

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

CAROLINE PORTO LEITE

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE (O-METIL)-N-2-HIDROXI-
BENZOIL TIRAMINA (RIPARINA II) DE *Aniba riparia* (NEES) MEZ (LAURACEAE)
EM MODELOS COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM
CAMUNDONGOS

FORTALEZA

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CAROLINE PORTO LEITE

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE (O-METIL)-N-2-HIDROXI-
BENZOIL TIRAMINA (RIPARINA II) DE *Aniba riparia* (NEES) MEZ (LAURACEAE)
EM MODELOS COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM
CAMUNDONGOS

Dissertação submetida 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.

Orientador: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

FORTALEZA
2008

L551a Leite, Caroline Porto
Avaliação dos efeitos farmacológicos de (O-metil)-n-2-hidroxi-benzoil
tiramina(riparina II) de aniba riparia (NEES) mez (Lauraceae) em modelos
comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos / Caroline
Porto Leite. – Fortaleza, 2008.
134 f. : il.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Francisca Cléa Florenço de Sousa.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-
Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2008

1. Lauraceae. 2. Laurus. 3. Plantas medicinais. 4. Antidepressivos. 5.
Ansiolíticos. I. Sousa, Francisca Cléa Florenço de Sousa (Orient.) II. Título.

CDD T615.32323

CAROLINE PORTO LEITE

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE (O-METIL)-N-2-HIDROXI-BENZOIL TIRAMINA (RIPARINA II) DE *Aniba riparia* (NEES) MEZ (LAURACEAE) EM MODELOS COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM CAMUNDONGOS

Dissertação submetida 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.

Aprovada em 11/ 07/ 2008

BANCA EXAMINADORA

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

Profª. Dra. Marta Maria de França Fonteles
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará

“Nada perturbe o teu coração. A paciência tudo alcança, quem a Deus tem nada faltará.

Fora de Deus tudo é vão, pois só Ele é e basta!”

Pe. Airton Freire

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito.
Um se chama ONTEM e o outro AMANHÃ.
Portanto HOJE é o dia certo para AMAR, ACREDITAR,
FAZER e principalmente VIVER.”

Dalai Lama

Ao Senhor meu Deus, por esse momento de conquista; pois sei, Senhor, que sem a tua força e iluminação nada disso seria possível. Tu és não só o Autor do meu trabalho, e sim autor da minha vida.

Aqui registro a minha gratidão.

Aos meus pais, Antônio Edgard e Regina Coeli, pela dedicação e esforço incondicionais aos meus estudos, e, por me ensinarem o verdadeiro significado do amor.

Aos meus irmãos, Edgard e Rafael, pela paciência, compreensão e apoio nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa**, por ter me acolhido no laboratório de Neurofarmacologia desde a iniciação científica. Agradeço a você cada minuto dedicado ao meu crescimento como pesquisadora. Obrigada por ter acreditado em mim e ter sido acima de tudo uma grande amiga por quem tenho enorme admiração.

À **Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana**, agradeço a oportunidade de participar da equipe de grandes pesquisadores do Laboratório de Neurofarmacologia. Obrigada pelo auxílio no andamento das pesquisas.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, nas pessoas do **Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho** e doutorando **Stanley Juan Chávez Gutierrez**, que gentilmente nos cedeu a substância isolada e que muito colaborou para a realização deste estudo.

As professoras, **Marta Maria de França Fonteles** e **Nylane Maria Nunes de Alencar**, 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, **Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos**, **Profa. Dra. Geanne Matos**, **Prof. Dr. Vietla Rao**, **Profa. Dra. Flávia Almeida**, **Profa. Dra. Elizabete Moraes**, **Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro**, **Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Pontes de Souza** e **Prof. Dr. Hélio Rola**, pelos conhecimentos transmitidos e dedicação permanente aos alunos e ao programa de pós-graduação.

À minha grande companheira, **Carla Thiciane Vasconcelos de Melo (Thicyzinha)**, pela paciência e pelo conhecimento dividido ao longo desses anos. Pelo exemplo de amiga, sempre disposta a ajudar a qualquer hora. Você foi um anjo que caiu na minha vida!

Aos amigos de pós-graduação, **Larisse Lucetti**, **Fernando Luiz**, **Patrícia Freire**, **Fabiano Magacho**, **Aline Oliveira**, **Izabel Gomes**, **Patrícia Gomes**, **Daniel**, **Jéferson**, **Lissiana**, **Roberto**, **Hidemburgo**, **Danilo** e **Otacílio** pela amizade, cooperação e apoio recebido.

Aos estudantes de iniciação científica do LNF, **Rufino**, **Paulo**, **Brinell**, **Mariana**, **Alyne Mara** e **Raquel** pela dedicação e seriedade na execução dos experimentos.

Às técnicas do Laboratório de Neurofarmacologia, **Vilani** e **Jacqueline**, pela companhia constante, alegre e animadora no laboratório.

Aos demais integrantes do Laboratório de Neurofarmacologia, **Dra. Juvênia, Edith, Isabel, Maria do Carmo, Natália, Fábio, Noé e Helvira**, por estarem sempre dispostos a ajudar, e também pela dedicação e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, **Aura, Chiquinho, Edmílson, Haroldo, Fernando, Íris, Joana, Marta e Mônica**, pela dedicação ao trabalho.

À minha titia e madrinha, **Rosa**, pelo apoio e incentivo desde o início da profissão. Você é um exemplo de dedicação em tudo que faz.

Aos amigos da faculdade de Farmácia, **Babi, Evando, Kaka, Adriana e Jamille**, dentre muitos outros, por fazerem parte dos quatro anos mais maravilhosos da minha vida, os anos de minha graduação acadêmica.

Às minhas amigas de profissão, **Larisse, Allana e Lícia**, por me ensinarem a enxergar a felicidade nas pequenas coisas da vida.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus familiares, tios, primos e amigos que sempre me deram sincero apoio e incentivo e, principalmente, por acreditaram na realização do meu trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!!!!!!!!!!

RESUMO

A riparina II, alcalamida isolada do fruto verde de *Aniba riparia*, foi avaliada em modelos animais clássicos para *screening* de drogas com atividade em ansiedade, depressão, sedação e convulsão, tais como, campo aberto, rota rod, labirinto em cruz elevado (LCE), placa perfurada, nado forçado, suspensão da cauda, tempo de sono induzido por pentobarbital e convulsão induzida por pentilenotetrazol. A riparina II foi administrada de forma aguda em todos os testes, nas doses de 25 e 50 mg/kg, e na dose de 75mg/kg nos testes do campo aberto, rota rod, plus maze e suspensão da cauda, através das vias oral e intraperitoneal. Os resultados mostraram que esta alcalamida não alterou a atividade locomotora e o *grooming*, mas diminuiu o número de *rearing*, no teste do campo aberto, sugerindo um possível efeito ansiolítico. No LCE e no teste da placa perfurada, a riparina II comprovou seu efeito ansiolítico, pois aumentou todos os parâmetros analisados no LCE, como NEBA, PEBA, TPBA e PTBA, assim como o número de *head dips* na placa perfurada. Este efeito está possivelmente relacionado com o sistema gabaérgico já que o flumazenil, antagonista dos receptores GABA_A/Benzodiazepínico, reverteu o efeito ansiolítico da riparina II no LCE. A avaliação sedativa/hipnótica da riparina II, no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital, mostrou uma potencialização do sono, que parece estar envolvido com processos farmacocinéticos ou com mecanismos de regulação do sono, já que o efeito sedativo não foi corroborado no campo aberto. No teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol, a riparina II protegeu parcialmente os animais da convulsão, assim como prolongou o tempo de vida, e, em alguns casos, até impediu a morte dos animais. Esse resultado sugere um efeito anticonvulsivante da riparina II, possivelmente relacionado com o sistema gabaérgico, visto que há um envolvimento desta substância com os receptores GABA_A/Benzodiazepínico mostrado no LCE. A riparina II também parece apresentar um efeito antidepressivo, pois no teste do nado forçado e suspensão da cauda, esta substância diminuiu o tempo de imobilidade dos animais. O efeito antidepressivo da riparina II parece estar envolvido com o sistema dopaminérgico e noradrenérgico. Os antagonistas dos receptores dopaminérgicos do tipo D₁ e D₂, SCH23390 e sulpirida, reverteram o efeito da riparina II no nado forçado. O antagonista dos receptores adrenérgicos do tipo α_1 , prazosina, reverteu o efeito da riparina II no nado forçado. Por outro lado, o antagonista adrenérgico do tipo α_2 , ioimbina, não reverteu esse efeito. Esses resultados sugerem, então, que o efeito antidepressivo desta alcalamida, se dá pelo envolvimento com os sistemas dopaminérgico, receptores D₁ e D₂, e noradrenérgico, especificamente com os receptores do tipo α_1 . Em conclusão, esses efeitos mostraram que a riparina II apresenta efeito ansiolítico e anticonvulsivante, provavelmente relacionado com o sistema gabaérgico e efeito antidepressivo, provavelmente relacionado com os sistemas dopaminérgico e noradrenérgico.

Palavras-chave: Lauraceae; Laurus; Antidepressivo; Ansiolíticos; Plantas medicinais.

ABSTRACT

Evaluation of Pharmacological Effects of (O-Methyl)-N-2-hydroxy-benzoyl-tyramine (riparin II) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) on behavioral models of anxiety and depression in mice. CAROLINE PORTO LEITE. Supervisor: Prof. Dr. Francisca Cléa Florenço de Sousa. Master Dissertation. Program of Post-graduation in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2008.

Riparin II, an alkalamide isolated from unripe fruit of *Aniba riparia*, was evaluated in animal classical models for screening of new drugs in anxiety, depression, sedation and convulsion, such as, open field, rota rod, plus maze, hole board, forced swimming, tail suspension, pentobarbital-induced sleeping time and pentilenotetrazole-induced seizures tests. Riparin II was administered acutely in all tests, at doses of 25 e 50 mg/kg, and at dose 75 mg/kg in open field, rota rod, plus maze and tail suspension tests, through oral and intraperitoneal routes. The results showed that this alkalamide did not alter the locomotor activity and grooming, but decreased the number of rearing in the open field test, suggesting a possible anxiolytic effect. In the plus maze and hole board tests, riparin II presented anxiolytic effect due to an increase in all parameters analyzed, such as, NEOA, PEOA, TPOA and PTOA, in the plus maze, and an increase in the number of *head dips* in the hole board test. This effect is possible related with GABAergic system, since flumazenil, an antagonist of GABA_A/Benzodiazepinic receptors, reversed the anxiolytic effect of riparin II, in the plus maze test. The sedative/hypnotic evaluation of riparin II, in pentobarbital-induced sleeping time, showed a sleeping potentiation that seems to be involved with pharmacokinetic processes or sleeping regulation mechanisms, since the sedative effect of riparin II was not corroborated in the open field test. In the pentilenotetrazole-induced seizures test, riparin II partially protected the animals from seizures, increased the death time, and in some cases, even protected the animals from death. This result may suggest an anticonvulsant effect of riparin II, possible related to GABAergic system, since there is an involvement of this substance with GABA_A/Benzodiazepinic receptor, seen in plus maze test. Riparin II also presents an antidepressant effect, since in the forced swimming and tail suspension tests, this substance decreased the immobility time of the animals. The antidepressant effect of riparin II seems to be related with dopaminergic and noradrenergic systems. The antagonists of D₁ and D₂ dopaminergic receptor, SCH23390 and sulpiride, reverted riparin II effect in the forced swimming test. The antagonist of α_1 adrenergic receptor, prazosin, reverted riparin II effect in the forced swimming test. However, the antagonist of α_2 adrenergic receptor, yohimbine, did not revert this effect. This result suggests that the antidepressant effect of this alkalamide is involved with dopaminergic system, with D₁ and D₂ dopaminergic receptor, and noradrenergic systems, specifically with α_1 adrenergic receptor. In conclusion, these effects showed that riparin II presents anxiolytic and anticonvulsant effects, probably related with GABAergic system, and presents antidepressant effect, probably related with dopaminergic and noradrenergic systems.

Key-words: Lauraceae; *Laurus*; Antidepressive agents; Anti-anxiety agents; Plants, medicinal.

LISTA DE FIGURAS

1.	<i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez (folhas).....	27
2.	Estrutura química da riparina II.....	32
3.	Receptor GABA _A	35
4.	Vias dopaminérgicas no cérebro	39
5.	Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (5a) e oral (5b), sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos...	64
6.	Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (6a) e oral (6b), sobre o número de <i>rearing</i> no teste do campo aberto em camundongos.....	65
7.	Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (7a) e oral (7b), sobre o número de <i>grooming</i> no teste do campo aberto em camundongos.....	66
8.	Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (8a) e oral (8b), sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.....	72
9.	Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (9a) e oral (9b), sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.....	73
10.	Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (10a) e oral (10b), sobre a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.....	74
11.	Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (11a) e oral (11b), sobre a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.....	75
12.	Efeito da riparina II e diazepam, via oral, sozinhos ou associados com flumazenil, antagonista dos receptores de benzodiazepínicos sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.....	76
13.	Efeito da riparina II e diazepam, via oral, sozinhos ou associados com flumazenil, antagonista dos receptores de benzodiazepínicos sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), em segundos, no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.....	77
14.	Efeito da riparina II e diazepam, via oral, sozinhos ou associados com	

flumazenil, antagonista dos receptores de benzodiazepínicos sobre a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA), no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.....	78
15. Efeito da riparina II e diazepam, via oral, sozinhos ou associados com flumazenil, antagonista dos receptores de benzodiazepínicos sobre a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA), no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.....	79
16. Efeito da riparina II e diazepam, via oral (16a) e intraperitoneal (16b), sobre o número de <i>head dips</i> no teste da placa perfurada em camundongos.....	81
17. Efeito da riparina II, bupropiona e imipramina, via intraperitoneal (17a) e oral (17b), sobre o tempo de imobilidade, em segundos, no teste do nado forçado em camundongos.....	83
18. Efeito da riparina II (50 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com SCH23390 (15 µg/kg), antagonista dos receptores dopaminérgicos do tipo D ₁ , sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.....	84
19. Efeito da riparina II (50 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com sulpirida (50 mg/kg), antagonista dos receptores dopaminérgicos do tipo D ₂ , sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.....	85
20. Efeito da riparina II (50 mg/kg) e imipramina (10 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com prazosina (1 mg/kg), antagonista dos receptores α ₁ -adrenérgicos, sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.....	86
21. Efeito da riparina II (50 mg/kg) e imipramina (10 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com ioimbina (1 mg/kg), antagonista dos receptores α ₂ -adrenérgicos, sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.....	87
22. Efeito da riparina II, e imipramina, via intraperitoneal (22a) e oral (22b), sobre o tempo de imobilidade, em segundos, no teste da suspensão da cauda em camundongos.....	89
23. Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (23a) e oral (23b), sobre a latência do sono, em segundos, no teste do tempo de sono induzido por	

	pentobarbital em camundongos.....	91
24.	Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (24a) e oral (24b), sobre a duração do sono, em segundos, no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.....	92

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.	Alimentos aos quais se atribui um elevado teor de tiramina ou outros agentes simpaticomimético	28
Quadro 2.	Conversão da tiramina em dopamina	30
Quadro 3.	Receptores de dopamina.....	40
Quadro 4.	Receptores adrenérgicos	42
Quadro 5.	Esquema do teste do campo aberto	52
Quadro 6.	Esquema do teste do <i>rota rod</i>	53
Quadro 7.	Esquema do teste do labirinto em cruz elevado	55
Quadro 8.	Esquema do teste da placa perfurada	56
Quadro 9.	Esquema do teste do nado forçado	57
Quadro 10.	Esquema do teste da suspensão da cauda	58
Quadro 11.	Esquema do teste do tempo de sono induzido por pentobarbital	59
Quadro 12.	Esquema do teste de convulsão induzido por pentobarbital	60
Tabela 1.	Efeito da administração intraperitoneal e oral da riparina II e diazepam no número de quedas no teste do <i>rota rod</i> para camundongos	68
Tabela 2.	Efeito da administração intraperitoneal e oral da riparina II e diazepam no tempo de permanência na barra (s) no teste do <i>rota rod</i> para camundongos	69
Tabela 3.	Efeito da administração intraperitoneal e oral da riparina II e diazepam nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

\pm	Mais ou menos
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Grau (s) Centígrado (s)
μg	Micrograma
μM	Micromolar
α	Alfa
β	Beta
5-HT	Serotonina
a.C.	Antes de Cristo
AAS	Ácido acetil salicílico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ALE	Atividade Locomotora Espontânea
ANOVA	Análise de Variância
BUP	Bupropiona
Ca²⁺	Íons Cálcio
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
Cl⁻	Íons cloreto
CNS	Conselho Nacional de Saúde
COMT	Catecol-O-metil-transferase
C₆H₆	Benzeno
CHCl₃	Clorofórmio
cm	Centímetros
cont.	Controle
D₁	Receptores dopaminérgicos do tipo 1
D₂	Receptores dopaminérgicos do tipo 2
DL50	Dose letal que mata 50% dos animais
DS	Duração do Sono
DZP	Diazepam
EPM	Erro padrão da média
et al.	E colaboradores
EUA	Estados Unidos

FLU	Flumazenil
GABA	Ácido gama amino butírico
g	Gramma
g/kg	Gramma/Quilograma
h	Hora
IMI	Imipramina
i.p.	Intraperitoneal
IP₃	Trifosfato de Inositol
kg	Quilograma
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LC	Latência da Convulsão
LM	Latência de Morte
LS	Latência do Sono
MAO	Monoamino oxidase
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama/Mililitro
mg/kg	Miligrama/quilograma
mL/kg	Mililitro/quilograma
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Ministério da Saúde
Na⁺	Íon sódio
NEBA	Número de Entradas nos Braços Abertos
NQ	Número de Quedas
p	Nível de Significância
PEBA	Percentagem de Entrada nos Braços Abertos
PTB	Pentobarbital sódico
PTBA	Pecentagem do Tempo de Permanência nos Braços Abertos
PTZ	Pentilenotetrazol
rpm	Rotação por Minuto
s	Segundo
SCH	SCH23390

SNC	Sistema Nervoso Central
SPD	Sulpirida
spp	Espécies
TH	Tirosina hidroxilase
TP	Tempo de Permanência
TPBA	Tempo de Permanência nos Braços Abertos
v.o.	Via oral
vs	Versus
W	Watt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Generalidades	22
1.2	A Família Lauraceae	24
1.3	<i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez	25
1.4	Tiramina	27
1.5	Alcaminas	30
1.6	Riparina II (O-metil)-N-2-hidroxibenzoil-tiramina	31
1.7	Ansiedade	32
1.7.1	Sistema gabaérgico	33
1.8	Depressão	35
1.8.1	Catecolaminas	37
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	43
3	OBJETIVOS	45
3.1	Objetivo geral	46
3.2	Objetivos específicos	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	Material botânico	48
4.2	Extração e isolamento	48
4.3	Animais	49
4.4	Drogas e reagentes	49
4.5	Equipamentos	50
4.6	Preparo de drogas	50
4.7	Tratamento dos grupos experimentais	51
4.8	Protocolo experimental	51
4.9	Avaliação da atividade ansiolítica	52
4.9.1	Teste do campo aberto	52
4.9.2	Teste do <i>rota rod</i>	53
4.9.3	Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)	54
4.9.4	Teste da placa perfurada	55
4.10	Avaliação da atividade antidepressiva	56

4.10.1	Teste do nado forçado	56
4.10.2	Teste da suspensão da cauda	58
4.11	Avaliação da atividade sedativa/hipnótica e anticonvulsivante	59
4.11.1	Teste do tempo de sono induzido por pentobarbital	59
4.11.2	Teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol	60
4.12	Análise estatística	61
5	RESULTADOS	62
5.1	Avaliação da atividade ansiolítica	63
5.1.1	Teste do campo aberto	63
5.1.2	Teste do <i>rota rod</i>	67
5.1.3	Teste do labirinto em cruz elevado	70
5.1.4	Teste da placa perfurada	80
5.2	Avaliação da atividade antidepressiva	82
5.2.1	Teste do nado forçado	82
5.2.2	Teste da suspensão da cauda	88
5.3	Avaliação da atividade sedativa/hipnótica e anticonvulsivante	90
5.3.1	Teste do tempo de sono induzido por pentobarbital	90
5.3.2	Teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol	93
6	DISCUSSÃO	95
7	CONCLUSÕES	108
	REFERÊNCIAS	111
	ANEXO.....	129

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

O uso popular de plantas medicinais acompanha o homem desde os primórdios da civilização. Existem registros antigos, como desenhos em cavernas, que revelam uma ligação íntima do homem com a natureza, principalmente com as plantas (SOARES, 2002). O processo de evolução da “arte de cura” se deu de forma empírica em processos de descoberta por tentativas, com erros e acertos (GOTTLIEB; KAPLAN, 1993; MORS, 1992).

A população de um modo geral guarda um saber significativo a respeito de métodos alternativos para curas de doenças mais freqüentes. As comunidades tradicionais possuem uma bagagem maior sobre este assunto, porém esta bagagem vem sendo ameaçada devido à influência direta do uso da medicina ocidental moderna, nas comunidades tradicionais.

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL *et al.*, 2002)

Assim, desde muito tempo, os produtos naturais, notavelmente os originados de plantas, têm sido uma importante fonte de agentes terapêuticos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Cerca de 25 a 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005). No entanto, apesar do aumento de estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SOEJARTO, 1996).

O Brasil tem uma das mais ricas biodiversidades do planeta, com milhares de espécies em sua fauna e flora. A utilização das plantas surgiu, não só como alimento, mas também como fonte terapêutica, há cerca de 12 mil anos, dando origem aos paleoíndios do país (SOARES, 2002).

A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos. Os mais utilizados são a síntese de novas moléculas, a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com

propriedades farmacológicas definidas, extração, isolamento e purificação de novos compostos de fontes naturais, especialmente de origem vegetal, as quais se caracterizam como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento (DI STASI, 1996).

Neste contexto é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica (MATOS, 2000). Como exemplo, podemos citar a morfina, a emetina, a vincristina, a colchicina, a rutina, etc.

Logicamente, o fato de usar princípios ativos extraídos de plantas medicinais, em sua forma isolada apresenta muitas vantagens como asseguramento da constância de composição, ausência de qualquer outra substância ativa, além daquela determinante da atividade e maior facilidade para o controle de qualidade, em relação aos produtos de composição complexa e não conhecida completamente. (SCHENKEL; GOSMAN; PETROVICK, 2003).

O desenvolvimento desta linha de pesquisa ocorre graças a vários fatores. Entre eles, vale à pena destacar uma inter-relação cada vez maior de profissionais de diversas áreas do conhecimento (agronomia, botânica, química, farmacognosia, farmacologia, toxicologia e outras) que se interseccionam com o estudo das plantas medicinais (DI STASI, 1996).

Individualmente, a descoberta de novos fármacos, ou fármacos acessíveis, pode determinar a melhoria da qualidade de vida em doenças crônicas ou a própria sobrevivência do paciente afetado. Socialmente, a descoberta de fontes naturais e locais de compostos químicos usualmente importados e/ou o desenvolvimento de fitoterápicos de fabricação nacional, podem ter conseqüências econômicas significativas, além de possibilitar autonomia de cada país no gerenciamento de suas políticas de saúde.

No entanto, o uso popular, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Nesse sentido, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer xenobiótico sintético e sua preconização, ou a autorização oficial do seu uso medicamentoso, devem ser fundamentadas em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aqueles que a utilizam é suplantado pelos benefícios que possam advir (BRASIL, 1995).

Os conceitos de autonomia, não maleficência, beneficência e justiça foram incorporados à resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS), Ministério da Saúde (MS), posteriormente substituída pela Resolução 196/1996 (BRASIL, 1996), que normatiza as pesquisas nessa área visando o aperfeiçoamento do saber científico e à síntese de insumos

para o atendimento médico-hospitalar e, regulamenta as etapas das pesquisas pré-clínicas e clínicas para avaliação e registro de novos medicamentos (LAPA *et al.*, 2003).

Atualmente, muitos centros em nosso país e no exterior vêm desenvolvendo estudos sérios sobre as propriedades farmacológicas das plantas medicinais, chegando a resultados bastante promissores, publicados em revistas científicas respeitáveis – cerca de 590 plantas encontram-se registradas no Ministério da Saúde brasileiro para comercialização (CORRÊA; BATISTA; QUINTAS, 2003).

Para a finalidade desta exposição, os fitoterápicos, remédios vegetais, remédios herbários, ou simplesmente plantas medicinais, sob qualquer forma ou processamento, são considerados como novos medicamentos para o uso na espécie humana. Para tanto foi criada a portaria 6/1995 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, reformulada pela Portaria 1029/1988 e finalmente substituída pela Resolução RDC ANVISA 17/2000, que regulamenta as condições para registro de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 1995, 1998, 2000).

Além disso, com o objetivo de assegurar o acesso, uso correto de plantas medicinais e fitoterápicos pela população, bem como a utilização sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento da indústria nacional, foi aprovado no dia 22 de junho de 2006 a Política Nacional de Plantas Medicinais pelo governo federal (BRASIL, 2006).

1.2 A Família Lauraceae

Lauraceae tem cerca de 2500 espécies incluídas em 52 gêneros. É pantropical com poucos representantes em regiões temperadas. Nas Américas ocorrem cerca de 29 gêneros e 900 espécies. A família é freqüente em florestas tropicais montanas, com algumas espécies habitando grandes altitudes, mas a grande diversidade ocorre em terras baixas da Amazônia e América Central (ROHWER, 1986; WERFF; RICHTER, 1996).

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.) (EVANS, 1996). Algumas espécies têm sido 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.

Lauraceae é de grande importância econômica em todo o mundo. Espécies utilizadas em larga escala são o abacate (*Persea americana*), a canela (*Cinnamomum verum*) e o louro (*Laurus nobilis*); as demais têm em geral grande importância econômica em suas áreas de ocorrência. A casca ou o fruto de algumas espécies são usados como condimentos (*Dicypellium caryophyllaceum*) ou para fazer chá (*Licaria puchury-major* e *Aniba canelilla*). Substâncias aromáticas para perfumaria são extraídas de algumas espécies, como a canela-sassafrás (*Ocotea odorifera*) e o pau-rosa (*Aniba rosaeodora*). Esta última foi muito explorada na região de Manaus. Outras têm usos na medicina popular ou industrial, como a cânfora (*Cinnamomum camphora*). A madeira de Lauraceae é amplamente explorada em diversas regiões. Na Amazônia, a itaúba (*Mezilaurus* spp.) é a madeira preferida para construção de embarcações devido a sua alta durabilidade e resistência. Diversas outras espécies constituem o principal produto madeireiro vendido nas lojas de Manaus sob o nome de "louro" (VICENTINI; WERFF; NICOLAU, 1999).

Na medicina popular, as Lauraceae apresentam utilização variada, desempenhando diferentes funções contra diversas doenças. Deve-se ressaltar, entretanto, que o uso fitoterápico das plantas deve ser feito com critério. Assim, estão aptas a serem utilizadas aquelas que tenham conhecida sua eficiência terapêutica e sua toxicologia (MARTINS; SANTOS, 1995).

A família Lauraceae revela um número expressivo de espécies que apresentam uma grande diversidade de usos, com destaque para as que possuem utilização medicinal e na indústria. O alto valor econômico destas espécies tem levado a uma exploração crescente ao longo dos anos, fazendo com que estas se tornem “vulneráveis” ou mesmo “em perigo de extinção”, segundo classificação da União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais (I.U.C.N) (VIEIRA *et al.*, 1997).

1.3 *Aniba riparia* (Nees) Mez

O gênero *Aniba* compreende cerca de 40 espécies de arbustos e árvores de planície, ocorrentes na Amazônia e nas Guianas, nos Andes e em montanhas do norte da Venezuela como também no leste e sul do Brasil (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000).

Dentre as espécies medicinais, também merecem destaque as pertencentes ao gênero *Aniba*. A espécie *A. riparia* (Nees) Mez, por exemplo, é típica da região amazônica e dela pode-se obter um extrato dos frutos e dos cálices persistentes que possuem atividade antibiótica comprovada contra *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiela pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. As espécies *A. canellita* (H.B.K) Mez, *A. duckei* Kosterm. e *A. hastmanniana* (Nees) Mez, também possuem atividade bloqueadora no desenvolvimento do ancilostomídeo humano, devido à ação do óleo essencial que é extraído do lenho e da casca (MARQUES, 2001).

Aniba riparia (Nees) Mez é conhecida popularmente como “louro” no Brasil (MARQUES, 2001). Essa planta 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; WERFF; NICOLAU, 1999) (FIGURA 1).

A partir de estudos químicos, foi descoberta a presença de alguns flavonóides, benzilbenzoatos e benzaldeídos nas cascas do caule de *Aniba riparia* (FRANÇA *et al.*, 1976). Além disso, o estudo realizado por Barbosa-Filho *et al.* (1987), com o fruto verde da planta, mostrou 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).



FIGURA 1 – *Aniba riparia* (Nees) Mez.

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

1.4 Tiramina

A tiramina é um subproduto normal do metabolismo da tirosina no organismo, estruturalmente relacionada com a noradrenalina, dopamina e o metilfenidato, que é utilizado

pelos seus efeitos centrais. É também encontrada, em altas concentrações, nos alimentos fermentados, como queijos (QUADRO 1). A tiramina é rapidamente metabolizada pela MAO no fígado, sendo normalmente inativada quando ingerida, em virtude do elevado efeito de primeira passagem. Quando administrada por via parenteral, exerce uma ação simpaticomimética indireta, causada pela liberação de catecolaminas armazenadas. Por conseguinte, seu espectro de ação assemelha-se ao da noradrenalina (KATZUNG, 2003).

Em pacientes tratados com inibidores da MAO – particularmente inibidores da isoforma MAO-A -, esse efeito da tiramina pode ser acentuadamente intensificado, resultando em elevações pronunciadas da pressão arterial. Esses indivíduos devem ter muito cuidado para evitar alimentos contendo tiramina (KATZUNG, 2003). Os inibidores da MAO potencializam fortemente seus efeitos ao impedirem a inativação do transmissor deslocado das vesículas para o interior das terminações. A inibição da MAO aumenta particularmente a ação da tiramina, visto que esta substância é, em si, um substrato da MAO. Normalmente, a tiramina da dieta é destruída pela MAO na parede intestinal e no fígado antes de alcançar a circulação sistêmica. Quando a MAO é inibida, essa ação não ocorre, e a ingestão de alimentos ricos em tiramina, como queijo fermentado, pode provocar então uma elevação súbita e perigosa da pressão arterial (RANG *et al.*, 2004). Existem diferenças nos efeitos de vários inibidores da MAO sobre a biodisponibilidade da tiramina.

Quadro 1 - Alimentos aos quais se atribui um elevado teor de tiramina ou outros agentes simpaticomiméticos.

Alimento	Conteúdo de Tiramina de uma Porção Média
Cerveja	(Nenhum dado)
Escargô	Desprezível (mas contém feniletilamina)
Feijão em geral, feijão tipo fava	Desprezível (mas contém dopamina)
Fígado de galinha	0 a 9 mg
Levedura (por exemplo, suplementos de levedura de cerveja dietética)	2 – 68 mg
Peixe defumado ou em conserva (por exemplo, arenque em conserva)	0 a 198 mg
Queijo natural ou curado	0 a 130 mg (queijos Cheddar, Gruyère e Stilton com conteúdo particularmente alto)
Salsicha fermentada (por exemplo, salame, piperone, salsicha de verão)	0 a 74 mg
Vinho (tinto)	0 a 3 mg

Fonte: KATZUNG, 2003

Num paciente em uso de inibidor irreversível de MAO, a presença de 20-50mg de tiramina numa refeição pode elevar significamente a pressão arterial. Observe-se que apenas o queijo, a salsicha, o peixe em conserva e os suplementos de levedura contêm tiramina suficiente para serem consistentemente perigosos. Isso não afasta a possibilidade de que algumas preparações de outros alimentos possam conter quantidades de tiramina significativas acima da média.

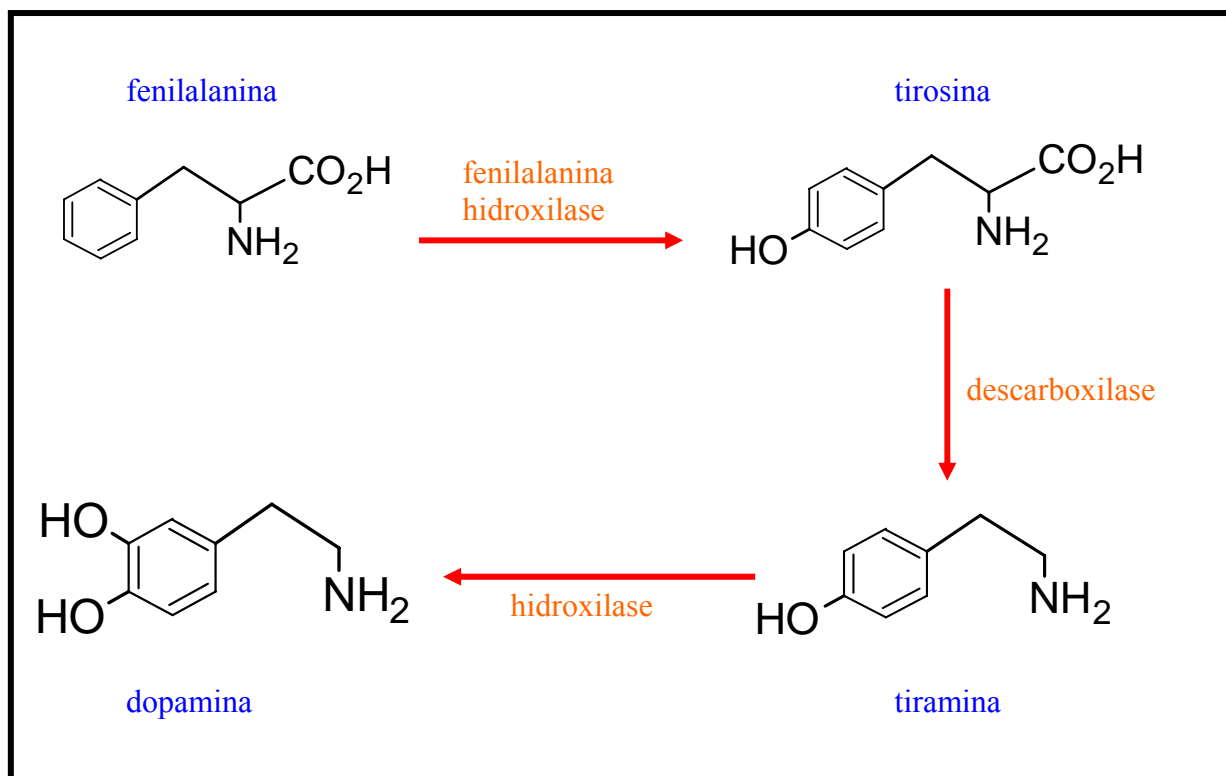
Uma vez no interior das terminações nervosas, as aminas simpaticomiméticas de ação indireta são captadas nas vesículas pelo carreador de monoamina vesicular em troca do neurotransmissor, que escapa no citosol. Parte do neurotransmissor citosólico é degradado pela MAO (monoaminooxidase), enquanto o restante escapa através da captação 1, em troca da monoamina estranha, atuando sobre os receptores pós-sinápticos. A exocitose não está envolvida no processo de liberação, de modo que essas ações não exigem a presença de Ca^{2+} (RANG *et al.*, 2004).

A tiramina é captada nas terminações nervosas e convertida em octopamina, que substitui parcialmente a noradrenalina nos grânulos de armazenamento das catecolaminas. Como a octopamina é ineficaz como agonista pressor nos receptores α pós-sinápticos, ocorre simpatoplegia, embora as reservas totais de noradrenalina possam estar aumentadas. (KATZUNG, 2003)

Uma importante característica dos efeitos das aminas simpaticomiméticas de ação indireta consiste no desenvolvimento de acentuada tolerância. Assim, por exemplo, doses repetidas de anfetamina ou de tiramina produzem respostas pressoras progressivamente menores (RANG *et al.*, 2004).

A tiramina é um metabólito secundário da tirosina, precursor das catecolaminas noradrenalina e dopamina, portanto, além de entrar na terminação nervosa como falso transmissor, ela ainda pode ser convertida em dopamina através de uma reação catalisada pela enzima hidroxilase (Quadro 2).

Quadro 2 - Conversão da tiramina em dopamina.



Fonte: www.dq.fct.unl.pt/caadeiras/qpn1/molweb/2002/mescalina/classifi.htm

1.5 Alcamidas

As alcamidas são metabólitos secundários que compreendem cerca de 200 compostos comumente presente em plantas. Compõe uma classe resultante biossinteticamente da condensação de uma amina, feniletilaminas naturais, com um ácido graxo insaturado, ácidos fenilpropiônicos, possuindo atividades biológicas promissoras (HOFER *et al.*, 1986).

Do ponto de vista biogênico, as alcamidas representam uma classe distinta de produtos naturais que se forma ao serem conjugadas nas diferentes rotas metabólicas, sendo por isso, então, consideradas metabólitos secundários (HOFER *et al.*, 1986).

Dependendo do tipo de insaturações apresentadas, as alcamidas são divididas em dois grupos principais: alcamidas olefinicas, com apenas ligações duplas e olefinas acetilênicas, com pelo menos uma ligação tripla. As alcamidas alifáticas (de cadeia aberta) são mais importantes para o metabolismo secundário e são as mais comumente utilizadas pelo

homem. São compostos bioativos, pois alguns compostos apresentam uma notável resposta nos receptores das células-alvo. As alcanidas alifáticas tem se mostrado bastante eficazes como compostos medicinais, flavorizantes e no controle biológico, o que explica crescente interesse dos pesquisadores e da indústria nesta classe de fármacos (TORRES; CHAVEZ, 2001).

Muitas vezes, a diferença entre alimento, medicamento e veneno é uma questão de dose. As plantas que contém alcanidas devem ser tratadas com cautela e serem utilizadas esporadicamente. Com o uso prolongado, interno ou externo, aumenta a probabilidade de efeitos adversos. As pessoas que apresentam erupções na pele ao manejar algumas plantas que contenham alcanidas podem ser alérgicas a essa substância (TORRES; CHAVEZ, 2001).

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.

Foram isoladas algumas alcanidas do fruto maduro da planta *Aniba riparia*, como por exemplo, 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 (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987). Essas amidas ou alcanidas foram denominadas riparinas em homenagem a planta (BARBOSA-FILHO, 1997).

Posteriormente, essas alcanidas naturais encontradas na planta *Aniba riparia* foram sintetizadas por Barbosa-Filho, Yoshida e Gottlieb (1990).

1.6 Riparina II (O-metil-N-2-dihidroxibenzoil-tiramina)

Riparina II (Figura 2) é uma molécula isolada da fruta verde da planta *Aniba riparia* que apresenta atividade antimicrobiana (THOMAS *et al.*, 1994; CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000).

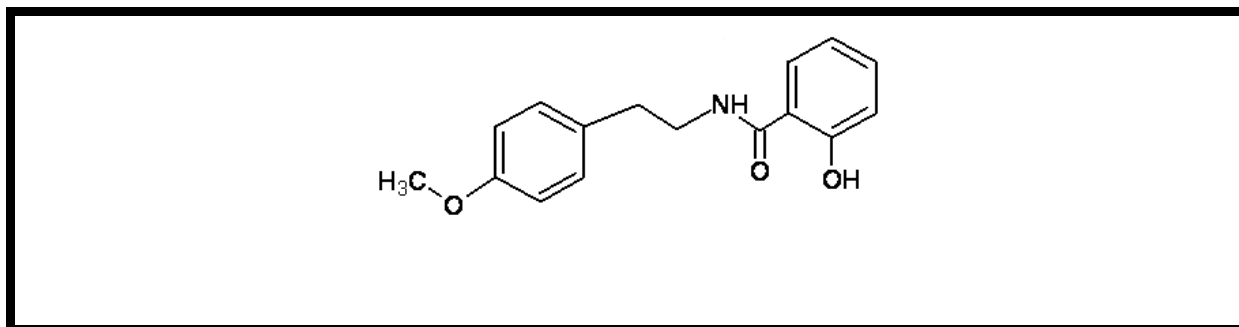


Figura 2 – Estrutura química da riparina II.

Isolada do fruto verde de *Aniba riparia*, a riparina II é um alcalóide do ciclo não heterocíclico, mais especificamente, uma alcalamida natural, caracterizada como uma feniletilamida de ácido benzóico, é o componente majoritário isolado do fruto não maduro. É formada da união da tiramina, uma feniletilamina, e o ácido benzóico. Apresenta uma substituição no anel do ácido benzóico, acrescentando uma hidroxila. Além disso, o anel da tiramina apresenta um metil ligado ao oxigênio formando uma função éter (Figura 2).

Em relação à toxicidade aguda da droga verificou-se que riparina II, quando administrada por via oral (v.o.) em doses de até 1g/kg não causou mortes de camundongos durante um período de 48 h. A droga também não apresentou letalidade por via intraperitoneal, em doses semelhantes. Além disso, testes hipocráticos foram realizados para verificar se riparina II, nas doses de 500mg/kg, v.o. e i.p., provocariam alterações centrais, autonômicas ou musculares. O resultado se mostrou negativo para todos estes parâmetros, não só para riparina II, como também para as riparinas I e III. (CASTELO BRANCO *et al.*, 2000).

Riparina II, assim como riparinas I e III, apresenta efeito hipotensor e bradicárdico transitório, devido a uma ação que parece envolver, principalmente, um componente de origem parassimpática a nível cardíaco (SEIXAS, 1996).

1.7 Ansiedade

A ansiedade, diferente de outras condições psiquiátricas, tais como, esquizofrenia e depressão, é uma emoção normal e também uma desordem psiquiátrica. Muitas vezes é difícil separar a condição normal da patológica, no entanto, quando os sintomas são freqüentes e mal adaptados, interferindo com o funcionamento normal do indivíduo, a

ansiedade é considerada patológica e requer terapia farmacológica (BHATTACHARYA; SATTYAN, 1997).

Em termos biológicos, a ansiedade induz a uma forma particular de inibição comportamental, que ocorre em resposta aos eventos ambientais que são novos, não-recompensadores (em condições em que a recompensa é esperada) ou à punição. Em animais, esta inibição comportamental pode tomar a forma de imobilidade ou de supressão de uma resposta comportamental, tal como pressionar uma alavanca para obter comida. Para desenvolver novos fármacos ansiolíticos, é importante ter testes animais que forneçam um bom guia para a atividade em seres humanos e muito empenho para desenvolver e dar validade a tais testes (RANG *et al.*, 2004).

Um agente ansiolítico deve reduzir a ansiedade e exercer um efeito calmante, com pouco ou nenhum efeito sobre as funções motoras ou mentais. Várias drogas ansiolíticas usadas rotineiramente, principalmente os benzodiazepínicos, estão entre as classes de drogas que modulam alostericamente os receptores gabaérgicos do tipo A (OLSON, 2002).

O aparecimento dos benzodiazepínicos contribuiu para uma melhor compreensão das bases da ansiedade. Essas drogas foram introduzidas na clínica médica há mais de quatro décadas e são os agentes ansiolíticos de escolha devido a sua efetividade e relativa segurança. Entretanto, essas drogas podem induzir tolerância e dependência física (WALKER, 1990). Isto tem direcionado a pesquisa para novos e melhores agentes ansiolíticos. Drogas que reduzem a atividade serotoninérgica central, tais como o agonista parcial do receptor 5-HT_{1A}, buspirona, e o antagonista 5-HT₃, ondansetron, têm desviado a atenção dos benzodiazepínicos.

1.7.1 Sistema gabaérgico

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório no SNC e é formado por uma via metabólica denominada GABA *shunt*. O GABA *shunt* é um processo de alça fechada que tem como objetivo produzir e conservar o suplemento de GABA. Este neurotransmissor está presente em altas concentrações (milimolar) em muitas regiões cerebrais, concentrações estas que são cerca de 1.000 vezes maiores que aquelas dos neurotransmissores clássicos monoaminérgicos nas mesmas regiões. Isto está de acordo com

as ações poderosas e específicas dos neurônios GABAérgicos nestas regiões. A glicose é o principal precursor da produção do GABA *in vivo*, embora o piruvato e outros aminoácidos possam atuar como precursores.

O GABA atua em dois tipos distintos de receptores: GABA_A e GABA_B. O receptor GABA_A consiste em um canal regulado por ligante, sensível ao cloreto, enquanto os receptores GABA_B são acoplados à proteína G e regulam canais de K⁺ que quando ativados reduzem a condutância ao Ca⁺⁺ e inibem a produção de AMPc. Recentemente, foi proposto o receptor GABA_C que se assemelha estreitamente ao receptor GABA_A e exibe ações farmacológicas ligeiramente diferentes, embora sua importância funcional permaneça desconhecida.

Os receptores GABA_A são os de maior importância por possuírem um papel central na regulação da excitabilidade cerebral, através de seus efeitos inibitórios, e, muitas drogas importantes tais como os benzodiazepínicos, apresentam vários efeitos relacionados com este receptor, tais como a sedação e a indução do sono, a redução da ansiedade e da agressão, a redução do tônus muscular e da coordenação, efeito anticonvulsivante, além de amnésia anterógrada. Estes efeitos dos benzodiazepínicos ocorrem através da potencialização da resposta ao GABA, por facilitarem a abertura dos canais de cloreto ativados pelo GABA. Eles se ligam de um modo específico em um sítio regulador do receptor, distinto do sítio ligante de GABA, e agem de modo alostérico, aumentando a afinidade do GABA pelo receptor (RANG *et al.*, 2004)

O receptor GABA_A (Figura 3) é um canal iônico acionado por ligante, consistindo de um aglomerado pentamérico, construído pela reunião de 18 ou mais subunidades diferentes. A subunidade α do complexo pentamérico ocorre em seis isoformas (α_1 - α_6). Mutações de um único aminoácido, na subunidade α , elimina a sensibilidade aos benzodiazepínicos. Isto foi usado em uma série engenhosa de experimentos em camundongos transgênicos nos quais esse aminoácido foi mutado em quatro das diferentes subunidades α . A seguir, os animais foram testados, para determinar que efeitos benzodiazepínicos fossem eliminados nesses diferentes mutantes, com o resultado interessante de que a mutação na subunidade α_1 (a variante mais amplamente expressa) eliminou as ações sedativa e a produtora de amnésia dos benzodiazepínicos, assim como diminuiu o efeito anticonvulsivante, enquanto que a mutação na subunidade α_2 (expressa principalmente no sistema límbico) eliminou o efeito ansiolítico, mas deixou inalterado o efeito sedativo. Diferentes efeitos benzodiazepínicos podem, assim, estar ligados a diferentes subtipos de

receptores de GABA_A, sugerindo a possibilidade de desenvolvimento de novas substâncias com efeitos mais seletivos do que os benzodiazepínicos existentes. Um avanço importante deve ser uma substância seletiva para α_2 com ações ansiolíticas, mas sem atividades sedativas (RANG *et al.*, 2004).

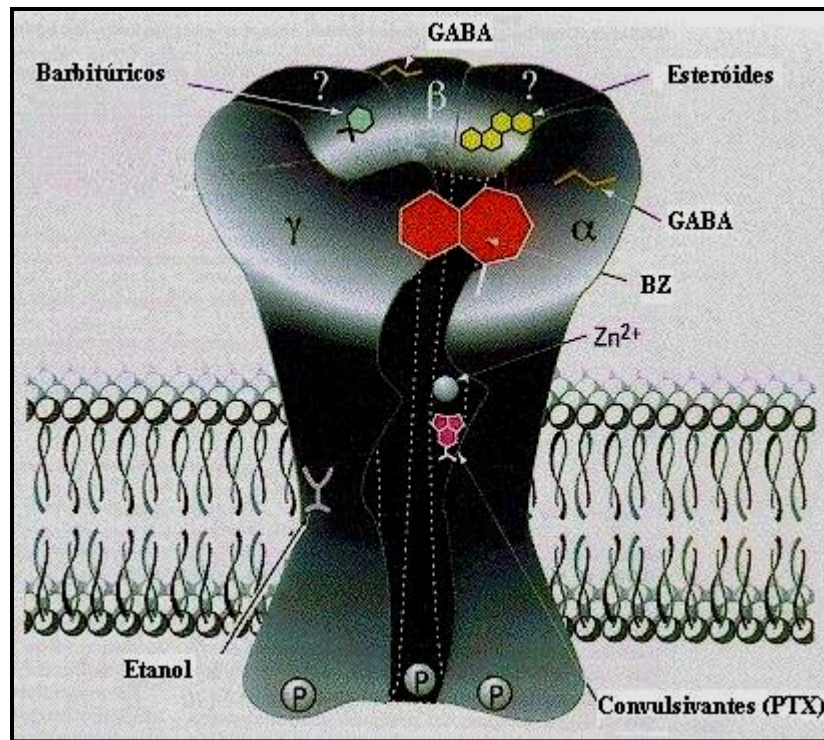


Figura 3 - Receptor GABA_A.

Fonte: <<http://www.pr.mq.edu.au/macnews/sept01/apaf.htm>>

1.8 Depressão

A depressão é uma condição psiquiátrica extremamente comum, debilitante, com uma significativa incidência na população mundial. Cerca de 5-6% da população apresentam depressão (prevalência de ponto), e estima-se que 10% das pessoas podem vir a sofrer depressão durante a sua vida (prevalência em toda a vida) (KATZUNG, 2003). Numerosos compostos antidepressivos estão agora disponíveis e presume-se que agem através de diferentes mecanismos, incluindo os sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e/ou dopaminérgico. A heterogeneidade da resposta clínica às drogas antidepressivas e

estabilizadoras do humor, e, a susceptibilidade aos efeitos adversos, são os maiores problemas encontrados atualmente na clínica (LERER; MACCIARDI, 2002).

Acredita-se que o estresse e a depressão são fenômenos inter-relacionados. O estresse é tipicamente implicado na etiologia das desordens depressivas ou como uma conseqüência delas (ANISMAN; ZACHARKO, 1982; BROWN, 1993; LLOYD, 1980; SHERRILL *et al.*, 1997; TURNER; LLOYD, 1999).

Para explicar a patogenia da depressão surgiu a hipótese das monoaminas, que afirma que a depressão é causada por um déficit funcional das monoaminas transmissoras em certos locais no cérebro, enquanto a mania resulta de um excesso funcional (MANJI; DREVETS; CHARNEY, 2001). Esta hipótese surgiu originalmente das associações entre os efeitos clínicos de vários fármacos que causam ou aliviam os sintomas da depressão e seus efeitos neuroquímicos conhecidos sobre a transmissão monoaminérgica no cérebro.

Apesar da teoria das monoaminas, foi sugerido que o neurotransmissor dopamina também participa na depressão (BROWN, 1993; KAPUR; MANN, 1992). A dopamina está implicada na regulação do humor (BROWN, 1993) e foi mostrado que, em modelos animais de depressão, os níveis de dopamina extracelular no cérebro estavam diminuídos (ROSSETTI *et al.*, 1993). Além disso, tem sido considerado que a dopamina está envolvida com os efeitos antidepressivos de drogas (JOCA *et al.*, 2000), pois a bupropiona, um inibidor seletivo da recaptação de dopamina, é clinicamente usado em humanos como um antidepressivo ou na terapia de retirada da nicotina (ASCHER *et al.*, 1995; MARTIN *et al.*, 1990; RICHMOND; ZWAR, 2003).

A disponibilidade de agonistas e antagonistas permitiram estudos, os quais indicam o papel dos receptores dopaminérgicos nas funções motoras tais como locomoção, catalepsia, *rearing* e *grooming* em camundongos e ratos. Geralmente, agonistas aumentam a função dopaminérgica, aumentando a atividade motora, enquanto os antagonistas possuem efeito oposto. A administração sistêmica do agonista do receptor D₁, SKF-38393, em ratos aumenta o *grooming* e *rearing*, mas não aumenta significativamente a locomoção ou outros comportamentos estereotipados (JACKSON; WESTLIND-DANIELSSON, 1994). Entretanto, a infusão direta deste agonista dentro do núcleo accumbens também afeta a locomoção, *rearing* e a estereotipia de maneira dose-dependente (MEYER; VAN HARTESVELDT; POTTER, 1993). De forma oposta, a injeção de antagonistas dos receptores D₁, tais como SCH-23390 ou SKF-83566 reduzem os mesmos comportamentos, de maneira dose e tempo-dependente (MEYER *et al.*, 1993).

A principal objeção da hipótese dopaminérgica da depressão é que clinicamente os antidepressivos efetivos inibem a recaptação de serotonina ou noradrenalina, mas não dopamina. Existe uma aparente contradição no mecanismo de ação desses antidepressivos, pois, apesar do bloqueio da recaptação de serotonina e noradrenalina ocorrerem imediatamente após o tratamento agudo, o efeito clínico dos antidepressivos acontece apenas após duas ou quatro semanas de tratamento. Essa afirmativa pode fortalecer a hipótese dopaminérgica, pois estudos mostram que o tratamento crônico com todos os inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina potenciam a transmissão dopaminérgica no núcleo *accumbens* (SERRA *et al.*, 1992).

Em animais, não há condição conhecida que corresponda à condição inata da depressão em seres humanos, mas vários procedimentos foram descritos, que produzem em animais estados comportamentais (retirada da interação social, perda de apetite, atividade motora reduzida, estresse, situações inescapáveis, entre outros), típicos da depressão humana (PORSOLT; ANTON; JALFRE, 1987).

1.8.1 Catecolaminas

As catecolaminas são compostos que contêm um núcleo catecol e uma cadeia lateral contendo amina. Do ponto de vista farmacológico, as catecolaminas mais importantes são:

- Noradrenalina: substância transmissora liberada por neurônios pós-ganglionares;
- Adrenalina: hormônio secretado, juntamente com a noradrenalina, pela supra-renal;
- Dopamina: precursor da noradrenalina e da adrenalina;
- Isoprenalina: derivado sintético da noradrenalina que não é encontrado no corpo (RANG *et al.*, 2004).

A dopamina é um dos principais neurotransmissores de modulação no cérebro (JONES; PILOWSKY, 2002). Evidências mostram que a dopamina tem um papel bem

estabelecido na regulação da atividade motora, emoção, motivação e cognição. Um desequilíbrio do sistema dopaminérgico é a base etiológica de doenças como a esquizofrenia, doença de Parkinson e discinesia tardia (SPIELEWOY *et al.*, 2000).

A síntese da dopamina começa com a L-tirosina, um aminoácido aromático presente nos líquidos orgânicos, que é captado pelos neurônios adrenérgicos. A tirosina hidroxilase, enzima que catalisa a conversão de tirosina em diidroxifenilalanina (DOPA), é encontrada apenas nas células que contêm catecolaminas, provavelmente sob a forma livre no citosol. A tirosina-hidroxilase é considerada a enzima limitante desta via (FELDMAN; MEYER; QUENZER, 1997). A etapa seguinte, que consiste na conversão da DOPA em dopamina, é catalisada pela DOPA descarboxilase, em enzima citosólica, que não se limita às células que sintetizam catecolaminas.

A dopamina sintetizada pode atuar nos receptores dopaminérgicos, ser recaptada sem sofrer nenhuma transformação, ser metabolizada pelas enzimas monoamina oxidase (MAO) e catecol-O-metil transferase (COMT) em produtos inativos ou pode ser convertida em noradrenalina pela dopamina β -hidroxilase nas terminações nervosas. A MAO está localizada na parte externa da membrana mitocondrial (COSTA; SANDLER, 1972) e pela sua localização intracelular, tem um papel estratégico na inativação das catecolaminas que estão livres na fenda sináptica. A COMT age nas catecolaminas extraneuronais.

A noradrenalina é um transmissor da via inibitória do *locus ceruleus* para o corno dorsal e possivelmente também em outras vias antinociceptivas. A teoria das monoaminas sugere que a depressão resulta da deficiência funcional da transmissão dessa monoamina, relacionando especificamente com os receptores adrenérgicos do tipo α_1 (HIRANO *et al.*, 2007).

O processo de captação das monoaminas foi originalmente descrito por AXELROD (1971) e é de suma importância para a finalização da ação do neurotransmissor na fenda sináptica. A captação é mediada por um carreador ou transportador localizado no lado externo do neurônio catecolaminérgico. Estes transportadores fazem parte de uma grande família de neurotransportadores (AMARA; KUHAR, 1993). O processo de captação é dependente de energia, desde que ele pode ser inibido pela incubação a baixas temperaturas ou por inibidores metabólicos. O processo depende de um gradiente de Na^+ e de Cl^- . Este transporte pode ser inibido por drogas como os antidepressivos e a cocaína.

- Sistema dopaminérgico

A dopamina constitui em torno de 80% do conteúdo de catecolaminas no cérebro. Projeções originadas de áreas cerebrais que sintetizam este neurotransmissor se estendem para

regiões do mesencéfalo formando quatro vias dopaminérgicas: (1) nigroestriatal; (2) mesolímbica; (3) mesocortical e (4) tuberoinfundibular (Figura 4).

O sistema nigroestriatal compreende os neurônios dopaminérgicos que se originam da substância negra *pars compacta* e terminam na região chamada de corpo estriado dorsal. Esta região inclui o núcleo caudado e putamen. A via nigroestriatal esta envolvida no controle dos movimentos e a sua degeneração causa a doença de Parkinson, caracterizada por tremor de repouso, rigidez e bradicinesia (GERFEN, 1992; LANG; LOZANO, 1998). A via mesocortical tem origem na área tegmentar ventral (ATV) e inerva diferentes regiões do cortex frontal. Esta via parece estar envolvida em alguns aspectos do aprendizado e memória (FELDMAN; MEYER; QUENZER, 1997). A via mesolímbica é originada do mesencéfalo na área tegmentar ventral e inerva o estriado ventral (núcleo *accumbens*), o tubérculo olfatório (TO) e parte do sistema límbico (FELDMAN; MEYER; QUENZER, 1997). Esta via está implicada com o comportamento motivacional (KOOB; BLOOM, 1988; KOOB, 1992). A via tuberoinfundibular origina-se das células do núcleo periventricular e arqueado do hipotálamo (FELDMAN; MEYER; QUENZER, 1997). As projeções desta via alcançam a eminência média do hipotálamo onde ocorre liberação de dopamina nos espaços perivascularres do plexo capilar do sistema hipotalâmico-hipofisário. Por esta via a dopamina é transportada para a hipófise anterior onde atua inibindo a liberação de prolactina (Quadro 3).

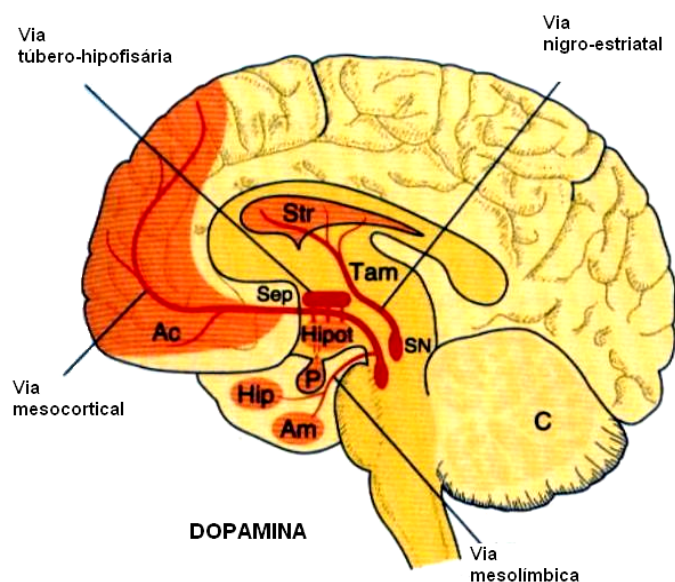


Figura 4 – Vias dopaminérgicas no cérebro.

Fonte: Rang *et al.*, 2004.

A família de receptores da dopamina pode ser dividida em dois grupos principais: D1-símile (D1 e D5) e D2-símile (D2, D3, D4) que estão distribuídos pelo cérebro. Essa divisão foi devido à existência de diferentes seqüências de aminoácidos no DNA. Os receptores D1 e D2 encontram-se predominantemente no neocórtex, enquanto os receptores D3 estão presentes principalmente no tubérculo olfatório, núcleo *accumbens* e no hipotálamo (ANANTH *et al.*, 2001; JONES; PILOWSKY, 2002). Os receptores D3 são os mais sensíveis, requerendo menos dopamina para serem disparados do que os outros. O receptor D4 apresenta níveis elevados no córtex pré-frontal (ANANTH *et al.*, 2001) e o D5 no hipotálamo e no hipocampo (JONES; PILOWSKY, 2002).

Esses receptores realizam suas ações por se acoplarem e ativarem diferentes complexos de proteínas G. Os receptores D₁-símile interagem com o complexo de proteínas G_s, resultando em ativação da adenilil ciclase e aumento nos níveis de AMPc intracelular. Esses receptores estão localizados principalmente no neurônio pós-sináptico. Os receptores D₂-símile interagem com um complexo de proteínas G_i com conseqüente inibição da produção de AMPc (CIVELLI; BUNZOW; GRANDY, 1993; COOPER; BLOOM; ROTH, 1991; DE KEYSER, 1993). Além disso, a família de receptores D₂-símile bloqueia os canais de cálcio e abrem os canais de potássio, através do mecanismo da hidrólise do fosfolipídio, aumentando assim o trifosfato de inositol (IP₃) (Quadro 3).

Quadro 3 – Receptores de dopamina

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 Ativação/inibição da secreção de hormônios	Inibição pré- e pós-sináptica Ativação/inibição da secreção de hormônios	Inibição pré- e pós-sináptica Ativação/inibição da secreção de hormônios

IP₃ – trifosfato de inositol

Fonte: Rang *et al.*, 2004

- Sistema noradrenérgico

O neurônio noradrenérgico constitui um importante alvo para a ação de substâncias, tanto como objeto de investigação por si mesmo quanto como ponto de ataque de muitas substâncias clinicamente úteis.

Os receptores adrenérgicos são classificados farmacologicamente em subtipos α e β . Os estudos subseqüentes com agonistas e antagonistas confirmaram a existência de dois subtipos principais de receptores α -adrenérgicos (α_1 e α_2) e três subtipos de receptores β -adrenérgicos (β_1 , β_2 e β_3) (Quadro 4)

Todos os adrenérgicos constituem em receptores típicos acoplados à proteína G, e a sua clonagem revelou que os receptores α_1 e α_2 -adrenérgicos são constituídos, cada um, de outras subclasses, que se expressam em diferentes locais, mas cuja funções ainda não foram, em sua maior parte, elucidadas (BYLUND, 1994; INSEL, 1996).

Quadro 4 – Receptores adrenérgicos

	α_1	α_2	β_1	β_2	β_3
Tecidos e efeitos					
Músculo liso:					
Vasos sangüíneos	Constrição	Constrição/dilatação		Dilatação	
Brônquios	Constrição			Dilatação	
Trato GI	Relaxamento	Relaxamento (Efeito pré-sináptico)		Relaxamento	
Esfíncteres GI	Contração				
Útero	Contração			Relaxamento	
Detrusor da bexiga				Relaxamento	
Esfíncter da bexiga	Contração				
Vias seminais	Contração			Relaxamento	
Íris (músculo radial)	Contração				
Músculo ciliar				Relaxamento	
Coração					
Freqüência			Aumento		
Força da contração			Aumento		
Musculatura esquelética					
				Tremor Aumento da massa muscular e da velocidade de contração Glicogenólise	Termogênese
Fígado					
	Glicogenólise			Glicogenólise	
Gordura					
					Lipólise Termogênese
Ilhotas pancreáticas					
		Diminuição da secreção de insulina			
Terminações nervosas					
Adrenérgicas		Redução da liberação		Aumento da liberação	
Colinérgicas		Redução da liberação			
Glândulas salivares					
	Liberação de K^+		Secreção de amilase		
Plaquetas					
		Agregação			
Mastócitos					
				Inibição da liberação de histamina	
Tronco encefálico					
		Inibe o fluxo simpático			
Segundos mensageiros e efetores					
	Ativação da PLC $\uparrow IP_3$ $\uparrow DAG$ $\uparrow Ca^{2+}$	$\downarrow cAMP$ \downarrow Canais de cálcio \uparrow Canais de potássio	$\uparrow cAMP$	$\uparrow cAMP$	$\uparrow cAMP$
Ordem de potência dos agonistas					
	NA \geq A \gg ISO	A > NA \gg ISO	ISO > NA > A	ISO > A > NA	ISO > NA = A
Agonistas seletivos					
	Fenilefrina, metoxamina	Clonidina, clenbuterol	Dobutamina, xamoterol	Salbutamol, terbutalina, salmeterol, formoterol	BRL 37344
Antagonistas seletivos					
	Prazosina, doxazocina	loimbina, idazoxan	Atenolol, metoprolol	Butoxamina	
A, adrenalina; cAMP, 3',5'-adenosina monofosfato cíclico; DAG, diacilglicerol; ISO, isoprenalina; IP ₃ , trifosfato de inositol, NA, noradrenalina; PLC, fosfolipase C.					

Fonte: Rang *et al.*, 2004

RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Devido ao precário acesso a medicina moderna, grande parte da população depende essencialmente de plantas medicinais para o cuidado com a saúde primária. Todavia, poucas plantas foram cientificamente estudadas para assegurar sua qualidade, segurança e eficácia (CALIXTO, 2005).

O reconhecimento das propriedades biológicas de ampla variedade de produtos naturais, termo empregado como sinônimo de metabólitos secundários, tem alimentado uma busca intensa por novos fármacos (MACEDO JÚNIOR., 2007).

A riparina II, uma substância pura, extraída do fruto maduro da planta *Aniba riparia*, que apresentou algumas propriedades farmacológicas mostrando ser uma substância biologicamente ativa. Quimicamente, a riparina II apresenta em sua estrutura, uma feniletilamina, especificamente a tiramina. A tiramina é um composto químico de ocorrência natural, produzida no metabolismo da tirosina (precursor das catecolaminas), podendo também ser convertida em dopamina através de uma reação metabólica catalisada por uma enzima chamada hidroxilase. Quando a tiramina alcança a circulação sanguínea, é captada para dentro dos terminais nervosos pré-sinápticos pelo mesmo mecanismo de transporte usado pelas catecolaminas. Uma vez inserida nos terminais nervosos, acredita-se que a tiramina provoque a liberação das catecolaminas para a fenda sináptica provocando o estímulo dos neurônios pré- e pós-sinápticos.

Diante da necessidade de buscar novos medicamentos de maior eficácia, com qualidade e segurança comprovadas, e levando em consideração a influência da tiramina sobre o sistema nervoso central (SNC), tornou-se de extrema relevância estudar os efeitos da riparina II, sobre o SNC, em vários modelos animais de comportamento, além de possível atividade anticonvulsivante e hipnótica.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar as ações da riparina II de Aniba riparia (Nees) Mez no sistema nervoso central, através do estudo das alterações comportamentais em diferentes modelos, já padronizados, de depressão, ansiedade, convulsão e sedação em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a atividade motora da riparina II nos modelos de campo abeto e rota rod;
- ✓ Avaliar a atividade ansiolítica da riparina II nos modelos de labirinto em cruz elevado e placa perfurada;
- ✓ Avaliar a atividade antidepressiva da riparina II nos modelos de nado forçado, suspensão da cauda;
- ✓ Avaliar a atividade anticonvulsivante da riparina II no modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol (PTZ);
- ✓ Avaliar a atividade sedativa/hipnótica da riparina II no modelo de tempo de sono induzido por pentobarbital;
- ✓ Avaliar a participação dos receptores GABA_A/Benzodiazepínicos, no mecanismo de ação ansiolítico da riparina II.
- ✓ Avaliar a participação do sistema dopaminérgico e noradrenérgico no mecanismo de ação antidepressivo da riparina II;

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). A fruta verde de *Aniba riparia* (material botânico) foi coletada 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 foi cedido ao Prof. Dr. José Maria Barbosa-Filho do grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba.

A extração e isolamento foram feitos pelo doutorando Stanley Juan Chavez Gutierrez sob a orientação e supervisão do Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho que gentilmente nos cedeu a substância isolada e que muito colaborou para realização deste trabalho.

4.2 Extração e isolamento

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 (CHCl₃). 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 à cromatografia (sílica gel). A eluição com solvente de polaridade crescente deu na ordem benzilbenzoatos (1 g) e sitosterol (75 mg). O extrato de CHCl₃ (59 g) foi cristalizado com benzeno (C₆H₆) dando riparina II (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).

4.3 Animais

Camundongos *Swiss* (20-25 g), adultos, do sexo masculino, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas de propileno, acondicionados em temperatura ambiente (26 ± 1 °C) e submetidos ao ciclo claro/escuro de 12 em 12 h onde receberam ração do tipo Purina e água *ad libitum*. Nos experimentos em que a via oral era utilizada para absorção do fármaco, os animais foram colocados em jejum de sólidos de 8 horas. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) desta universidade.

4.4 Drogas e reagentes

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

4.5 Equipamentos

Equipamentos	Origem
Balança Analítica	Modelo H5, Mettler, Suíça
Balança para animais	Filizola, Brasil
Campo Aberto	Fabricado no próprio laboratório
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	Fabricado no departamento
Pipetas Automáticas	H.E., Dinamarca
Recipiente do Nado Forçado	Fabricado no próprio laboratório
Sonicador	Modelo PT 10-35. Brinkmann Instruments Inc., USA
Vidrarias	Pirex, Brasil

4.6 Preparo das drogas

A riparina II (ripII) foi dissolvida com Tween 80 a 2% e diluída em água destilada, obtendo-se a concentração final de 2,5, 5,0 e 7,5mg/mL para ser administrada nas doses 25, 50 e 75 mg/kg, respectivamente. Os grupos controles receberam veículo (água destilada emulsificada a 2% com Tween 80). As drogas utilizadas ao longo dos experimentos tais como, diazepam (1 e 2 mg/kg), imipramina (10 e 30 mg/kg), bupropiona (30 mg/kg), pentobarbital sódico (40 mg/kg), pentilenotetrazol (100 mg/kg), flumazenil (2,5 mg/kg), SCH 23390 (15 µg/kg), sulpirida (50 mg/kg), ioimbina (1 mg/kg) e prazosina (1 mg/kg) foram dissolvidas e diluídas diretamente em água destilada. O volume total de solução administrada nos animais foi de 10 mL/kg.

4.7 Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram tratados com riparina II, de forma aguda, nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg através das vias oral (v.o.) e intraperitoneal (i.p.). Os animais foram submetidos aos testes 30 ou 60 minutos (min) após o tratamento intraperitoneal ou oral, respectivamente. Para a avaliação da atividade antidepressiva, foi utilizada imipramina 10 e 30 mg/kg, i.p., e, bupropiona 30 mg/kg, i.p. no teste do nado forçado e da suspensão da cauda, como padrões positivos. 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. Diazepam 2 mg/kg, i.p., foi usado também no modelo do *rota rod*, como padrão para atividade relaxante muscular, assim como diazepam 1 mg/kg, i.p., foi ainda utilizado nos modelos de tempo de sono induzido por pentobarbital e convulsão induzida por pentilenotetrazol como padrão para atividade sedativa e anticonvulsivante, respectivamente.

4.8 Protocolo experimental

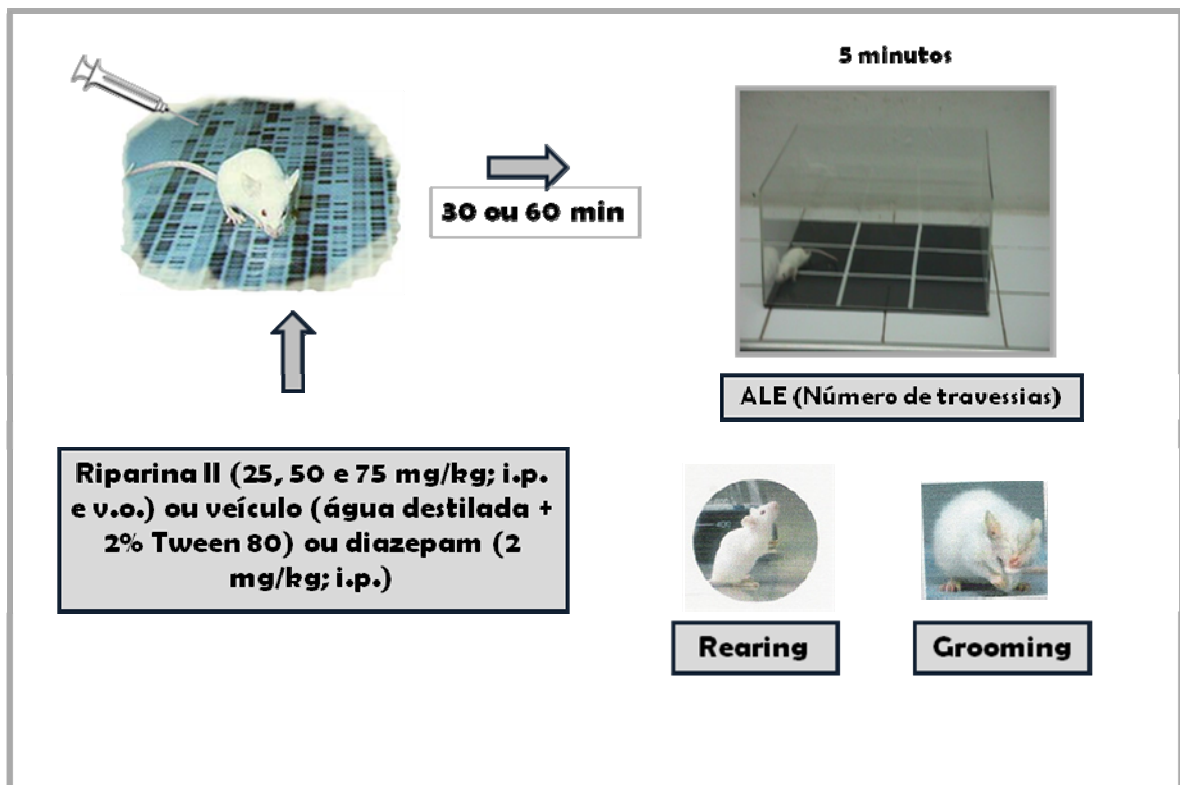
Antes dos experimentos, os animais foram colocados num ambiente fechado, desprovido de barulho externo, com a temperatura constante ($24 \pm 1^\circ \text{C}$) e iluminação de baixa densidade (lâmpada vermelha de 15 W), de modo que se adaptassem com o ambiente do experimento. Os testes do campo aberto e *rota rod* foram realizados com os mesmos grupos de animais da maneira descrita a seguir: primeiramente o animais, um por vez, foram colocados no campo aberto onde foram avaliados durante 5 minutos e, em seguida, foram transferidos para o *rota rod* onde a atividade foi registrada por 1 minuto. Os outros testes comportamentais tais como, labirinto em cruz elevado, placa perfurada, nado forçado, suspensão da cauda, tempo de sono induzido por pentobarbital e convulsão induzida por pentilenotetrazol foram realizados com diferentes grupos de animais. Em todos os testes, com exceção apenas do nado forçado e suspensão da cauda, após a observação de cada animal, foi utilizado álcool 70% para a remoção de resíduos e odor do animal.

4.9 Avaliação da atividade ansiolítica

4.9.1 Teste do campo aberto

O campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal (ARCHER, 1973). O teste consiste em observar o número de travessias de cada animal, durante 5 minutos. 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. Os parâmetros observados foram: ALE (atividade locomotora espontânea), ou seja, o número de quadrantes atravessados com as quatro patas cruzando cada área, “grooming” (número de comportamentos de auto-limpeza) e “rearing” (número de comportamento exploratório vertical).

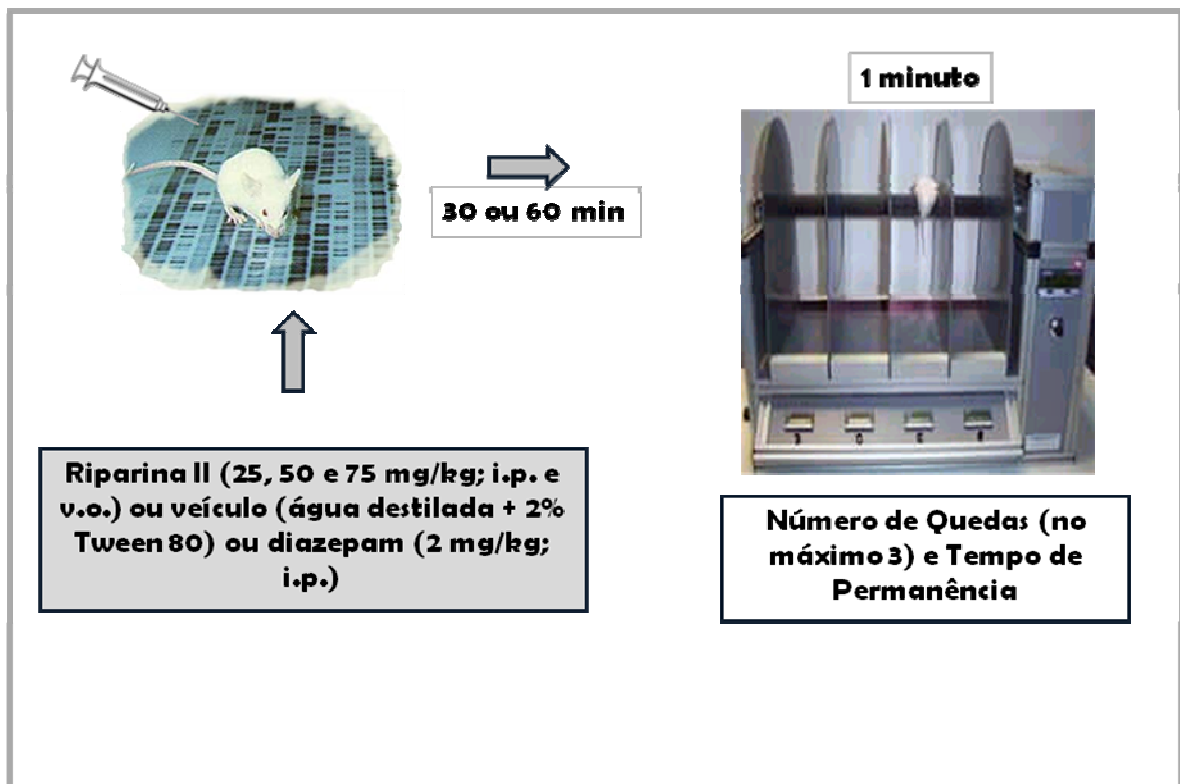
Quadro 5 – Esquema do teste do campo aberto.



4.9.2 Teste do *Rota Rod*

O teste do *rota rod* mede o efeito de relaxamento muscular ou incoordenação motora produzidos por drogas nos animais (CARLINI; BURGOS, 1979). O animal foi colocado 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. Para cada animal foram registrados o tempo de permanência na barra giratória, em segundos (s), e o número de quedas, com três reconduções, no máximo, em um período de até 1 minuto (DUNHAM; MIYA, 1957).

Quadro 6 – Esquema do teste do *rota rod*

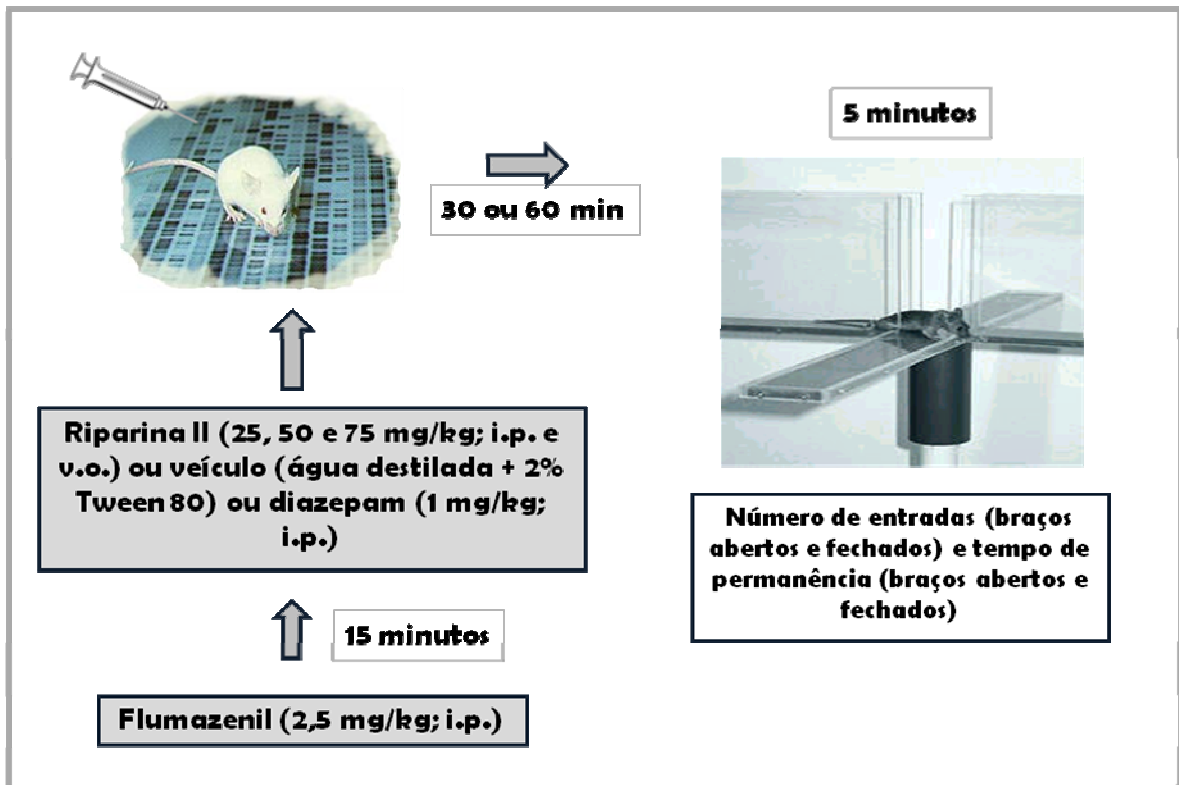


4.9.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado para camundongos (LISTER, 1987) consiste de dois braços abertos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm) posicionados perpendicularmente. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma, as paredes laterais dos braços fechados são confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto. 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 posicionados no centro do aparelho com o focinho voltado para um dos braços fechados. Durante 5 minutos foram observados os seguintes parâmetros: número de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo de permanência em cada um deles. A frequência total de entradas é obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e nos fechados. Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos a percentagem de entradas nos braços abertos é calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, e esse índice multiplicado por 100. De maneira semelhante é calculada a percentagem do tempo em que os animais permanecem nos braços abertos. Dessa forma, os parâmetros levados em consideração para análise estatística são: número de entradas nos braços abertos (NEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) e percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA).

Subseqüentemente foram feitos dois grupos com a finalidade de investigar o mecanismo de ação da riparina II. O primeiro grupo foi composto por camundongos tratados com flumazenil (FLU) 2,5 mg/kg, i.p., um antagonista do receptor GABA_A/Benzodiazepínico, e 15 min depois, foi administrado veículo por via oral (FLU-2,5 + veículo). Ao segundo grupo foi administrado flumazenil, e, 15 min depois riparina II 75 mg/kg, v.o. (FLU-2,5 + ripII-75). Os dois grupos experimentais foram conduzidos ao labirinto 60 min depois da administração do veículo e ripII-75. Para análise estatística, o grupo (FLU-2,5 + ripII-75) foi comparado com o grupo ripII-75, v.o., enquanto que os demais grupos foram comparados aos respectivos controles.

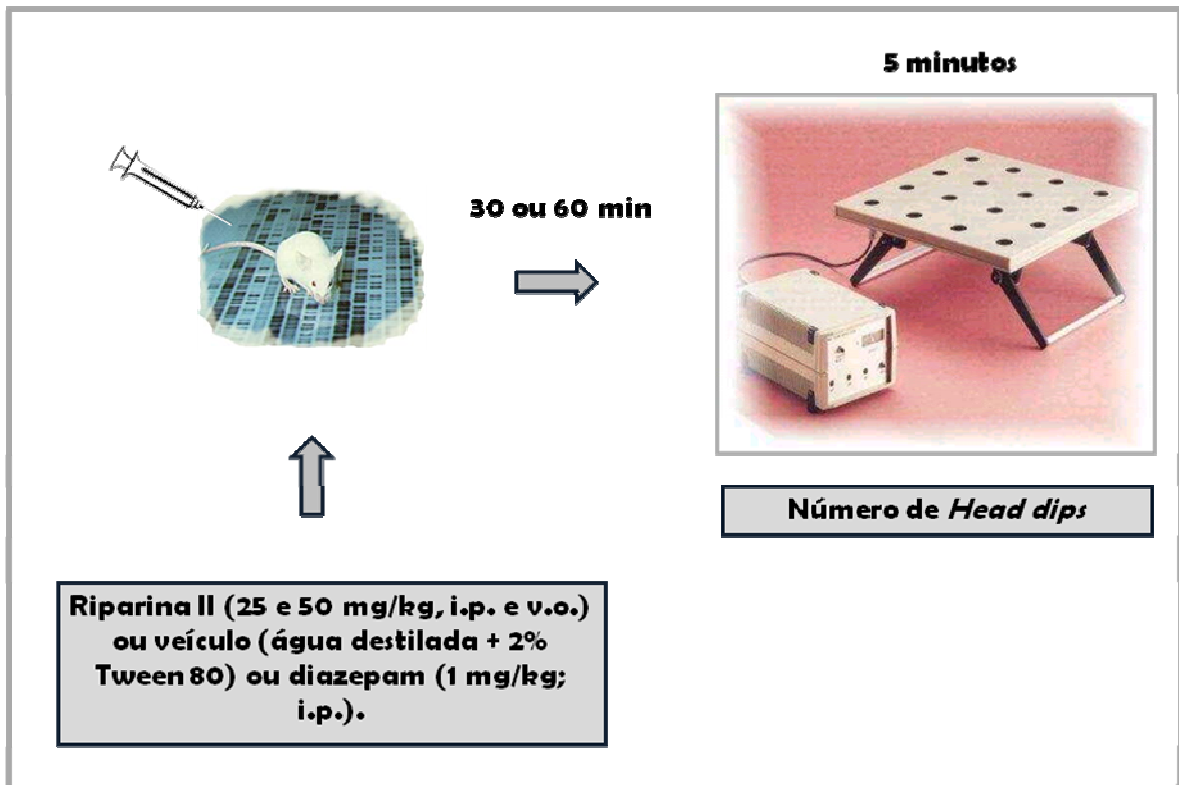
Quadro 7 – Esquema do Teste do Labirinto em Cruz Elevado.



4.9.4 Teste da placa perfurada

O teste da placa furada, utilizado para avaliar o comportamento exploratório em camundongos foi o proposto por Clark, Koster e Person, (1971). O aparato usado foi um Ugo Basile de 60 x 30 cm com 16 buracos espaçados uniformemente com sensores de infravermelho. O parâmetro analisado foi o número de vezes que o animal colocou a cabeça nos buracos (*head dips*) durante o período de 5 minutos. Os animais, um por vez, foram colocados na plataforma 30 ou 60 minutos após os tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente. A contagem do número de *head dips* foi feita automaticamente através do sensor localizado nos buracos e registrada no aparelho.

Quadro 8 – Esquema do teste da placa perfurada



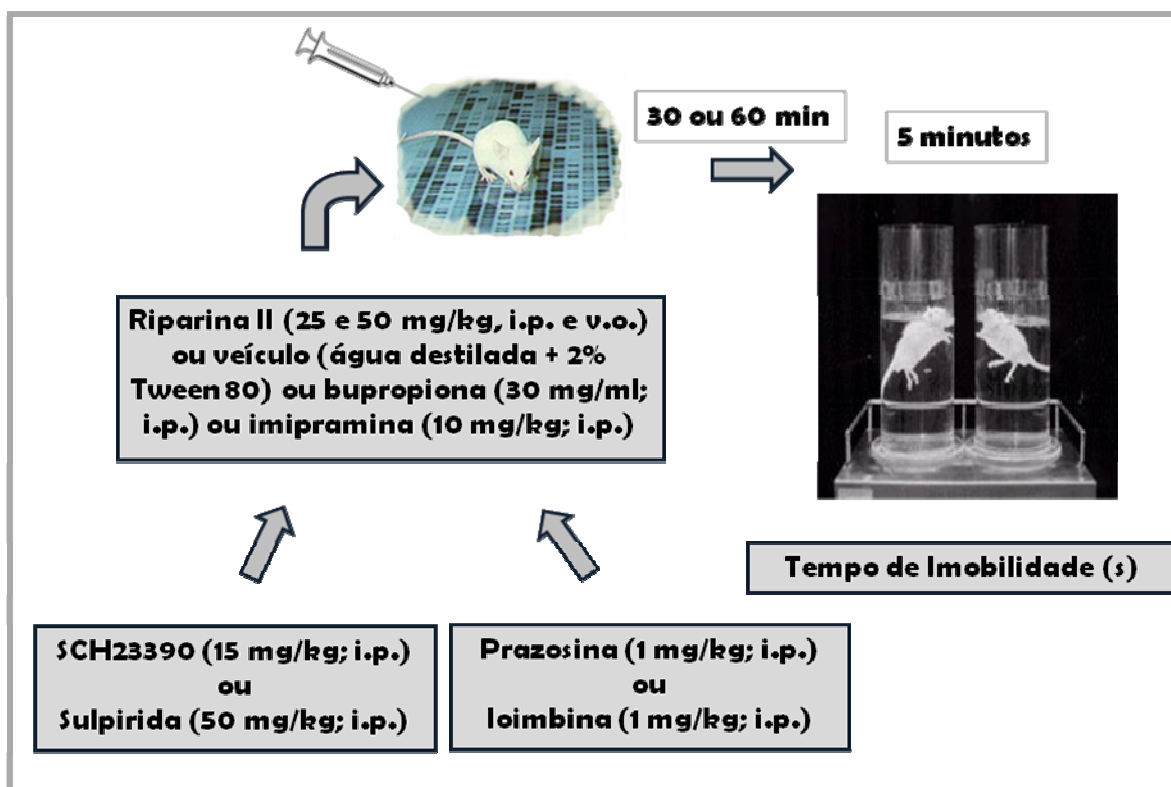
4.10 Avaliação da atividade antidepressiva

4.10.1 Teste do nado forçado

No teste do nado forçado (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977) tanques cilíndrico transparentes medindo 22 cm de diâmetro e 40 cm de altura contendo água na temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) 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 parâmetro observado foi o tempo de imobilidade, em segundos, 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.

Com a finalidade de investigar o mecanismo de ação da atividade antidepressiva da riparina II diferentes grupos foram utilizados. Para avaliar se estava relacionado com a atividade dopaminérgica, os animais foram pré-tratados com sulpirida (SPD; 50 mg/kg, i.p.) ou SCH 23390 (SCH; 15 µg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração de riparina II (50 mg/kg, v.o.), veículo (água destilada + 2% Tween 80, v.o.) ou bupropiona (30 mg/kg, v.o.). Depois de 60 minutos da administração da ripII-50, veículo ou bupropiona, os animais foram colocados no cilindro com água onde o tempo de imobilidade por 5 minutos foi avaliado. Na investigação do envolvimento do sistema noradrenérgico, foram utilizados prazosina (PRA; 1mg/kg; i.p.), antagonista dos receptores α_1 -adrenérgicos, ou ioimbina (IOIM; 1mg/kg; i.p.), antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos e como padrão positivo a imipramina (10 mg/kg, i.p.).

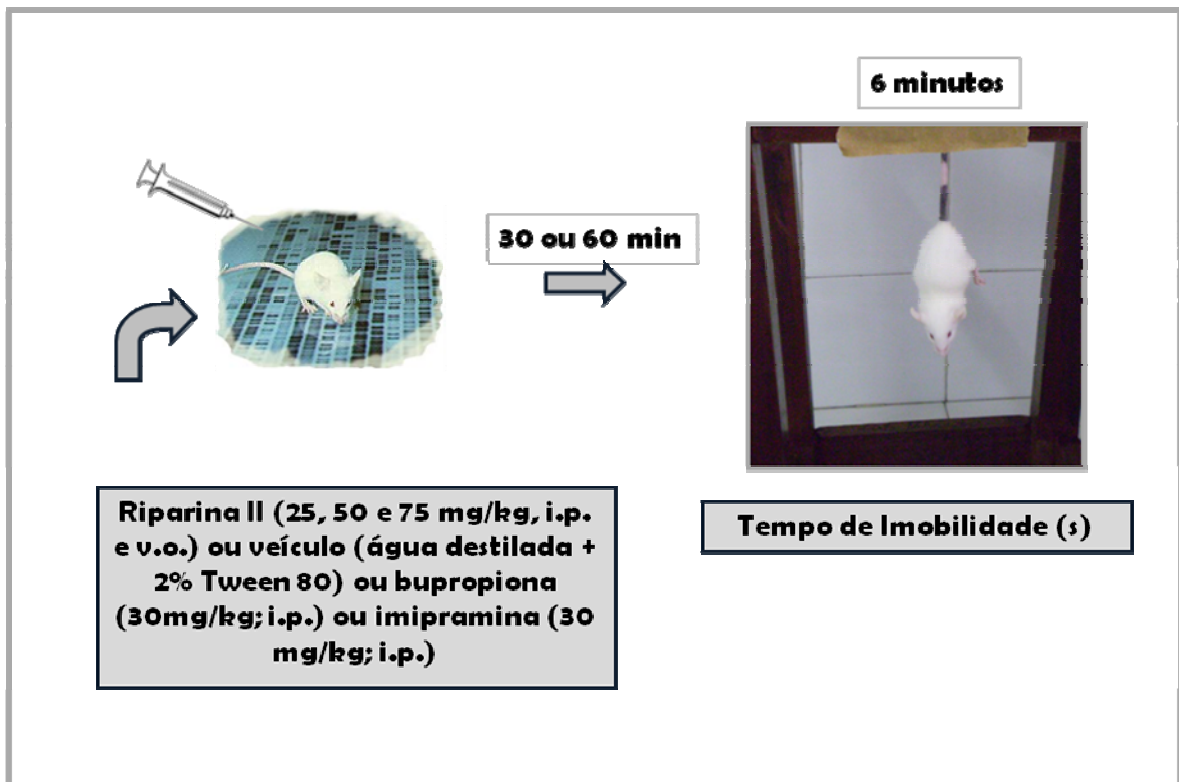
Quadro 9 – Esquema do teste do nado forçado.



4.10.2 Teste da suspensão da cauda

O método seguido foi o proposto por STERU *et al.*, (1985). Após 30 ou 60 min do tratamento i.p. ou v.o., respectivamente, os animais foram suspensos, presos com uma fita adesiva a cerca de 1 cm da ponta da cauda, numa plataforma 58 cm acima da bancada. O tempo de imobilidade do animal, em segundos, foi observado durante 6 minutos. Neste experimento foram utilizados os seguintes grupos: imipramina (30 mg/kg, i.p.), veículo (i.p. ou v.o.) ou riparina II (25 e 50 mg/kg; i.p ou v.o.).

Quadro 10 – Esquema do teste da suspensão da cauda

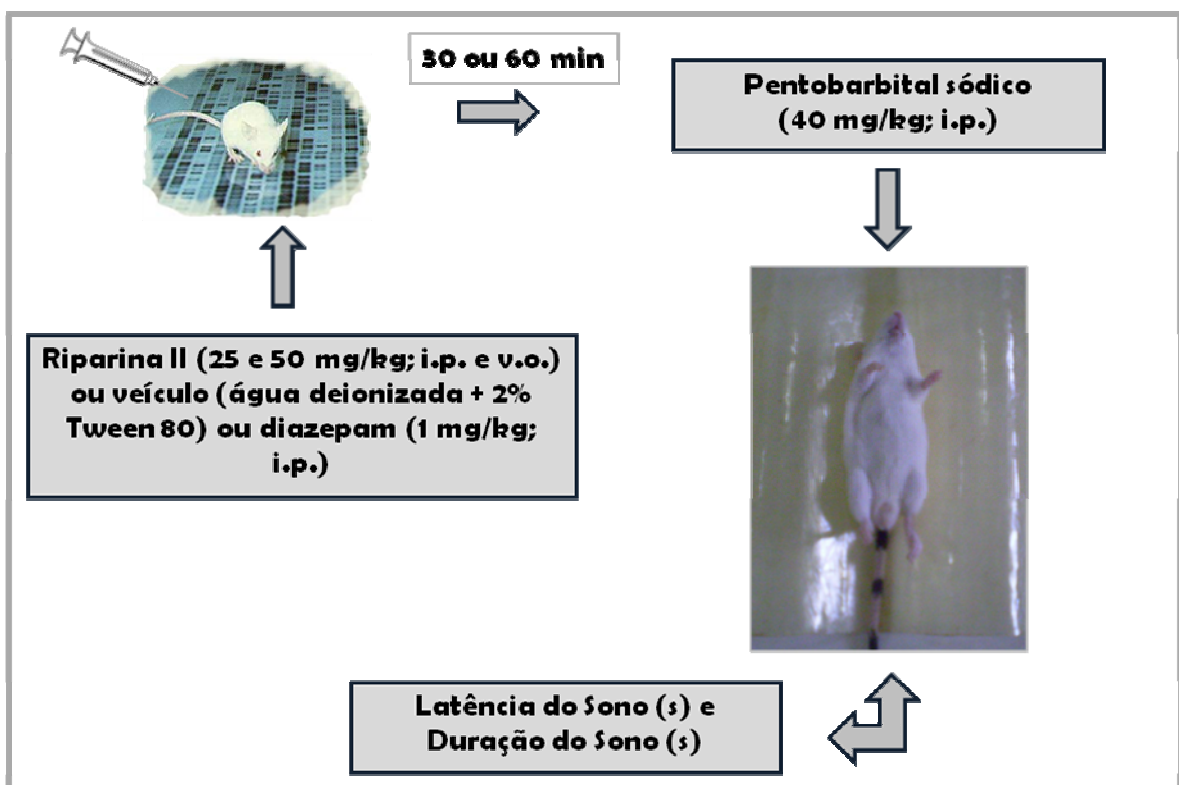


4.11 Avaliação da atividade sedativa/hipnótica e anticonvulsivante

4.11.1 Teste do tempo de sono induzido por pentobarbital

Os animais foram pré-tratados com riparina II (25 e 50 mg/kg; i.p. ou v.o.), veículo (controle) ou diazepam (1mg/kg, i.p.). Após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente, injetou-se pentobarbital sódico (PTB) na dose de 40 mg/kg, via i.p. Com o início da atividade do PTB, os animais foram colocados na posição de decúbito dorsal. O tempo desde a injeção do pentobarbital até o animal perder o reflexo postural é registrado como latência de sono e o tempo de latência entre a perda e a recuperação voluntária do reflexo postural é registrado como tempo de sono (WAMBEBE, 1985; ROLLAND *et al.*, 1991). O critério para a recuperação dos reflexos foi fixado quando o animal saiu da imposição por três vezes consecutivas (CARLINI *et al.*, 1986; MATTEI *et al.*, 1998). Um tempo máximo de 240 minutos foi estabelecido, ou seja, animais cujo tempo de sono ultrapassava esse valor, o mesmo foi mantido.

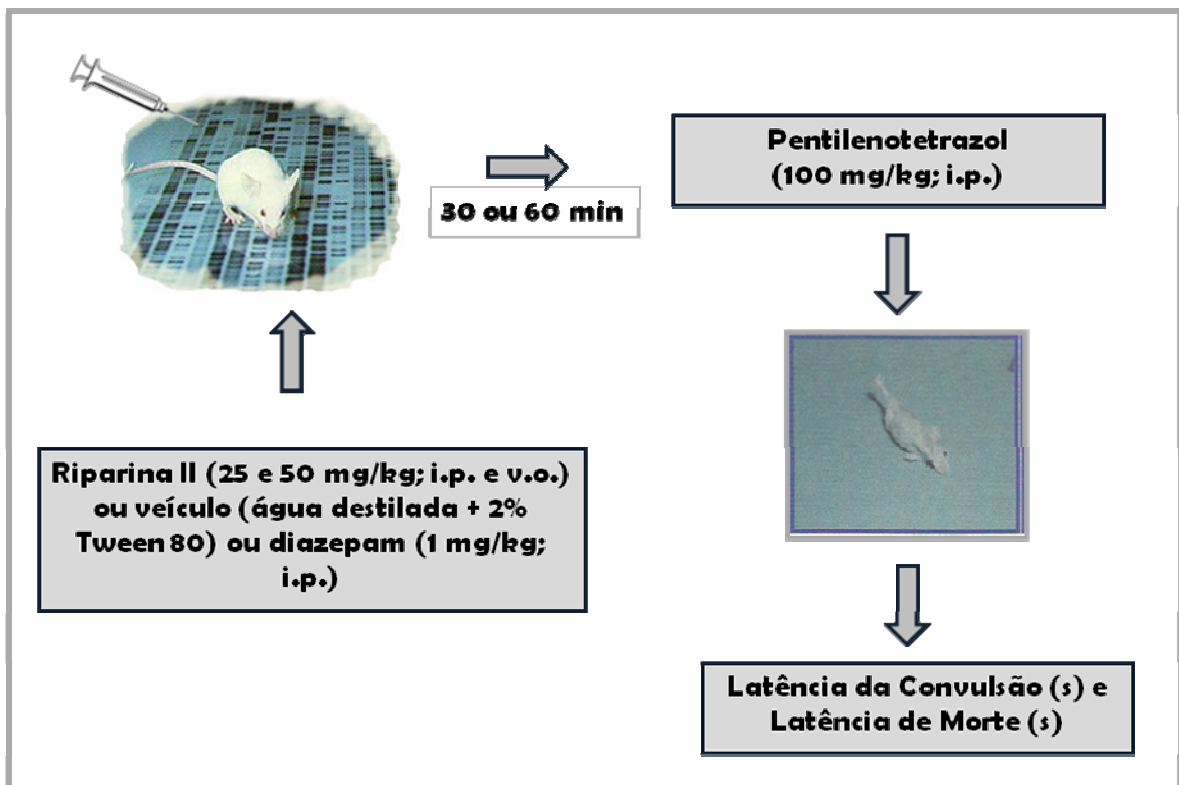
Quadro 11 – Esquema do teste do tempo de sono induzido por pentobarbital



4.11.2 Teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol

Esse experimento tem como objetivo avaliar a possível ação anticonvulsivante da droga em teste. O pentilenotetrazol (PTZ) 100 mg/kg, i.p. foi administrado como agente indutor das convulsões após o tratamento com riparina II (25 e 50 mg/kg; i.p. ou v.o.), veículo (controle) ou diazepam (1mg/kg, i.p.). Os animais foram colocados em gaiolas individuais e observados por um período de até 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.

Quadro 12 – Esquema do teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol



4.12 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism versão 4.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego California EUA. Copyright (c) 1994-1999 por GraphPad Software.

Os resultados que obedeciam a uma distribuição paramétrica foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Student Newman Keuls (*post hoc*). Os dados não-paramétricos foram analisados pelo mesmo programa utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunns (*post hoc*).

Em todas as análises estatísticas, os valores foram representados pela Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) com o número de animais entre parênteses e foi considerado o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,05$). Os asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) caracterizam o grau de significância, assim como os demais símbolos a e b.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

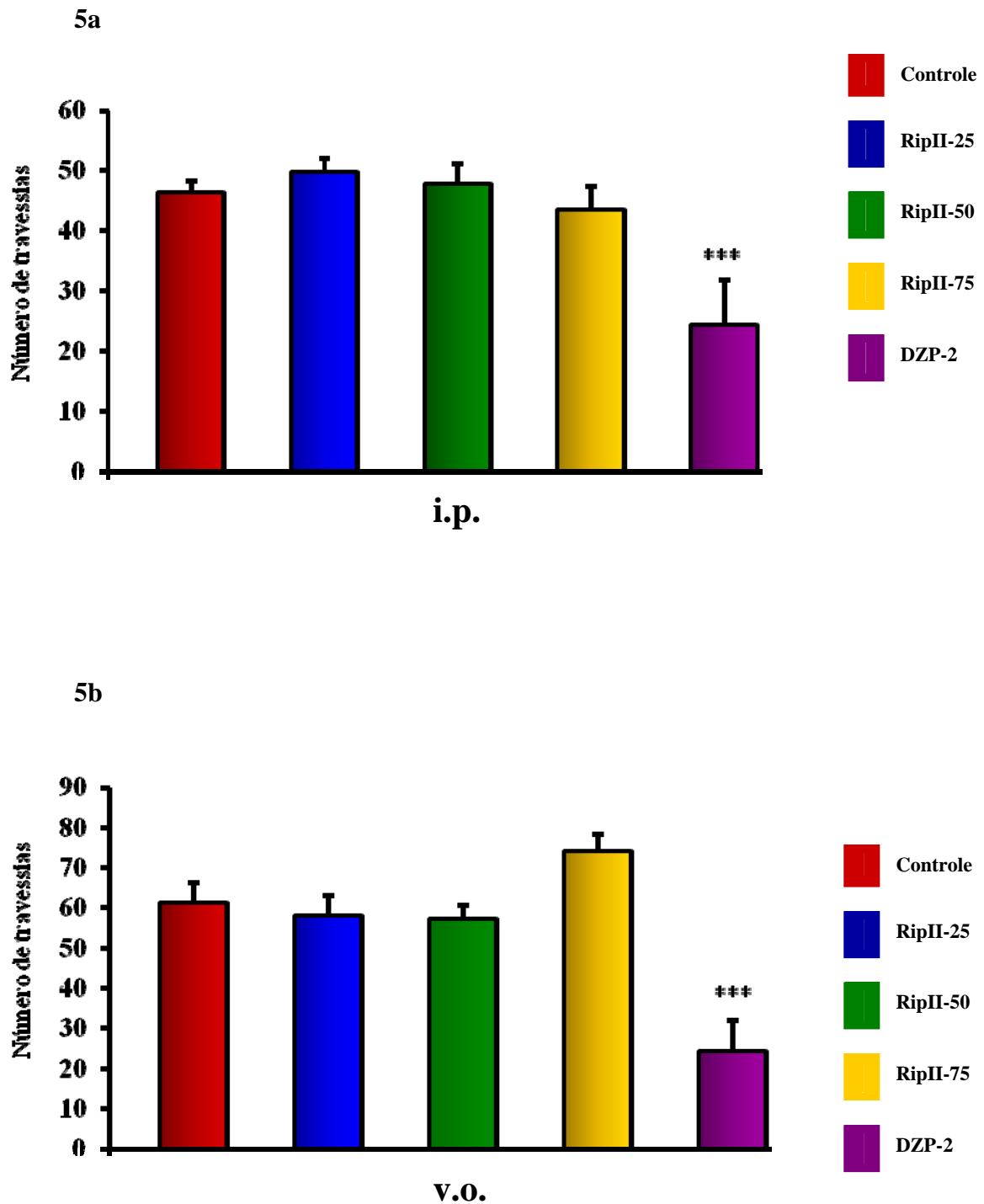
5.1 Avaliação da atividade ansiolítica

5.1.1 Teste do campo aberto

Os parâmetros analisados foram atividade locomotora espontânea (ALE), *rearing* e *grooming* e os resultados foram expressos como número de cruzamentos, de *rearing* e de *grooming*. A riparina II, por via oral e intraperitoneal, não alterou a atividade locomotora (Figuras 5a e 5b) em nenhuma das doses utilizadas [(i.p.) = ripII-25: $49,67 \pm 2,41$ (12); ripII-50: $47,83 \pm 3,30$ (12); ripII-75: $43,43 \pm 3,94$ (7); (v.o.) = ripII-25: $58,0 \pm 5,16$ (12); ripII-50: $57,25 \pm 3,31$ (12); ripII-75: $74,0 \pm 4,42$ (9)] comparando com os respectivos controles [(i.p.) = cont.: $45,83 \pm 1,98$ (12); (v.o.) = cont.: $61,17 \pm 5,06$ (12)]. O diazepam 2 mg/kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu a atividade locomotora em relação aos controles de ambas vias de administração, v.o. e i.p. [(DZP-2: $24,28 \pm 7,61$ (7); (i.p.) = cont.: $45,83 \pm 1,98$ (12); (v.o.) = cont.: $61,17 \pm 5,06$ (12)].

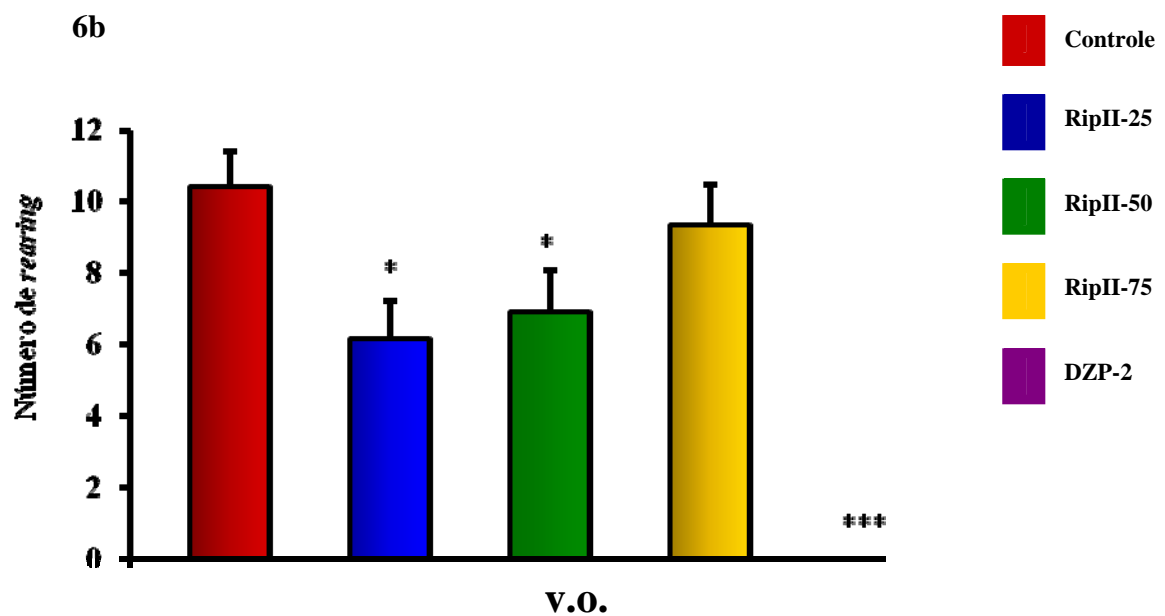
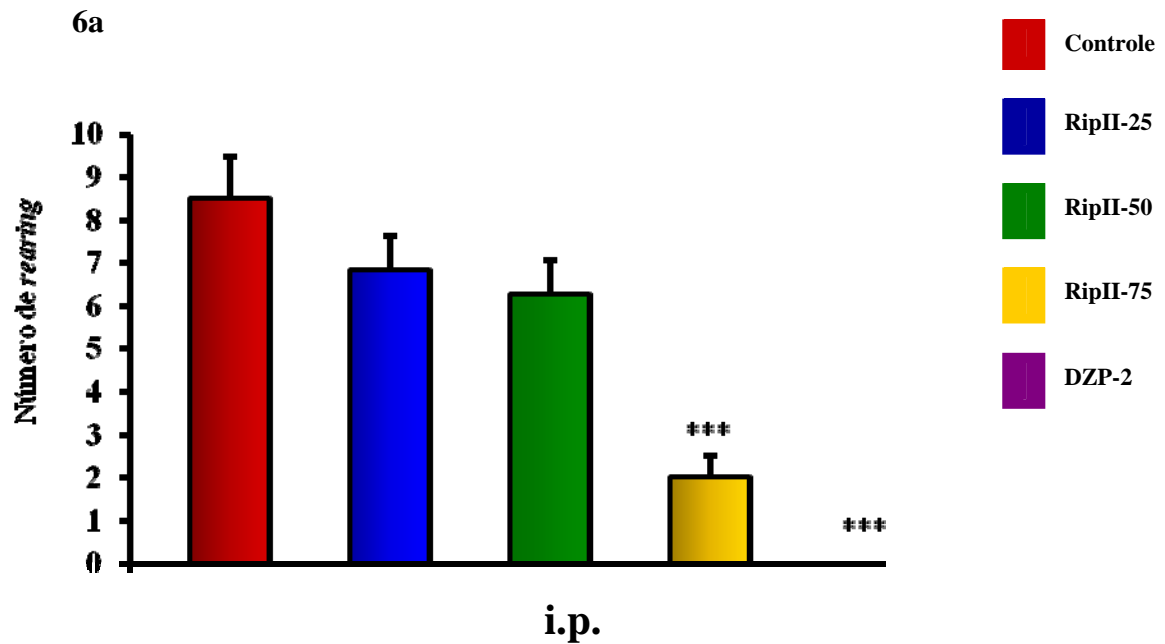
As Figuras 6a e 6b mostram que a riparina II diminuiu o número de *rearing* em ambas vias de administração [(i.p.) = ripII-25: $6,83 \pm 0,80$ (12); ripII-50: $6,27 \pm 0,79$ (11); ripII-75: $2,0 \pm 0,52$ (6); (v.o.) = ripII-25: $6,17 \pm 1,06$ (12); ripII-50: $6,92 \pm 1,18$ (12); ripII-75: $9,33 \pm 1,14$ (9)] quando comparado com os respectivos controles [(i.p.) = cont.: $8,50 \pm 0,97$ (12); (v.o.) = cont.: $10,42 \pm 1,0$ (12)]. Da mesma forma, diazepam 2 mg/kg, i.p. também diminuiu o número de *rearing* [DZP-2: $0,00 \pm 0,00$ (8)] comparando com os controles [(i.p.) = cont.: $8,50 \pm 0,97$ (12); (v.o.) = cont.: $10,42 \pm 1,0$ (12)].

O número de *grooming*, Figuras 7a e 7b, manteve-se constante após o tratamento i.p. e v.o. com riparina II [(i.p.) = ripII-25: $2,17 \pm 0,36$ (12); ripII-50: $1,92 \pm 0,36$ (12); ripII-75: $2,57 \pm 0,65$ (7); (v.o.) = ripII-25: $4,67 \pm 0,51$ (12); ripII-50: $4,08 \pm 0,70$ (12); ripII-75: $5,33 \pm 1,07$ (9)] comparando com os respectivos controles [(i.p.) = cont.: $3,08 \pm 0,45$ (12); (v.o.) = cont.: $4,16 \pm 0,61$ (12)]. Diazepam 2 mg/kg, i.p., também diminuiu este parâmetro [DZP-2: $1,12 \pm 0,29$ (8)] comparando com os controles [(i.p.) = cont.: $3,08 \pm 0,45$ (12); (v.o.) = cont.: $4,16 \pm 0,61$ (12)].



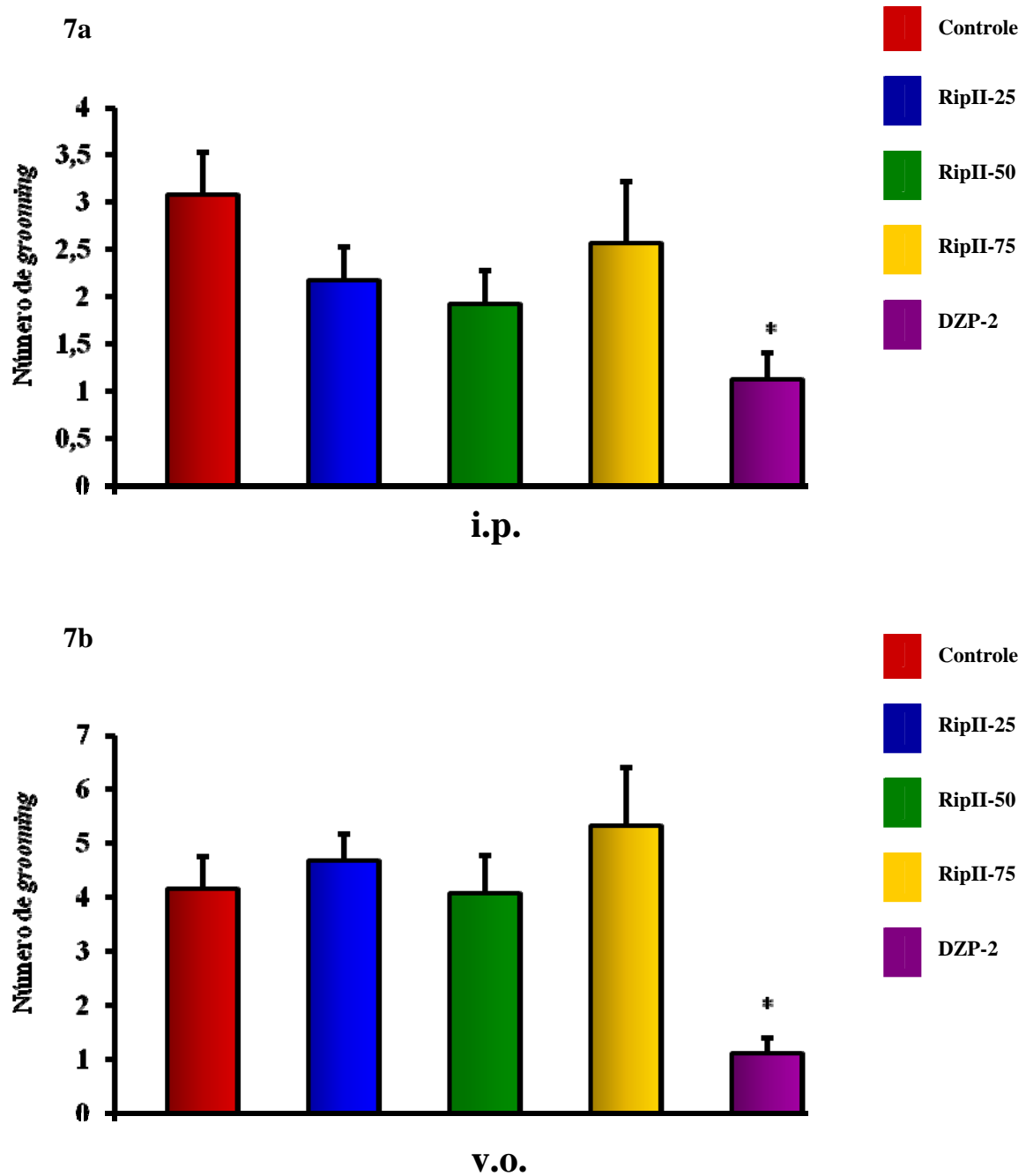
Figuras 5 - Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (5a) e oral (5b), sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25, 50 e 75 mg/kg) e diazepam (DZP; 2 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras 5a e 5b apresentam 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*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.



Figuras 6 - Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (6a) e oral (6b), sobre o número de *rearing* no teste do campo aberto em camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25, 50 e 75 mg/kg) e diazepam (DZP; 2 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras 6a e 6b representam a média \pm EPM do número de *rearing* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle.



Figuras 7 - Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (7a) e oral (7b), sobre o número de *grooming* no teste do campo aberto em camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25, 50 e 75 mg/kg) e diazepam (DZP; 2 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras **7a** e **7b** representam a média \pm EPM do número de *grooming* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs controle.

5.1.2 Teste do *rota rod*

Os animais tratados por via intraperitoneal com riparina II nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) no número de quedas (Tabela 1) [(NQ) ripII-25: $0,67 \pm 0,26$ (12); ripII-50: $0,92 \pm 0,19$ (12); ripII-75: $1,0 \pm 0,38$ (8)] ou no tempo de permanência na barra (Tabela 2), em segundos [(TP) ripII-25: $57,42 \pm 1,96$ (12); ripII-50: $58,67 \pm 0,33$ (12); ripII-75: $57,50 \pm 1,18$ (8)] em relação ao grupo controle [(NQ) controle: $0,58 \pm 0,19$ (12); (TP) controle: $59,25 \pm 0,25$ (12)].

Nenhuma alteração nestes parâmetros foi observada com os animais tratados com riparina II nas mesmas doses por via oral [(NQ) ripII-25: $0,77 \pm 0,32$ (13); ripII-50: $1,08 \pm 0,31$ (13); ripII-75: $0,62 \pm 0,32$ (8)] e [(TP) ripII-25: $55,31 \pm 2,98$ (13); ripII-50: $57,31 \pm 1,22$ (13); ripII-75: $58,75 \pm 0,65$ (8)] em relação ao grupo controle [(NQ) controle: $0,76 \pm 0,20$ (13) e (TP) controle: $59,0 \pm 0,28$ (13)] (Tabelas 1 e 2).

Como padrão positivo, o diazepam 2 mg/kg, i.p., aumentou o número de quedas [$2,50 \pm 0,27$ (8)] e diminuiu o tempo de permanência na barra [$35,25 \pm 6,69$ (8)] quando comparado aos grupos controles via oral e intraperitoneal. (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Efeito da administração intraperitoneal e oral da riparina II e diazepam no número de quedas no teste do *rota rod* para camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Número de Quedas
Via intraperitoneal		
Controle i.p	-	0,58 ± 0,19 (12)
RipII	25	0,67 ± 0,26 (12)
RipII	50	0,92 ± 0,19 (12)
RipII	75	1,00 ± 0,38 (8)
Via oral		
Controle v.o.	-	0,76 ± 0,20 (13)
RipII	25	0,77 ± 0,32 (13)
RipII	50	1,08 ± 0,31 (13)
RipII	75	0,62 ± 0,32 (8)
DZP	2	2,50 ± 0,27 (8)***

Os valores representam a média ± EPM do número de quedas. O número de animais está representado entre parênteses. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: ***p<0,001 vs controle v.o e i.p.

Tabela 2 – Efeito da administração intraperitoneal e oral da riparina II e diazepam no tempo de permanência na barra (s) no teste do *rota rod* para camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo de Permanência (s)
Via intraperitoneal		
Controle i.p	-	59,25 ± 0,25 (12)
RipII	25	57,42 ± 1,96 (12)
RipII	50	58,67 ± 0,33 (12)
RipII	75	57,50 ± 1,18 (8)
Via oral		
Controle v.o.	-	59,00 ± 0,28 (13)
RipII	25	55,31 ± 2,98 (13)
RipII	50	57,31 ± 1,22 (13)
RipII	75	58,75 ± 0,65 (8)
DZP	2	35,25 ± 6,69 (8)***

Os valores representam a média ± EPM do número de quedas. O número de animais está representado entre parênteses. Para análise estatística foi realizado o teste paramétrico ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: ***p<0,001 vs controle v.o e i.p.

5.1.3 Teste do labirinto em cruz elevado

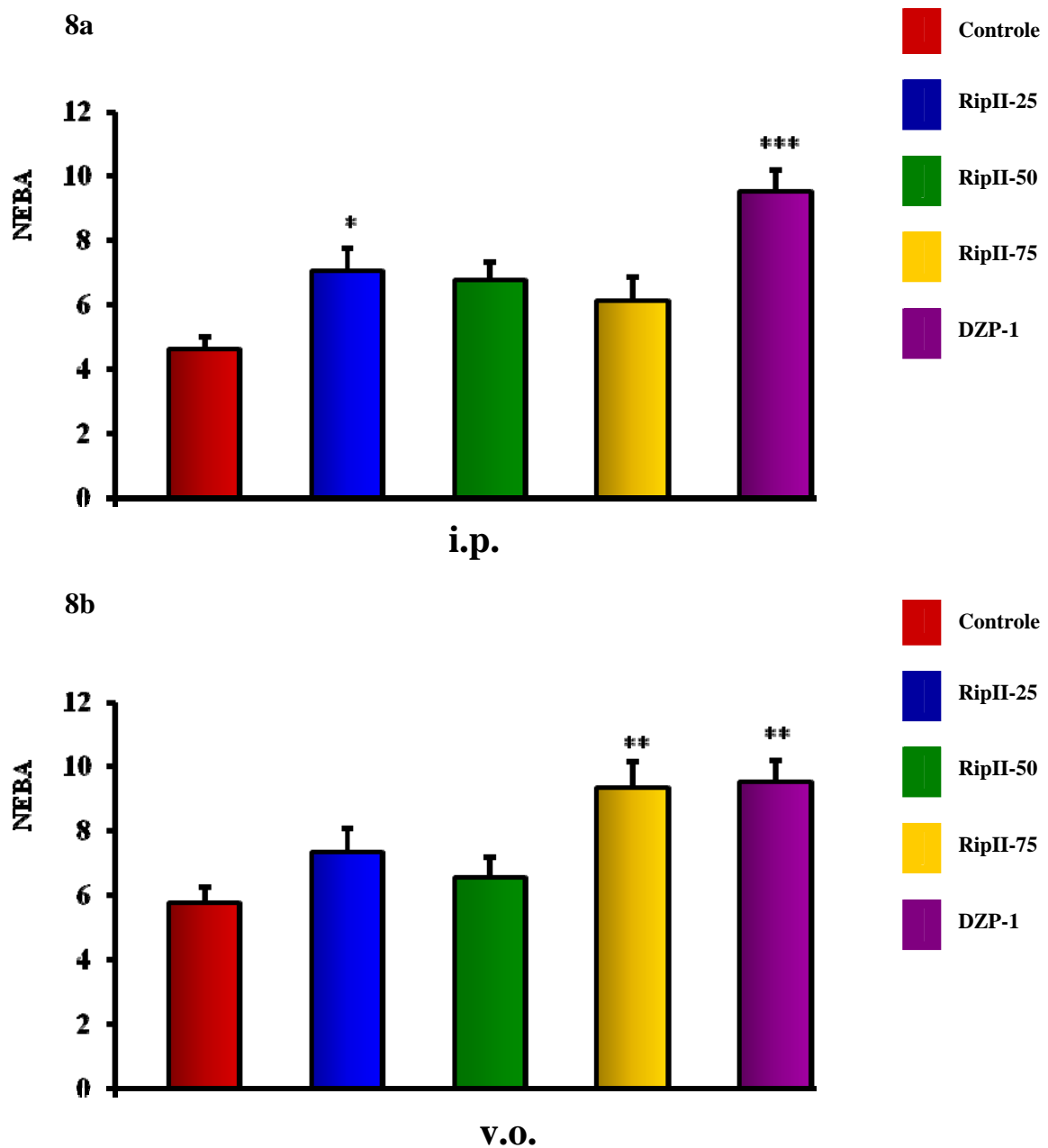
O tratamento agudo por via i.p. com a riparina II nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, no labirinto em cruz elevado, mostrou que a riparina II aumentou todos os parâmetros analisados na dose de 25 mg/kg: NEBA (Figura 8a) [ripII-25: $7,07 \pm 0,69$ (15); ripII-50: $6,78 \pm 0,57$ (9); ripII-75: $6,12 \pm 0,74$ (8)]; TPBA (Figura 9a) [ripII-25: $133,70 \pm 8,65$ (10); ripII-50: $120,71 \pm 11,85$ (14); ripII-75: $118,37 \pm 5,26$ (8)]; PEBA (Figura 10a) [ripII-25: $47,81 \pm 1,81$ (13); ripII-50: $47,18 \pm 1,26$ (10); ripII-75: $47,49 \pm 3,11$ (8)]; PTBA (Figura 11a) [ripII-25: $53,06 \pm 2,43$ (8); ripII-50: $46,31 \pm 4,13$ (14); ripII-75: $50,43 \pm 1,29$ (7)] quando comparado com os respectivos controles: NEBA [$4,62 \pm 0,40$ (13)]; TPBA [$91,92 \pm 7,79$ (13)]; PEBA [$38,75 \pm 2,58$ (15)] e PTBA [$36,16 \pm 3,10$ (13)].

O tratamento agudo com as doses de 25, 50 e 75 mg/kg de riparina II aumentou no teste do labirinto em cruz elevado, por via oral, o NEBA (Figura 8a) na dose de 75mg/kg [ripII-25: $7,33 \pm 0,76$ (12); ripII-50: $6,54 \pm 0,65$ (11); ripII-75: $9,33 \pm 0,84$ (9)] comparando com o controle [$5,77 \pm 0,48$ (13)], assim como aumentou TPBA (Figura 9a) na dose de 75mg/kg [ripII-25: $101,67 \pm 11,27$ (12); ripII-50: $96,91 \pm 6,80$ (11); ripII-75: $116,1 \pm 10,58$ (10)] comparando com o controle [$76,08 \pm 7,69$ (12)], e PEBA (Figura 10a) em todas as doses [ripII-25: $50,40 \pm 2,38$ (11); ripII-50: $51,14 \pm 3,16$ (11); ripII-75: $51,98 \pm 2,65$ (10)] comparando com o controle [$41,24 \pm 2,05$ (12)]. A riparina II não alterou PTBA (Figura 11a) [ripII-25: $40,67 \pm 4,25$ (13); ripII-50: $47,19 \pm 5,62$ (11); ripII-75: $45,17 \pm 3,84$ (10) controle: $33,03 \pm 2,62$ (12)].

Diazepam 1 mg/kg aumentou todos os parâmetros: NEBA [$9,50 \pm 0,70$ (14)]; TPBA [$139,60 \pm 8,82$ (15)]; PEBA [$54,13 \pm 2,82$ (15)] e PTBA [$59,29 \pm 3,80$ (16)] em relação aos controles v.o. e i.p. (Figuras 8, 9, 10 e 11; a e b).

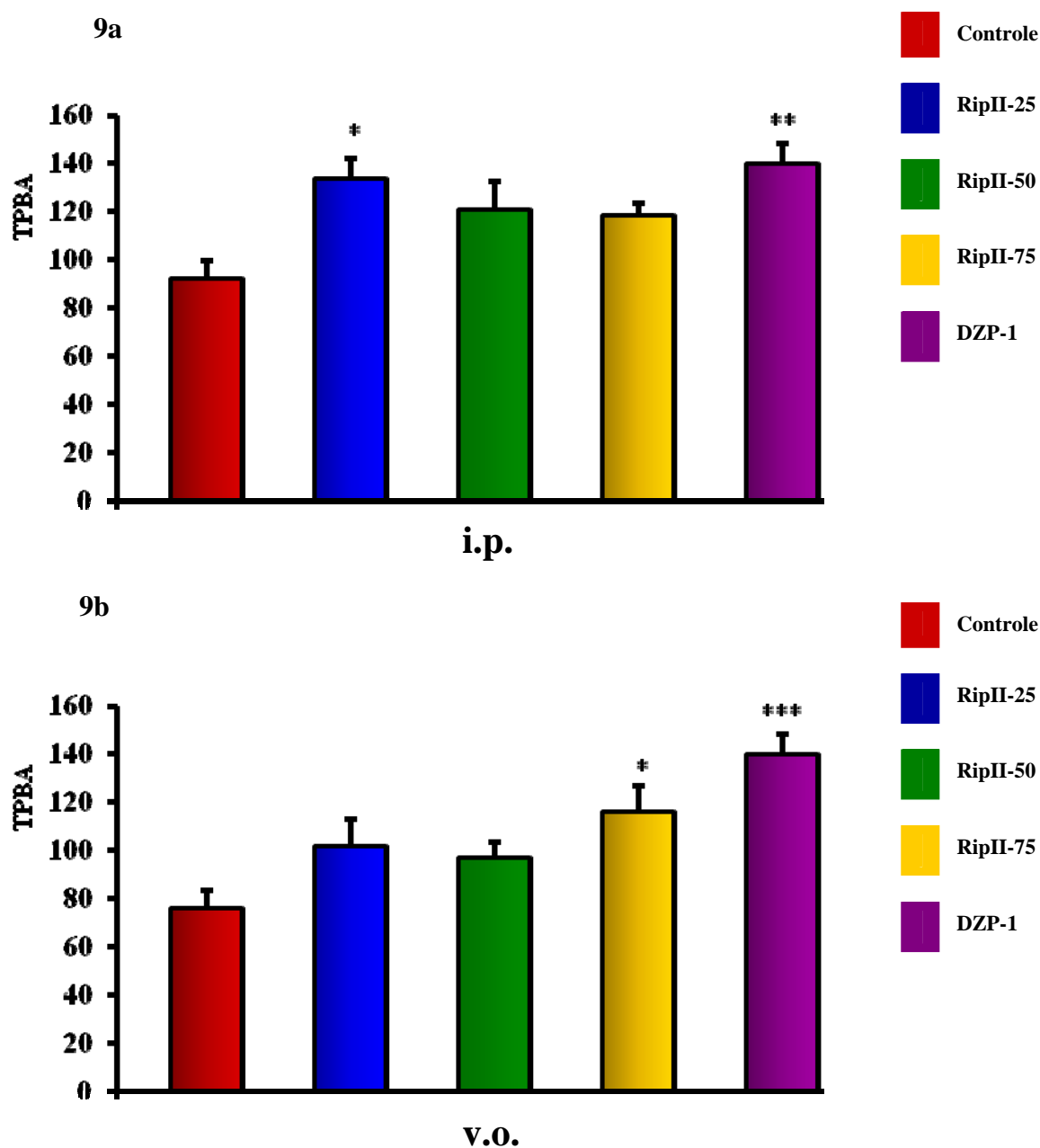
A análise do envolvimento dos receptores benzodiazepínicos no efeito ansiolítico da riparina II mostrou que o grupo (FLU-2,5 + veículo v.o.) não alterou os parâmetros analisados NEBA [$4,70 \pm 0,33$ (10)] (Figura 12); TPBA [$77,0 \pm 9,44$ (10)] (Figura 13); PEBA [$38,28 \pm 2,24$ (8)] (Figura 14); PTBA [$40,35 \pm 2,57$ (10)] (Figura 15) quando comparado com os respectivos grupos controle v.o. No entanto, o flumazenil, no grupo (FLU-2,5 + ripII-75 v.o.), reverteu o efeito ansiolítico da riparina II no NEBA [$3,75 \pm 0,70$ (8)] (Figura 12); TPBA [$71,25 \pm 19,04$ (8)] (Figura 13); PEBA [$39,98 \pm 2,24$ (7)] (Figura 14) quando este grupo foi comparado com os respectivos grupos de ripII-75 v.o.. Não houve diferença significativa no PTBA [$38,23 \pm 6,68$ (5)] (Figura 15). A associação (FLU-2,5 + DZP-1) reverteu o efeito

ansiolítico do diazepam (DZP-1 + FLU-2,5) em todos os parâmetros analisados NEBA [$3,80 \pm 0,69$ (10)] (Figura 12); TPBA [$94,33 \pm 4,31$ (9)] (Figura 13); PEBA [$43,40 \pm 2,46$ (10)] (Figura 14); PTBA [$43,18 \pm 2,66$ (9)] (Figura 15) quando comparado com os respectivos grupos de DZP-1.



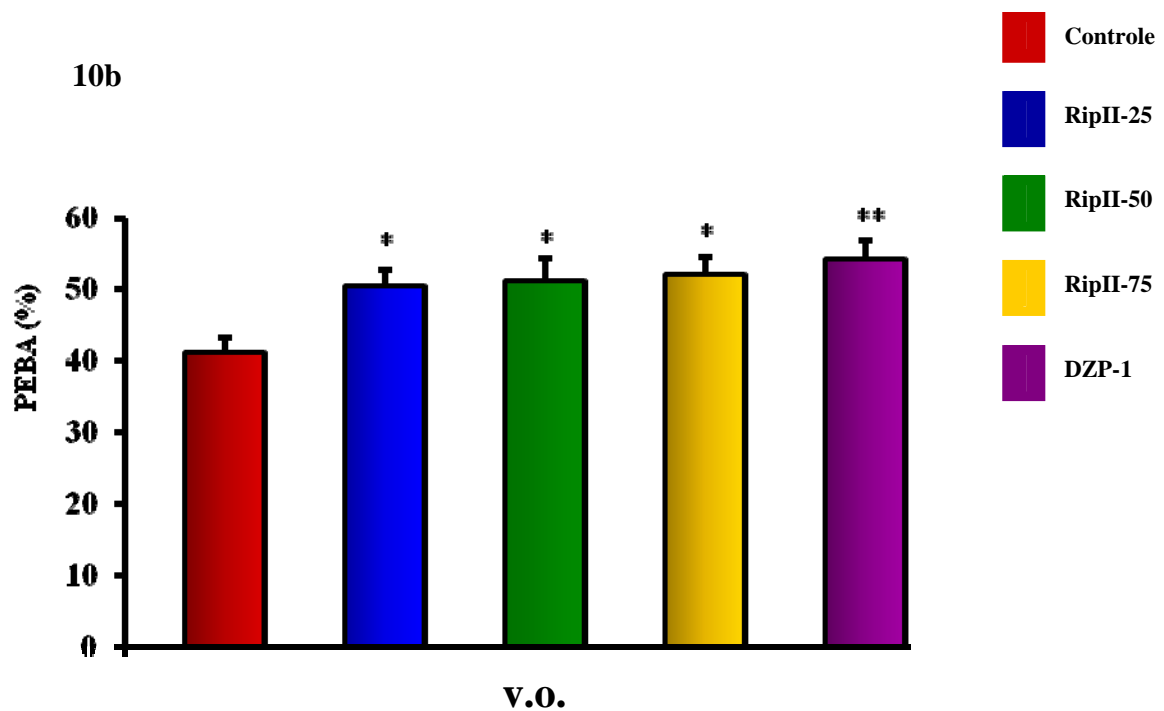
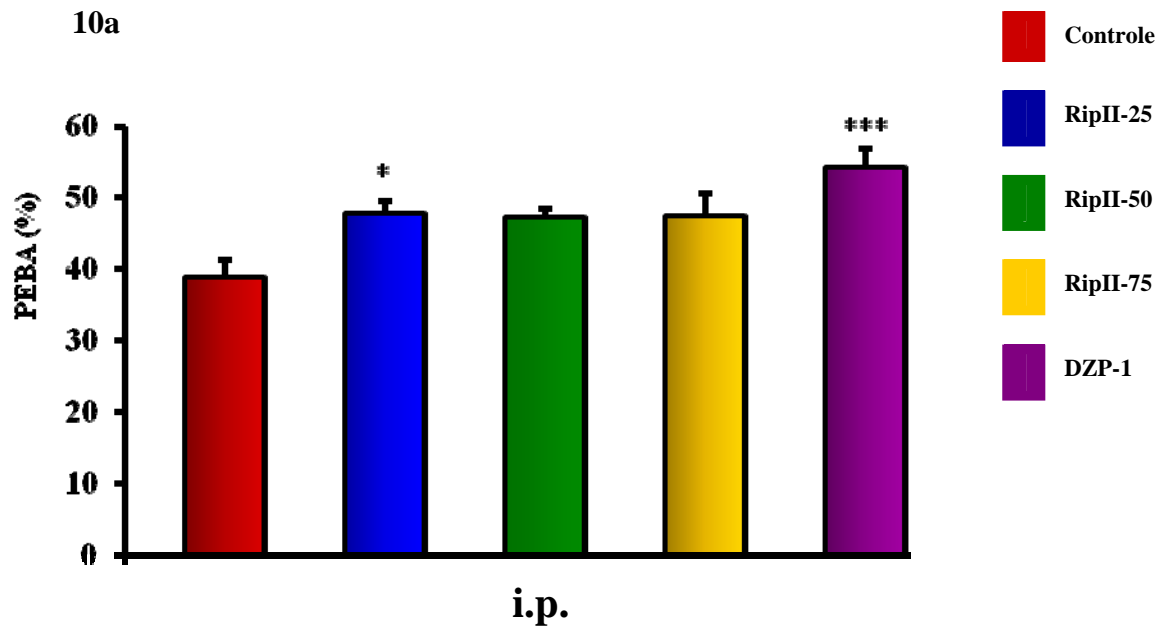
Figuras 8 - Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (8a) e oral (8b), sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25, 50 e 75 mg/kg) e diazepam (DZP; 1 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras **8a** e **8b** representam a média \pm EPM do número de entradas nos braços abertos (NEBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.



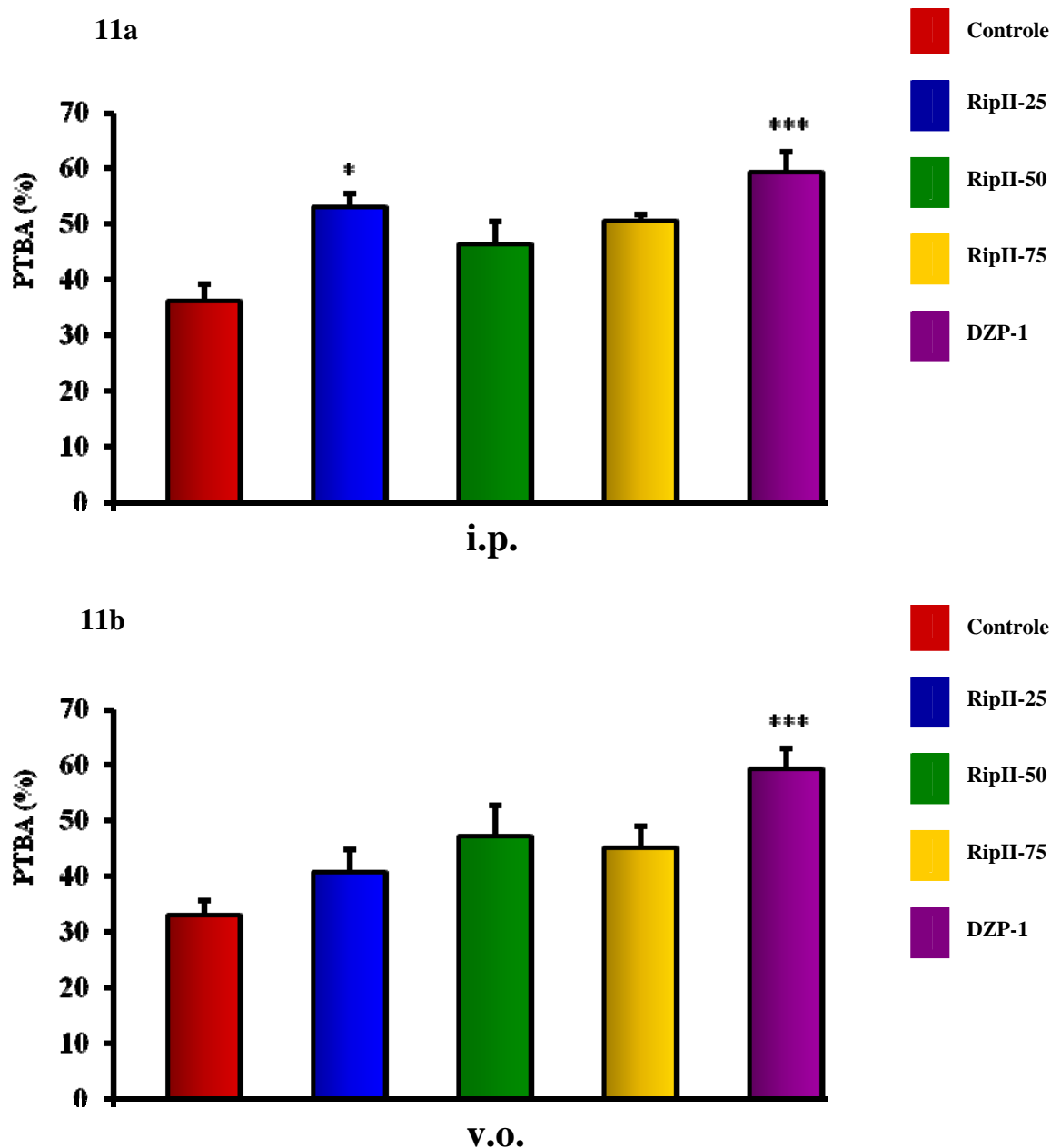
Figuras 9 - Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (9a) e oral (9b), sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25, 50 e 75 mg/kg) e diazepam (DZP; 1 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras **9a** e **9b** representam a média ± EPM do tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.



Figuras 10 - Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (10a) e oral (10b), sobre a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25, 50 e 75 mg/kg) e diazepam (DZP; 1 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras **10a** e **10b** representam a média \pm EPM da percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.



Figuras 11 - Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (11a) e oral (11b), sobre a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25, 50 e 75 mg/kg) e diazepam (DZP; 1 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras **11a** e **11b** representam a média \pm EPM da percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle.

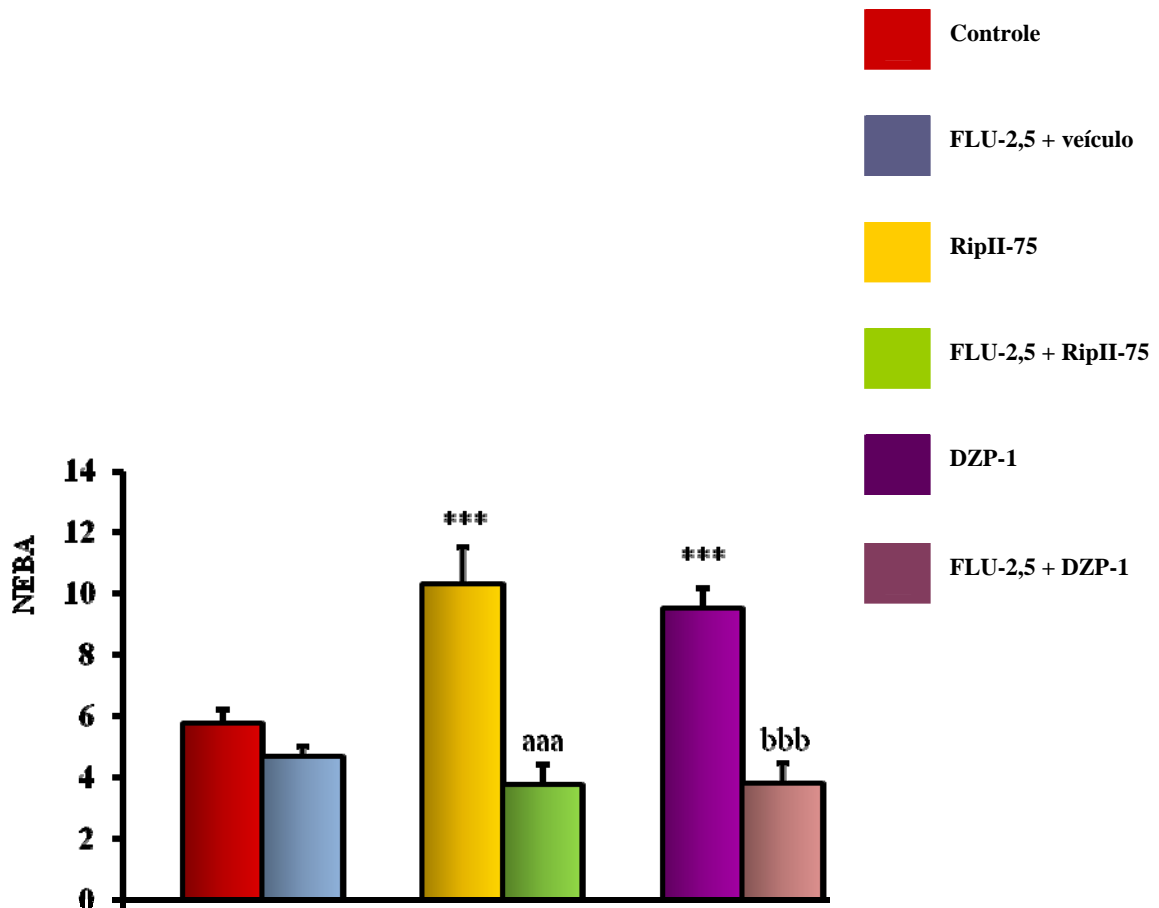


Figura 12 - Efeito da riparina II e diazepam, via oral, sozinhos ou associados com flumazenil, antagonista dos receptores de benzodiazepínicos sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25, 50 e 75 mg/kg) e diazepam (DZP; 1 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 15 min após a administração de flumazenil (FLU; 2,5 mg/kg) e, então, 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura 12 representam a média \pm EPM do número de entradas nos braços abertos (NEBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle; ^{aaa} $p < 0,001$ vs RipII-75; ^{bbb} $p < 0,001$ vs DZP-1.

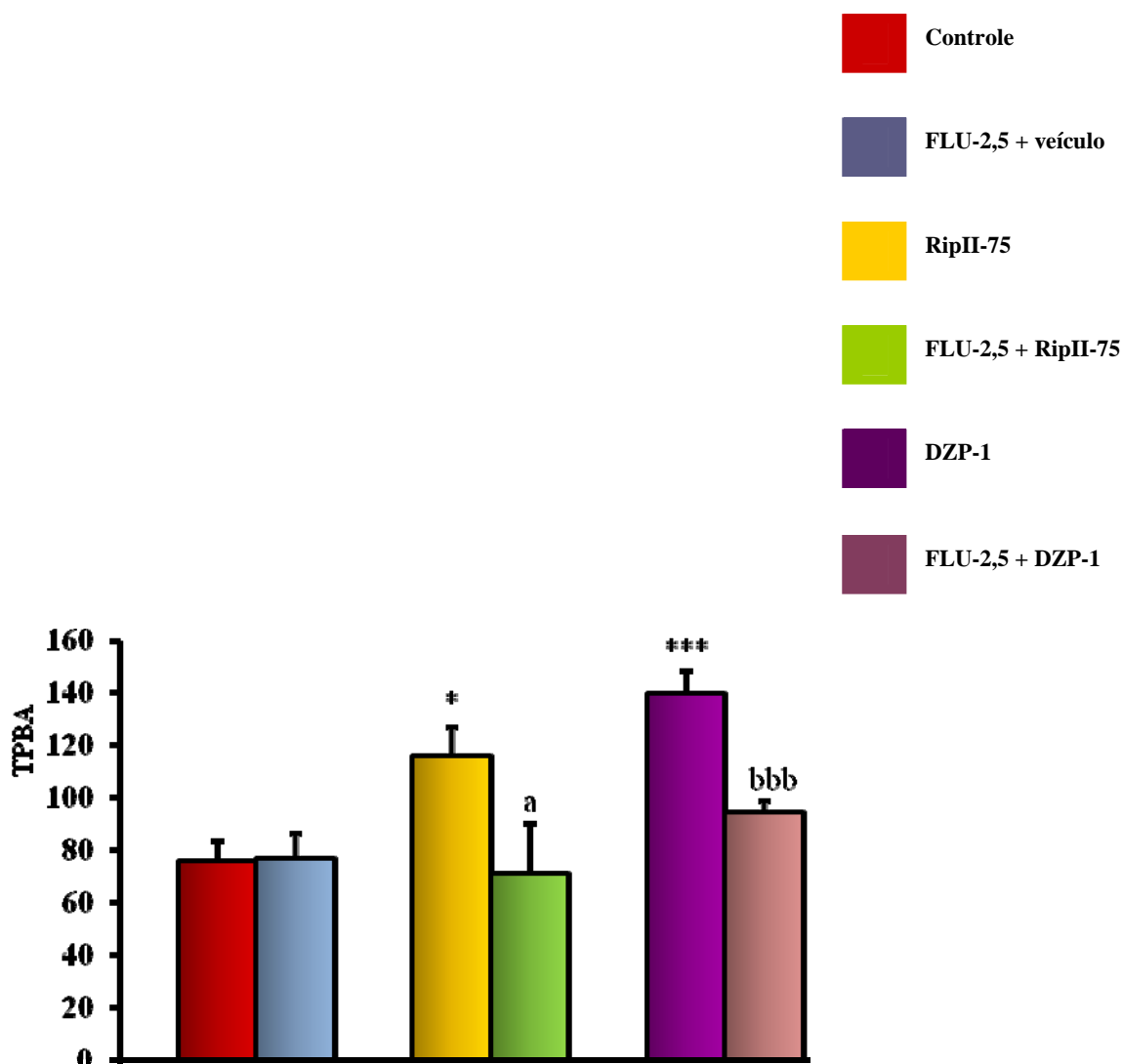


Figura 13 - Efeito da riparina II e diazepam, via oral, sozinhos ou associados com flumazenil, antagonista dos receptores de benzodiazepínicos sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), em segundos, no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25, 50 e 75 mg/kg) e diazepam (DZP; 1 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 15 min após a administração de flumazenil (FLU; 2,5 mg/kg) e, então, 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura 13 representam a média ± EPM do tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle; ^a $p < 0,05$ vs RipII-75; ^{bbb} $p < 0,001$ vs DZP-1.

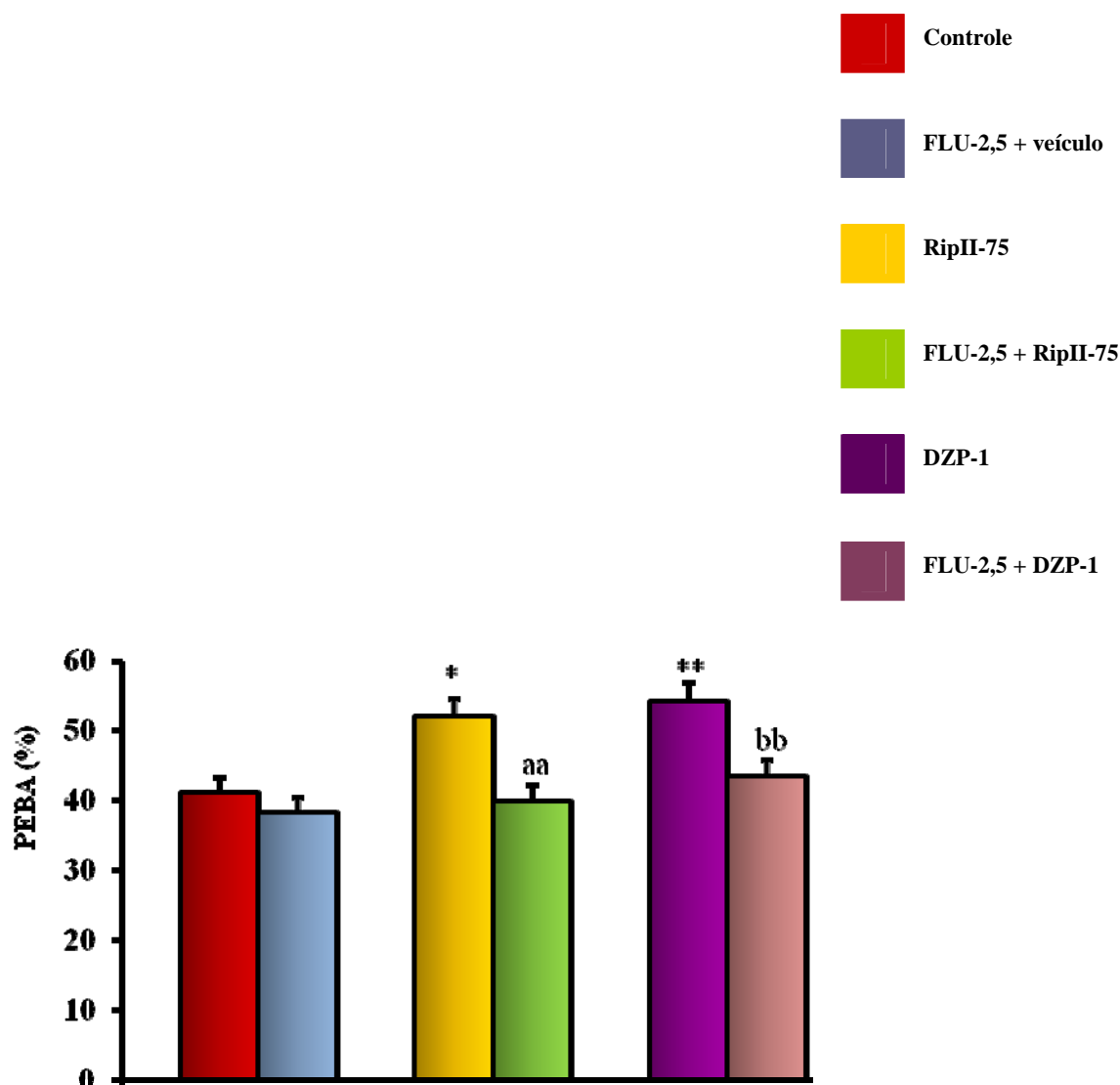


Figura 14 - Efeito da riparina II e diazepam, via oral, sozinhos ou associados com flumazenil, antagonista dos receptores de benzodiazepínicos sobre a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA), no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25, 50 e 75 mg/kg) e diazepam (DZP; 1 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 15 min após a administração de flumazenil (FLU; 2,5 mg/kg) e, então, 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura 14 representam a média \pm EPM da percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs controle; ^{aa} $p < 0,01$ vs RipII-75; ^{bb} $p < 0,01$ vs DZP-1.

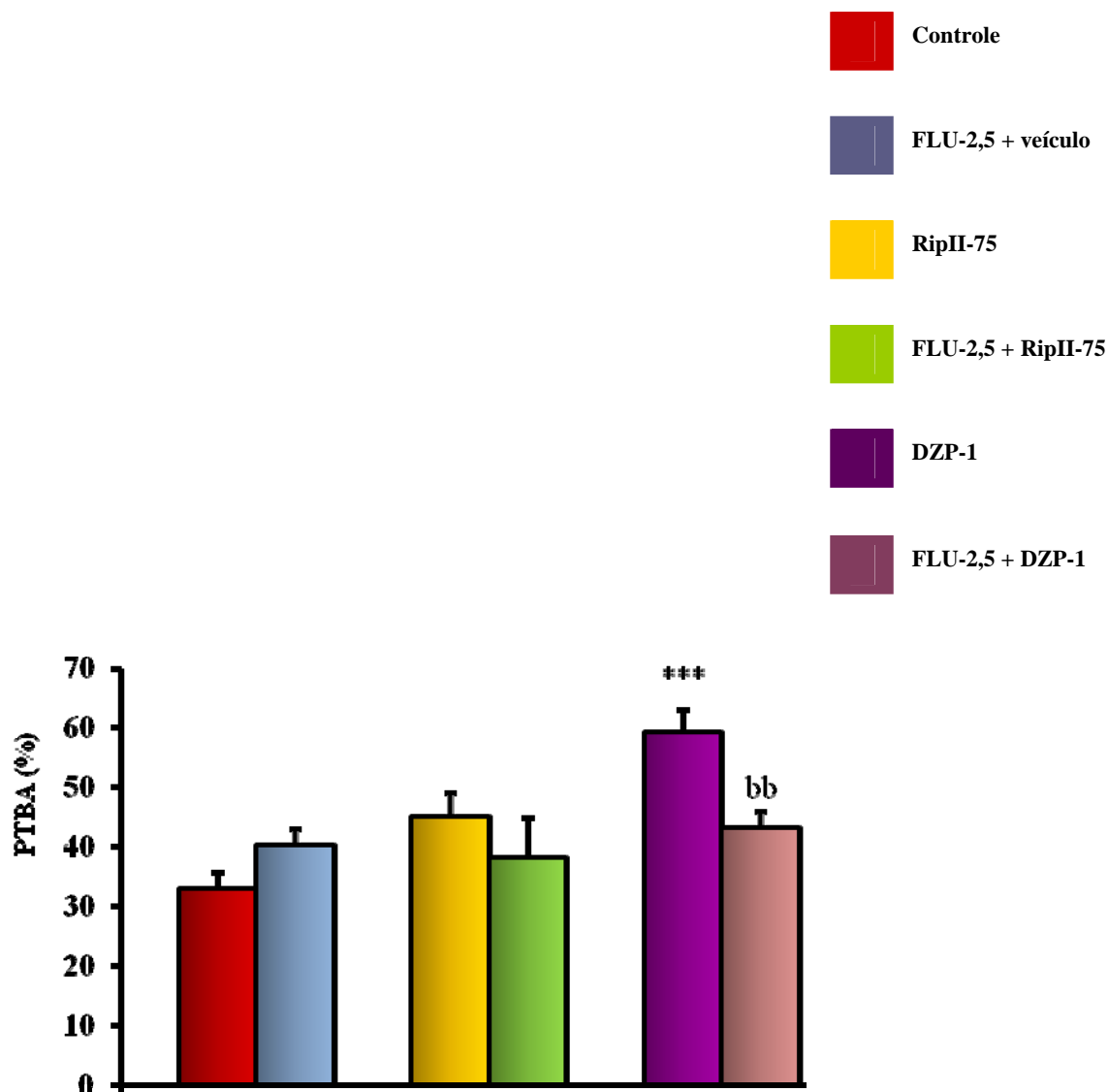


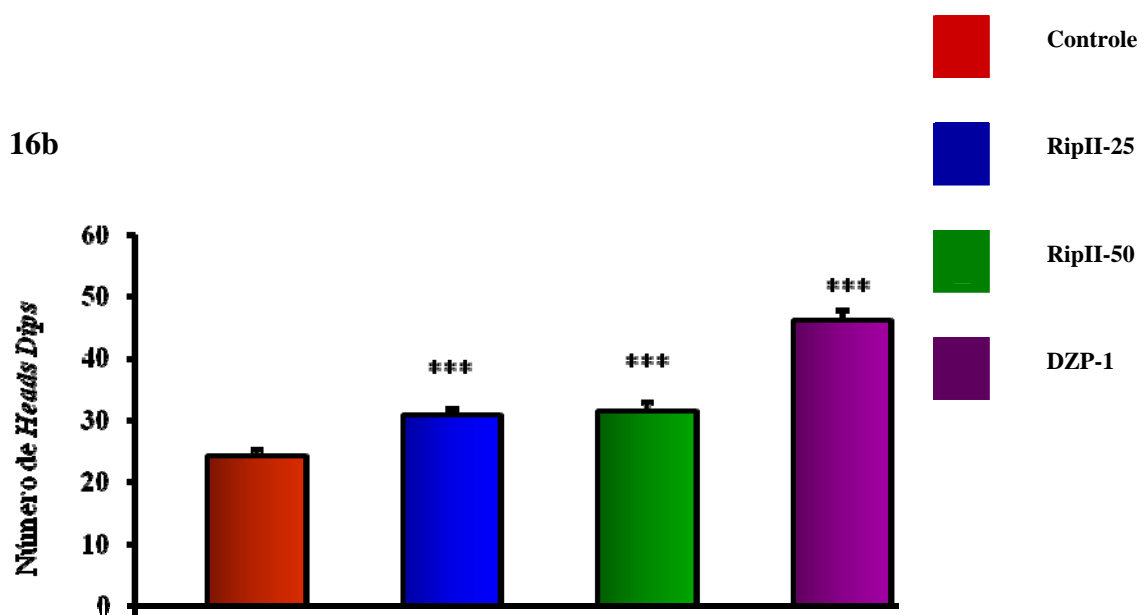
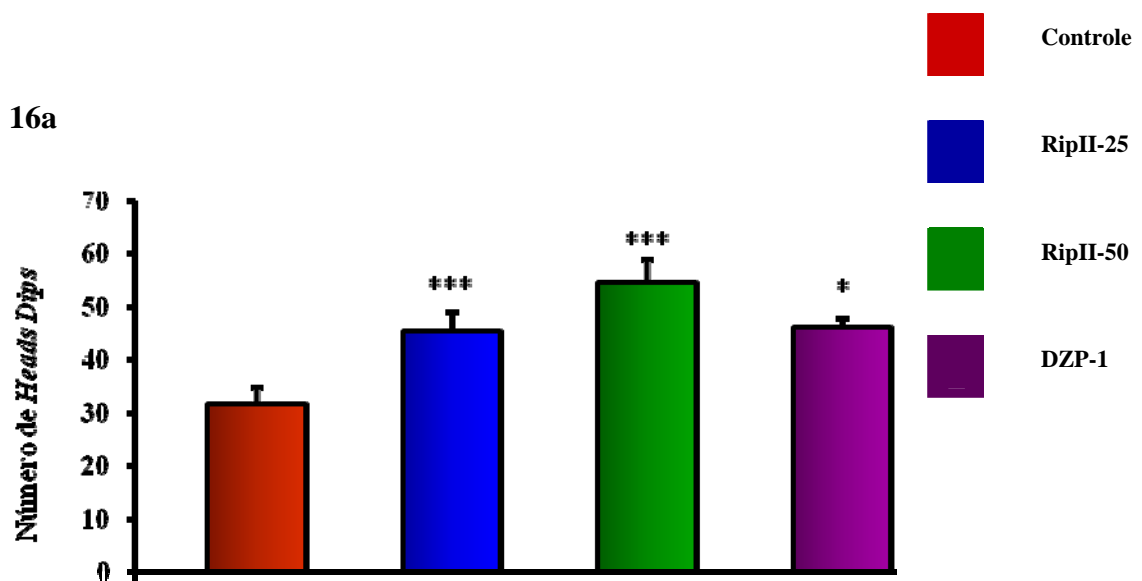
Figura 15 - Efeito da riparina II e diazepam, via oral, sozinhos ou associados com flumazenil, antagonista dos receptores de benzodiazepínicos sobre a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA), no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25, 50 e 75 mg/kg) e diazepam (DZP; 1 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 15 min após a administração de flumazenil (FLU; 2,5 mg/kg) e, então, 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura **15** representam a média \pm EPM da percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle; ^{bb} $p < 0,01$ vs DZP-1.

5.1.4 Teste da placa perfurada

Neste modelo experimental, após a administração aguda de riparina II nas doses de 25 e 50 mg/kg, foi observado um significativo aumento do número de vezes que o animal colocou a cabeça no buraco da placa perfurada (*head dips*), tanto pela administração v.o. (Figura 16a) [ripII-25: $45,33 \pm 3,72$ (9); ripII-50: $54,44 \pm 4,29$ (9)] quanto pela i.p. (Figura 16b) [ripII-25: $30,92 \pm 1,0$ (13); ripII-50: $31,54 \pm 1,40$ (13)] quando comparado aos respectivos grupos controle [v.o.: $31,63 \pm 3,09$ (8); i.p.: $24,31 \pm 1,0$ (13)].

O efeito do diazepam (DZP) 1 mg/kg, i.p., administrado 30 min antes do teste da placa perfurada é também mostrado nas Figuras 16a e 16b. Comparado aos grupos controle (i.p. e v.o.), os animais tratados com diazepam manifestaram um aumento do número de *head dips*, [DZP-1: $46,14 \pm 1,53$ (7)].



Figuras 16 - Efeito da riparina II e diazepam, via oral (16a) e intraperitoneal (16b), sobre o número de *head dips* no teste da placa perfurada em camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25 e 50 mg/kg) e diazepam (DZP; 1 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras **16a** e **16b** representam a média \pm EPM do número de *head dips* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle.

5.2. Avaliação da atividade antidepressiva

5.2.1 Teste do nado forçado

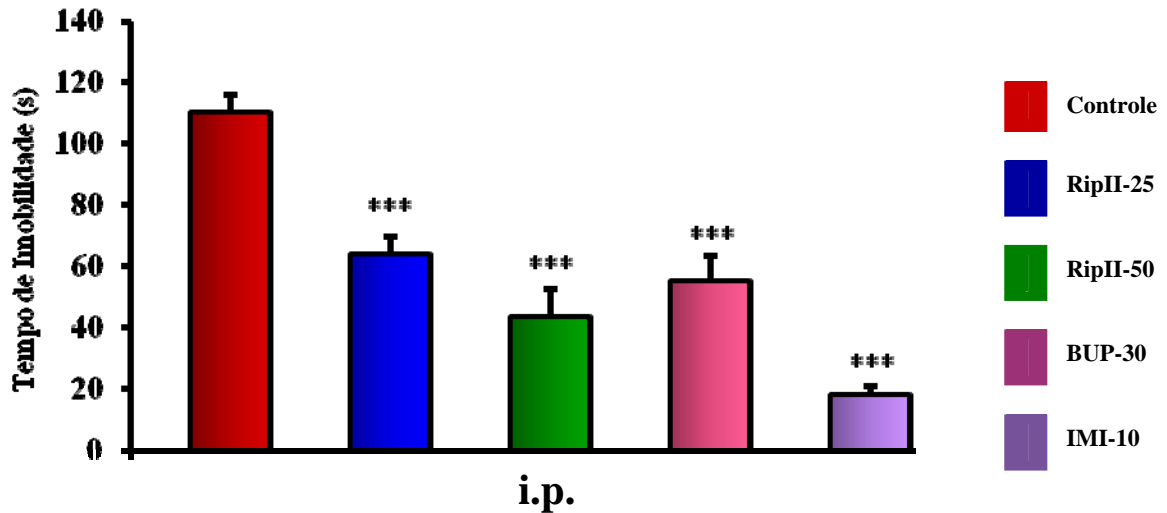
No teste do nado forçado, os animais tratados com riparina II, por via i.p., apresentaram uma diminuição do tempo de imobilidade em 42,20% na dose de 25 mg/kg [$63,75 \pm 5,93$ (8)] assim como também houve uma diminuição do tempo de imobilidade em 60,62% na dose de 50 mg/kg [$43,44 \pm 9,38$ (9)] quando comparado com o controle [$110,30 \pm 5,70$ (10)] (Figura 17a).

Do mesmo modo, por via oral, a riparina II diminuiu o tempo de imobilidade em 51,89% na dose de 25 mg/kg [$62,06 \pm 6,38$ (16)] e em 52,65% na dose de 50 mg/kg [$56,63 \pm 7,73$ (16)] comparando com o controle [$119,60 \pm 12,42$ (16)] (Figura 17b).

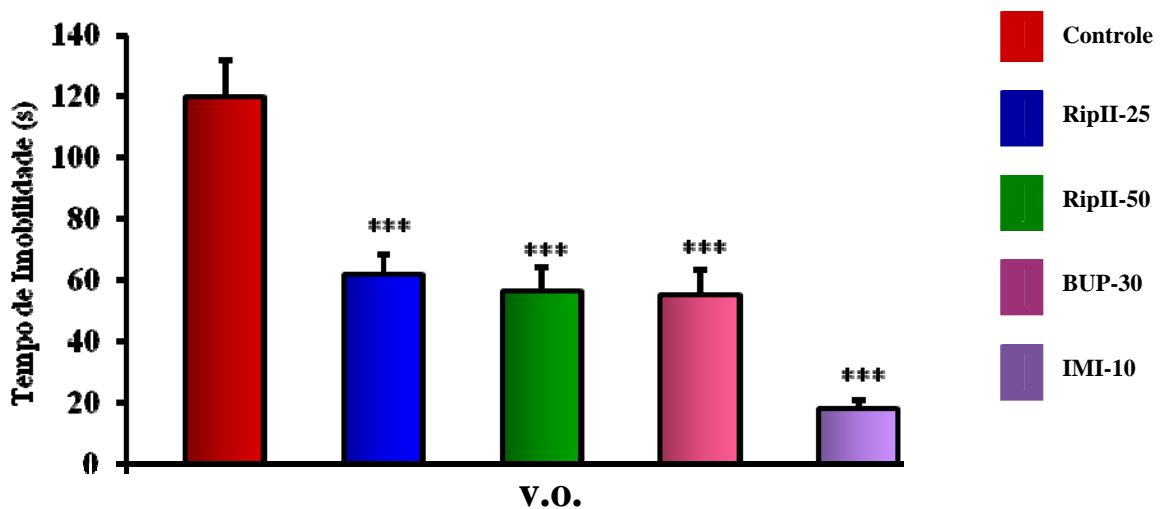
Os padrões positivos utilizados imipramina 10 mg/kg e bupropiona 30 mg/kg também diminuíram o tempo de imobilidade [IMI-10: $18,12 \pm 2,74$ (8); BUP-30: $55,11 \pm 8,43$ (9)] em relação aos controles v.o. e i.p. (Figuras 17a e 17b).

Os grupos pré-tratados com SCH23390 (Figura 18), sulpirida (Figura 19) prazosina (Figura 20) e ioimbina (Figura 21) e tratados com veículo não diminuíram o tempo de imobilidade [SCH-15 + veículo: $107,6 \pm 12,97$ (8); SPD-50 + veículo: $124,0 \pm 6,91$ (10); PRA-1 + veículo: $105,00 \pm 6,77$ (11); IOI-1 + veículo: $103,90 \pm 8,65$ (11)] em relação ao controle oral (veículo). Os grupos pré-tratados com SCH23390, sulpirida e prazosina, e, posteriormente, tratado com ripII-50, v.o., reverteram o efeito antidepressivo da riparina II [SCH-15 + ripII-50: $95,25 \pm 12,97$ (8)] (Figura 18); [SPD-50 + ripII-50: $103,50 \pm 9,39$ (8)] (Figura 19); [PRA-1 + ripII-50: $104,20 \pm 17,41$ (6)] (Figura 20), pois apresentaram uma diferença significativa em relação ao grupo ripII-50, v.o. No grupo pré-tratado com ioimbina, a riparina II continuou diminuindo o tempo de imobilidade [IOI-1 + ripII-50: $56,43 \pm 7,35$ (7)] (Figura 21). O SCH23390 (Figura 18) e a sulpirida (Figura 19) reverteram o efeito antidepressivo da bupropiona [SCH-15 + BUP-30: $97,75 \pm 10,22$ (8); SUL-50 + BUP-30: $89,40 \pm 7,38$ (10)] da mesma forma que a prazosina (Figura 20) e a ioimbina (Figura 21) reverteram o efeito antidepressivo da imipramina [PRA-1 + IMI-10: $45,17 \pm 6,29$ (6); IOI-1 + IMI-10: $58,00 \pm 8,45$ (6)], pois todos grupos mostraram diferenças significativas quando comparados com o grupo BUP-30 e IMI-10 respectivamente.

17a



17b



Figuras 17 - Efeito da riparina II, bupropiona e imipramina, via intraperitoneal (17a) e oral (17b), sobre o tempo de imobilidade, em segundos, no teste do nado forçado em camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25 e 50 mg/kg), imipramina (IMI; 10 mg/kg) e bupropiona (BUP; 30 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras **17a** e **17b** representam a média \pm EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

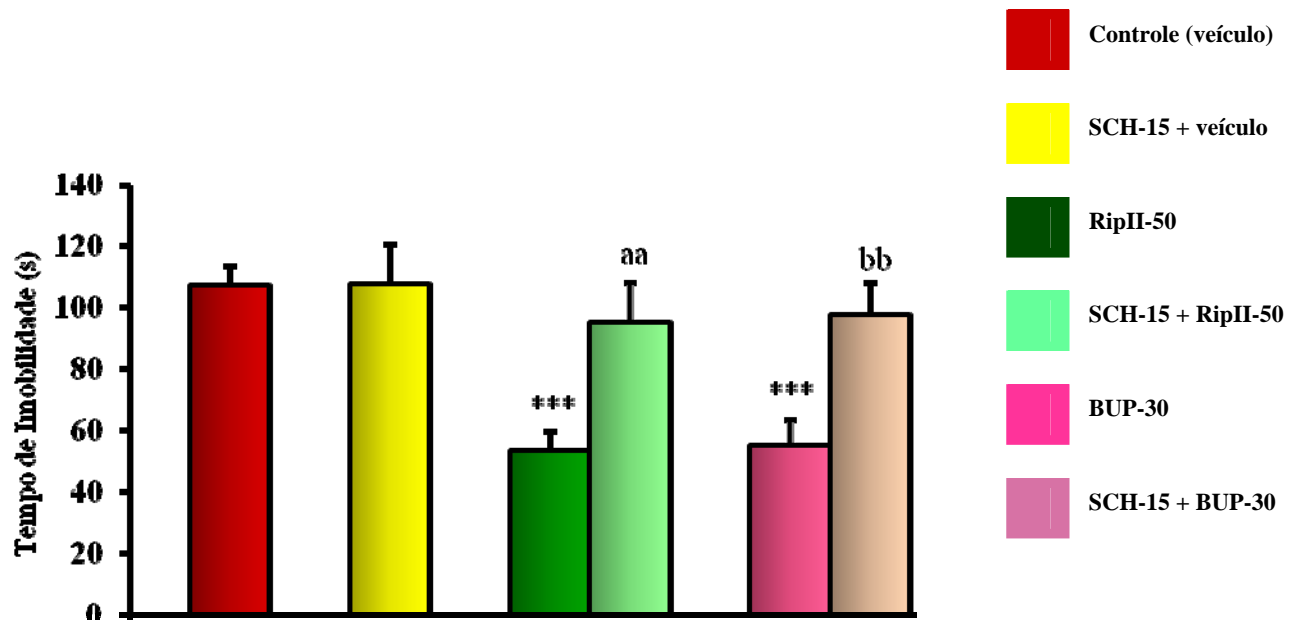


Figura 18 - Efeito da riparina II (50 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com SCH23390 (15 µg/kg), antagonista dos receptores dopaminérgicos do tipo D₁, sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 50 mg/kg) e bupropiona (BUP; 30 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 30 min após a administração de SCH23390 (SCH; 2,5 mg/kg) e, então, 60 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura **18** representam a média ± EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle^{aa} $p < 0,01$ vs RipII-50; ^{bb} $p < 0,01$ vs BUP-30.

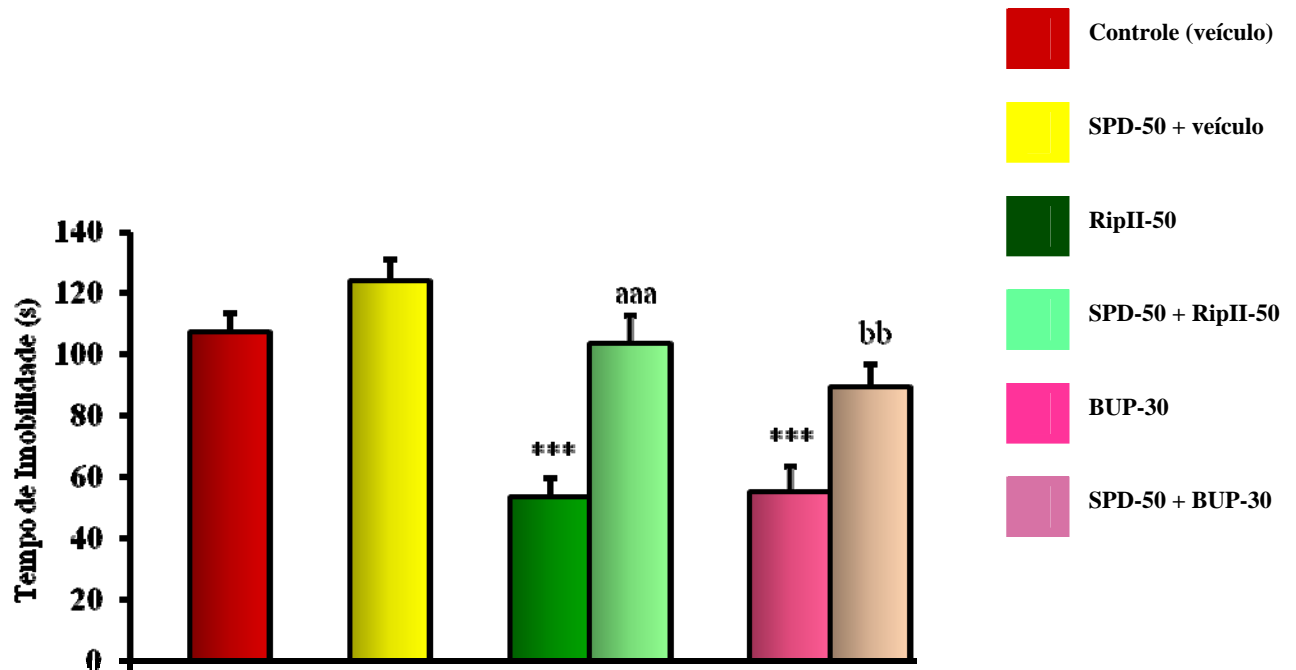


Figura 19 - Efeito da riparina II (50 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com sulpirida (50 mg/kg), antagonista dos receptores dopaminérgicos do tipo D₂, sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 50 mg/kg) e bupropiona (BUP; 30 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 30 min após a administração de sulpirida (SPD; 50 mg/kg) e, então, 60 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura 19 representam a média ± EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle; ^{aaa} $p < 0,001$ vs RipII-50; ^{bb} $p < 0,01$ vs BUP-30.

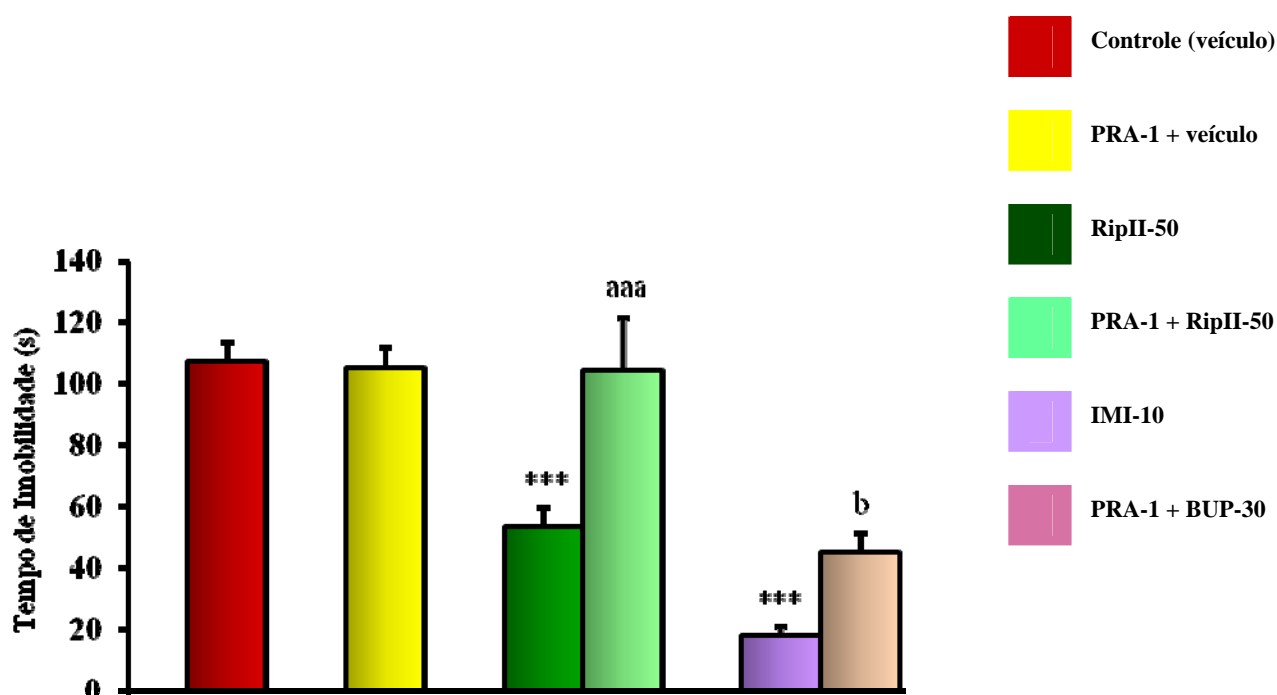


Figura 20 - Efeito da riparina II (50 mg/kg) e imipramina (10 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com prazosina (1 mg/kg), antagonista dos receptores α_1 -adrenérgicos, sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 50 mg/kg) e imipramina (IMI; 10 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 30 min após a administração de prazosina (PRA; 1 mg/kg) e, então, 60 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura 18 representam a média \pm EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle ^{aaa} $p < 0,001$ vs RipII-50; ^b $p < 0,05$ vs IMI-10.

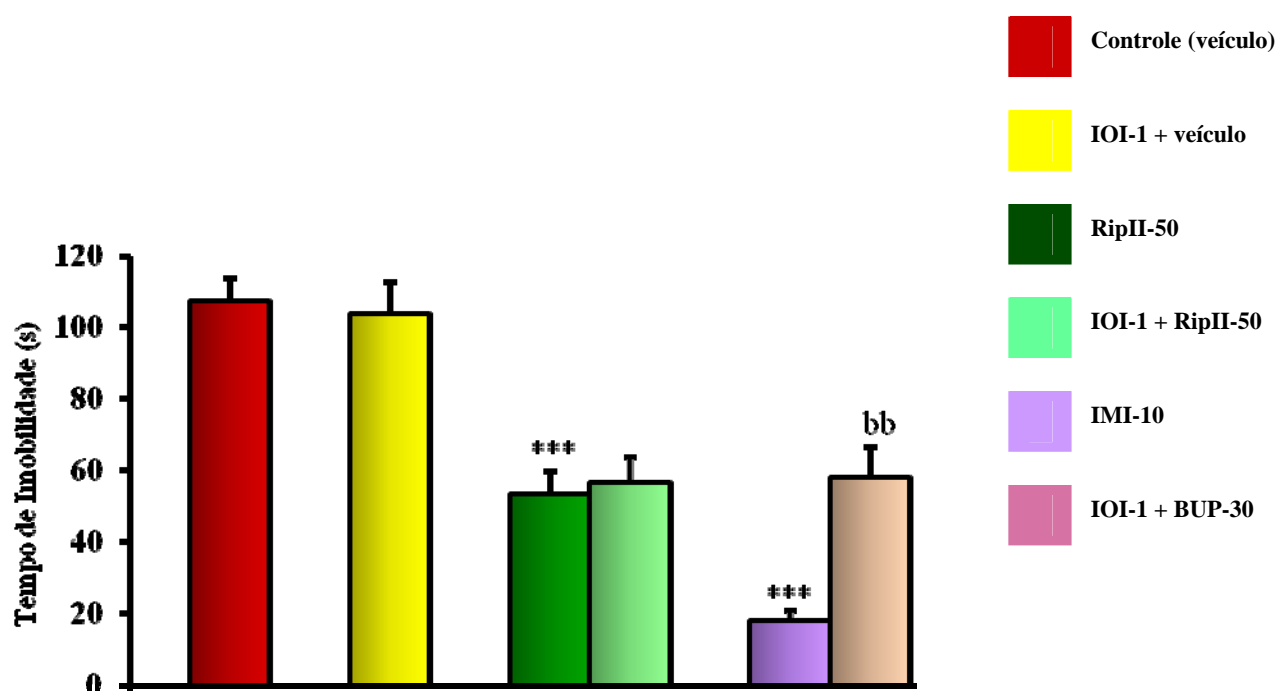


Figura 21 - Efeito da riparina II (50 mg/kg) e imipramina (10 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com ioimbina (1 mg/kg), antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.

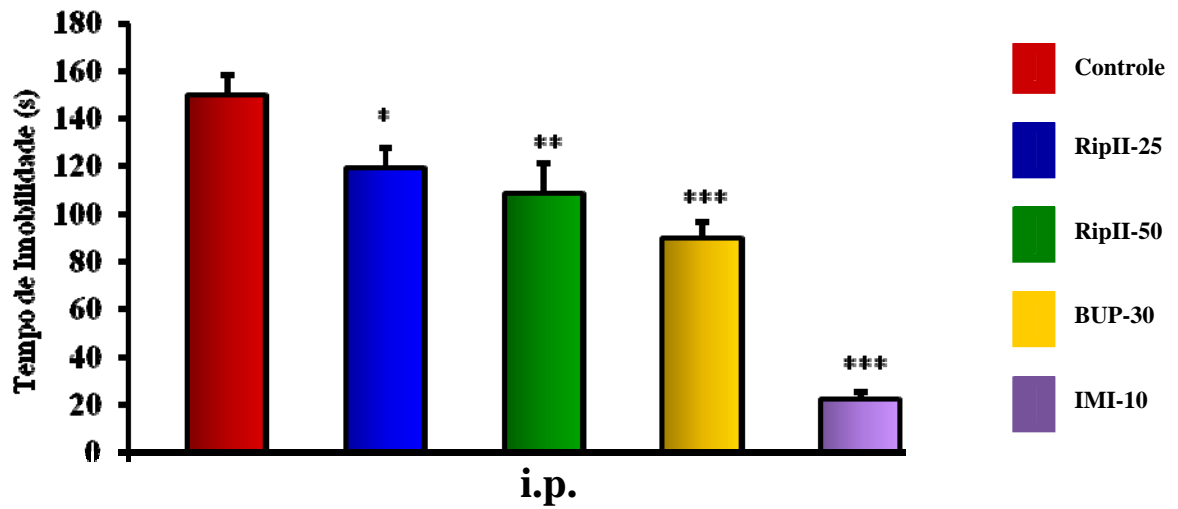
Controle (veículo), riparina II (RipII; 50 mg/kg) e imipramina (IMI; 10 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 30 min após a administração de ioimbina (IOI; 1 mg/kg) e, então, 60 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura 19 representam a média \pm EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle; ^{bb} $p < 0,01$ vs IMI-10.

5.2.2 Teste da suspensão da cauda

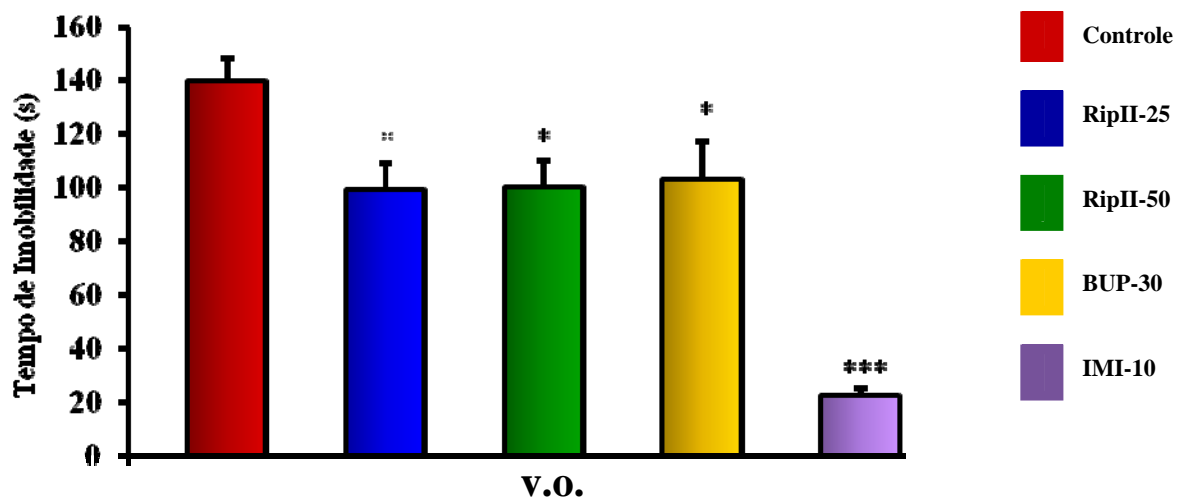
Neste experimento, a administração oral de riparina II diminuiu em 20,32% o tempo de imobilidade na dose de 25 mg/kg [$119,18 \pm 8,56$ (11)], diminuiu 27,59% na dose de 50 mg/kg [$108,30 \pm 12,78$ (10)], assim como diminuiu 40,10 % na dose de 75 mg /kg [$89,60 \pm 6,88$ (10)] relacionando ao grupo controle [$149,57 \pm 8,78$ (14)] (Figura 22a). Da mesma forma, por via i.p., a riparina II também diminuiu o tempo de imobilidade em todas as doses, em 28,90% na dose de 25 mg/kg [$99,33 \pm 10,02$ (12)], 28,20% na dose de 50 mg/kg [$100,30 \pm 9,99$ (12)] e 26,13% na dose de 75 mg/kg [$103,20 \pm 14,39$ (9)] quando comparado ao controle [$139,7 \pm 8,55$ (12)] (Figura 22b).

A imipramina 30 mg/kg também diminuiu o tempo de imobilidade [IMI-30: $22,44 \pm 2,88$ (9)] em relação aos controles oral e intraperitoneal (Figuras 22a e 22b).

22a



22b



Figuras 22 - Efeito da riparina II e imipramina, via intraperitoneal (22a) e oral (22b), sobre o tempo de imobilidade, em segundos, no teste da suspensão da cauda em camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25, 50 e 75 mg/kg) e imipramina (IMI; 30 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras 22a e 22b 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*. Valores significativos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

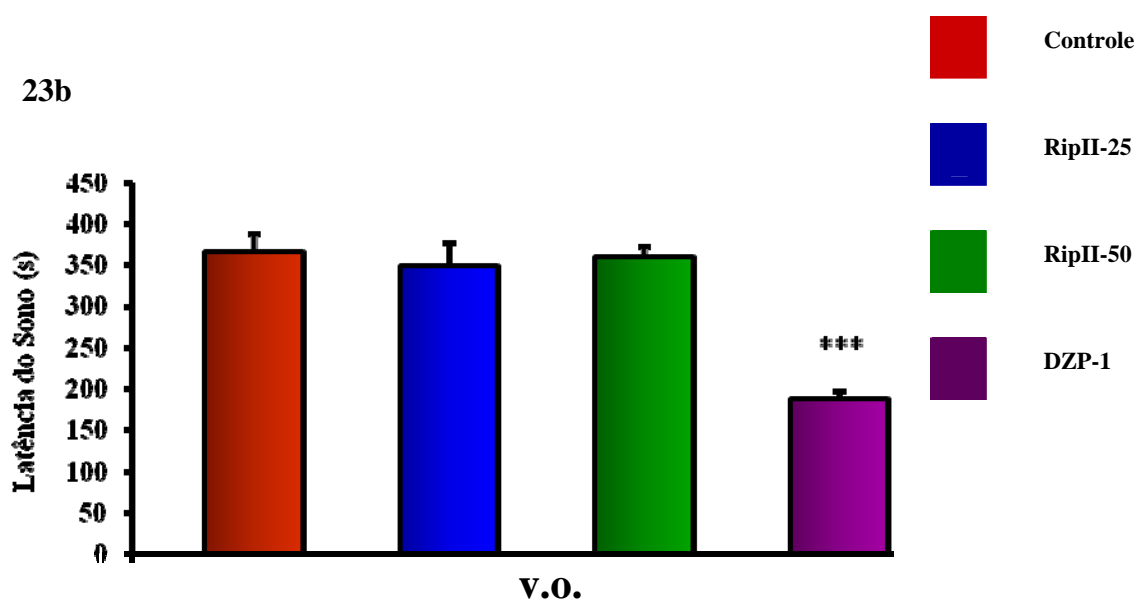
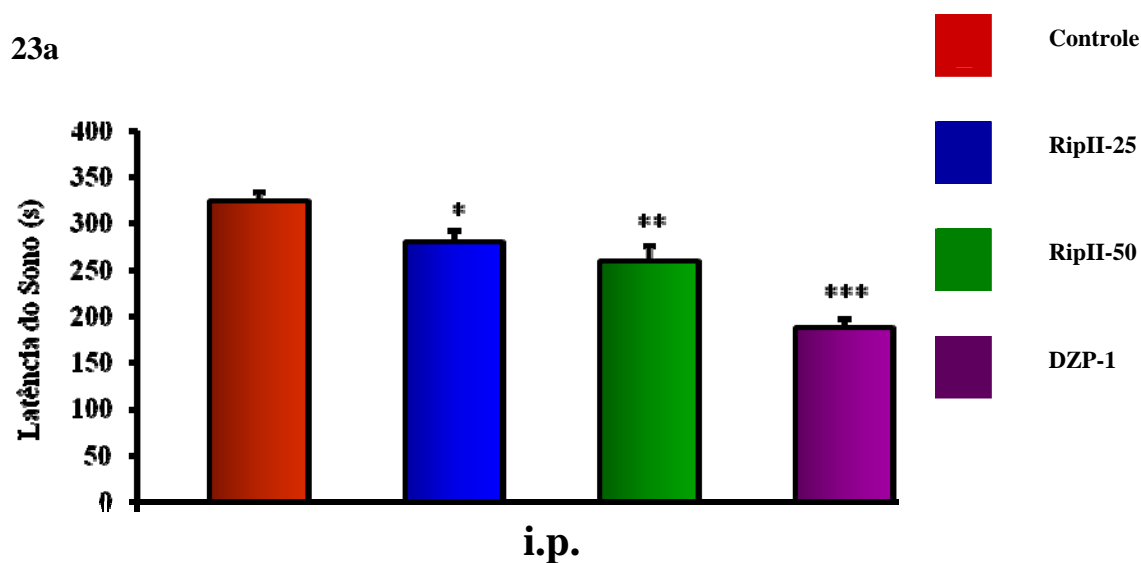
5.3 Avaliação da atividade sedativa/hipnótica e anticonvulsivante

5.3.1 Teste do tempo de sono induzido por pentobarbital

Neste teste foram analisados dois parâmetros: a latência do sono (LS), em segundos e a duração do sono (DS), também em segundos. A riparina II diminuiu a latência do sono por via i.p. (Figuras 23a) nas doses de 25 e 50 mg/kg [i.p. = ripII-25: $279,40 \pm 13,26$ (13); ripII-50: $258,80 \pm 17,01$ (13)] comparando com o controle i.p. [$323,30 \pm 10,61$ (12)], no entanto, nenhuma alteração na latência do sono foi vista após administração por via oral (Figura 23b) [v.o. = ripII-25: $349,60 \pm 27,28$ (8); ripII-50: $359,40 \pm 13,30$ (8); controle: $365,30 \pm 21,68$ (12)].

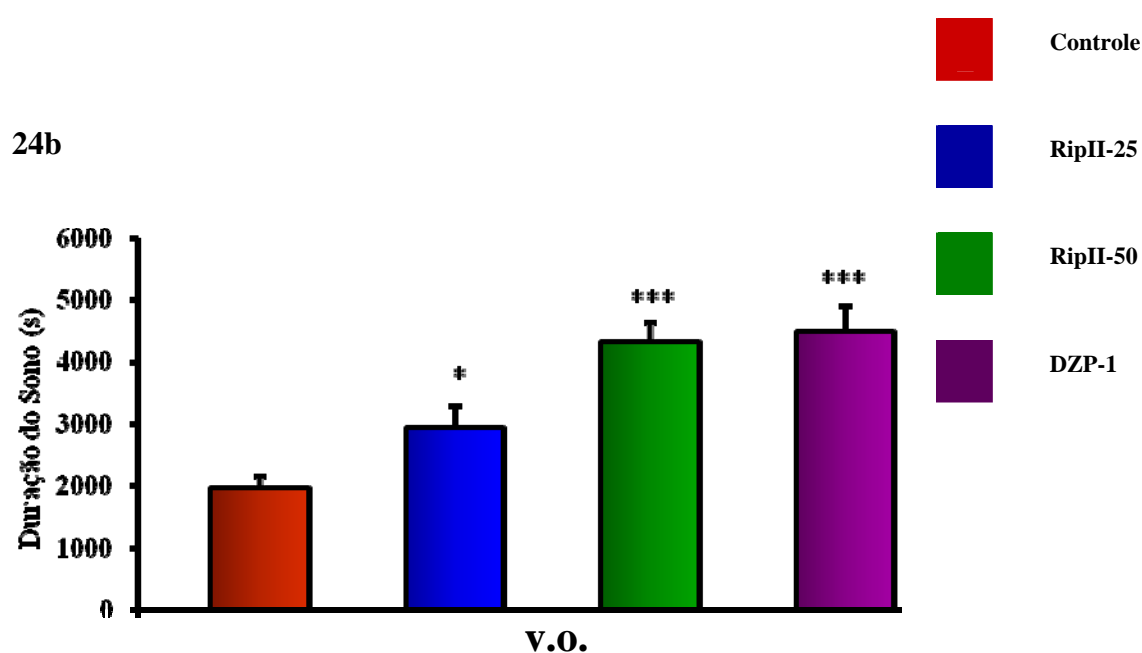
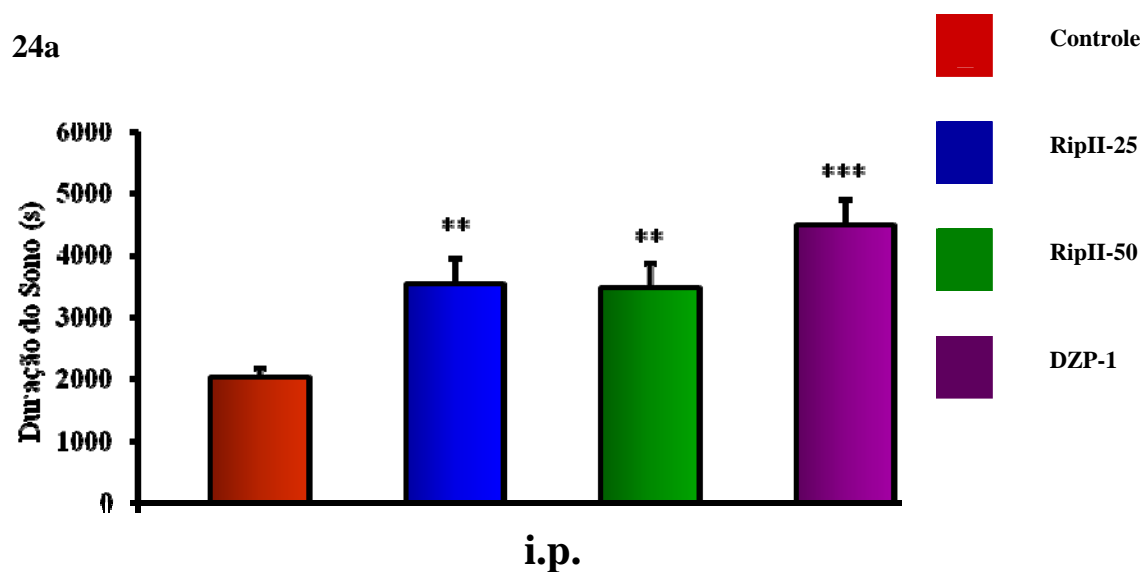
Na duração do sono, a riparina II aumentou esse parâmetro tanto por via i.p. (Figura 24a) quanto por via oral (Figura 24b) [i.p. = ripII-25: $3541,0 \pm 402,7$ (12); ripII-50: $3469,0 \pm 407,2,61$ (12); v.o. = ripII-25: $2930,0 \pm 355,2$ (7); ripII-50: $4330,0 \pm 290,7$ (7)] comparando com os respectivos controles [i.p. = $2032,0 \pm 134,5$ (13); v.o. = $1973,0 \pm 171,7$ (11)].

Como esperado, o diazepam 1 mg/kg, i.p., reduziu o tempo de latência do sono [DZP-1: $187,6 \pm 9,25$ (10)] e aumentou a duração do sono [DZP-1: $4481,4 \pm 419,21$ (10)] em relação aos grupos controle v.o. e i.p., conforme as Figuras 23 e 24.



Figuras 23 - Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (23a) e oral (23b), sobre a latência do sono, em segundos, no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25 e 50 mg/kg) e diazepam (DZP; 1 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras **23a** e **23b** 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*. Valores significativos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.



Figuras 24 - Efeito da riparina II e diazepam, via intraperitoneal (24a) e oral (24b), sobre a duração do sono, em segundos, no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.

Controle (veículo), riparina II (RipII; 25 e 50 mg/kg) e diazepam (DZP; 1 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras **24a** e **24b** representam a média \pm EPM da duração do sono (s). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

5.3.2 Teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol

No teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol foram avaliados a latência da convulsão (LC), em segundos, a latência de morte (LM), em segundos, e a porcentagem de sobrevivência. Nenhuma alteração na latência da convulsão foi vista após administração da riparina II tanto via i.p. quanto por via oral [i.p. = ripII-25: $69,67 \pm 4,90$ (18); ripII-50: $76,67 \pm 4,15$ (18); v.o. = ripII-25: $65,40 \pm 4,20$ (10); ripII-50: $69,50 \pm 7,10$ (10)] comparando aos respectivos controles [i.p. = $59,33 \pm 3,62$ (18); v.o. = $69,0 \pm 2,83$ (15)] (Tabela 3).

A riparina II aumentou o tempo de morte nas mesmas doses e vias utilizadas [i.p. = ripII-25: $494,70 \pm 99,80$ (17); ripII-50: $509,85 \pm 59,04$ (14); v.o. = ripII-25: $330,10 \pm 28,30$ (9); ripII-50: $342,0 \pm 29,20$ (7)], comparando aos respectivos controles [i.p. = $227,82 \pm 29,40$ (17); v.o. = $222,30 \pm 19,50$ (15)] (Tabela 3).

O diazepam, 1 mg/kg, como esperado, aumentou a latência da convulsão [DZP-1: $156,06 \pm 14,40$ (17)] comparando com os controles i.p. e v.o., de acordo com a Tabela 3.

A porcentagem de sobrevivência dos animais tratados com riparina II, por via oral, foi de 0% em ambas as doses. Contudo, por via i.p., 4,54% e 14,28% dos animais de cada grupo de riparina II (25 e 50 mg/kg), respectivamente, sobreviveram, assim como, 100% dos animais tratados com diazepam sobreviveram (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito da administração intraperitoneal e oral da riparina II e diazepam nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos.

Grupo (mg/kg)	Latência da Convulsão (s)	Latência de Morte (s)	Sobrevivência (%)
Via Intraperitoneal			
Controle	59,33 ± 3,62 (18)	227,82 ± 29,40 (17)	0
RipII-25	69,67 ± 4,90 (18)	494,70 ± 99,80 (17)**	4,54
RipII-50	76,67 ± 4,15 (18)	509,85 ± 59,04 (14)*	14,28
Via Oral			
Controle	69,00 ± 2,83 (15)	222,30 ± 19,50 (15)	0
RipII-25	65,40 ± 4,20 (10)	330,10 ± 28,30 (9)**	0
RipII-50	69,50 ± 7,10 (10)	342,00 ± 29,20 (7)**	0
DZP-1	156,06 ± 14,40 (17)***	-	100

Os valores representam a média ± EPM da latência da convulsão e latência de morte. O número de animais está representado entre parênteses. Para análise estatística foi realizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs controle. O grupo DZP-1 foi significativo em relação aos controles intraperitoneal e oral.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A pesquisa de plantas medicinais como estratégia alternativa na procura de novos agentes terapêuticos tem se tornado uma ferramenta bastante útil nos países em desenvolvimento visto que, a utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade médica, que preza por plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua segurança e eficácia (CECHINEL; YUNES, 1998; KINGORN, 2001).

A importância das plantas medicinais Deve-se também por sua contribuição como fonte natural de fármacos e por proporcionar grandes chances de obter-se uma molécula protótipo devido à diversidade de constituintes presentes nestas (KINGORN, 2001)

Aproximadamente 25% de todas as drogas modernas disponíveis são derivadas, direta ou indiretamente, de plantas. Um dos exemplos que podemos destacar são os salicilatos que levaram ao desenvolvimento das maiores classes de drogas analgésicas, principalmente, opióides e drogas antiinflamatórias não esteroidais (CALIXTO *et al.*, 2000 e 2005). Todavia, o potencial dos produtos naturais como fontes de novas drogas tem sido pouco explorado (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991).

Aniba riparia (Nees) Mez, um herbáceo da família *Lauraceae*, popularmente conhecida como “louro”, “louro-faia” e “pau-rosa”, é encontrada na Amazônia, Brasil (MARQUES, 2001). Do fruto verde desta planta foram isoladas três alcaloides que possuíam atividade antimicrobiana: riparina I, riparina II e riparina III (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987, 1990; CATÃO *et al.*, 2005). Alguns trabalhos mostraram que estas substâncias apresentam outros efeitos farmacológicos. Castelo-Branco *et al.*, (1991, 1992) mostraram que a riparina III apresenta efeitos espasmolíticos e Thomas *et al.*, (1994) concluiu que esse efeito estava relacionado com a redução da concentração intracelular do Ca^{2+} . Além disso, recentemente, foi verificado, em outros estudos, que a riparina I (SOUSA *et al.*, 2005) e III (SOUSA *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2006) apresentam efeitos ansiolíticos em camundongos nas doses de 25 e 50 mg/kg.

Neste trabalho, procurou-se estudar a riparina II com o intuito de investigar suas propriedades farmacológicas aliado com o fato da riparina II apresentar em sua estrutura química, a tiramina, uma amina simpaticomimética de ação indireta. Os efeitos da riparina II foram estudados em vários modelos de comportamento animal, tais como o campo aberto, *rota rod*, labirinto em cruz elevado (LCE), placa perfurada, nado forçado, suspensão da

cauda, tempo de sono induzido por pentobarbital e convulsão induzida por pentilenotetrazol. Estes testes são modelos clássicos para *screening* de atividades sobre o sistema nervoso central em animais e fornece informações tais como desempenho psicomotor, locomoção, atividades relaxante muscular, ansiolítica, antidepressiva, sedativo/hipnótica e anticonvulsivante.

A ansiedade pode ser caracterizada como a antecipação emocional de uma situação aversiva, de difícil controle e de provável ocorrência. Medo, no entanto, pode ser definido como uma reação a uma situação perigosa real e bem definida e é visto por vários autores como uma entidade independente da ansiedade. Ainda assim, Por vezes pode ser difícil uma separação entre as duas.

Alguns modelos animais de ansiedade evocam, pela simples exposição do animal a um novo ambiente ou estímulo, comportamentos de medo ou defensivos, análogos a manifestações ansiosas em indivíduos com transtornos de ansiedade. Por exemplo, animais expostos ao labirinto em cruz elevado apresentam um comportamento denominado de avaliação de risco (*risk assessment*), o que pode ser relacionado à hipervigilância, apresentada por indivíduos ansiosos. A avaliação de risco representa uma antecipação de um perigo potencial, sendo um comportamento defensivo de grande valor adaptativo; ainda assim, indivíduos ansiosos parecem mais frequentemente tentar antecipar tal ameaça no intuito de lidar melhor com isto, o que acaba por trazer prejuízos para os mesmos (RAMOS *et al.*, 1997; BLANCHARD *et al.*, 1989).

Vários testes foram desenvolvidos para avaliar parâmetros comportamentais que indicassem ansiedade em roedores. A avaliação do comportamento relacionado à ansiedade em modelos animais tem por base a hipótese da ansiedade em animais ser comparável a ansiedade em humanos. É incontestável que diferentes modelos comportamentais em roedores indicam ansiedade, isto é, mudanças comportamentais e periféricas que, presumivelmente podem estar relacionadas com uma alta atividade do sistema nervoso simpático. Portanto, uma analogia, senão uma homologia, pode ser assumida entre a ansiedade em humanos e roedores (HALL, 1936; OHL, 2003).

Os roedores parecem preferir a periferia ao centro do campo aberto, normalmente ambulados em contato com as paredes, ou seja, apresentam tigmotaxia. Portanto, assim como no labirinto em cruz elevado, a tigmotaxia estaria relacionada com a ansiedade no campo aberto (CAROLA *et al.*, 2002; PRUT; BELZUNG, 2003). 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, colocamos os animais em uma sala fechada pobremente iluminada com uma luz vermelha de 15W.

O comportamento dos roedores é determinado pelo conflito entre explorar áreas/objetos desconhecidos e o instinto de evitar perigos potenciais. A ansiedade inibe o comportamento exploratório (atividade locomotora, rearing, climbing, e manipulação de objetos) do animal (BARNETT, 1975). Um aumento ou diminuição deste comportamento pode ser indiretamente uma medida do nível de ansiedade (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; PELLOW *et al.*, 1985).

O teste do campo aberto é utilizado para avaliar a atividade exploratória dos animais, como medida de emocionalidade em roedores (BROADHURST, 1958, 1978; ALBONETTI; FARABOLLINI, 1984, 1992;) além de ser utilizado para estudar os efeitos de ansiolíticos e outras classes de drogas sobre o comportamento em um novo ambiente. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado por este ambiente (MONTGOMERY, 1958). Desta forma, a locomoção, *rearing* e *grooming* em roedores, observados no campo aberto, são os parâmetros comportamentais mais usados para descrever influências dos eventos da vida ou da administração de drogas (MONTGOMERY, 1958; ARAKAWA; IKEDA, 1991; REX; STEPHENS; FINK, 1996).

A riparina II não alterou a atividade locomotora dos animais em todas doses utilizadas, tanto por via oral como intraperitoneal. Dados na literatura demonstraram que a redução na atividade locomotora espontânea dá uma indicação do nível de excitabilidade do sistema nervoso central (MANSUR; MARTZ; CARLINI, 1971) e, esta redução pode estar relacionada com a sedação resultante da depressão do sistema nervoso central (OZTURK *et al.*, 1996; PEREZ *et al.*, 1998). Os resultados apresentados sugerem que a riparina II não apresenta efeito sedativo no campo aberto. O diazepam, na dose de 2 mg/kg, diminuiu a atividade locomotora mostrando seu efeito sedativo.

A atividade de *rearing* parece estar relacionada com a hiperatividade dopaminérgica. Estudos apontam que o aumento da atividade dopaminérgica induz um maior comportamento de *rearing* (SWANSON *et al.*, 1997). Em alguns estudos o *rearing* tem sido focalizado como um aspecto de comportamento exploratório (JOHANSSON; AHLENIUS, 1989), mas outros sugerem que agentes ansiolíticos diminuem o número de *rearing* (HUGHES, 1972; STOUT; WEISS, 1994).

No presente trabalho, como mencionado anteriormente, a riparina II reduziu o número de *rearing* em todas as doses usadas em ambas vias administradas. A dose de diazepam usada neste estudo também reduziu o número de *rearing*. Estes achados são consistentes com estudos anteriores que mostraram que ratos de raça mais emocional apresentaram maior número de *rearing* em campo aberto que uma raça menos emocional (HINE, 1995), e com outros achados anteriores que apresentaram uma redução no número de *rearing* em campo aberto produzido por ansiolíticos (GRAY, 1982). A atividade de *rearing* em roedores é também descrita como um comportamento estereotipado complexo (DANDIYA *et al.*, 1969). Assim sendo, a redução de *rearing*, induzida pela riparina II, pode também ser devido à redução da excitabilidade do sistema nervoso central por esta substância, desde que, o sistema nervoso central é conhecido facilitar o *rearing* (GUPTA *et al.*, 1971).

De acordo com MacFarland e Reeder, (1974), quase todos os animais gastam uma significativa parte do tempo no comportamento de *grooming*. Embora vários transmissores possam modular a expressão deste comportamento (MOODY; MERALI; CRAWLEY, 1993; TRABER *et al.*, *apud* SERAFIM; FELÍCIO, 2001), a dopamina está particularmente envolvida (COOLS; SPRUIJT; ELLENBROEK *apud* SERAFIM; FELÍCIO, 2001; DRAGO; CONTARINO; BUSA, 1999). Neste estudo, o *grooming* manteve-se constante no campo aberto, com a riparina II, em ambas vias administradas e doses utilizadas nos experimentos. O diazepam, na dose de 2 mg/kg, diminuiu o *grooming*. Na literatura, é referido que o aumento de *grooming* é observado em roedores apreensivos (ARCHER, 1973), e em um grande número de estudos, pesquisadores observaram que drogas ansiolíticas reduzem o *grooming* no campo aberto (BARROS *et al.*, 1994; DUNN *et al.*, 1981; MOODY; MERALI; CRAWLEY, 1993).

Alguns autores afirmam que os receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ interagem na locomoção e na estereotipia. A locomoção depende da ativação dos receptores D₁ (STARR; STAAR, 1989), enquanto o comportamento estereotipado depende do receptor D₂ (USHIJIMA; CARINO; HORITA, 1995). Além disso, tem sido relatado que a redução da atividade locomotora é causada pela diminuição da dopamina, de forma que a locomoção depende do aumento ou redução desta monoamina (HSICH; PENG; HSICH, 1994). Pode-se sugerir que a riparina II não estimula os receptores dopaminérgicos do tipo D₁, já que não alterou a atividade locomotora espontânea. Com relação ao *rearing* e o *grooming* (comportamentos estereotipados), alguns autores afirmam o envolvimento dos receptores dopaminérgicos do tipo D₂. Assim sendo, já que a riparina II diminuiu um desses parâmetros

(*rearing*) de forma significativa, pode-se sugerir que há um envolvimento desta substância, no teste do campo aberto, com esse tipo de receptor dopaminérgico, provavelmente estimulando os receptores D₂ pré-sinápticos.

O teste do *rota rod* é usado para medir o desempenho da coordenação motora nos animais (SEDELIS; SCHWARTING R; HUSTON, 2001), ou seja, é um modelo que serve para detectar déficits neurológicos em ratos e camundongos (DUNHAM; MIYA, 1957). A riparina II, em todas as doses e vias utilizadas, não alterou a coordenação motora no teste do *rota rod*, diferentemente do diazepam que aumentou o número de quedas e diminuiu o tempo de permanência na barra por apresentar um efeito relaxante muscular. Esses resultados sugerem que as ações desta substância, provavelmente, podem não ser exercidas através de bloqueio neuromuscular periférico, mas seus efeitos devem envolver neurônios que controlam a atividade depressora central (ADZU *et al.*, 2002; PEREZ *et al.*, 1998; AMOS *et al.*, 2001).

Para ratificar os efeitos ansiolíticos da riparina II, foram realizados mais dois testes para drogas ansiolíticas, a placa perfurada e o LCE, além de um teste para avaliar o efeito sedativo/hipnótico, o tempo de sono induzido por pentobarbital.

O teste da placa perfurada (*Hole board*), foi estudado para explorar o potencial ansiolítico da riparina II. Neste teste é medido o comportamento exploratório em roedores (FILE; WARDILL, 1975). O número de vezes que o animal coloca a cabeça no buraco da placa perfurada (*head dips*) tem sido registrado como um parâmetro para avaliar as condições de ansiedade em animais. Neste modelo, doses não-sedativas de benzodiazepínicos e outras drogas ansiolíticas, aumentaram o número de *head dips* em camundongos, enquanto seus antagonistas o reduziram (CRAWLEY, 1985).

Estudos realizados por Takeda, Tsuji e Matsumiya (1998) demonstraram que, ansiolíticos benzodiazepínicos, tais como, o diazepam e o clordiazepóxido, apresentaram efeitos consistentes no comportamento de *head dips* no teste da placa perfurada, ou seja, ambos aumentaram o número de *head dips* em doses que estes compostos não produziam sedação. Esta observação é consistente com resultados anteriores, que mostraram aumento na frequência de *head dips* seguida de injeções de doses não sedativas de diazepam. No entanto este efeito foi revertido com doses maiores de diazepam, o qual induziu sedação (SUZUKI; INAYAMA; MISAWA, 1990). Estudos realizados com compostos ansiogênicos, tais como, FG7142 e β -CCM, ambos derivados β -carbolina, mostraram que estas drogas reduziram o número de *head dips* (TAKEDA; TSUJI; MATSUMIYA, 1998). Estes efeitos sugerem que a redução no comportamento de *head dip* pode refletir estado ansiogênico do animal, e que

ambos os estados ansiolíticos e ansiogênicos podem ser estimados usando o teste da placa perfurada (TAKEDA; TSUJI; MATSUMIYA, 1998). Com base nestes estudos e, em informações que a expressão de um estado ansiolítico em animais pode ser refletida por um aumento no comportamento de *head dip*, nossos resultados forneceram evidências que a riparina II apresentou efeito ansiolítico, desde que, nas doses de 25, 50 mg/kg, tanto por via intraperitoneal como oral, mostrou aumento deste comportamento.

O labirinto em cruz elevado (LCE) é o modelo mais utilizado e aceito pela comunidade científica como um procedimento rápido e simples para detectar ambos efeitos ansiolítico e ansiogênico de drogas em ratos e camundongos (TREIT, 1985; ZANGROSSI JR., 1997). Este modelo experimental é muito sensível para determinar a influência do receptor GABA_A/Benzodiazepínico no processo de ansiedade, visto que, outras drogas como a buspirona, que envolve receptores serotoninérgicos, tem resultados muito variáveis em relação a esse teste. É o teste mais popular para pesquisar agentes ansiolíticos como os benzodiazepínicos (PELLOW *et al.*, 1985; RODGERS *et al.*, 1997).

Quando confinados nos braços abertos, ratos mostram manifestações comportamentais e fisiológicas de medo, tais como *freezing* (congelamento), defecação, e aumento de corticosteróides no plasma (PELLOW *et al.*, 1985; TREIT; MENARD; ROYAN, 1993). Drogas ansiolíticas aumentam o número e o tempo de permanência nos braços abertos, enquanto agentes ansiogênicos fazem o oposto (HANDLEY; MITHANIM, 1984; PELLOW *et al.*, 1985; PELLOW; FILE, 1986; TRULLAS; SKOLNICK, 1991).

No presente estudo, como esperado, o diazepam, usado como droga ansiolítica de referência, produziu significativo aumento em todos os parâmetros analisados, ou seja, número de entradas nos braços abertos (NEBA), percentual do número de entradas nos braços abertos (PEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e percentual do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA). A riparina II, na dose de 25mg/kg, aumentou todos esses parâmetros quando administrada por via intraperitoneal. Na via oral, aumentou NEBA (75 mg/kg), PEBA (25, 50 e 75 mg/kg) e TPBA (75 mg/kg). Contudo, a aparente discrepância pode ser devido ao diferente número de animais usado em cada condição. Ainda assim, a riparina II mostrou que apresenta um efeito ansiolítico tanto no teste da placa perfurada quanto no teste do labirinto em cruz elevado, do mesmo modo que o diazepam.

Trabalhos anteriores mostram que o flumazenil, antagonista competitivo do receptor GABA_A/Benzodiazepínico, preveniu os efeitos ansiolíticos do diazepam no LCE (KURIBARA; MARUYAMA, 1996; KURIBARA *et al.*, 1998; LUSCOMBE *et al.*, 1991). Para melhor esclarecer o mecanismo de ação do efeito ansiolítico da riparina II, foi utilizado o

flumazenil para avaliar o possível envolvimento do sistema gabaérgico. Para tanto, foi escolhido o teste do LCE, por ser mais sensível para testar drogas ansiolíticas do tipo benzodiazepínicas (PELOW *et al.*, 1985; RODGERS *et al.*, 1997). Além disso, a via de administração usada para tratar os animais com riparina II foi a via oral, por ter apresentado resultados mais significantes quando comparados com o controle. Os resultados mostraram que o flumazenil reverteu o efeito ansiolítico da riparina II no NEBA, PEBA e TPBA, do mesmo modo que reverteu os efeitos do diazepam, sugerindo assim, que a riparina II apresenta efeito ansiolítico, e, este efeito parece estar relacionado com o sistema gabaérgico, mais especificamente envolvido com os receptores GABA_A/Benzodiazepínico.

De acordo com a literatura, os benzodiazepínicos, tais como o diazepam, agem como ansiolíticos (em doses baixas) e anticonvulsivantes, produzindo também sedação e efeito relaxante muscular em doses mais altas (ONAIVI *et al.*, 1992; WOLFFGRAMM; MIKOLAICZY; COPER, 1994). Por esta razão, no presente trabalho, foram utilizadas diferentes doses de diazepam nos testes realizados.

É conhecido que a diminuição na latência do sono e o aumento no tempo de sono são classicamente relatados por drogas depressoras do SNC (WILLIANSO; OKPAKO EVANS, 1996). O princípio deste teste é verificar se uma droga possui a capacidade de potencializar o efeito sedativo e hipnótico do pentobarbital sódico, embora algumas drogas desprovidas de ação central, como por exemplo, a adrenalina e a histamina, também apresentam resultados positivos (RILEY; SPINKS, 1958).

Nossos resultados mostraram que a riparina II diminuiu a latência do sono em ambas as doses por via intraperitoneal, e aumentou a duração do sono em ambas as vias e doses. Os dados deste trabalho sugerem que esta potencialização é um fenômeno dose-dependente, pois os efeitos observados com doses maiores foram mais significativos quando comparado com os controles. No entanto, este teste não é específico, visto que compostos que interagem com a biotransformação do pentobarbital, pelo complexo citocromo P-450, podem apresentar o mesmo efeito de drogas depressoras no SNC (GOLOUBKOVA *et al.*, 1998). Desse modo, o prolongamento da hipnose pelo pentobarbital sódico pode ser devido às propriedades sedativo/hipnóticas (FUJIMORI, 1965) atribuídas à inibição do metabolismo do pentobarbital (KAUL; KULKARNI, 1978) ou mecanismos centrais envolvidos na regulação do sono (N'GOUEMO; NQUEMBY-BINA; BALDY-MOULINIER, 1994). Neste experimento, o efeito sedativo/hipnótico da riparina II não foi corroborado no teste do campo aberto, no qual os animais tratados com riparina II, em ambas vias e doses, não tiveram alteração da atividade locomotora espontânea.

Como a riparina II já havia demonstrado efeito ansiolítico, via mecanismo GABAérgico, foi estudado também a possibilidade de efeitos anticonvulsivantes através dos mecanismos GABAérgicos. O pentilenotetrazol (PTZ) é uma droga ansiogênica, que, em humanos, foi inicialmente utilizada como uma droga convulsivante, sendo constatado posteriormente que, em doses subconvulsivantes, produzia intensa ansiedade e ataques de pânico. Está claro que os efeitos específicos do PTZ são largamente mediados pelo receptor GABA_A, embora o mecanismo de bloqueio do receptor pelo PTZ ainda não esteja esclarecido. Sabe-se que o PTZ age via sítio picrotoxina (situado no interior do canal de cloreto) no complexo receptor GABA_A-benzodiazepínico-canal de cloreto, reduzindo o influxo de íons cloreto (JUNG; LAL; GATCH, 2002; HANSEN; SPERLING; SÁNCHEZ, 2004).

O teste das convulsões induzidas por pentilenotetrazol é usado para avaliar efeitos sedativos sobre o sistema nervoso central. As convulsões são propostas como resultado do desequilíbrio das atividades excitatórias ou inibitórias neuronais, seguida do aumento da excitação glutamatérgica ou redução da inibição gabaérgica (ELISABETSKY; SILVA-BRUM; SOUZA, 1999). As convulsões do tipo tônico-clônica generalizadas podem ser estudadas através de modelos que utilizem a administração sistêmica de substâncias químicas convulsivantes, muito usadas como *screening* de drogas anticonvulsivantes (SWINYARD, 1949; SWINYARD; BROWN; GOODMAN, 1952).

A inibição das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) é uma metodologia extensamente utilizada para avaliar o efeito anticonvulsivante de drogas em animais (LOWSON; GENT; GOODCHILD, 1991). O PTZ é um agente protótipo das substâncias químicas sistêmicas convulsivantes (PAPY; NAQUET, 1971). Apresenta ação convulsivante em camundongos, ratos, gatos e primatas, e quando administrado pela via parenteral produz inicialmente abalos mioclônicos, que se mantêm sustentados evoluindo para convulsões generalizadas do tipo tônico-clônica. As convulsões induzidas por PTZ são como descargas elétricas anormais na atividade cerebral (PRINCE, 1978). 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 (KUPFERBERG; SCHMUTZ, 1997). Sabe-se que os benzodiazepínicos produzem seus efeitos sedativos, hipnóticos, ansiolíticos e anticonvulsivantes pela sua interação com receptores GABA_A (GOODCHILD, 1993; SHADER; GREEBLAT, 1993).

O diazepam, utilizado como padrão positivo nos experimentos, aumentou a latência da convulsão e obteve 100% de sobrevivência dos animais. A riparina II aumentou a latência de morte em ambas vias e doses utilizadas, no entanto, não teve nenhum efeito sobre

a latência da convulsão. Além disso, por via intraperitoneal, os grupos tratados com riparina II 25 e 50 mg/kg obtiveram 4,54% e 14,28%, respectivamente, de sobrevivência dos animais. Esses resultados sugerem que a riparina II apresenta um possível efeito anticonvulsivante e que este efeito 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.

Outros estudos também mostram outras drogas de origem vegetal como a wogonina que possuem efeitos anticonvulsivantes que também resultam da potencialização da atividade do GABA (PARK *et al.*, 2007).

A depressão é uma condição psiquiátrica extremamente comum, para a qual existem uma gama de teorias neuroquímicas e uma variedade correspondente de diferentes tipos de fármacos usada no tratamento. É um campo no qual o empirismo terapêutico ocorreu antes, com o entendimento do mecanismo, tendendo a ficar para trás, sendo que parte das dificuldades é dos modelos de animais que não se aplicam à mudança de humor que define a condição humana (RANG *et al.*, 2004). Numerosos compostos antidepressivos estão agora disponíveis e presume-se que agem através de diferentes mecanismos, incluindo os sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e/ou dopaminérgico.

Muitos modelos animais para a avaliação de drogas antidepressivas são baseados na associação clínica de episódios de depressão e de eventos como o estresse. O estresse é tipicamente implicado na etiologia das desordens depressivas ou como uma consequência delas (ANISMAN; ZACHARKO, 1982; BROWN, 1993; LLOYD, 1980; SHERRILL *et al.*, 1997; TURNER; LLOYD, 1999). Os dois modelos animais mais amplamente utilizados para *screening* de novas drogas antidepressivas são os testes do nado forçado e da suspensão da cauda. Esses testes são bastante sensíveis e relativamente específicos para a maioria das classes de drogas antidepressivas, incluindo, os antidepressivos tricíclicos, os inibidores seletivos da recaptção de serotonina, os inibidores da MAO (monoamina oxidase) e os atípicos (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995; PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977; STERU *et al.*, 1985).

A depressão representa uma condição psiquiátrica que necessita de intervenção medicamentosa. Clinicamente, é tratada com antidepressivos, porém, nem todos pacientes respondem ao tratamento, os efeitos terapêuticos são prolongados persistindo por várias semanas. Tornam-se necessárias novas estratégias para o tratamento da depressão, onde estudos comprovam que o sistema serotoninérgico desempenha um importante papel. (TAYLOR, *et al.*, 2005; NEUMEISTER, 2003).

Vários modelos animais de doenças humanas têm provado ser útil na elucidação de mecanismos básicos dessas doenças (GUAY-WOODFORD, 2003). O teste da suspensão da cauda baseia-se no fato de que camundongos, quando suspensos pela cauda demonstram um padrão temporal, alternando entre períodos de atividade (“comportamento de fuga”) e imobilidade (“comportamento de espera”), refletindo um “desespero comportamental” (PORSOLT *et al.*, 1978). Esse comportamento em animais é considerado como uma reprodução semelhante ao comportamento da depressão humana (STERU *et al.*, 1985; WILLNER, 1984). Foi evidenciado nos nossos resultados que a riparina II diminuiu o tempo de imobilidade, em todas as doses utilizadas, quando administrada tanto por via intraperitoneal quanto por via oral. Uma diminuição no tempo de imobilidade de um grupo submetido à administração de uma droga padrão ou teste, em relação ao grupo controle, sugere uma ação antidepressiva (STERU *et al.*, 1985). Esses efeitos sugerem que a riparina II apresenta um efeito antidepressivo e para corroborar com esses resultados obtidos no teste da suspensão da cauda, foi realizado o teste do nado forçado.

O teste do nado forçado é um teste comportamental que nos dá uma indicação da eficácia clínica de vários tipos de drogas antidepressivas. Atualmente, drogas antidepressivas são conhecidas por agirem através de vários diferentes mecanismos em nível de receptor, provavelmente estimulando caminhos em nível sub-celular (YILDIZ *et al.*, 2000).

O fenômeno comportamental observado nesse teste parece ser resultado da exposição a uma situação inescapável, e o animal divide seu comportamento em períodos de atividade vigorosa (comportamento de procura) e de imobilidade (comportamento de espera) (STERU *et al.*, 1985). Embora a relação entre imobilidade (uma postura mantida que reflete um estado de “desespero comportamental” no qual o animal é rendido pelo desejo de escapar) e depressão sejam controversas é bem demonstrado que drogas com atividade antidepressiva antagonizam, ou seja, diminuem o tempo de imobilidade do animal (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977).

A riparina II, neste teste, diminuiu o tempo de imobilidade em ambas vias e doses utilizadas. Nossos resultados também mostraram que a imipramina (inibidor da recaptação de noradrenalina e serotonina) e a bupropiona (inibidor da recaptação de dopamina), usados como padrões positivos nos testes do nado forçado e suspensão da cauda (imipramina), também diminuíram o tempo de imobilidade dos animais, corroborando com os estudos que mostram a sensibilidade destes testes às várias classes de drogas antidepressivas (KULKARNI; DHIR, 2007).

O teste do nado forçado foi utilizado para investigação do mecanismo de ação por parece ser mais sensível que o teste da suspensão da cauda em detectar drogas com atividade antidepressiva, visto que, doses menores de drogas como a imipramina são suficientes para apresentar um efeito antidepressivo no nado forçado (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977). Isso é possível, por exemplo, através da administração combinada de drogas-teste com agonistas ou antagonistas específicos de receptores, permitindo elucidar o mecanismo de ação dessas drogas (REDROBE *et al.*, 1998).

A principal teoria bioquímica da depressão é a hipótese das monoaminas, proposta por Schildkraut em 1965, que afirma que a depressão é causada por um déficit funcional das monoaminas transmissoras, noradrenalina e/ou serotonina, em certos locais do cérebro (RANG *et al.*, 2004). Inibidores seletivos da recaptação dessas monoaminas melhoram a depressão (BLIER; DE MONTIGNY, 1994). No entanto, tem sido proposto que a dopamina apresenta um importante papel nos sintomas depressivos e no efeito antidepressivo de drogas (WILLNER, 1995) além de estar implicada na regulação do humor (BROWN, 1993).

O envolvimento da dopamina na depressão é fortemente baseado na observação de que o efeito antidepressivo da imipramina é significativamente antagonizado pelos bloqueadores dos receptores dopaminérgicos do tipo D₁ (HIRANO *et al.*, 2007). Além disso, alguns antidepressivos que agem na neurotransmissão dopaminérgica, inibindo a recaptação de dopamina, exibem um efeito anti-imobilidade no nado forçado, em doses que não alteram a atividade locomotora do campo aberto (PORSOLT *et al.*, 1978; VAUGEOIS *et al.*, 1996).

Com a finalidade de verificar o envolvimento do sistema dopaminérgico com o mecanismo de ação do efeito antidepressivo da riparina II, diferentes grupos foram pré-tratados com SCH23390 (antagonista dos receptores dopaminérgicos do tipo D₁) ou com sulpirida (antagonista dos receptores dopaminérgicos do tipo D₂) e tratados com riparina II, por via oral. Os resultados mostraram que os efeitos da riparina II foram revertidos pela sulpirida e pelo SCH23390 sugerindo que a riparina II apresenta efeito antidepressivo, e, este efeito parece estar envolvido com os receptores dopaminérgicos do tipo D₁ e D₂.

Foi observado por Yamada, Sugimoto, e Yamada (2004) que o SCH 23390 e o sulpiride antagonizaram os efeitos anti-imobilidade da bupropiona, sugerindo que a participação dos receptores D₁ e D₂ podem potencialmente melhorar a depressão e, além disso, está bem documentado, que existe uma interação funcional sinérgica entre os receptores D₁ e D₂ em vários tipos de comportamento (MENON *et al.*, 1988).

Vários estudos experimentais e estudos clínicos indicaram que o sistema noradrenérgico está envolvido na fisiopatologia da depressão (FRAZER, 2000; NUTT, 2006).

Drogas que afetam a transmissão noradrenérgica, como as que inibem a recaptação de noradrenalina nos terminais nervosos, ou seu metabolismo (inibidores da MAO), são efetivas na depressão.

Para avaliação do envolvimento noradrenérgico, foram utilizados prazosina, antagonista dos receptores α_1 -adrenérgicos, ou ioimbina, antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, e tratados com riparina II, por via oral. A prazosina reverteu os efeitos, diferentemente da ioimbina, onde a riparina II continuou diminuindo o tempo de imobilidade. Os resultados sugerem que a riparina II apresente efeito antidepressivo envolvido com os receptores noradrenérgicos do tipo α_1 , mas não α_2 . Os receptores α_1 - e α_2 -adrenérgicos tem um papel importante na ação antidepressiva das drogas nos modelos comportamentais de depressão (KITADA *et al.*, 1983; DANYSZ *et al.*, 1986; MASUDA; OHNUMA; SUGIYAMA, 2001).

O efeito anti-imobilidade da riparina II nos testes do nado forçado e suspensão da cauda não estão associados com qualquer efeito motor, uma vez que a riparina II não alterou a atividade locomotora espontânea no campo aberto. Isso indica que o aumento da atividade motora não está envolvido no efeito visto no nado forçado e suspensão da cauda, e confirma a assertiva de que o efeito antidepressivo da riparina II é específico.

A riparina II mostrou ser bastante promissora nos modelos animais de ansiedade. Apesar de o seu mecanismo parecer estar envolvido com o receptor GABA_A/Benzodiazepínico, apresentou efeitos ansiolíticos desprovidos de efeitos sedativos comuns à maioria dos ansiolíticos clássicos, principalmente os benzodiazepínicos. Em modelos de depressão, a riparina II apresentou efeitos antidepressivos e, estes parecem estar envolvidos com o sistema dopaminérgico, com a estimulação dos receptores dopaminérgicos do tipo D₁ e D₂, e noradrenérgico, mais especificamente com estimulação dos receptores noradrenérgicos do tipo α_1 .

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O estudo dos efeitos centrais da riparina II, em vários modelos comportamentais, permitiu as seguintes conclusões:

- ✓ No teste do campo aberto, a riparina II diminuiu o número de *rearing*, sugerindo um possível efeito ansiolítico, mas é desprovida de efeito sedativo, pois não alterou a atividade locomotora espontânea dos animais;
- ✓ No teste do *rota rod*, a coordenação motora dos animais não foi alterada, mostrando que os efeitos desta substância não estão relacionados com o bloqueio neuromuscular periférico, mas sim, ocasionados centralmente.
- ✓ Nos testes do labirinto em cruz elevado e placa perfurada, a riparina II comprovou seu efeito ansiolítico sugerido no teste do campo aberto, pois aumentou todos os parâmetros analisados.
- ✓ O flumazenil, antagonista benzodiazepínico, associado a riparina II, reverteu os efeitos ansiolíticos produzidos por essa substância no teste do labirinto em cruz elevado, considerando que o mecanismo de ação da riparina II esteja relacionado com o receptor GABA_A/Benzodiazepínico.
- ✓ No teste do tempo de sono induzido por pentobarbital, a riparina II potencializou o efeito sedativo/hipnótico do pentobarbital sódico, o que não parece ser um efeito específico, já que o efeito sedativo não foi confirmado no teste do campo aberto. Este efeito pode estar envolvido com alterações farmacocinéticas do pentobarbital ou mecanismos de regulação do sono;
- ✓ No teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol, a riparina II aumentou a latência 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.

✓ No teste da suspensão da cauda e nado forçado, a riparina II apresentou efeito antidepressivo, que não, está relacionado com a hiperatividade, pois não alterou a atividade locomotora espontânea no campo aberto;

✓ O mecanismo de ação antidepressivo da riparina II, analisado no teste do nado forçado, parece estar envolvido com os sistemas dopaminérgico e noradrenérgico, sugerindo uma possível ativação dos receptores dopaminérgicos do tipo D₁ e D₂, e noradrenérgico, especificamente com ativação dos receptores adrenérgicos do tipo α_1 .

✓ Este trabalho permitiu concluir que a riparina II apresenta efeito ansiolítico, sem apresentar efeito sedativo, assim como também apresenta um possível efeito anticonvulsivante. Provavelmente, esses efeitos estão relacionados com o sistema gabaérgico. Além disso, essa alcamida apresenta efeito antidepressivo, provavelmente relacionado com o sistema dopaminérgico e noradrenérgico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADZU, B.; AMOS, S.; DZARMA, S.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Effect of *Zizyphus spina-christi* willd aqueous extract on the central nervous system in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 79, p. 13-16, 2002.

ALBONETTI, M. E.; FARABOLLINI, F. Social stress by repeated defeat: effects of social behavior and emotionality. **Behav. Brain Res.**, v. 62, p. 187-193, 1984.

_____. Behavioural responses to a single and repeated restraint in male and female rats. **Behav. Proc.**, v. 28, p. 97-110, 1992.

AMARA, S. G.; KUHAR, M. J. Neurotransmitter transporters: recent progress. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 16, p. 73-93, 1993.

AMOS, S.; ADZU, B.; BINDA, L.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Neuropharmacological effect of the aqueous extract of *Sphaeranthus senegalensis* in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 78, p. 33-37, 2001.

ANANTH, J.; BURGOYNE, K.S.; GADASALLI, R.; AQUINO, S. How do the atypical antipsychotics work? **J. Psychiatry Neurosci.**, v. 26, n. 5, p. 385-394, 2001.

ANISMAN, H.; ZACHARKO, R.M. Depression: the predisposing influence of stress. **Behav. Brain Sci.**, v. 5, p. 89-137, 1982.

ARAKAWA, O.; IKEDA, T. Apomorphine effects on single and paired rat open-field behavior. **Physiol. Behav.**, v. 50, p. 189-194, 1991.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Anim. Behav.**, v. 21, p. 205-35, 1973.

ASCHER, J. A.; COLE, J. O.; COLIN, J. N.; FEIGHNER, J. P.; FERRIS, R. M.; FIBIGER, H. C.; GOLDEN, R. N.; MARTIN, P.; POTTER, W. Z.; RICHELSON, E.; SULSER, F. Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity. **J. Clin. Psychiatry**, v. 56, p. 395-401, 1995.

AXELROD, J. Noradrenaline: fate and control of its biosynthesis. **Science**, v. 173, p. 598-606, 1971.

BARBOSA-FILHO, J. M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana. **Cad. Farm.**, v. 13, n. 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. **Rev. Latinoam. Quimica**, 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. 2615-2617, 1987.

BARNETT, S. A. **The rat**: a study in behavior. Chicago: University of Chicago Press, 1975.

BARROS, H. M.; TANNHAUSER, S. L.; TANNHAUSER, A. L.; TANNHAUSER, M. The effects of GABAergic drugs on grooming behavior in the open field. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 74, p. 339-344, 1994.

BHATTACHARYA, S. K.; SATTYAN, K. S. Experimental methods for evaluation of psychotropic agents in rodents: I- Anti-anxiety agents. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 35, n. 6, p. 565-575, 1997.

BLANCHARD, D. C.; HORI, K.; RODGERS, R. J.; HENDRIC, C. A.; BLANCHARD, R. J. Attenuation of defensive threat and attack in wild rats (*Rattus rattus*) by benzodiazepines. **Psychopharmacology**, v. 97, p. 392-401, 1989.

BLIER, P.; DE MONTIGNY, C. Current advances and trends in the treatment of depression. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 16, n. 1, p. 220-225, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Decreto nº. 5813 de 22 de Junho de 2006**. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm>. Acesso em: 23 nov 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria nº. 1029 de 21 de dezembro de 1998**. Visa disciplinar o procedimento de registro de produto fitoterápicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília, DF, 23 dez 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº. 116 de 12.08.96. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, v. 201, seção I, p. 15198 – 15199, 12 ago 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº. 06 de 31 de janeiro de 1995. Instituir e normatizar o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, v. 200, seção I, p. 1523 – 1524, 6 fev 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº. 17, de 24 de fevereiro de 2000**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <<http://webmail.crfdf.org.br/pagina.php?id=214>>. Acesso em: 23 nov 2006.

BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat: III- Strain differences. **J. Comp. Physiol.**, v. 51, p. 55-59, 1958.

_____. **Drugs and the inheritance of behavior**: a survey of comparative psychopharmacogenetics. New York: Plenum Press, 1978. v. 2, p. 206.

BROWN, G. W. The role of life events in the aetiology of depressive and anxiety disorders. In: STANNFORD, S.; SAMON, P. (Ed.). **Stress**: from synapse to syndrome. London: Academic Press, 1993. p. 23-50.

CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother Res.**, v. 14, p. 401-18, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **J. Ethnofarmacol.**, v. 100, p. 131–134, 2005.

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

CARLINI, E. A.; CONSTAR, J. D. P.; SILVA-FILHO, A. R.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; FROCHTENGARTEN, M. I.; BUENO, O. V. A. Pharmacology of Lemon-grass (*Cymbopogon citratus* Stapf). Effects of teas prepared from leaves on laboratory-animals. **J. Ethnopharmacol.**, v. 17, p. 37-64, 1986.

CAROLA, V.; D'OLIMPIO; BRUNAMONTI, E.; MANGIA, F.; RENZI, P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice. **Behav. Brain Res.**, v. 134, p. 49-57, 2002.

CASTELO-BRANCO, U. V.; 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, n. 3, p. 197-202, 2000.

CASTELO-BRANCO, U. J. V. **Estudos farmacológicos do éter metílico de N-(2,6-dihydroxibenzoyl)-tyramine**. Dissertação(Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, 1992.

CASTELO BRANCO, UJV, Thomas, G, Araújo, CC, Barbosa-Filho, JM. **Atividade espasmolítica de benzamidas isoladas de *Aniba riparia* (Parte 1)**. Resúme VI Reunião Anual de Federação de Sociedades de Biologia Experimental. 1991. Abstr. 6-69, 302.

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. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 34, n. 4, p. 247-249, 2005.

CIVELLI, O.; BUNZOW, J. R.; GRANDY, D. K. Molecular diversity of the dopamine receptors. **Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 32, p. 281-307, 1993.

CLARK, G.; KOSTER, A. G.; PERSON, D. W. Exploratory behavior in chronic disulfoton poisoning in mice. **Psychopharmacology**, v. 20, n. 2, p. 169-71, 1971.

COOLS, A. R.; SPRUIJT, B. M.; ELLENBROEK, B. A *apud* SERAFIM, A. P.; FELÍCIO, L. F. Dopaminergic modulation of grooming behavior in virgin and pregnant rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 1465-1470, 2001.

COOPER, J. R.; BLOOM, F. E.; ROTH, R. H. **The Biochemical basis of neuropharmacology**. 6th ed. New York: Oxford University, 1991.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais, do cultivo à terapêutica**. 6. ed. Petrópolis: Vozes, 2003.

COSTA, E.; SANDLER, M. **Monoamine oxidase: new vistas**. New York: Raven, 1972.

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

CRAWLEY, J. N. Exploratory behavior models of anxiety in mice. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 9, p. 37-44, 1985.

DANDIYA, P. C.; GUPTA, B. D.; GUPTA, M. L.; PATNI, S. K. Effects of LSD on open field performance I rats. **Psychopharmacologia**, v. 15, p. 333-340, 1969.

DANYSZ, W.; KOSTOWSKI, W.; KOZAK, W.; HAUPTMANN, M. On the role of noradrenergic neurotransmission in the action of desipramine and amitriptyline in animal models of depression. **Pol. J. Pharmacol. Pharm.**, v. 38, p. 285-298, 1986.

DE KEYSER, J. Subtypes and localization of dopamine receptors in human brain. **Neurochem. Int.**, v. 22, p. 83-93, 1993.

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

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais**: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed. UNESP, 1996.

DRAGO, F.; CONTARINO, A.; BUSA, L. The expression of neuropeptide-induced excessive grooming behavior in dopamine D₁ and D₂ receptor-deficient mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 365, p. 125-131, 1999.

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.

DUNN, A. J.; GUILD, A. L.; KRAMARCY, N. R.; WARE, M. D. Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty but not ACTh or beta-endorphin. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 15, p. 605-608, 1981.

ELISABETSKY, E.; SILVA-BRUM, L. F.; SOUZA, D. O. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. **Phytomedicine**, v. 6, n. 2, p. 107-113, 1999.

EVANS, W. C. Orders and families of medicinal plants; animal-derived drugs. In: EVANS, W. C. (Ed.). **Trease and Evans pharmacognosy**. 14th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996. cap. 2, p. 28-55.

FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S.; QUENZER, L. F. **Principles of neuro-psycho-pharmacology**. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 1997. p. 277-344.

FILE, S. E.; WARDILL, A. G. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. **Psychopharmacology**, v. 44, p. 53-59, 1975.

FRANÇA, N. C.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T.; MENDES, P. H.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; GOTTLIEB, H. E. Tri-*O*-methylgalangin from *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 4, p. 572-573, 1976.

FRAZER, A. Norepinephrine involvement in antidepressant action. **J. Clin. Psychiatry**, v. 61, p. 25-30, 2000.

FUJIMORI, H. Potentiation of barbital hypnosis as an evaluation method for central nervous system depressant. **Psychopharmacology**, v. 7, p. 374-377, 1965.

GERFEN, C. R. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 15, p. 285-320, 1992.

GOLOUBKOVA, T. D.; HECKLER, E.; RATES, S. M. K.; HENRIQUES, J. A. P.; HENRIQUES, A. T. Inhibition of cytochrome P-450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction from *Helietta apiculata* markedly potentiates the hypnotic action of pentobarbital. **J. Ethnopharmacol.**, v. 60, p. 141-148, 1998.

GOODCHILD, C. S. GABA receptors and benzodiazepines. **Br. J. Anaesth.**, v. 71, n. 1, p. 127-133, 1993.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. **Ciência Hoje**, v. 15, n. 89, p. 51-54, 1993.

GRAY, J. A. **The neuropsychology of anxiety**. Oxford: Oxford University Press, 1982.

GUAY-WOODFORD, L. M. Murine models of polycystic kidney disease: molecular and therapeutic insights. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 285, n. 6, p. F1034-F1049, 2003.

GUPTA, B. D.; DANDIYA, P. C.; GUPTA, M. L.; GABBA, A. K. An examination of the effects of central nervous system stimulant and antidepressant drugs on open field performance in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 13, p. 341-346, 1971.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 22, p. 345-52, 1936.

HANDLEY, S. E.; MITHANIM, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonist and antagonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HANSEN, S. L.; SPERLING, B. B.; SÁNCHEZ, C. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABA_A receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. **Prog. Neuropsychopharmacology Biol. Psychiatry**, v. 28, n. 1, p. 105-113, 2004.

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

HINE, B. Differential open-field activity in HAS and LAS rats. **Physiol. Behav.**, v. 57, p. 301-306, 1995.

HIRANO, S.; MIYATA, S.; ONODERA, K.; KAMEI, J. Involvement of dopamine D₁ receptors and α₁-adrenoceptors in the antidepressant-like effects of chlorpheniramine in the mouse tail suspension test. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 562, p. 72-76, 2007.

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.

HUGHES, R. N. Chlordiazepoxide-modified exploration in rats. **Psychopharmacology**, (Berlin), v. 24, p. 462-469, 1972.

JACKSON, D. M.; WESTLIND-DANIELSSON, A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. **Pharmacol. Ther.**, v. 64, p. 291-370, 1994.

JOCA, S. R.; SKALISZ, L. L.; BEIJAMINI, V.; VITAL, M. A.; ANDREATINI, R. The antidepressive-like effect of oxcarbazepine: possible role of dopaminergic neurotransmission. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 10, p. 223-228, 2000.

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.

JONES, H. M.; PILOWSKY, L. S. Dopamine and antipsychotic drug action revisited. **Br. J. Psychiatry**, v. 181, p. 271-275, 2002.

JUNG, M. E.; LAL, H.; GATCH, M. B. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazole as a model of anxiety: recent developments. **Neurosc. Biobehav. Rev.**, v. 26, p. 429-439, 2002.

KAPUR, S.; MANN, J. J. Role of the dopaminergic system in depression. **Biol. Psychiatry**, v. 32, p. 1-17, 1992.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

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

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

KOOB, G. F.; BLOOM, F. E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science**, v. 242, p. 715-23, 1988.

KOOB, G. F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. **Trends Pharmacol Sci**, v. 13, p. 177-84, 1992.

KULKARNI, S. K.; DHIR, A. Effect of various classes of antidepressants in behavioral paradigms of despair. **Prog. Neuropsychopharmacology Biol. Psychiatry**, v. 31, p. 1248-1254, 2007.

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, 1997. p. 1417-34.

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. First of two parts. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, p. 1044-1053, 1998.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. 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**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2003. cap. 11, p. 247-262.

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, n. 3, p. 255-275, 2002.

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

LLOYD, C. Life events and depressive disorders reviewed. 2 Events as precipitating factors. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 37, p. 541-8, 1980.

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. 879-882, 1991.

MACEDO JR., F. C. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estudo de rotas biossintéticas de produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n.1, p. 116-124, 2007.

MacFARLAND, C. G.; REEDER, W. G. Cleaning symbiosis involving Galapagos tortoises and two species of Darwin's finches. **Z. Tierpsychol.**, v. 34, p. 464-483, 1974.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. P.; VEIGA JR., V. F. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.

MANJI, H. K.; DREVETS, W. C.; CHARNEY, D. S. The cellular neurobiology of depression. **Nat. Med.**, v. 7, p. 541-547, 2001.

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. **Psychopharmacology**, v. 19, p. 338-397, 1971.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae. **Floresta Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MARTIN, P.; MASSOL, J.; COLIN, J. N.; LACOMBLEZ, L.; PUECH, A. J. Antidepressant profile of bupropion and three metabolites in mice. **Pharmacopsychiatry**, v. 23, p. 187-194, 1990.

MARTINS, E. R.; SANTOS, R. H. S. Plantas medicinais: uma alternativa terapêutica de baixo custo. **Inf. Téc. UFV**, v. 73, p. 1-26, 1995.

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.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária-UFC, 2000.

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. Ethnopharmacol.**, v. 60, p. 111-116, 1998.

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, p. 19-21, 2001.

MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LEITE, C. P.; ARAÚJO, F. L. O.; LIMA, V. T. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-benzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biol. Pharmaceutical Bull.**, v. 29, n. 3, p. 451-454, 2006.

MENON, M. K.; GORDON, L. I.; KODAMA, C. K.; FITTEN, J. Influence of D₁ receptor system on the D₂ receptor-mediated hypothermic response in mice. **Life Sci.**, v. 43, p. 871-881, 1988.

MEYER, M. E.; VAN HARTESVELDT, C.; POTTER, T. J. Locomotor activity following intra-accumbens microinjection of dopamine D1 agonist SK&F 38393 in rats, **Synapse**, v. 13, p. 310-314, 1993.

MEYER, M. E.; COTTRELL, G. A.; VAN HARTESVELDT, C.; POTTER, T. J. Effects of dopamine D1 antagonists SCH23390 and SKF83566 on locomotor activities in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 44, p. 429-432, 1993.

MOODY, T. W.; MERALI, Z.; CRAWLEY, J. N. The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior. **Ann. NY. Acad. Sci.**, v. 90, p. 281-290, 1993.

MONTGOMERY, K. C. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 48, p. 254-260, 1958.

MORS, W. B. Plantas medicinais. **Ciênc. Hoje**, v. 1, n. 3, p. 51-54, 1992.

NEUMEISTER, A. Tryptophan depletion, serotonin, and depression: where do we stand? **Psychopharmacol. Bull.**, v. 37, p. 99-115, 2003.

N'GOUEMO, P.; NQUEMBY-BINA, C.; BALDY-MOULINIER, M. Some neuropharmacological effects of an ethanol extract of *Maprounea africana* in rodents. **J. Ethnopharmacol.**, v. 43, p. 161-166, 1994.

NUTT, D. J. The role of dopamine and norepinephrine in depression and antidepressant treatment. **J. Clin. Psychiatry**, v. 67, p. 3-8, 2006.

OHL, F. Testing for anxiety. **Clin. Neurosci. Res.**, v. 3, p. 233-238, 2003.

OLSON, R. GABA. In: DAVIS, K.; CHARNEY, D.; COYLE, J.; NEMEROFF, C. (Ed.). **Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress**. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2002. cap. 12.

ONAIWI, E. S.; MAQUIRI, P. A.; TSAI, N. F.; 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 calximum* L. extract on the central nervous system in mice. **Phytomedicine**, v. 3, p. 139-146, 1996.

PAPY, J. J.; NAQUET, R. Cerebral blood flow and seizures induced by Metrazol ® in the baboon. **Clin. Dev. Med.**, v. 39, p. 283-296, 1971.

PARK, H. G.; YOON, S. Y.; CHOI, J. Y.; LEE, G. S.; CHOI, J. H.; SHIN, C. Y.; SON, K. H.; LEE, Y. S.; Kim, W. K.; RYU, J. H.; KO, K. H.; CHEONG, J. H. Anticonvulsant effect of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 574, p. 112-119, 2007.

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.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 24, p. 525-529, 1986.

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.; ANTON, N. B.; JALFRE, M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 229, p. 327-336, 1987.

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.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JAFRE, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 47, p. 379-391, 1978.

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. Pharmacol.**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMEDE, P.; CHAUOFF, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav. Brain Res.*, v. 85, p. 57-69, 1997.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

REDROBE, J. P.; BOURIN, M.; COLOMBEL, M. C.; BAKER, G. B. Psychopharmacological profile of the selective serotonin reuptake inhibitor, paroxetine: implication of noradrenergic and serotonergic mechanisms. **J. Psychopharmacol.**, v. 12, p. 179-186, 1998.

REX, A.; STEPHENS, D. N.; FINK, H. "Anxiolytic" action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 53, p. 1005-1012, 1996.

RICHMOND, R.; ZWAR, N. Review of bupropion for smoking cessation. **Drug Alcohol Rev.**, v. 22, p. 203-220, 2003.

RILEY, H.; SPINKS, A. Biological assessment of tranquilizers. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 10, p. 657-671, 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.

ROHWER, J. G.. Prodrômus einer monographie der Gattung *Ocotea* Aublet (Lauraceae), sensu lato. **Mitt. Allg. Bot. Hamburg**, v. 20, p. 3-278, 1986.

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. 212-216, 1991.

ROSSETTI, Z. L.; LAI, M.; HMAIDAN, Y.; GESSA, G. L. Depletion of mesolimbic dopamine during behavioral despair: partial reversal by chronic imipramine. **Eur. J. Pharmacol.** v. 242, p. 313-315, 1993.

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**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ UFSC, 2003. cap. 15, p. 371-400.

SEDELIS, M.; SCHWARTING, R. K.; HUSTON, J. P. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Behav. Brain Res.**, v. 125, p. 109-125, 2001.

SEIXAS, S. R. S. **Preparação de derivados benzoiltiramínicos e sua atividade cardiopressora**. 103p. 1996. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1996.

SERRA, G.; COLLU, M.; D'AQUILA, P. S.; GESSA, G. L. Role of the mesolimbic dopamine system in the mechanism of action of antidepressants. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 71, supl. 1, p. 72-85, 1992.

SHADER, R. I.; GREENBLATT, D. J. Use of benzodiazepines in anxiety disorders. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, p. 1398-1405, 1993.

SHERRILL, J. T.; ANDERSON, B.; FRANK, E.; REYNOLDS, C. F.; TU, X. M.; PATTERSON, D.; RITENOUR, A.; KUPFER, D. J. Is life stress more likely to provoke depressive disorders in women than in man? **Depress Anxiety**, v. 6, p. 395-405, 1997.

SINGH, S. K.; PRASAD, A. K.; OLSEN, C. E.; JHA, A.; JAIN, S. C.; PARMAN, V. S.; WENGEL, J. Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1355-1360, 1996.

SOARES, A. C. Se bem não fizer, mal também não fará. **Rev. Eletrônica Ciências**, n. 12, 2002. Disponível em: <http://www.cdcc.sc.usp/ciencia/artigos/art12/medicamento.html>>. Acesso em: 6 set 2008.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol.**, v. 51, p. 1-15, 1996.

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. F.; VIANA, G. S. B. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacol., Biochem. Behav.**, v. 78, p. 27-33, 2004.

SOUSA, F. C. F.; MONTEIRO, A. P.; MELO, C. T. V.; OLIVEIRA, G. R.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Antianxiety effects of Riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Phytother. Res.**, v. 19, p. 1005-1008, 2005.

SPIELEWOY, C.; ROUBERT, C.; HAMON, M.; NOSTEN-BERTRAND, M.; BETANCUR, C.; GIROS, B. Behavioral disturbances associated with hyperdopaminergia in dopamine-transporter knockout mice. **Behav. Pharmacol.**, v. 11, p. 279-290, 2000.

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, n. 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.

STOUT, J. C.; WEISS, J. M. An animal model for measuring behavioral responses to anxiogenic and ansiolytic manipulation. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 47, p. 459-465, 1994.

SUZUKI, T.; INAYAMA, M.; MISAWA, M. The effect of diazepam on exploratory behavior and its strain differences in inbred rats. **Jpn. J. Psychopharmacol.**, v. 10, p. 307-314, 1990.

SWANSON, C. J.; HEATH, S.; STRATFORD, T. R.; KELLEY, A. E. Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 58, p. 933-945, 1997.

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 ansiolytic state in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 350, p. 21-29, 1998.

TAYLOR, C.; FRICKER, A. D.; DEVI, L. A.; GOMES, I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. **Cell Signal**, v. 17, p. 549-57, 2005.

THOMAS, G.; CASTELO-BRANCO, U. J. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BACHELET, M.; VARGAFTIG, B. B. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea pig alveolar leucocytes. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, p. 103-107, 1994.

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

TRABER, J.; SPENCER, D. J.; GLASER, T.; GISPEN, W. H. (1988) apud SERAFIM, A. P.; FELÍCIO, L. F. Dopaminergic modulation of grooming behavior in virgin and pregnant rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 1465-1470, 2001.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 9, p. 203-222, 1985.

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

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Are glutamatergic pathways involved in the pathophysiology of anxiety? In: BRILEY, M.; FILE, S. (Eds.). **New concepts in anxiety**. London: MacMillan, 1991. p. 382-394.

TURNER, R. J.; LLOYD, D. A. The stress process and the social distribution of depression. **J. Health Soc. Behav.**, v. 40, p. 437-444, 1999.

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.

VAUGEOIS, J. M.; POUHE, D.; ZUCCARO, F.; COSTENTIN, J. Indirect dopamine agonists effects on despair test – dissociation from hyperactivity. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 54, n. 1, p. 235-239, 1996.

VICENTINI, A.; WERFF, H. V. D.; NICOLAU, S. Lauraceae. In: RIBEIRO, J.E.L.S. et al. (Eds.). **Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA – DFID, 1999. v. 1, p. 150-179.

VIEIRA, C. M.; VAZ, A. M. S. F.; LIMA, H. C. **Espécies de interesse conservacionista na Reserva ecológica de Macaé de Cima**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1997. p. 297 – 306.

WALKER, L. G. The measurement of anxiety. **Postgrad. Med. J.**, v. 66, n. 2, p. S11-S17, 1990.

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. 185-191, 1985.

WERFF, H. V. D.; RICHTER, H. G. Toward an improved classification of Lauraceae. **Ann. Missouri Bot. Garden**, v. 83, p. 419-432, 1996.

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

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

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, p. 1-16, 1984.

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.

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.

YILDIZ, F.; ULAK, G.; ERDEN, B. F.; GACAR, N. Anxiolytic-like effects of 7-nitroindazole in the rat plus-maze test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 65, p. 199-202, 2000.

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

ANEXO

Evaluation of Effects of *N*-(2-Hydroxybenzoyl) Tyramine (Riparin II) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauracea) in Anxiety Models in Mice

Francisca Cléa Florenço de SOUSA,^{*,a} Caroline Porto LEITE,^a Carla Thiciane Vasconcelos de MELO,^a Fernando Luiz Oliveira de ARAÚJO,^a Stanley Juan Chavez GUTIERREZ,^b José Maria BARBOSA-FILHO,^b Marta Maria de França FONTELES,^a Silvânia Maria Mendes de VASCONCELOS,^a and Glauce Socorro de BARROS VIANA^a

^a Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará; Rua Cel. Nunes de Melo 1127, 60430-270, Fortaleza; and ^b Laboratory of Pharmaceutics Technology, Federal University of Paraíba; João Pessoa, Brazil. Received October 5, 2006; accepted March 30, 2007

In order to evaluate the effects produced by *N*-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin II) isolated from the unripe fruit of *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauracea) on the central nervous system, different behavioral tests were performed. Riparin II (rip II) was administered orally (*p.o.*) and intraperitoneally (*i.p.*) in male mice, at doses of 25, 50 and 75 mg/kg, and tested on elevated plus maze (EPM), open field, rota rod and hole board tests. The results revealed that rip II caused considered increase of the number of head dips in hole board test and increased the number of entries and the time of permanence in the open arms in plus maze test in both routes. No significant effect was evidenced on rota rod and open field test, except an increase observed in the number of rearing. These results showed that riparin II presents anxiolytic-like effects in the plus maze and hole board tests which are not influenced by the locomotor activity as detected in the open field test.

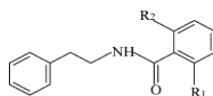
Key words *Aniba riparia*; riparin II; antianxiety

Aniba riparia (NEES) MEZ, from the Lauraceae family, is popularly named "louro" in Brazil. It belongs to a genus mainly found in Central Amazonia and Guiana comprising approximately 40 species of lowland shrubs and trees.^{1,2)}

From the green fruit of *Aniba riparia*, collected from the Amazonas state of Brazil, were isolated three substances with broad spectrum antimicrobial activity: methyl ethers of *N*-benzoyl tyramine (riparin I), *N*-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin II) and *N*-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine (riparin III)¹⁾ which were later synthesized.³⁾

It was previously reported that (*O*-methyl)-*N*-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine (riparin III) has potent smooth muscle relaxant activity^{4,5)} and this spasmolytic effect was possibly related to a reduction of intracellular Ca²⁺ concentration.⁶⁾

Recently, it was reported by us that riparin I⁷⁾ and III^{8,9)} presented antianxiety effects in mice treated with the doses of 25 and 50 mg/kg. As far as we know, there are no studies in the literature on the central actions of riparin II. However, this substance is an *N*-(2-hydroxybenzoyl) tyramine, and previous data showed that the spectrum of tyramine actions are similar to those of norepinephrine. In fact, some reports related that tyramine-rich foods when ingested by individuals taking antidepressant drugs, such as monoamino oxidase inhibitors, might result in a prolonged increase in blood pressure.¹⁰⁾



Riparin I (R1=R2=H)
Riparin II (R1=OH, R2=H)
Riparin III (R1=R2=OH)

Fig. 1. Structure of Riparin (I, II, III)

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: clea@ufc.br

Hereby, these findings led us to investigate the behavioral effects of riparin II on animals models of locomotion, anxiolytic and myorelaxant activities.

MATERIALS AND METHODS

Animals Male Swiss mice weighing 25–30 g were used in these experiments. The animals were housed in plastic cages, 30 to cage, under a 12 h light/dark cycle (light on at 7:00 a.m.) at constant temperature of 23±1 °C with free access to food and water, except during the experiments. Animals were treated in accordance to the current law and the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Drugs Riparin II was emulsified with 3% Tween 80 (Sigma-U.S.A.) and dissolved in distilled water. Animals were treated with the compound in doses of 25, 50 and 75 mg/kg, once, 30 or 60 min before the experiments when administered by intraperitoneal or oral routes, respectively. Controls received vehicle at the same volume (10 ml/kg) and the same route as the treated groups. Diazepam (DZP), União Química Brazil, (1, 2 mg/kg) was used as standard.

Experimental Protocol The animals were tested during the light period and were observed in a closed room at constant temperature (23±1 °C) and poorly illuminated with a 15-V red light. One hour after the treatment, the open field and rota rod tests were performed with the same animals in the manner described below: Firstly, the animal was placed in the open field area for 5 min. Immediately after the open field test, the animal was removed to the rota rod where it was evaluated for 1 min. All the other tests were performed in different days with other groups of animals.

Elevated Plus Maze Test (EPM) The EPM for mice¹¹⁾ consisted of two opposed open arms (30×5 cm) and two closed arms (30×5×25 cm) also in opposed position. The open and closed arms were connected by a central platform (5×5 cm). The lateral walls of the closed arms were made of

transparent acrylic and the floor was made of black acrylic. The maze was 45 cm above the floor. Thirty minutes after intraperitoneal treatment or 60 min after oral treatment, the animal was placed at the center of the plus maze facing one of the enclosed arms, and observed for 5 min, according to the following parameters: number of entries into the open and closed arms, and time of permanence in each of them. The ratios "number of entries into open arms/number of entries into all (*i.e.*, open and closed) arms" and "time spent in the open arms/time spent in all arms" were calculated and multiplied by 100 to yield the percentages of entries into open arms and the percentage of time of permanence in the open arms. Anxiolytic compounds reduce the animal's aversion to the open arms and promote the exploration thereof. The animals were divided into four groups with 8–17 per group.

Open Field Test The open field area was made of acrylic (transparent walls and black floor, 30×30×15 cm) divided into nine squares of equal area. The open field was used to evaluate the exploratory activity of the animal.¹²⁾ The observed parameters were: number of squares crossed with the four paws (locomotor activity) and numbers of grooming (number of times the animal makes washing movements over the head) and rearing (number of times the animal stood completely erect on its hind legs).

Rota Rod For the rota rod test, the animal was placed with the four paws on a 2.5 cm diameter bar, 25 cm above the floor, which was rotating at 12 rpm. For each animal, the number of falls (up to three falls) and the time of permanence on the bar for 1 min were registered.¹³⁾

Hole Board Test The hole-board test for exploratory behavior of mice was used as described previously by Clark *et al.* (1971).¹⁴⁾ The apparatus used was an Ugo Basile of 60 cm×30 cm with 16 evenly spaced holes with built infra red sensors. For each animal, the number of head dips into the holes was counted for each animal for 5 min.

Statistical Analysis All results are presented as mean±S.E.M. ANOVA followed by Newman–Keuls as the *post hoc* test was used. Results were considered significant at $p<0.05$.

RESULTS

Figures 2 and 3 show the effects of riparin II from *Aniba riparia* in EPM test at both routes. The results showed that the oral treatment of riparin II (Fig. 2) increased the parameters number of entries into the open arms, percentages of entries into open arms and time of permanence in open arms only at the dose of 75 mg/kg [number of entries into the open arms: 9.33 ± 0.84 (9) $p<0.01$; percentages of entries into open arms: 53.0 ± 2.75 (9) $p<0.05$; time of permanence in open arms: 116.1 ± 10.57 (10) $p<0.05$] compared to respective controls [number of entries into the open arms: 5.77 ± 0.48 (13); percentages of entries into open arms: 41.24 ± 2.05 (12); time of permanence in open arms: 76.08 ± 7.69 (12)]. Figure 3 shows that when riparin II was administered intraperitoneally, it presented a statistical increase in all parameters analyzed at the dose of 25 mg/kg [number of entries into the open arms: 7.07 ± 0.69 (15) $p<0.05$; percentages of entries into open arms: 47.81 ± 1.81 (13) $p<0.05$; time of permanence in open arms: 133.7 ± 8.65 (10) $p<0.05$; per-

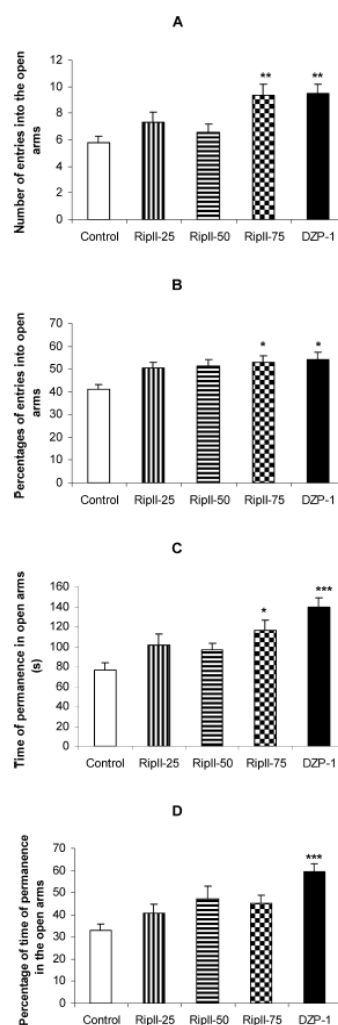


Fig. 2. EPM Test of Groups of Mice Which Received Vehicle, Riparin II (25, 50, 75 mg/kg), *p.o.*, and DZP (1 mg/kg)

(A) number of entries in the open arms; (B) percentage of entries in the open arms; (C) time of permanence in the open arms. (D) percentage of time of permanence in the open arms. The results are presented as mean±S.E.M. Significant difference compared with control (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$). ANOVA and Newman–Keuls as the *post hoc* test.

centage of time of permanence in the open arms: 53.06 ± 2.43 (8) $p<0.05$] as compared to controls [number of entries into the open arms: 4.62 ± 0.4 (13); percentages of entries into open arms: 38.75 ± 2.58 (15); time of permanence in open arms: 91.92 ± 7.79 (13); percentage of time of permanence in the open arms: 36.16 ± 3.10 (13)]. Similarly, diazepam (1 mg/kg, *i.p.*), used as standard, increased all parameters observed [number of entries into the open arms: 9.5 ± 0.70 (14) $p<0.01$; percentages of entries into open arms: 54.18 ± 3.03 (14) $p<0.05$; time of permanence in open arms: 146.5 ± 10.76 (16) $p<0.001$; percentage of time of permanence in the open arms: 59.28 ± 3.80 (16) $p<0.001$] comparing to *i.p.* and *per os* controls.

In the open field test (Table 1), the groups treated orally

25 mg/kg and intraperitoneally 75 mg/kg with riparin II decreased the number of rearing as compared to controls. No alteration was observed in the number of crossing and

grooming with riparin II at the doses and routes used in the present work. Diazepam (2 mg/kg, i.p.) decreased all the parameters as compared to controls.

In the rota rod test (Table 2), there were no difference after the treatment with riparin II, at the doses and routes used, unlikely diazepam (2 mg/kg, i.p.) when compared with respective controls.

Figure 4 shows the results of the *per os* administration of rip II in hole board test. In this test, rip II increased, with both doses, the number of head dips [ripII-25: 48.71±3.82 (7) *p*<0.01; ripII-50: 52.00±4.0 (8) *p*<0.001] as compared to control [31.62±3.08 (8)]. Riparin II also increased this parameter after i.p. treatment (Fig. 5) at both doses [ripII-25: 31.4±0.9 (12) *p*<0.001; ripII-50: 31.5±1.4 (13) *p*<0.001] comparing to control [24.3±1.0 (13)]. As the same as riparin II, diazepam (1 mg/kg; i.p.) increased the number of head dips [47.16±1.35 (6) *p*<0.05].

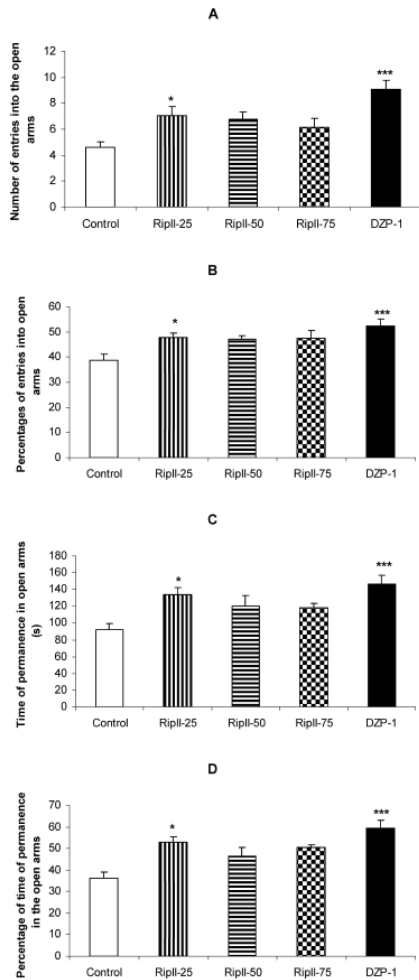


Fig. 3. EPM Test of Groups of Mice Which Received Vehicle, Riparin II (25, 50, 75 mg/kg), i.p., and DZP (1 mg/kg)

(A) number of entries in the open arms; (B) percentage of entries in the open arms; (C) time of permanence in the open arms. (D) percentage of time of permanence in the open arms. The results are presented as mean±S.E.M. Significant difference compared with control (**p*<0.05; ****p*<0.001). ANOVA and Newman-Keuls as the *post hoc* test.

Table 2. Effects of Riparin II and Diazepam in the Rota Rod Test

Groups	Number of falls ^{a)}	Time of permanence ^{b)} (s)
Control <i>per os</i>	0.76±0.20 (13)	59.0±0.28 (13)
RipII-25 mg/kg <i>per os</i>	0.77±0.32 (13)	55.31±2.98 (13)
RipII-50 mg/kg <i>per os</i>	1.08±0.31 (13)	57.31±1.22 (13)
RipII-75 mg/kg <i>per os</i>	0.62±0.32 (8)	58.75±0.65 (8)
Control i.p.	0.58±0.19 (12)	59.25±0.25 (12)
RipII-25 mg/kg i.p.	0.67±0.26 (12)	57.42±1.96 (12)
RipII-50 mg/kg i.p.	0.92±0.19 (12)	58.67±0.33 (12)
RipII-75 mg/kg i.p.	1.0±0.38 (8)	57.50±1.18 (8)
DZP-2 mg/kg i.p.	2.5±0.27 (8)**	35.25±6.69 (8)***

Each value represents the mean±S.E.M. of the number of animals in parenthesis. ***p*<0.01, ****p*<0.001 as compared to both control groups. a,b) One way ANOVA followed by Newman-Keuls as the *post hoc* test.

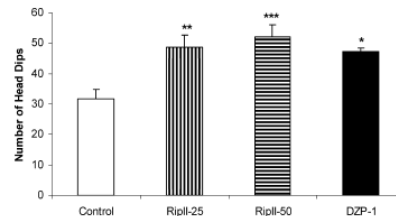


Fig. 4. Hole Board Test of Groups of Mice Which Received, Riparin II (25, 50 mg/kg), *p.o.*, and DZP (1 mg/kg)

The figure shows the number of head dips. The results are presented as mean±S.E.M. Significant difference compared with control (**p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001). ANOVA and Newman-Keuls as the *post hoc* test.

Table 1. Effects of Riparin II and Diazepam in the Open Field Test

Groups	Number of squares crossed ^{a)}	Rearing ^{b)}	Grooming ^{c)}
Control <i>per os</i>	61.17±5.06 (12)	10.42±1.0 (12)	4.16±0.61 (12)
RipII-25 mg/kg <i>per os</i>	58.0±5.16 (12)	6.17±1.06 (12)*	4.67±0.51 (12)
RipII-50 mg/kg <i>per os</i>	57.25±3.31 (12)	6.92±1.18 (12)	4.08±0.70 (12)
RipII-75 mg/kg <i>per os</i>	74.0±4.42 (9)	9.33±1.14 (9)	5.33±1.07 (9)
Control i.p.	45.83±1.98 (12)	8.5±0.97 (12)	3.08±0.45 (12)
RipII-25 mg/kg i.p.	49.67±2.41 (12)	6.83±0.80 (12)	2.17±0.36 (12)
RipII-50 mg/kg i.p.	47.83±3.30 (12)	6.27±0.79 (11)	1.92±0.36 (12)
RipII-75 mg/kg i.p.	43.43±3.94 (7)	2.0±0.52 (6)***	2.57±0.65 (7)
DZP-2 mg/kg i.p.	24.28±7.61 (7) [#]	0 (8) ^{###}	1.12±0.29 (8) [#]

Each value represents the mean±S.E.M. of the number of animals in parenthesis. ***p*<0.01, ****p*<0.001 as compared to respective controls. #*p*<0.05, ##*p*<0.01, ###*p*<0.001 as compared to both control groups. a-c) One way ANOVA followed by Newman-Keuls as the *post hoc* test.

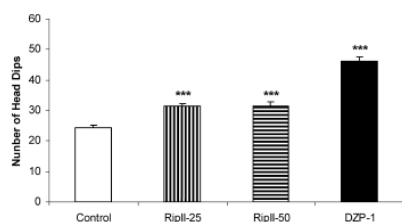


Fig. 5. Hole Board Test of Groups of Mice Which Received, Riparin II (25, 50 mg/kg), i.p., and DZP (1 mg/kg)

The figure shows the number of head dips. The results are presented as mean \pm S.E.M. Significant difference compared with control (***) $p < 0.001$. ANOVA and Newman-Keuls as the *post hoc* test.

DISCUSSION

In this work, it was studied the effects in anxiety of riparin II from *A. riparia* in several behavioral animal models as open field, rota rod, EPM, and hole board tests. These tests are classical models for screening central nervous system actions providing information about psychomotor performance, myorelaxant activity and anxiety.

Behavior in rodents is determined by the conflict between the drive to explore the unknown area/object and the motivation to avoid potential danger. Exploration behavior in rodents summarizes a broad spectrum of behavioral patterns such as risk assessment behaviors, walking, rearing, climbing, sniffing, and manipulating objects.¹⁵ Exploration is gradually inhibited by anxiety, thereby representing an indirect measurement of anxiety.^{16,17}

For the EPM test, it has been demonstrated that the preference shown for the closed arms reflects an aversion toward the open arms, caused by fear or anxiety induced by the open space.¹⁸ The EPM test is the most popular test to search for new anxiolytic agents.^{17,19} Thus, the present results show that the riparin II is active in this test of fear or anxiety since riparin II at 25 mg/kg (i.p.) and 75 mg/kg, (*p.o.*) had anti-anxiety effects, as indicated by increase of the time spent and the number of entries in the open arms. However, even if the doses of 50 mg/kg and 75 mg/kg, i.p., have not presented statistically significant anxiolytic-effect, there was a tendency to have. This fact may not have been detected probably due to the number of animals used, such as the number of animals used in the group of 25 mg/kg was higher than the number used in other groups.

Besides, the anxiolytic-like effect of riparin II was confirmed in the hole board test which measures exploratory behavior.²⁰ Anxiolytics have been shown to increase the number of head dips.²¹ The animals treated with riparin II at both doses (25 and 50 mg/kg, *p.o.* and i.p.) showed an increase in the number of head dips as the same as diazepam (1 mg/kg), indicating an anti-anxiety activity.

The anxiolytic-like effect of riparin II shown in the plus maze and hole board tests seems to be similar to the riparin III anxiolytic effects. This can be seen comparing riparin II and riparin III. For example, the last substance, when administered intraperitoneally, only presented anxiolytic effect with the higher dose on the plus maze test, but presented anxiolytic effect on the hole board test with both routes and doses used (Sousa *et al.*, 2004), similarly to riparin II. Besides, the potencies of riparin I, II and III as anxiolytic agents seem to

be similar once there are no statistical differences among them. Moreover, none of the three substances seem to present dose-dependency effect, as can be seen in previous works with riparin I (Sousa *et al.*, 2005) and with riparin III (Sousa *et al.*, 2004; Melo *et al.*, 2006). Similarly, riparin II did not show dose-dependency effect among the treated groups, suggesting that these three substances present similar effects. This can be explained by the similarities between their chemical structures (Fig. 1).

As riparin II acted similar to DZP in the EPM and hole board tests, it is possible to speculate that its anxiolytic-like effects observed in these tests could be probably related to the potentiation of GABA's inhibitory actions. However, we can not discard that other mechanisms can be involved and further studies need to be performed.

The open-field test is based on rodents' natural tendency to stay near the perimeters of a novel environment (*i.e.*, thigmotaxis), which may serve to protect the animal from avian predators.²² Anxiolytic effects are indicated by increased entries and time spent in the open-field's central sector, in the absence of concomitant changes in general locomotor activity.²³ Previous works showed that drugs which alter locomotor activity may give false-positive/negative results in the plus maze. Therefore, in order to verify the relation between rip II anxiolytic effects with locomotor activity alteration, we used in our protocol the open field test, which also can be useful in detecting genetic or pharmacological effects on anxiety.²³ The open field test, a classical animal model, is used to evaluate autonomic effects of drugs and general activity of animals.²⁴ Our findings show that the animals treated with riparin II (25, 50, 75 mg/kg) did not alter the locomotor activity, different from diazepam (2 mg/kg) which decreased this parameter showing a sedative effect. In addition, the anxiolytic-like effect of riparin II seems not to be associated with any motor effects since it did not alter significantly the ambulatory behavior in the open field test. This indicates that increased motor activity were not involved in the action seen in both plus maze and hole board tests, and confirms the assumption that the anxiolytic-like effect of riparin II may be specific.

In the rota rod test, different from diazepam (2 mg/kg), riparin II had no effect on the motor co-ordination suggesting that the anxiolytic-like effect of the substance might not be exerted through peripheral neuromuscular blockade, but rather, elicited centrally.^{25,26}

In summary, the present data show that riparin II presents anxiolytic-like effects in the EPM and hole board tests, similarly to the other compounds isolated from *Aniba riparia*, riparin I⁷ and III.^{8,9} Moreover, this effect of riparin II was devoid of sedative or myorelaxant effect as assessed by the open field and rota rod tests respectively.

REFERENCES

- 1) Barbosa-Filho J. M., Yoshida M., Gottlieb O. R., Barbosa R. C. S. B. C., Giesbrecht A. M., Young C. M., *Phytochemistry*, **26**, 2615–2617 (1987).
- 2) Castelo-Branco U. V., Castelo-Branco U. J. V., Thomas G., Araújo C. C., Barbosa-Filho J. M., *Acta Farm. Bonaerense*, **19**, 197–202 (2000).
- 3) Barbosa-Filho J. M., Yoshida M., Gottlieb O. R., *Rev. Latinoam. Quím.*, **21**, 5–7 (1990).
- 4) Castelo-Branco U. J. V., Thomas G., Araújo C. C., Barbosa-Filho J.

- M., Resúme VI Reunião Anual de Federação de Sociedade Experimental, Abstr., 302, 6, 69 (1991).
- 5) Castelo-Branco U. J. V., "Estudos Farmacológicos do Éter Metílico de *N*-(2,6-dihydroxibenzoil)-tiramine," MSc Thesis, ed. by Federal University of Paraíba, Brazil, 1992.
 - 6) Thomas G., Castelo-Branco U. J. V., Barbosa-Filho J. M., Bachelet M., Vargaftig B. B., *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 103—107 (1994).
 - 7) Sousa F. C. F., Monteiro A. P., Melo C. T. V., Oliveira G. R., Vasconcelos S. M. M., Fonteles M. M. F., Gutierrez S. J. C., Barbosa-Filho J. M., Viana G. S. B., *Phytother. Res.*, **19**, 1005—1008 (2005).
 - 8) 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., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **78**, 27—33 (2004).
 - 9) Melo C. T. V., Monteiro A. P., Leite C. P., Araújo F. L. O., Lima V. T. M., Barbosa-Filho J. M., Fonteles M. M. F., Vasconcelos S. M. M., Viana G. S. B., Sousa F. C. F., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 451—454 (2006).
 - 10) Potter W. Z., Hollister L. E., "Antidepressant Agents. In: Katzung, B.G. Basic and Clinical Pharmacology," ed. by Connecticut-EUA, Appleton & Lange, 1998.
 - 11) Lister R. G., *Psychopharmacology*, **92**, 180—185 (1987).
 - 12) Archer J., *Anim. Behav.*, **21**, 205—235 (1973).
 - 13) Dunham N. W., Miya T. S., *J. Am. Pharm. Assoc.*, **46**, 208—212 (1957).
 - 14) Clark G., Koster A. G., Person D. W., *Psychopharmacology*, **20**, 169—171 (1971).
 - 15) Barnett S. A., "The Rat: a Study in Behavior," ed. by University of Chicago Press, Chicago, 1975.
 - 16) Crawley L. N., Goodwin F. K., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **13**, 167—170 (1980).
 - 17) Pellow S., Chopin P., File S. E., Briley M., *J. Neurosci. Methods*, **14**, 149—167 (1985).
 - 18) Treid D., Menard J., Royan C., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **44**, 463—469 (1993).
 - 19) Rodgers R. J., Cao B. J., Dalvi A., Holmes A., *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **30**, 289—304 (1997).
 - 20) Crawley J. N., *Neurosci. Behav. Rev.*, **9**, 37—44 (1985).
 - 21) Takeda H., Tsuji M., Matsumiya T., *Eur. J. Pharmacol.*, **350**, 21—29 (1998).
 - 22) Barnett S. A., "The Rat: a Study in Behavior," ed. by Metheun, London, 1963.
 - 23) Treit D., Fundytus M., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **31**, 959—962 (1988).
 - 24) Novas M. L., Wolfman C., Medina J. H., De Robertis E., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **30**, 331—336 (1988).
 - 25) Perez G. R. M., Perez L. J. A., Garcia D. L. M., Sossa M. H., *J. Ethnopharmacol.*, **62**, 43—48 (1998).
 - 26) Amos S., Kolawole E., Akah P., Wambebe C., Gamaniel K., *Phytomedicine*, **8**, 356—361 (2001).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)