, I.; BYE, R; FRANZBLAU, S.; TIMMERMANN, B.J. **Nat. Prod.**, v. 67, p. 19-61, 2004.

MATTEI, R.; DIAS, R.F.; ESPÍNOLA, E.B.; CARLINI, E.A.; BARROS, S.B.M. Guaraná (*Paulinea cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **J. Ethnopharmacology**, v. 60, p. 111-6, 1998.

MCEWEN BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Res** 2000;886:172-89.

MEINARDI H, SCOTT RA, REIS R, SANDER JW. The treatment gap in epilepsy: the current situation and ways forward. **Epilepsia**; v.42, pp. 136-49, 2001.

MELO C.T.V, DE CARVALHO A.M., MOURA B.A., TEIXEIRA C.P., VASCONCELOS L.F., FEITOSA M.L., DE OLIVEIRA G.V., BARBOSA-FILHO J.M., CHAVEZ GUTIERREZ S.J., DE FRANÇA FONTELES M.M., VASCONCELOS S.M., DE SOUSA F.C. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Fundam Clin Pharma* (2011), in press.

MELO, C.T.V. Estudo dos efeitos farmacológicos de (o-metil)-n-2,6-dihidroxi-benzoil tiramina (riparina III) de *aniba riparia* (nees) mez (lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos. Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2006.

MELO, F. H. C. , VENÂNCIO, E. T., SOUSA, D. P., FONTELES, M. M. F., VASCONCELOS, S. M. M, VIANA, G.S.B. SOUSA, F. C. F. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. **Fundam Clin Pharma**, 2009.

MUELLER, K.; KUNKO, P.M.; WHITESIDE, D.; HASKETT, C. Time course of amphetamine-induced locomotor stereotypy in an open field. **Psychopharmacology**, v. 99, n. 4, p. 501-507, 1989.

MURRAY CJL, LOPEZ AD: The Global Burden of Disease: A Comprehensive Assessment of Mortality and Disability from Diseases, Injuries, and Risk Factors in 1990 and Projected to 2020. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1996.

NEMEROFF, C. B. Improving Antidepressant Adherence. **J Clin Psychiatry**; v. 64, pp. 25–30, 2003.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. & SNADER, K. M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981–2002. *J. Nat. Prod.* V. 66, pp. 1002–1037, 2003.

NEWMAN, DJ.; CRAGG, GM. Natural Products as Drugs and Leads to Drugs: The Historical Perspective. In: Buss, AD.; Butler, MS., editors. RSC Biomolecular Sciences No. 18; Natural Product Chemistry for Drug Discovery. **Royal Society of Chemistry**; Cambridge, UK. p.3-27. 2010.

NGUGI AK, BOTTEMLEY C, KLEINSCHMIDT I et al. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. **Epilepsia**; v. 51, pp. 883-90, 2010.

NISKANEN P., TAMMINEN T. and VIUKARI M., Sulpiride vs. amitriptyline in the treatment of depression, *Current Therapeutic Research*, v. 17(3), pp. 281–284, 1975.

NUTT D.J.: The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 17, pp. 1-12, 2002.

O. BENKERT AND F. HOLSBOER, “Effect of sulpiride in endogenous depression, **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 69, pp. 43–48, 1984.

O’LEARY O.F., BECHTHOLT A.J., CROWLEY J.J., HILL T.E., PAGE M.E., LUCKI I. Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. **Psychopharmacol. (Berl.)**, v192, pp. 357–371, 2007.

OHL, F.; TOSCHI, N.; WIGGER, A.; HENNIGER, M.S.H.; LANDGRAF, R. Dimensions of emotionality in an animal model of inborn hyperanxiety. *Behav Neurosci*, v. 115, p. 429-436, 2001.

ONAIWI, E.S.; MAQUIRI, P.A.; TSAI, NF.; DAVIES, M.F.; LOCUS, G.H. Comparison of behavioral and central BDZ binding profile in three rat lines. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 43, p. 825-831, 1992.

OZTURK, Y.; AYDINI, S., BEIS, R.; BASER, K.H.C.; BERBEROGLU, H. Effect of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calximun* L. extract on the central nervous system in mice. **Phytomedicine**, v. 3, p. 139-146, 1996.

PAGE M.E., DETKE M.J., DALVI A., KIRBY L.G., LUCKI I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl.)* V 147, pp.162–167, 1999.

PAPAKOSTAS G.I. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. *Eur. Neuropsychopharmacol.* V 16, pp 391–402, 2006.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

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

PORSOLT, R.D; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharmacodyn.** Ther., v. 229, p. 327-36, 1977.

PORTER R.J., MELDRUM B.S. Fármacos anticonvulsivantes. In: KATZUNG B. G . *Farmacologia Básica e Clínica*, 10 ed. São Paulo: Lange, 2007. PP. 333-351.

PRINCE, D.A. Neurophysiology of epilepsy. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 1, p. 395-415, 1978.
PRUT, L; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J of Pharmacol.**, v. 28,463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

PUCHEAULT M. Natural products: chemical instruments to apprehend biological symphony. **Org Biomol Chem**; v.6, pp. 424–432, 2008.

QUINTANS JUNIOR, LUCINDO J. et al . Plants with anticonvulsant properties: a review. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, 2012 .

RANG H. P.; DALE, M.M. *Farmacologia*. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. *Farmacologia.*, 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

RILEY, H.; SPINKS, A. Biological assessment of tranquilizers. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 10, p. 657-71, 1958.

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animals models of anxiety: an ethological perspective. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 289-304, 1997.

ROLLAND, A.; FLEURETIN, J.; LANHERS, M.C.; YOUNOS, C.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: sedative and anxiolytic properties. **Planta Med.**, v. 57, p. 212-6, 1991.

SANDER J.W. The epidemiology of epilepsy revisited. **Curr Opin Neurol**;v. 16, pp. 165-70, 2003.

SANTOS, R. L.; GUIMARAES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde/ Analysis about phytotherapy as an integrating practice in the Brazilian Unified Health System (UHS). Rev. bras. plantas med; 13(4): 486-491, 2011.

SANTOS, R.L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. Rev. bras. plantas med. vol.13 no.4 Botucatu 2011.

SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Ed.) Farmacognosia da planta ao medicamento. 5ª. Ed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, cap. 15, p. 371 – 400, 2003.

SEIXAS, S.R.S. Preparação de derivados benzoiltiramínicos e sua atividade cardiopressora. João Pessoa. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Produtos Naturais. Universidade Federal da Paraíba. 103p. 1996.

SHEFFRIN M, DRISCOLL HC, LENZE EJ, ET AL. Pilot study of augmentation with aripiprazole for incomplete response in late-life depression: getting to remission. **J Clin Psychiatry**; v. 70(2), pp. 208-13, 2009.

SILVA, FAN. Avaliação antioxidante de 3,5-dimetil isoxazol, pirazóis e tiazóis utilizando o método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio).Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo-USP, 2010.

SINGH, S.K.; PRASAD, A.K.; OLSEN, C.E.; JHA, A.; JAIN, S.C.; PARMAN, V.S.; WENGEL, J. **Phytochemistry**, v. 43, p. 1355, 1996.

SOFRONIEW M.V., Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection and neural repair. **Annu Rev Neurosci**; v. 24, pp. 1217–81, 2001.

SOMERS, J.M., Goldner E.M., Waraich P., Hsu L.: Prevalence and incidence studies of anxiety disorders: a systematic review of the literature. **J Psychiatry**. V.51(2),PP.100-113, 2006.

SOUSA F.C.F., LEITE C.P., MELO C.T.V., ARAÚJO F.L.O., GUTIERREZ S.J.C., BARBOSA-FILHO J.M., FONTELES M.M.F., VASCONCELOS S.M.M., VIANA G.S.B. Evaluation of Effects of *N*-(2-Hydroxybenzoyl) Tyramine (Riparin II) from *Aniba riparia*

(NEES) MEZ (Lauraceae) in Anxiety Models in Mice. *Biol Pharm Bull.* V. 30, pp.1212-1216, 2007.

SOUSA F.C.F., MELO C.T.V., MONTEIRO A.P., LIMA V.T.M., GUTIERREZ S.J.C, PEREIRA B.A., BARBOSA-FILHO J.M., VASCONCELOS S.M.M., FONTELES M.M.F., VIANA G.S.B. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Pharmacol Biochem Be.* V.78, pp.27-33, 2004.

STAHL, S. M. Transtornos ansiosos e ansiolíticos. In _____ *PSICOFARMACOLOGIA: Bases Neuroquímicas e Aplicações Práticas.* 3ª . ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 14. P 481-519, 2010.

STARR, M.S.; STAAR, B.S. Behavioural synergism between the dopamine agonist SKF 38393 and LY 171555 in dopamine-depleted mice: Antagonism by sulpiride reveals only stimulant postsynaptic D₂ receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 33(1), p. 41-44, 1989.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. Tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, v. 85, p. 367-70, 1985.

STONE E.A., GRUNEWALD G.L., LIN Y., AHSAN R., ROSENGARTEN H., KRAMER H.K., QUARTERMAIN D. Role of epinephrine stimulation of CNS α 1-adrenoceptors in motor activity in mice. *Synapse*; v.49, pp.67-76, 2003.

STOUDEMIRE, A., Epidemiology and psychopharmacology of anxiety in medical patients. *J. Clin. Psychiat.*, v.57,pp. 64-72, 1996.

SWINYARD, E.A. Laboratory assay of clinical effective antiepileptic drugs. *J. Am. Pharm. Assoc.*, v. 38, p. 201-204, 1949.

SWINYARD, E.A.; BROWN, W.C.; GOODMAN, L.S. Comparative assay of antiepileptic drugs in mice and rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 106, p. 319-330, 1952.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/ or anxiolytic state in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 350, p. 21-29, 1998.

TAYLOR L. The healing power of rainforest herbs. A guide to understanding and using herbal medicinals, New York, Square One Publishers, 2005.

TEIXEIRA C.P.L., MELO C.T.V., DE ARAUJO F.L.O., DE CARVALHO A.M.R., SILVA, M.I.G., BARBOSA-FILHO J.M., MACÊDO D.S., VIANA G.S.B., SOUSA F.C.F. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Fundam Clin Pharma.* (2011), in press.

THIERRY B, STÉRU L., SIMON AND P., PORSOLT R.D. The tail suspension test: Ethical considerations. *Psychopharmacology.* V 90, 2 , 284-285, 1986.

TORRES, J.M.; CHAVEZ, A.G. Secamidas en plantas: distribución e importancia. *Avance y perspective*, v. 20, pp. 377-387, 2001.

TREIT D, MENARD J, ROYAN C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze, **Pharmacol. Biochem. Behav.** 44: 463-469, 1993.

TRIVEDI MH, THASE ME, OSUNTOKUN O, et al. An integrated analysis of olanzapine/fluoxetine combination in clinical trials of treatment-resistant depression. **J Clin Psychiatry**; v.70(3), PP. 387-96, 2009.

TSUKAMOTO T., ASAKURA V, TSUNEIZUMI V, SATOH V, SHINOZUKA V., HASEGAWA K., Therapeutic effects and side effects in patients with major depression treated with sulpiride once a day, **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 18, (3), pp. 615–618, 1994.

USHIJIMA, I.; CARINO, M.A.; HORITA, A. Involvement of D₁ and D₂ dopamine System in the behavioral effects of cocaine in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 52, p. 737-741, 1995.

VICENTINI, A.; WERFF, H.V.D.; NICOLAU, S. Lauraceae. In: Flora da Reserva Ducke – Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Edited by RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M; SOUZA, M.A.D; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C., SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. Manaus: INPA – DFID, v. 1, p. 150-179, 1999.

WAMBEBE, C. Influence of some agents that affect 5-hydroxy-tryptamine metabolism and receptors on nitrazepam-induced sleep in mice. **Braz. J. Pharmacol.**, v. 84, p. 185-91, 1985.
WANG, R. et al. The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 578, p. 43-50, 2008.

WERFF, H.V.D.; RICHTER, H.G. Toward an improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 83, pp. 419-432, 1996.

WILLIANSO, E.; OKPAKO, D.; EVANS, F.J. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. Chichester: J. Wiley, 1996.

WILLNER P., The mesolimbic dopamine system as a target for rapid antidepressant action, **Int Clin Psychopharmacology**, v. 12, pp. 7–14, 1997.

WILLNER, P. Animal models of depression: validity and application. In: GESSA, G.L. (ed). **Neurobiology Treatment**. New York: Raven Press, p. 19-41, 1995.

WILLNER, P. Dopamine and depression. In: DI CHIARA, G. (ed.), Handbook of Experimental Pharmacology: Dopamine in the CNS. **Springer**, Berlin, p. 213-234, 2002.

WOLFFGRAMM, J.; MIKOLAICZY, K.C.; COPER, H. Acute and sub-chronic benzodiazepine-barbiturate-interactions on behavioral and physiological response of the mouse. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol*, v. 349, p. 279-286, 1994.

WONG ML, LICINIO J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci** , V 2, pp. 343–51, 2001.

World Health Organization. Atlas: Epilepsy Care in the World, 2005.

YACUBIAN EMT – Epilepsias, em: Nitrine R, Bacheschi LA – A Neurologia que todo Médico deve saber. 2a Ed, São Paulo, Atheneu;235-256, 2008.

YAMADA, J.; SUGIMOTO, Y; YAMADA, S. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 504, p. 207-211, 2004.

ZANGROSSI JR., H. Modelos Animais de Ansiedade. In: HETEM, L. A. B.; GRAEFF, F. G. (Eds.). Ansiedade e transtornos de ansiedade. **Científica Nacional**, 1997. p. 85-120.

ZÉTOLA M, DE LIMA TC, SONAGLIO D, GONZÁLEZ-ORTEGA G, LIMBERGER RP, PETROVICK PR, BASSANI VL. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from Lippia alba-Verbenaceae (Brazilian false melissa). J Ethnopharmacol., v.82(2-3), pp.207-15, 2002.