



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

VALDÉCIO SILVANO MONTEIRO

**EFEITO ANSIOLÍTICO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA
MARINHA VERMELHA *Gracilaria cornea* J. Agardh EM MODELOS
NEUROCOMPORTAMENTAIS EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA
2014

VALDÉCIO SILVANO MONTEIRO

**EFEITO ANSIOLÍTICO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA
MARINHA VERMELHA *Gracilaria cornea* J. Agardh EM MODELOS
NEUROCOMPORTAMENTAIS EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof^a. Dra. Norma Maria Barros Benevides.

Fortaleza
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- M774e Monteiro, Valdécio Silvano.
Efeito ansiolítico dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* J. Agardh em modelos neurocomportamentais em camundongos. / Valdécio Silvano Monteiro. – 2014.
71 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Bioquímica vegetal.
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.
Coorientação: Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos.
1. Sistema nervoso central. 2. Produtos naturais. 3. Alga marinha I. Título.

VALDÉCIO SILVANO MONTEIRO

**EFEITO ANSIOLÍTICO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA
MARINHA VERMELHA *Gracilaria cornea* J. Agardh EM MODELOS
NEUROCOMPORTAMENTAIS EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em 05/02/2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Norma Maria Barros Benevides (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof.^a Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof.^a Dra. Edna Maria Campelo Chaves
Universidade Estadual do Ceará -UECE

Aos meus pais, Valderi Xavier e Maria Anunciação
que sempre me incentivaram nos momentos mais
difíceis, e sempre acreditaram em mim.

As minhas irmãs, Valdenisia e Viviane, pelas
alegrias, paciência, compreensão e apoio durante
minha vida.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento primordial não poderia deixar de ser Àquele, que me permitiu sonhar de uma forma que alargasse meus horizontes. Sonhei, busquei e conquistei, mas antes o sonho foi plantado em mim, obrigado a Deus que semeou.

Em especial à minha querida mãezinha, que nos momentos de tristezas sempre estava do meu lado me consolando. Mãe, sei que muitas vezes a fiz sofrer, em muitos pedaços parti seu coração, e nem se quer ofereci-me para juntá-los. Mas hoje sei que sem você não teria conseguido. Só tenho a pedir desculpas e agradecer por todos os momentos que passamos juntos e peço que seja sempre esta pessoa maravilhosa que você é, porque dessa forma você é a pessoa que admiro, amo e respeito, pelo ontem, por hoje, pelo amanhã e para sempre. Te Amo.

À Prof.^a. Dra. Norma Maria Barros Benevides por quem tenho admiração e respeito, agradeço por ter deixado fazer parte do CarboLec onde fui sempre bem recebido por todos, Tici I, Tici II, Felipe, Ari, Will, Ricardo, Natássia, Ianna, Edfrank, Gerardo.

À Prof.^a. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos, por me receber no laboratório de Neurofarmacologia com imenso carinho. Por me incentivar a não desistir e acima de tudo confiando e acreditando em mim.

A minha amiga Renata Line, uma pessoa muito especial, que sempre dar conselhos e quer meu bem, só é um pouco estressadinha rrsrsrs, mais super legal.

Ao Neto Silva, pelo companheirismo, não somente nas horas das “farras”, mas também nos momentos difíceis.

Ao Walttenberg, apesar do pouco tempo de amizade, a gente percebe quem é de verdade.

A Cris, que vou ser sempre grato as suas ajudas e compreensão desde a graduação.

Ao Eduardo e a Sarah, meus amigos e companheiros do LNF, agradeço pela paciência e compreensão durante todo momento que estive no laboratório.

A todos que fazem parte do Laboratório de Neurofarmacologia, em especial a Edna Campelo, Edtih, Caren, Anália, Paulo Victor, Naiara, Germana. São como uma família, onde sempre obtive carinho, força e alegrias.

Ao Dr. Ercio Prado, por acreditar em mim, bem antes mesmo de entrar na universidade, sem seu apoio talvez não teria chegado aqui.

Aos amigos da Pesca que sempre foram como irmãos, Fred, Ricardo e Mário. Mesmo que a vida venha nos separar, jamais estaremos distantes para sermos esquecidos. No coração de cada um haverá saudade, recordação, companheirismo... Amizade é algo que não se reconstrói. Representa valor na vida de cada um. O tempo vai passar, mais eternas lembranças, temos certeza, irão ficar. Foi uma inesquecível jornada...

A técnica de laboratório Lena e Vilani, que são pessoas super legais e sempre dizem “isso não estava aí menino”.

À minha sobrinha linda, Vivian, que desde que chegou só me traz alegrias.

As minhas amigas, Michelle, Taty e Flor, que sempre estiveram nos bons e maus momentos.

Aos meus amigos, Teté (Sempre Tricolor), Manelzin Alves, Adriano Lima e Lio. Nunca me esquecerei de vocês.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e a CAPES pelo apoio financeiro.

Em maneira Geral, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, Obrigado!!!!

"Consulte não a seus medos mas a suas esperanças e sonhos. Pense não sobre suas frustrações, mas sobre seu potencial não usado. Preocupe-se não com o que você tentou e falhou, mas com aquilo que ainda é possível a você fazer."

(Papa João XXIII)

RESUMO

Efeito ansiolítico dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* J. Agardh em modelos neurocomportamentais em camundongos. Valdécio S. Monteiro. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós Graduação em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. Data da defesa: 05 de fevereiro de 2014. Prof^a Orientadora: Norma Maria Barros Benevides.

Atualmente há um aumento no interesse em desenvolver novos agentes terapêuticos a partir de moléculas biologicamente ativas presentes em fontes naturais, e os organismos marinhos tem-se destacado. Dentro deste contexto, as algas marinhas vermelhas têm recebido muita atenção por apresentar propriedades biológicas e farmacológicas ativas, como: antibacteriana, antioxidante, antiviral, antitumoral, antitrombótica, pró-trombótica, antinociceptiva, antiinflamatória, anticoagulante e anticancerígena. Pesquisas recentes mostram que muitos bioativos obtidos de origem marinha apresentam grande potencial para aplicações neurofarmacológicas. Assim o objetivo desta dissertação foi avaliar os efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais (PST) obtidos da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* no Sistema Nervoso Central, em modelos clássicos de animais (labirinto em cruz elevada (LCE), campo aberto, Placa perfurada, rota *rod*, nado forçado e suspensão de cauda) para *screening* de drogas com atividades relacionadas com as desordens neurocomportamentais, como ansiedade e depressão. Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss, machos, pesando de 25-32g, provenientes do biotério da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram tratados agudamente com PST nas doses de 0,1, 1 ou 10 mg/kg, via intraperitoneal. Trinta minutos após o tratamento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de locomoção (campo aberto e *rota rod*), ansiedade (LCE e placa perfurada) e depressão (nado forçado e suspensão de cauda). Os resultados mostraram que PST, na dose de 10 mg/kg, apresentou efeito ansiolítico nos modelos de LCE e placa perfurada, pois aumentou todos os parâmetros analisados no LCE, assim como o número de mergulhos nos orifícios da placa perfurada. Este efeito está provavelmente relacionado com o sistema gabaérgico, pois o flumazenil, antagonistas dos receptores GABA_A/Benzodiazepínicos, reverteu o efeito ansiolítico dos PST no LCE. No teste de campo aberto a dose de 10 mg/kg aumentou o número de quadrantes e o número de *rearing*, tendo uma ação excitatória, já no teste de rota *rod* não houve alteração, mostrando que a atividade motora dos animais não foi prejudicada. Na avaliação da atividade depressiva, os PST não alteraram o tempo de imobilidade nos testes de nado forçado e de suspensão de cauda, embora a dose de 10mg/kg apresentou uma diminuição no parâmetro analisado, porém não significativo. Conclusão: os polissacarídeos sulfatados totais extraídos da *Gracilaria cornea*, na dose de 10 mg/Kg, sugerem uma ação ansiolítica no Sistema Nervoso Central, possivelmente relacionado com o sistema gabaérgico, desprovida de ação antidepressivo.

Palavras-chaves: *Gracilaria cornea*; Sistema nervoso central; produto natural Ansiolítico; Antidepressivo.

ABSTRACT

Anxiolytic effect of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea* J. Agardh in neurobehavioral models in mice. Valdécio S. Monteiro. Dissertation of Máster presented to the Graduate Program in Biochemistry. Department of Biochemistry and Molecular Biology. Federal University of Ceará. Defense date: February 05th 2014. Prof^a Orientator: Dr^a Norma Maria Barros Benevides.

Currently there is an increased interest in developing new therapeutic agents from biologically active molecules present in natural sources from marine organisms has been posted. Within this context, red marine algae have received much attention for presenting active biological and pharmacological properties such as antibacterial, antioxidant, antiviral, antitumor, antithrombotic, pro-thrombotic, antinociceptive, anti-inflammatory, anticancer and anticoagulant. Recent surveys show that many bioactive obtained from marine sources have great potential for neuropharmacological applications. Thus the aim of this thesis was to evaluate the effects of sulfated polysaccharides total (PST) obtained from the red seaweed *Gracilaria cornea* in the Central Nervous System in classic animal models elevated plus maze (EPM), open field, hole board, rota rod, forced swim and tail suspension for the screening of drugs with activities related to neurobehavioral disorders such as anxiety and depression. For the experiments Swiss male mice were used, weighing 25-32g, from the vivarium of the Federal University of Ceará. The animals were treated acutely with PST at doses of 0.1, 1 or 10 mg/kg intraperitoneally. Thirty minutes after treatment, the animals were subjected to behavioral tests of locomotion (open field and rota rod), anxiety (LCE and hole board) and depression (forced swim and tail suspension). The results showed that PST, at a dose of 10 mg/kg, showed anxiolytic effects in models of EPM and hole board, it increased all parameters analyzed in the EPM, as well as the number of dives in the holes of the perforated plate. This effect is probably related to the GABAergic system because flumazenil, antagonists of GABA/Benzodiazepine receptor, reversed the anxiolytic effects of PST in the EPM. In the open field test dose of 10 mg/kg increased the number of quadrants and the number of rearing, try one exitatória action already in the route test rod did not change, showing that the motor activity of the animals was not affected. In the assessment of depressive activity, the PST did not alter the immobility time in the forced swim and tail suspension tests, although the dose of 10mg/kg showed a decrease in the parameter analyzed nonsignificant. Conclusion: total sulfated extracted from *Gracilaria cornea*, at a dose of 10 mg/kg, polysaccharides suggest an anxiolytic action in the central nervous system, possibly associated with the GABAergic system, devoid of antidepressant action.

Keywords: *Gracilaria cornea*; Central nervous system; Natural product; Anxiolytic; Antidepressant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1.	Unidade repetidas presentes nas galactanas de algas vermelhas.....	20
FIGURA 2.	Estrutura básica repetitiva de carragenanas, com unidades D- alternantes.....	20
FIGURA 3.	Estrutura básica repetitiva de agaranas, com unidades D- e L- alternante.....	21
FIGURA 4.	Síntese e metabolismo do GABA.....	26
FIGURA 5.	Receptor GABA _A	27
FIGURA 6.	Alga marinha vermelha <i>Gracilaria cornea</i> e sua classificação taxológica.....	32
FIGURA 7.	Fluxograma de extração de polissacarídeos totais (PST).....	34
FIGURA 8.	Efeito dos PST sobre o número de mergulhos (<i>head dips</i>) no teste da placa perfurada	42
FIGURA 9.	Efeito dos PST, Diazepam e Flumazenil sobre o número de entradas no braço aberto (NEBA) no teste de LCE em camundongos.....	44
FIGURA 10.	Efeito dos PST Diazepam e Flumazenil sobre a percentagem de entradas no braço aberto (PEBA) no teste de LCE em camundongos.....	45
FIGURA 11.	Efeito dos PST, Diazepam e Flumazenil sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste de LCE em camundongos.....	46
FIGURA 12.	Efeito dos PST, Diazepam e Flumazenil sobre a percentagem no tempo de permanencia nos braços abertos (PTBA) no teste de LCE em camundongos.....	47
FIGURA 13.	Efeito dos PST e Imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste da suspensão de cauda em camundongos.....	48
FIGURA 14.	Efeito dos PST e Imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste de nado forçado em camundongos.....	49

LISTA DE TABELA

1. Efeito do PST sobre a atividade locomotora (*ALE*), *grooming* e *rearing* no teste de campo aberto em camundongos..... 42
2. Efeito dos PST e diazepam sobre o número de quedas e tempo de permanência na barra no teste de *rota rod* em camundongos..... 43

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

A.L.E.	Atividade Locomotora Espontânea
ANOVA	Análise de variância
CPC	Cloreto de Cetil Piridina
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DZP	Diazepam
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
E.P.M.	Erro Padrão Médio
FLU	Flumazenil
GABA	Ácido γ -aminoburítico
GAD	Glutamato descarboxilase
IMAO	Inibidor da Monoamino Oxidase
IMI	Imipramina
i.p.	Intraperitoneal
IL	Interleucina
LCE	Labirinto em cruz elevada
mg	Miligrama
mL	Milimitros
NEBA	Número de entradas nos braços abertos
PEBA	Porcentagem de entradas nos braços abertos
PTBA	Tempo de permanência nos braços abertos
PGE2	Prostaglandinas
PSs	Polissacarídeos sulfatados
PST	Polissacarídeos sulfatados totais
NO	Óxido nítrico
s	Segundo
SNC	Sistema Nervoso Central
TCA	Tricíclicos
TNF	Fator de necrose tumoral
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Considerações gerais.....	16
1.2	Algas.....	17
1.3	Gênero <i>Gracilaria</i>.....	18
1.4	Polissacarídeos sulfatados.....	19
1.4.1	Galactanas sulfatadas obtidas de algas vermelhas.....	19
1.5	Polissacarídeos sulfatos de algas marinhas e suas atividades biológicas.....	21
1.6	Sistema Nervoso Central e sua importância funcional.....	23
1.7	Desordens neurocomportamentais.....	24
1.7.1	Ansiedade.....	24
1.7.1.1	Sistema gabaérgico.....	25
1.7.2	Depressão.....	27
1.7.2.1	Sistema dopamigérgico.....	28
1.8	Modelos de estudo de desordens neurocomportamentais para análise da depressão e ansiedade.....	29
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	Objetivo Geral.....	31
2.2	Objetivos Específicos.....	31
3	MATERIAS E METÓDOS.....	32
3.1	Algas marinhas.....	32
3.2	Drogas e Reagentes.....	33
3.3	Extração dos Polissacarídeos sulfatados totais.....	33
3.4	Animais.....	35
3.4.1	Tratamento dos grupos experimentais.....	35
3.4.2	Protocolo experimental.....	35
3.5	Modelos Experimentais da Análise da Atividade Motora em camundongos.....	36
3.5.1	Teste do Campo Aberto.....	36
3.5.2	Teste do Rota <i>rod</i>	36

3.6	Modelos Experimentais de Análise da Ansiedade em Camundongos.....	37
3.6.1	Teste da Placa Perfurada.....	37
3.6.2	Teste da cruz elevada (LCE).....	37
3.7	Modelos Experimentais de Análise da Depressão em camundongos.....	38
3.7.1	Teste da Suspensão de Cauda.....	38
3.7.2	Teste do Nado Forçado.....	39
3.8	Análise Estatística.....	39
4	RESULTADOS.....	40
4.1	Avaliação da Atividade Motora.....	40
4.1.1	Teste do Campo Aberto.....	40
4.1.2	Teste do Rota <i>rod</i>	41
4.2	Avaliação da Atividade Ansiolítica.....	42
4.2.1	Teste da Placa Perfurada.....	42
4.2.2	Teste do Labirinto em Cruz Elevada (LCE).....	43
4.3	Avaliação da Atividade Antidepressiva.....	48
4.3.1	Teste da Suspensão de Cauda.....	48
4.3.2	Teste do Nado Forçado.....	49
5	DISCUSSÃO.....	50
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7	CONCLUSÕES.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Desordens neurocomportamentais são compostas por um grande grupo de deficiências neurológicas, as quais estão associadas tanto com doenças cerebrais transitórias (esclerose múltipla, demência e condições neuro-oncológicas) como doenças cerebrais permanentes (encefalopatia metabólica e tóxica) e/ou ocasionadas por injúrias (como trauma, hipoxia e/ou esquizofrenia) (ZASLER; MARTELLI; JACOBS, 2013). Entre essas desordens, destacam-se a depressão e a ansiedade, as quais têm despertado cada vez mais o interesse científico devido ao percentual de indivíduos afetados no mundo e ao pouco conhecimento de estratégias terapêuticas sem efeitos adversos (MAO *et al.*, 2008; RABBANI; SAJJADI; MOHAMMADI, 2008).

Os estudos com moléculas bioativas têm ganhado espaço na área das ciências biológicas, pois a identificação de novas substâncias para a produção de fármacos pode contribuir para novas pesquisas nas áreas de farmacologia e fisiológica, pois ainda nos deparamos com pouco conhecimento de estratégias terapêuticas com poucos efeitos indesejáveis.

Para o sucesso do desenvolvimento de novos fármacos efetivos no tratamento das desordens neurocomportamentais, é fundamental a prospecção de novas fontes naturais com este potencial, assim como a elucidação dos mecanismos de ação envolvidos. Entre as potenciais fontes de bioprospecção de novos fármacos, as algas têm sido descritas na literatura como um recurso vegetal e com a presença de moléculas bioativas diversas e atóxicas, como os polissacarídeos sulfatados, os quais vêm despertando interesse científico por apresentarem uma diversa variedade de potenciais implicações farmacológicas (JIAO *et al.*, 2011).

No Brasil, há mais de 539 espécies de macroalgas catalogadas, mas com poucos estudos mostrando o seu potencial terapêutico. Nesse sentido, o Brasil apresenta-se como um grande potencial para a pesquisa e exploração na área de organismos marinhos (ALVES *et al.*, 2000), podendo contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos.

1.2 Algas

As algas são organismos autotróficos pertencentes ao Reino Protista, que precisam realizar fotossíntese para elaborar o alimento que precisam. Fazem parte dos seres unicelulares (eucarióticos) e multicelulares (procarióticos). São talófitas (plantas sem raízes, caules e folhas), sendo a clorofila “a” o pigmento fotossintético principal (VAN DEN HOECK; MANN; JAHNS, 1999). Em relação ao habitat, as algas são principalmente aquáticas, encontradas nos oceanos, em águas estuárias, dulciolas, e em superfícies úmidas. Sua distribuição está relacionada com a temperatura e salinidade da água, disponibilidade de luz solar, correntes dos oceanos e das condições físicas e químicas ambientais (RAVEN *et al.*, 2007).

As macroalgas, do ponto de vista botânico, encontram-se divididas em três principais grupos de acordo com sua estrutura física, função e ciclo reprodutivo em: Chlorophyta (algas verdes), Phaeophyta (algas pardas) e Rodophyta (algas vermelhas) (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas vermelhas apresentam uma grande diversidade de espécies, que estão distribuídas desde as regiões tropicais até ambientes mais frios. Existem cerca de 4000 a 6000 espécies destas algas. Sendo a grande maioria de habitat marinho. Apresentam freqüentemente coloração avermelhada, isso devido à presença de ficoeritrina, pigmento fotossintético acessório presente no interior dos cloroplastos. As algas vermelhas além da clorofila “a”, apresentam também a clorofila “b”, e o polissacarídeo conhecido como “amido das florídeas” como material de reserva (DAVIS; VOLESKY; MUCCI, 2003; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

A utilização de algas no comércio global é de grande importância na economia mundial, principalmente nos países asiáticos como Japão, China e Filipinas. A principal forma de utilização é através do cultivo de espécies em cativeiros para obtenção do Agar, carragenina e alginato. Sendo os hidrocolóides os que têm maior significância comercial, devido à propriedade de formar gel, reter água e emulsificar (SILVA *et al.*, 2010). Também são de grande utilização na culinária (McHUGH, 2003), nas indústrias de papel e têxtil como espessante de corantes (TURK; SCHNEIDER, 2000) e na farmacêutica como microesferas para liberação de drogas (CHAN; LEE; HENG, 2007).

1.3 Gênero *Gracilaria*

As algas marinhas oferecem amplos produtos e benefícios para a sociedade, como aplicação na nutrição, na cosmética, nos estudos farmacológicos, nos processamentos de alimentos e na biotecnologia (MORANO *et al.*, 1991; CAMPOS *et al.*, 2009).

As espécies do gênero *Gracilaria* destacam-se por possuírem alta concentração de ágar, que é de grande interesse na indústria alimentícia em todo o mundo (MELO *et al.*, 2002; PLASTINO; OLIVEIRA, 2002;). São encontradas principalmente nos mares temperados e tropicais, nas zonas entre-marés até o infralitoral. Seu comprimento pode variar de 0,1 a 5 metros, apresentando talo cilíndrico ou achatado, filamentosos ou pseudoparenquimatosos. Suportam variações de temperatura, salinidade, e circulação de água. Sua coloração é vermelha, porém pode haver variação para cor verde (GUIMARÃES; PLASTINO; OLIVEIRA, 1999).

No Brasil, as regiões de maior produtividade de algas do gênero *Gracilaria* encontram-se entre os estados da Paraíba e Ceará (OLIVEIRA; MIRANDA, 1998; MIRANDA, 2000;). Segundo Oliveira (1998), as espécies de maior potencial econômico são *G. cornea*, *G. caudata* e *Gracilariopsis tenuifrons*, todas encontradas nas águas quentes dos estados do nordeste. Apresentam crescimento vegetativo livre ou se fixam a pequenas rochas e fragmentos de corais em níveis de maré baixa (SINHA *et al.*, 2000), além de possuírem flexibilidade e um talo cilíndrico de consistência carnosa (JOLY, 1965).

A alga marinha *G. cornea* J. Agardh está presente no oceano atlântico entre o golfo do México até Cabo Frio, no Brasil (BIRD *et al.*, 1986). Sua utilização na produção de ágar é alta, devido ao seu grande rendimento. Como consequência dessa importância econômica, muitos aspectos fisiológicos têm sido estudados, tais como crescimento em laboratórios (YOKOYA; OLIVEIRA, 1992), fotossíntese e pigmentos (DAWES *et al.*, 1999), compostos que absorvem radiação violeta (SINHA *et al.*, 2000), qualidade do ágar (LEON, 1990; ESPINOZA *et al.*, 2003) e reprodução (GUZMÁN-URIÓSTEGUI; ROBLEDO, 1999).

1.4 Polissacarídeos sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados representam uma classe de macromoléculas polianiónicas complexas e heterogêneas formadas por unidades repetitivas de açúcares e carregadas negativamente devido à presença de grupos sulfatados ou da carboxila de ácidos urônicos, sendo encontrados principalmente em algas marinhas (JIAO *et al.*, 2011) e no reino animal (MEDEIROS *et al.*, 2008).

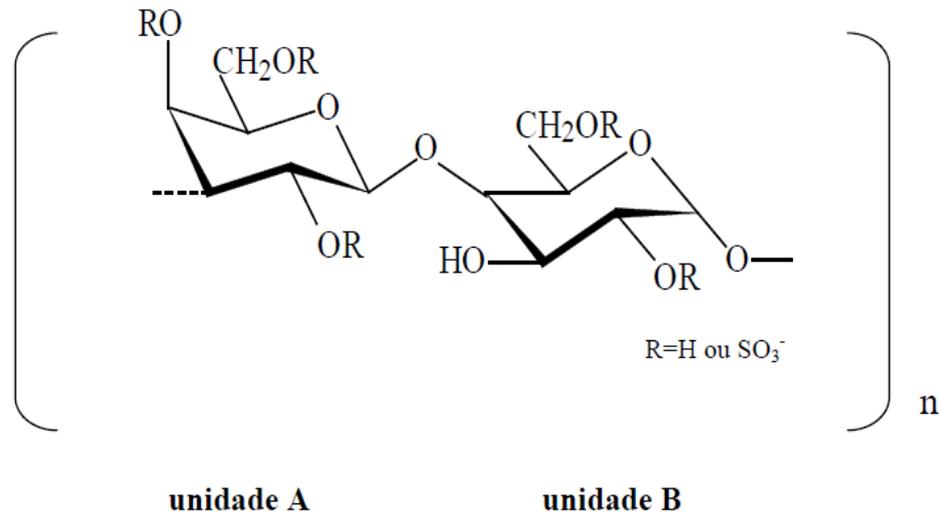
Uma característica peculiar as macroalgas, é a presença de pelo menos um polissacarídeo contendo éster sulfatado em sua matriz mucilaginosa. Polissacarídeos sulfatados ainda não foram relatados em plantas superiores terrestres, embora elas ocorram amplamente no tecido conjuntivo dos invertebrados e em menor quantidade nos invertebrados (FARIAS *et al.*, 2000).

Nas algas marinhas vermelhas os polissacarídeos sulfatados estão presentes na forma de galactanas sulfatadas, as quais são constituídas por unidades dissacarídicas repetitivas, da mesma forma que muitos polissacarídeos de tecidos conjuntivos de animais, tais como: condroitim sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato e queratam sulfato (USOV, 1984; FARIAS, 2000).

1.4.1 Galactanas sulfatadas obtidas de algas vermelhas

As algas marinhas vermelhas biossintetizam uma grande variedade de galactanas sulfatadas que são os principais componentes da matrix intracelular. Essencialmente, elas consistem de cadeias lineares formadas de dissacarídeos repetitivos, designados por unidade A, constituída por unidades de β -D-galactopiranosose ligadas através dos carbonos C-1 e C-3. e unidade B constituída por unidades de α -galactopiranosose, ligadas através dos carbonos C-1 e C-4 (LAHANE, 2001; VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004). Algumas unidades de α -galactopiranosose podem também ocorrer na forma ciclizada 3,6-anidrogallactopiranosose (PAINTER, 1983). Portanto, a cadeia linear da galactana é formada pela alternância das unidades A e B $(AB)_n$ de acordo com a estrutura repetitiva esquematizada na Figura 1.

Figura 3. Estrutura básica repetitiva de agaranas, com unidades D- e L- alternante.



Embora as galactanas sulfatadas apresentem uma estrutura básica repetitiva, elas possuem uma grande diversidade estrutural, pois apresentam diversos tipos diferentes de substituintes na cadeia principal (ERREA; MATULEWICZ, 2003), como presença de grupo éter metílico no C-6 ou grupos sulfato C-2, C-4 ou C-6, todos na unidade A ou ainda presença na unidade B de grupos éter metílico ou grupos sulfato C-2, C-3 ou C-4 (PAINTER, 1983). A proporção e distribuição dos substituintes mencionados na cadeia do esqueleto do galactano modificam as propriedades físico-químicas dos polissacarídeos (LAHAYE; ROCHAS, 1991; RODRÍGUEZ *et al.*, 2009). O maior grau de substituição por grupos sulfato, por exemplo, produz géis de menor força (VILLANUEVA, *et al.*, 2010).

1.5 Polissacarídeos sulfatos de algas marinhas e suas atividades biológicas

Os registros do uso de substâncias procedentes de organismos marinhos e o conhecimento de suas propriedades datam de tempos remotos. Há pelo menos mil anos os chineses já empregavam o extrato da alga *Laminaria japonicum* como tempero para incrementar o sabor e o aroma de certos alimentos. Mas tarde, o agente responsável por estas propriedades foi

identificado como sendo o ácido glutâmico, um importante neurotransmissor no sistema nervoso central (BASLOW, 1969).

Atualmente, as algas marinhas têm grande importância como novas fontes de substâncias bioativas, pois diversas pesquisas revelam que seus compostos vêm apresentando vasta atividade biológica (BARROW; SHAHIDI, 2008; WIJESSEKARA; KIM, 2010).

Estudos demonstram que as atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados (PSs) dependem da densidade de cargas, teor de sulfato, estrutura química, peso molecular e conformação de cadeia (FONSECA *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2010a; 2010b), além de apresentarem baixo risco de contaminação por partículas virais (LEITE *et al.*, 1998) e toxicidade bastante baixa (QUINDERÉ *et al.*, 2013).

Nandini e colaboradores (2004) relataram que polissacarídeos sulfatados, extraídos de notocorda de peixe, modulam positivamente a produção de fatores de crescimento em cultura de células de hipocampo de rato, como BDNF, fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fatores de crescimento de fibroblasto (FGF). De acordo com os autores, as interações entre os polissacarídeos sulfatados e esses fatores de crescimento neurotróficos sugerem a possibilidade de implicações *in vivo* no desenvolvimento de agentes terapêuticos para o tratamento de doenças neuronais e injúrias cerebrais.

A partir de então, a literatura tem demonstrado que vários tipos de polissacarídeos compostos por grupos sulfatados, de origem animal e vegetal, com efeitos neuroprotetores, como: proliferação de células neurais (LEE *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2010; SHENG *et al.*, 2011); antineurotoxicidade (SATO *et al.*, 2008; LUO *et al.*, 2009; PANGESTUTI; KIM, 2011; GAO *et al.*, 2012); antioxidante (YANG *et al.*, 2011; PANGESTUTI; KIM, 2011); e anti-neuroinflamatório, através da modulação de mediadores inflamatórios como óxido nítrico (NO) (LEE *et al.*, 2007), TNF α , IL-6, COX-2, PGE2 e IL1 β (PANGESTUTI; KIM, 2011).

Outras atividades biológicas foram descritas para PSs extraídos de algas marinhas, tais como: antibacteriana (CHOTIGEAT *et al.*, 2004; GEDENNE *et al.*, 2013), antioxidante (RUPEREZ; AHRAZEM; LEAL, 2002; MELO *et al.*, 2013), antiviral (CHOTIGEAT *et al.*, 2004; RABANAL, *et al.*, 2014), antitumoral (WANG *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2004), antitrombótica e pró-trombótica (FONSECA *et al.*, 2008), antinociceptiva (ASSREUY *et al.*, 2008; COURA *et al.*, 2012), antiinflamatória (NA *et al.*, 2010), anticoagulante (RODRIGUES *et al.*, 2010a; 2010b) e anticancerígena (SYNYTSYA *et al.*, 2010). Além de ter a capacidade de modular mediadores inflamatórios (PANGESTUTI; KIM, 2011), propiciar proliferação em

células neuronais (LEE *et al.*, 2007) e modular a plasticidade neural em hipocampo (GAO *et al.*, 2012).

Tem sido relatado na literatura que os PSs das espécies de algas marinhas pardas *Ecklonia cava* e *Laminaria japonica*, que apresentam ação anti-inflamatória, também apresentam ação neuroprotetora em modelos experimentais de animais, (PANGESTUTI; KIM, 2011; GAO *et al.*, 2012). No entanto, PSs das espécies de alga marinhas vermelhas, tais como *Gracilaria*, *G. cornea* e *G. birdiae*, também apresentam ação anti-inflamatória (VANDERLEI *et al.*, 2011; COURA *et al.*, 2012), mas até o momento não existe estudos relatando ação no sistema nervoso central para os referidos PSs.

1.6 Sistema Nervoso Central e sua importância funcional

O Sistema nervoso humano contém mais de 10 bilhões de neurônios, onde, em sua maioria, formam milhares de conexões sinápticas, conferindo ao sistema nervoso uma complexidade diferente daquela observada em qualquer outro sistema orgânico. As interações entre os circuitos neuronais medeiam funções que incluem desde reflexos primitivos até a linguagem, o humor, e a memória (GOLAN, 2009).

O sistema nervoso pode ser dividido, em nível estrutural e funcional, em componentes periférico e central. O sistema nervoso periférico inclui todos os nervos que seguem o seu percurso entre o sistema nervoso central e os locais somáticos e viscerais. Enquanto que o SNC transmite e processa sinais recebidos do sistema nervoso periférico, cujo processamento resulta em respostas que são formuladas e retransmitidas à sua periferia. O SNC é responsável por funções importantes, como: percepção, incluindo processamentos sensitivo, auditivo e visual; estado de vigília, linguagem e consciência (GOLAN, 2009).

Desordens no sistema nervoso, denominadas de desordens neurológicas, têm efeitos devastadores e são amplamente distribuídas em toda a população, sendo especialmente prevalente na população mais idosa. Essas desordens neurológicas são multifatoriais e podem ter origem genética, epigenética e/ou serem induzidas por estresses ambientais, injúrias, doenças e/ou processos inflamatórios (SIMONATO *et al.*, 2013). Entre essas desordens neurológicas, podem ser citados os distúrbios comportamentais (WIDLÖCHER, 1983).

1.7 Desordens neurocomportamentais

Os distúrbios comportamentais, cognitivos e emocionais associados a danos ou disfunções no SNC são classificados como desordens ou transtornos neurocomportamentais (STRUB; BLACK, 1981), os quais também estão associados a processos de degeneração neural (BERNHEIMER *et al*, 1973). Essas desordens são compostas por um grande grupo de deficiências neurológicas, as quais estão associadas tanto com doenças cerebrais transitórias (esclerose múltipla, demência e condições neuro-oncológicas) como doenças cerebrais permanentes (encefalopatia metabólica e tóxica) e/ou ocasionadas por injúrias (como trauma, hipoxia e/ou esquia) (ZASLER; MARTELLI; JACOBS, 2013). Entre essas desordens neurocomportamentais, podem-se citar as doenças afetivas, como a ansiedade e a depressão (WIDLÖCHER, 1983).

1.7.1 Ansiedade

A ansiedade é um termo utilizado para descrever um estado emocional normal associado ao estresse ou dificuldade psicológica associada a uma condição patológica. São reações normais até o momento que começam a provocar sofrimento no indivíduo (LENT, 2004). Quando a ansiedade é crônica e não está claramente associada a um evento bem definido ela geralmente é considerada anormal e própria para uma intervenção psicológica ou psiquiátrica (SANGER, 1991). Existem várias formas de ansiedade, sendo as mais comuns: distúrbio do pânico, transtorno do estresse pós-traumático e as fobias (GARAKANI; MATHEUS; CHARNEY, 2006).

Em termos biológicos, a ansiedade promove uma inibição comportamental, que acontece em respostas aos eventos ambientais que são novos, não-compensadores (em condição em que a recompensa era esperada) ou a punição. Em animais, esta inibição comportamental pode adotar forma de imobilidade ou supressão de uma resposta comportamental, tal como pressionar uma alavanca para obter alimento. Para o desenvolvimento de novos fármacos ansiolíticos, é importante o uso de testes em animais que forneçam um bom guia para atividades em seres humanos e muito esforço para desenvolver e dar validade a tais testes (RANG *et al.*, 2011).

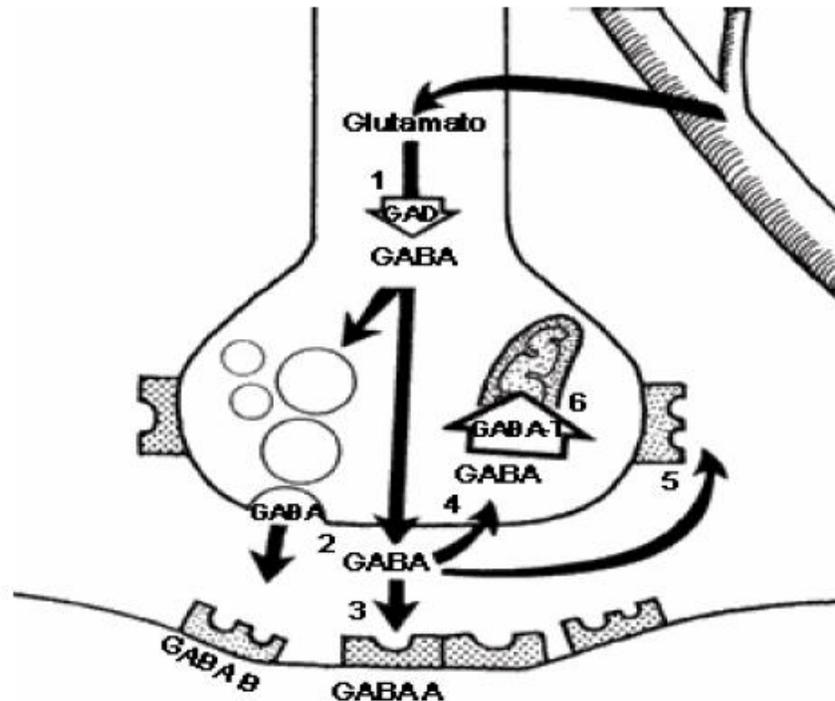
Nos últimos 45 anos, o tratamento farmacológico dos transtornos de ansiedade tem utilizado extensivamente os benzodiazepínicos, classe de drogas que modulam alostericamente os receptores gabaérgicos do tipo A (OLSON, 2002). No entanto, os seus efeitos adversos são predominantes, incluindo sedação, relaxamento muscular, amnésia anterógrada e dependência física (MITTE *et al.*, 2005; RABBANI; SAJJADI; MOHAMMADI, 2008).

1.7.1.1 Sistema gabaérgico

O ácido γ -aminoburítico (GABA), é o principal neurotransmissor inibitório presente no sistema nervoso central dos vertebrados. O GABA ativa duas classes de receptores distintos, o GABA_A e o GABA_B. Os receptores GABA_A abre os canais de cloreto e são antagonizados pela picrotoxina e bicuculina, ambas provocando convulsões generalizadas (BORMANN, 2000; SILVILOTTI; NISTRINI, 1991). Os receptores GABA_B podem ser ativados seletivamente pela droga antiespástica baclofeno e estão acoplados à proteína G, que inibem os canais de cálcio ou ativam os canais de potássio (BORMANN, 2000; BOWERY, 1993).

O GABA é sintetizado a partir do L-glutamato, numa reação de descarboxilação catalítica pela enzima glutamato descarboxilase (GAD), enzima encontrada apenas em neurônios que sintetizam este neurotransmissor no cérebro. Após ser sintetizado, o GABA é armazenado dentro de vesículas. Quando ocorre a liberação na fenda sináptica, o GABA liga-se ao seu receptor, causando uma hiperpolarização, isso devido ao influxo de Cl^- ou efluxo K^+ , no neurônio pós-sináptico (RANG *et al.*, 2011) (Figura 4).

Figura 4. Síntese e metabolismo do GABA.



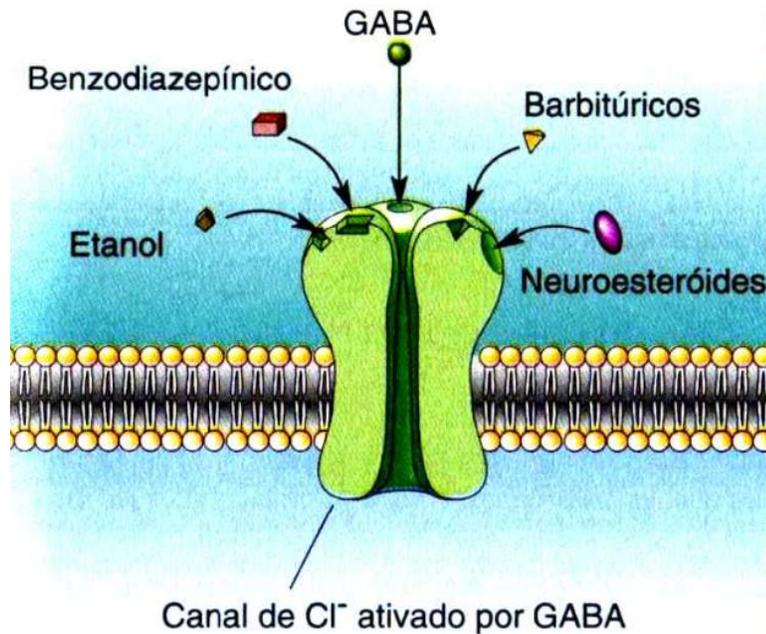
Fonte: Disponível em: www.javeriana.edu.com/.../gabal.gift/

Os receptores GABA_A são os mais importantes por possuírem um papel central na regulação da excitabilidade cerebral, através de seus efeitos inibitórios, e, muitos fármacos importantes, como os benzodiazepínicos, apresentam vários efeitos relacionados com este receptor, tais como sedação, indução do sono, redução da ansiedade e da agressão, redução do tônus muscular e coordenação, efeito anticonvulsivante e amnésia anterógrada. Todos esses efeitos ocorrem através da potencialização da resposta ao GABA por facilitarem a abertura dos canais de cloreto ativados pelo GABA. Eles se ligam de modo específico em um sítio regulador do receptor, distinto do sítio ligante do GABA, e agem de modo alostérico, aumentando a afinidade do GABA pelo receptor (RANG *et al.*, 2011).

O receptor GABA_A é um canal iônico ativado por ligante, consistindo de um aglomerado pentamérico, construído pela associação de 18 ou mais subunidades diferentes. A subunidade α do complexo pentamérico ocorre em seis isoformas ($\alpha 1$ - $\alpha 6$). Diferentes efeitos benzodiazepínicos podem, assim, estar ligados a diferentes subtipos de receptores GABA_A,

sugerindo a possibilidade de desenvolvimento de novas substâncias com efeitos mais seletivos do que os benzodiazepínicos existentes (JOHNSTON, 1991; RANG *et al.*, 2011) (Figura 5).

Figura 5. Receptor GABA_A



Fonte: Adaptado de: www.niaaa.nih.gov/.../gaba_receptor.gif

1.7.2 Depressão

A depressão é o mais comum distúrbio afetivo (distúrbio do humor ao invés de distúrbio de pensamento ou cognição), podendo ser de uma condição muito branda, beirando a normalidade, a uma depressão severa (psicótica) acompanhada por alucinações e delírios. Os sintomas da depressão compreendem apatia, irritabilidade, dificuldade de concentração, anomalia

no apetite e no sono (sintomas neurovegetativos) (RANG *et al.*, 2011). Encontrar-se associado ao suicídio, desenvolvimento de distúrbios coronários e diabetes tipo 2 (KNOL *et al.*, 2006), deste modo, a depressão prejudica o prognóstico de muitas outras condições médicas (EVANS *et al.*, 2005; GILDENGGERS *et al.*, 2008).

A explicação para o reduzido prognóstico de depressão e seu considerável impacto está correlacionada com o conhecimento rudimentar da sua fisiopatologia, comparada com outras doenças crônicas e potencialmente fatais (KRISHNAN; NESTLER, 2008). Uma explicação para essa discrepância é que as alterações no cérebro são muito mais difíceis de serem observadas que as alterações em outros organismos. Técnicas válidas para avaliar aberrações no circuito cerebral dependem de estudos post-mortem, no qual possuem numerosas limitações, ou técnicas de neuroimagem, que detecta alterações na atividade neuronal usando marcadores indiretos para ativação (PHELPS; LeDOUX, 2005).

O diagnóstico oficial da depressão é subjetivo e baseia-se na documentação de um certo número de sintomas. Baseado nesses sintomas existe vários tipos de antidepressivos utilizados na prática química, como os antidepressivos tricíclicos (TCA), inibidores da monoamino oxidase (IMAO), dentre outros.

Em animais, não existem condições conhecidas 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) (PORSOLT *et al.*, 1987).

1.7.2.1 Sistema dopaminérgico

A patogenia da depressão foi, explicada inicialmente, pela teoria das monoaminas, que afirma que a depressão é causada por um déficit funcional das monoaminas transmissoras em certos locais cerebral, enquanto a mania resulta de um excesso funcional (MANJI *et al.*, 2001). Essa hipótese surgiu após a observação entre os efeitos clínicos de vários fármacos que induziam ou aliviavam os sintomas da depressão e seus efeitos neuroquímicos conhecidos sobre a transmissão monoaminérgica no cérebro. Um exemplo disso foi à introdução da reserpina, no início da década de 50, onde se observou que pacientes em tratamento, com tal droga, para o controle da pressão arterial desenvolveram um quadro de depressão. Estudos farmacológicos

subseqüentes revelaram que o principal mecanismo de ação de reserpina consistia em inibir o armazenamento dos neurotransmissores amínicos, como a noradrenalina e a serotonina, nas vesículas das terminações nervosas pré-sinápticas (GOODWIN; BUNNEY, 1971).

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

A dopamina pertence ao grupo de neurotransmissores chamados de cetacolaminas. As suas características estruturais é a presença de um único grupamento amina, um núcleo de cetacol (um anel benzeno com dois grupos de hidroxilas adjacentes) e uma cadeia lateral de etilamina ou um de seus derivados (FELDMAN *et al.*, 1997).

1.8 Modelos de estudo de desordens neurocomportamentais para análise da depressão e ansiedade

Os modelos de estudos comportamentais em animais desempenham um papel central na investigação científica dos mecanismos fisiológicos e nos processos que estão envolvidos no controlo do comportamento normal e anormal (HOLMES, 2003; RODGERS *et al.*, 1997). Muitos destes modelos têm sido utilizados com sucesso para testar novas drogas ansiolíticas ou antidepressivas e compreender os mecanismos neuronais (ARBORELIUS *et al.*, 1999, PATERSON *et al.*, 2001; KALUEFF; MURPHY, 2007).

Dentre os testes de avaliação neurocomportamental para a depressão, os testes do nado forçado e da suspensão de cauda são os mais amplamente utilizados para um *screening* de novas drogas antidepressivas (STERU *et al.*, 1985; DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995). Nesses dois modelos o comportamento observado parece ser resultado da exposição a uma situação

inescapável, onde o animal divide o seu comportamento em períodos de atividades vigorosas (tentativas para escapar) e de imobilidade (comportamento de espera) (STERU *et al.*, 1985).

Os modelos experimentais com animais para análise de ansiedade evocam, pela simples exposição do animal, a um novo ambiente ou estímulo, comportamentos de medo ou defensivos, análogos as principais manifestações evidenciadas em indivíduos com transtornos de ansiedade. Entre esses modelos, pode-se citar o teste do labirinto em cruz elevado (LCE), onde animais submetidos ao referido teste apresentam um comportamento denominado de avaliação de risco, o qual pode ser relacionado à hipervigilância, apresentada por indivíduos ansiosos (BLANCHARD; GRIEBEL BLANCHARD, 2001). Embora haja atualmente outros modelos animais de ansiedade, como o modelo de placa perfurada, o LCE é sensível aos efeitos de lesões neurotóxicas em neurônios serotoninérgicos e aos efeitos de fármacos ansiogênicos e/ou ansiolíticas, o qual indica o referido modelo como um dos mais adequados para análise de novos bioativos com potencial efeito terapêutico para distúrbios neurocomportamentais de ansiedade (PELLOW; FILE, 1986).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação ansiolítica e antidepressiva dos polissacarídeos sulfatados totais (PST) da alga marinha *Gracilaria cornea* em modelos clássicos neurocomportamentais de ansiedade e depressão em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair os PST da alga marinha *G. cornea*;
- Avaliar os efeitos dos PST nas atividades motora e relaxante muscular nos modelos de campo aberto e rota *rod*, respectivamente;
- Verificar os efeitos dos PST na atividade ansiolítica em modelos de labirinto em cruz elevada e de placa perfurada;
- Avaliar os efeitos dos PST na atividade antidepressiva em modelos de nado forçado e suspensão de cauda.
- Verificar a participação dos receptores GABA/Bezondiazéinicos no mecanismo de ação ansiolítico dos PST da *G. cornea*.

3 MATERIAS E METÓDOS

3.1 Algas marinhas

A alga marinha vermelha *G. cornea* J. Agardh (1852) (Figura 6) foi coletada na praia de Fleixeiras, município de Trairi – CE, durante as marés de sizígia. Em seguida foram transportadas em sacos plásticos ao laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará (UFC). No laboratório as algas foram lavadas com água destilada e separadas cuidadosamente das epífitas e/ou organismos incrustantes, e posteriormente estocadas em freezer (-20 °C) até o uso. Uma exsicata foi depositada no Herbário Prisco Bezerra da UFC sob o número 34739.

Figura 6. Alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* e sua classificação taxológica.



Filo: Rodophyta
Classe: Floridophyceae
Ordem: Gracilariales
Família: *Gracilariaceae*
Gênero: *Gracilaria* J. Agardh
Epíteto específico: *cornea*
Nome botânico: *Gracilaria cornea*. J. Agardh

Fonte: taibif.org.tw

3.2. Soluções, Drogas e Corantes

Todos os reagentes utilizados apresentaram grau de pureza e propriedades analíticas adequadas. As drogas e reagentes utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho foram:

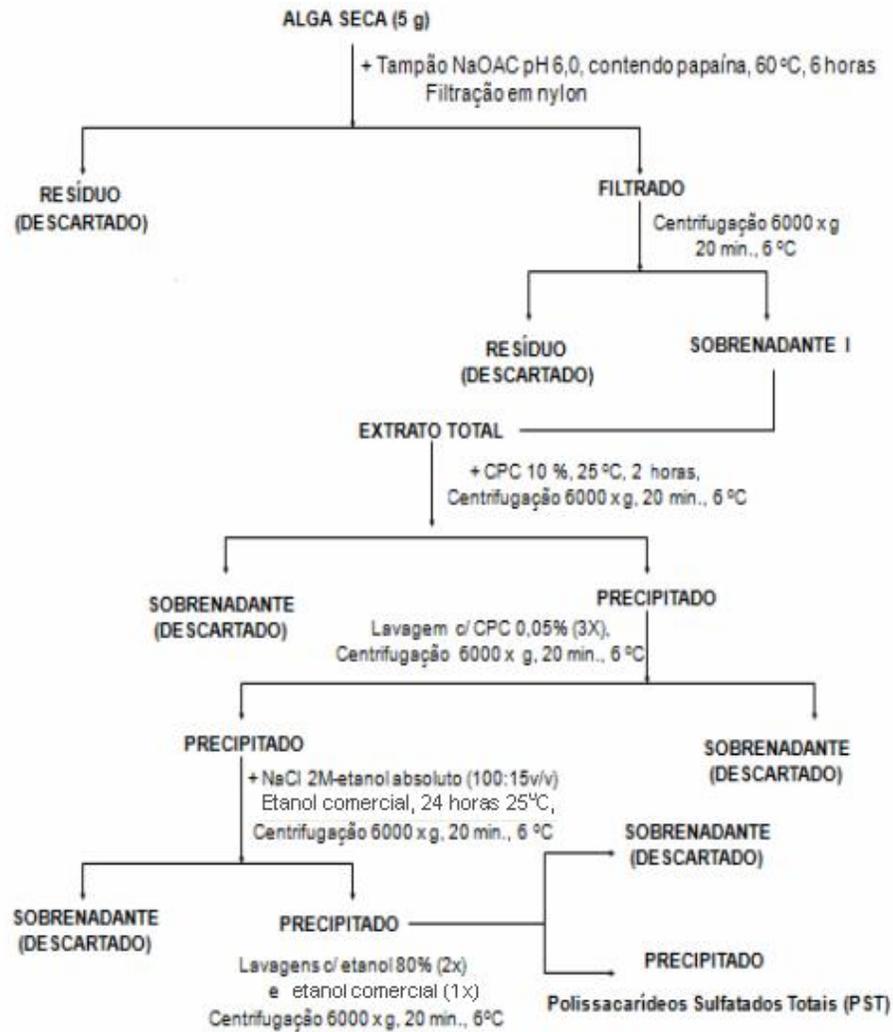
Álcool comercial; Cloreto de Sódio (NaCl), KCl, MgCl₂, NaH₂PO₄⁻, NaHCO₃⁻, CaCl₂ (Merck); Hidrato de cloral (Vetec; Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

Soluções e Drogas usadas foram: Diazepam (União Química Brasil); Flumazenil (sigma); Imipramina (Imipra, Cristália); ambos dissolvidos em solução salina (0,9%).

3.3. Extração dos Polissacarídeos sulfatados totais

A extração dos PST foi realizada conforme descrito previamente por Farias et. al., 2000. Inicialmente, a alga desidratada em temperatura ambiente (25 °C) e triturada (5 g) foi hidratada em 250 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo EDTA e cisteína (5 mM). Em seguida, foram adicionados 17 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg mL⁻¹) para extração do PST em banho-maria durante 6 horas a 60 °C. Após esse período, o material foi filtrado em tela de náilon, centrifugado (2295 × g, 30 min; 15 °C) e, ao sobrenadante, adicionados 48 mL de cloreto cetilpiridínio (CCP) a 10% para precipitação dos polissacarídeos presentes na mistura por 24 horas a 25 °C. Logo após a precipitação, o extrato foi novamente centrifugado, lavado (200 mL; CCP 0,05%), dissolvido em 174 mL de NaCl 2 M: etanol comercial (100:15; v:v) e novamente precipitado através da adição de 200 mL de etanol comercial (24 h; 4 °C). Logo após a segunda precipitação, o material foi lavado duas vezes com 200 mL de etanol comercial a 80% e uma terceira com etanol comercial (200 mL), dialisado e liofilizado e denominado PST (Figura 7).

Figura 7. Fluxograma de extração de polissacarídeos totais.



3.4 Animais

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos albino da espécie *Mus musculus* da variedade Swiss do sexo masculino, pesando entre 25 e 32 g, proveniente do Biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em caixas de propileno em uma sala com temperatura de 26 ± 2 °C com ciclo claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração do tipo Purina e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) desta Universidade sob o numero 45/13.

3.4.1 Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram tratados com PST, de forma aguda, nas doses de 0,1, 1 ou 10 mg/Kg através da via intraperitoneal (i.p.). Os animais foram submetidos aos testes comportamentais 30 minutos após a ultima administração do PST. Para a avaliação da atividade antidepressiva, foi utilizada imipramina 10 e 30 mg/kg, (i.p.), nos teste de nado forçado e suspensão de cauda, respectivamente, como padrão positivo. Como referência ansiolítica foi utilizado diazepam 1mg/kg (i.p.) nos testes do labirinto em cruz elevada e Placa perfurada. Diazepam 2 mg/kg (i.p.) no campo aberto e *rota rod* como padrão para atividade relaxante muscular.

3.4.2. Protocolo experimental

Antes dos experimentos, os animais foram colocados em ambiente fechado, desprovido de barulho externo, com a temperatura constante (24 ± 1 ° C) e iluminação de baixa intensidade (lâmpada vermelha de 15 W), de modo que se adaptem 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 os animais, um por vez, foram colocados no campo aberto onde foram avaliados durante 5 minutos e, em seguida, foram transferidos para

análise motora no *rota rod*, onde a atividade foi observada por 1 minuto. Os outros testes comportamentais, como labirinto em cruz elevado, placa perfurada, nado forçado e suspensão da cauda foram realizados com diferentes grupos de animais. Em todos os testes, com exceção, apenas, do nado forçado e suspensão da cauda, após cada observação animal, foi utilizado álcool 70% para remoção de resíduos e odor do animal.

3.5 Modelos Experimentais da Análise da Atividade Motora em camundongos

3.5.1 Teste do Campo Aberto

Este teste é baseado na metodologia descrita por Sielgel (1946) e validado por Archer (1973), e permite uma avaliação da atividade locomotora do animal. É usado também para avaliar a atividade estimulante, depressora ou ansiolítica de um dado composto. Os animais foram divididos em 5 grupos, onde receberão tratamento: veículo (solução salina 0,9% i.p.), PST (0,1, 1 ou 10 mg/kg, i.p.), diazepam 2 mg/kg. Após 30 minutos, os animais, um por vez, foi colocado no centro da arena em um campo-aberto confeccionado em acrílico com 60 cm de comprimento, 60 cm de largura, 60 cm de altura, dividido em 12 arenas. Estes animais permanecem nesse campo-aberto durante 5 minutos. Os parâmetros para observação foram: número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*), registrados durante um tempo de 5 minutos.

3.5.2 Teste do Rota rod

O teste do *Rota rod* mensura o efeito do relaxamento muscular ou desordem da coordenação motora induzidos pela ação de drogas em animais (CARLINI; BURGOS, 1979). Para este teste, os camundongos foram divididos em 5 grupos: tratamento com veículo (solução salina 0,9% i.p.), PST (0,1, 1 ou 10 mg/kg, i.p.), diazepam 2 mg/kg. Após 30 min, os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 12 rpm, por um período de 1 minuto. registrados o tempo de

permanência na barra giratória, em segundos (s), e o número de quedas, com três reconduções, no máximo (DUNHAM; MIYA, 1957).

3.6 Modelos Experimentais de Análise da Ansiedade em Camundongos

3.6.1 Teste da Placa Perfurada

Método desenvolvido por Clark *et al.*, (1971). O aparato usado foi um Ugo Basile de 60 x 30 cm com 16 orifícios espaçados uniformemente com sensores de infravermelho. O parâmetro analisado foi o número de *head dips* (números de vezes que o animal coloca a cabeça nos orifícios) durante 5 minutos. Os animais, um por vez, foram colocados na plataforma 30 minutos após o tratamento com veículo (solução salina 0,9%), PST (0,1, 1 e 10 mg/Kg; i.p.), diazepam 1 mg/kg. A contagem de *head dips* foi feita automaticamente por sensor localizados nos orifícios e registrada no aparelho.

3.6.2 Teste da cruz elevada (LCE)

O LCE apresenta dois braços abertos e dois braços fechados dispostos perpendicularmente (LISTER, 1987). Trinta minutos após o tratamento com os PST (0,1, 1 ou 10 mg/Kg; i.p.), os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por 5 min. As medidas comportamentais registradas no LCE são: número de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados.

A frequência total de entradas é obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e fechado. Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a porcentagem de entradas nos braços aberta 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 porcentagem de tempo em que os animais permanecem nos braços abertos. Dessa forma, os parâmetros utilizados para análise estatística foram: número de entradas

no braço aberto (NEBA), tempo de permanência no braço aberto (TPBA), percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) e percentagem de tempo nos braços abertos (PTBA). Para análise estatística, todos os grupos foram comparados ao grupo controle.

Posteriormente, com a finalidade de investigar o mecanismo de PST foram feitos três grupos, sendo o primeiro grupo composto por camundongos tratados Flumazenil (FLU) 2,0 mg/kg, i.p., um antagonista do receptor GABA_A/Benzodiazepínico, e 15 min depois tratados com veículo (salina 0,9% i.p.) (FLU 2,0 mg/kg). Ao segundo grupo, foi administrado Flumazenil e, 15 min depois PST 10 mg/kg, i.p. (FLU 2,0 + PST 10). Ao terceiro grupo, foi administrado Flumazenil e, 15 minutos depois diazepam 1 mg/kg, i.p. (FLU 2,0 + DZP-1). Os grupos foram conduzidos 30 min depois da última administração ao labirinto. Para análise estatística, o grupo (FLU 2,0 + PST 10) foi comparado ao grupo PST 10, enquanto o grupo (FLU 2,0 + DZP 1) foi comparado ao grupo do diazepam. Já o grupo (FLU 2,0 + veículo) foi comparado ao grupo controle.

3.7 Modelos Experimentais de Análise da Depressão em camundongos

3.7.1 Teste da Suspensão de Cauda

Os animais, um por vez, foram suspensos, presos por uma fita adesiva à cerca de 1 cm da ponta da cauda, numa plataforma 58 cm acima do da bancada, durante 5 minutos (STERU *et. al.*, 1985), após 30 minutos do tratamento com veículo (solução salina 0,9%), PST (0,1, 1 e 10 mg/Kg; i.p.) e imipramina (30 mg/kg, i.p.). O parâmetro observado foi o tempo de imobilidade do animal, em segundos.

3.7.2 Teste do Nado Forçado

O experimento consiste numa exposição do animal a um tanque (22 cm de diâmetro e 40 cm de altura), contendo água limpa e fresca a 25 °C até cerca de 20 cm de altura do tanque, e, posteriormente, o tempo de imobilidade do animal observado por um período de 5 minutos (PORSOLT; BERTINI; JALFRE, 1987). Os camundongos foram divididos em 5 grupos de animais, onde foram tratados com veículo (solução salina 0,9%), PST (0,1, 1, 10 mg/Kg, i.p.) e Imipramina (10 mg/Kg, i.p.). O animal foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando na água, fazendo apenas movimentos suaves necessários para manter a cabeça acima da água.

3.8 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism versão 5.0 pra Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia EUA. Copyright © 1992-2007 por GraphPad Software.

Os resultados que obedeciam a uma distribuição paramétrica foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguindo pelo teste de Student Newman Keuls (*post hoc*).

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

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da Atividade Motora:

4.1.2 Teste do Campo Aberto

Os animais tratados com PST (10 mg/kg) apresentaram um aumento na atividade locomotora espontânea (ALE) [PST 10 mg/kg: $47,3 \pm 4,2$ (8)] em relação ao grupo controle [controle: $35,0 \pm 2,3$ (7)]. Já o diazepam apresentou, como esperado, uma diminuição dessa atividade [DZP 2 mg/kg: $22,3 \pm 1,5$ (8)] (Tabela 1).

Os PST (1 ou 10 mg/kg) apresentaram um aumento no parâmetro do *rearing* (R) [PST 1 mg/kg: $7,6 \pm 1,7$ (6); PST 10 mg/kg: $10,6 \pm 1,0$ (6)] quando comparado ao grupo controle [controle: $3,1 \pm 0,4$ (6)]. Entretanto o número de *grooming* (G) não apresentou nenhuma alteração nos grupos estudados. (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito do PST sobre a atividade locomotora (ALE), *grooming* e *rearing* no teste de campo aberto em camundongos.

Tratamento	Parâmetros		
	A.L.E	<i>Grooming</i>	<i>Rearing</i>
Controle	$35,0 \pm 2,3$ (7)	$2,3 \pm 0,2$ (8)	$3,1 \pm 0,4$ (6)
PST 0,1 mg/kg, i.p.	$31,5 \pm 2,9$ (6)	$2,0 \pm 0,2$ (10)	$5,1 \pm 0,4$ (7)
PST 1 mg/kg, i.p.	$28,6 \pm 3,9$ (6)	$2,1 \pm 0,2$ (9)	$7,6 \pm 1,7$ (6)**
PST 10 mg/kg, i.p.	$47,3 \pm 4,2$ (8)*	$2,6 \pm 0,4$ (8)	$10,6 \pm 1,0$ (6)***
DZP 2 mg/kg	$22,3 \pm 1,5$ (8)*	$0,7 \pm 0,1$ (7)**	$0,5 \pm 0,2$ (10)*

Os valores representam a média \pm EPM da atividade locomotora, *grooming* e *rearing*. Em parêntese o número de animais por grupos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*.. Valores significativos comparados ao controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.1.2 Teste do Rota rod

Os PST nas doses de 0,1, 1 ou 10 mg/kg, não apresentaram nenhuma alteração no número de quedas ou tempo de permanência na barra quando comparado ao grupo controle. Por sua vez, o diazepam (2 mg/kg), utilizado como padrão positivo, aumentou o número de quedas e reduziu o tempo de permanência quando comparados ao controles (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito dos PST sobre o número de quedas e tempo de permanência na barra no teste de *rota rod* em camundongos.

Tratamento	Parâmetros	
	Números de quedas	Tempo de permanência (s)
Controle	0,3 ± 0,2 (8)	58,8 ± 0,8 (7)
PST 0,1 mg/kg, i.p.	0,3 ± 0,1 (8)	59,2 ± 0,3 (8)
PST 1 mg/kg, i.p.	0,4 ± 0,2 (7)	58,5 ± 0,7 (7)
PST 10 mg/kg, i.p.	0,6 ± 0,2 (6)	56,7 ± 0,7 (8)
DZP 2 mg/kg, i.p.	2,8 ± 0,2 (8)***	40,8 ± 3,5 (8)***

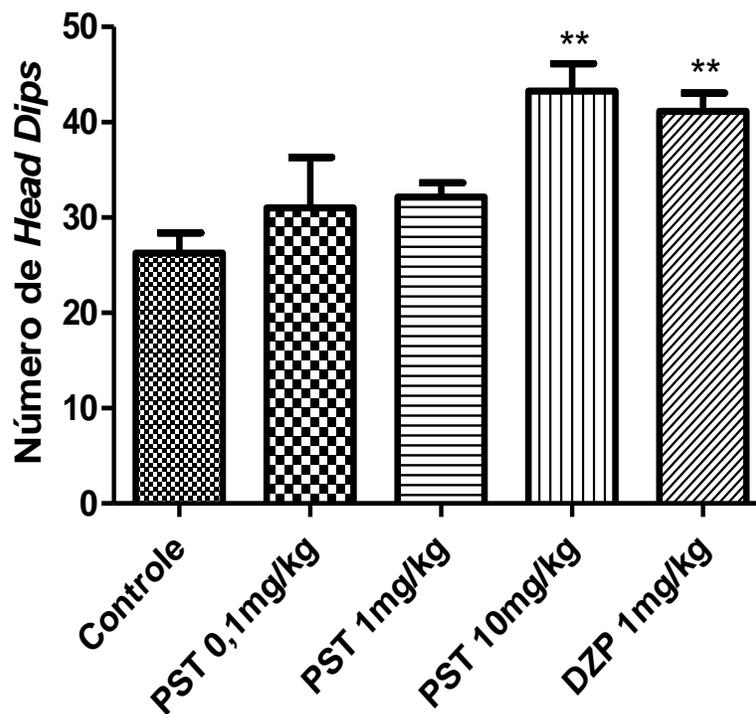
Os valores representam a média ± EPM sobre o número de quedas e o tempo de permanência na barra. Em parêntese o número de animais por grupos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valor significativo quando comparado ao controle (***p<0,001).

4.2 Avaliação da Atividade Ansiolítica:

4.2.1 Teste da Placa Perfurada

Neste modelo experimental, após a administração dos PST (10 mg/kg) foi observado um significativo aumento do número de vezes que o animal colocou a cabeça nos orifícios (*head dips*) da placa perfurada [PST 10 mg/kg: $43,2 \pm 2,8$ (7)] em relação ao grupo controle [controle: $26,2 \pm 2,1$ (8)]. Efeito semelhante foi observado com o grupo de animais tratados com DZP (1 mg/kg) [DZP 1 mg/kg: $41,1 \pm 1,9$ (8)] (Figura 8).

Figura 8: Efeito dos PST sobre o número de mergulhos (*head dips*) no teste da placa perfurada.



Os valores representam a média \pm EPM do número de *head dips* durante 5 minutos. Foram utilizados grupos de 8 animais. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos comparados ao controle (** $p < 0,01$).

4.2.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevada (LCE)

Os efeitos dos PST no teste do LCE foram observados em relação ao número de entradas nos braços abertos (NEBA), percentagem de entradas nos braços abertos (PEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA).

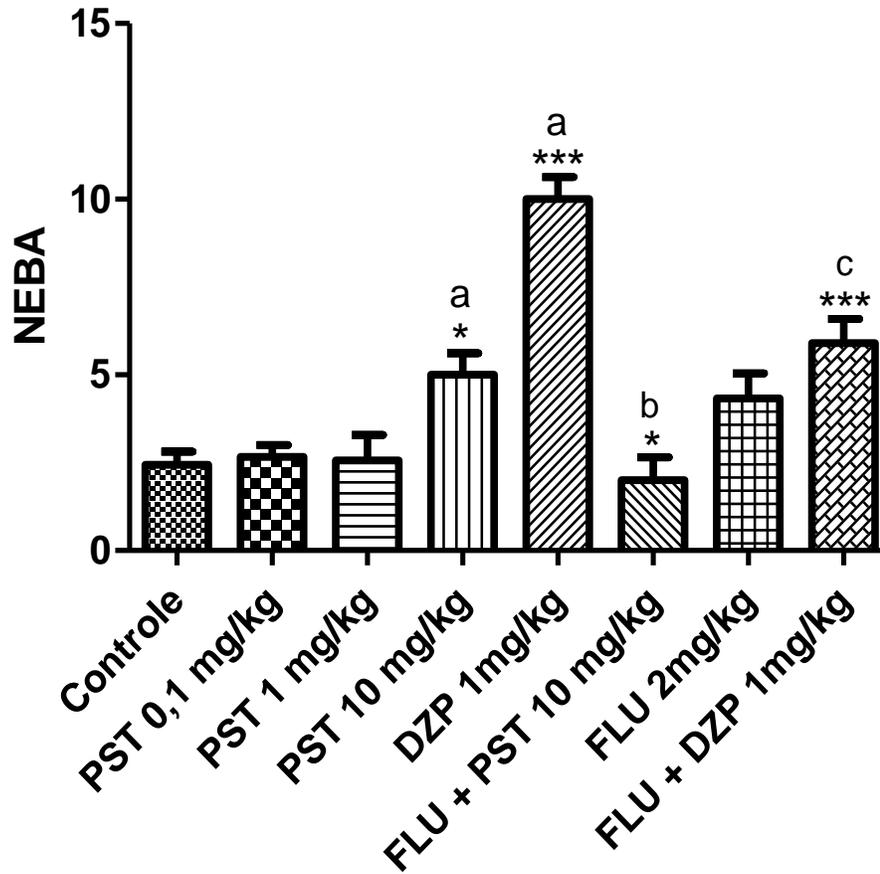
Os resultados no teste de LCE apresentaram um aumento em todos os parâmetros analisados no grupo tratado com PST 10 mg/kg: NEBA [PST 10 mg/kg: $5,0 \pm 0,6$ (7)]; PEBA [PST 10 mg/kg: $51,8 \pm 5,5$ (6)]; TPBA [PST 10 mg/kg: $63,0 \pm 4,4$ (6)]; PTBA [PST 10 mg/kg: $34,3 \pm 1,3$ (6)], quando comparado com os respectivos controles: NEBA [controle: $2,4 \pm 0,3$ (9)]; PEBA [controle: $27,1 \pm 2,9$ (8)]; TPBA [controle: $25,4 \pm 3,8$ (7)]; PTBA [controle: $15,4 \pm 0,5$ (6)] (Figuras 9, 10, 11 e 12).

O diazepam (1 mg/kg), como esperado, aumentou todos os parâmetros: NEBA [DZP 1 mg/kg: $10,0 \pm 0,6$ (6)]; PEBA [DZP 1 mg/kg: $61,5 \pm 1,6$ (7)]; TPBA [DZP 1 mg/kg: $146,1 \pm 13,1$ (8)]; PTBA [DZP 1 mg/kg: $52,1 \pm 3,9$ (7)] quando comparado ao controle (Figuras 9, 10, 11 e 12).

Ao analisar o envolvimento dos receptores benzodiazepínicos no efeito ansiolítico, o grupo de animais tratados com PST (10 mg/kg) e pré-tratados com Flumazenil (2,0 mg/kg) reduziram todos os parâmetros analisados quando comparado ao grupo de animais tratados com PST (10 mg/kg): NEBA [PST 10 mg/kg: $5,0 \pm 0,6$ (7); FLU + PST 10 mg/kg: $2,0 \pm 0,6$ (8)] (Figura 9); PEBA [PST 10 mg/kg: $51,8 \pm 5,5$ (6); FLU + PST 10 mg/kg: $20,6 \pm 4,9$ (9)] (Figura 10); TPBA [PST 10 mg/kg: $63,0 \pm 4,4$ (6); FLU + PST 10 mg/kg: $23,5 \pm 8,4$ (8)] (Figura 11); PTBA [PST 10 mg/kg: $34,3 \pm 1,3$ (6); FLU + PST 10 mg/kg: $9,3 \pm 3,8$ (7)] (Figura 12).

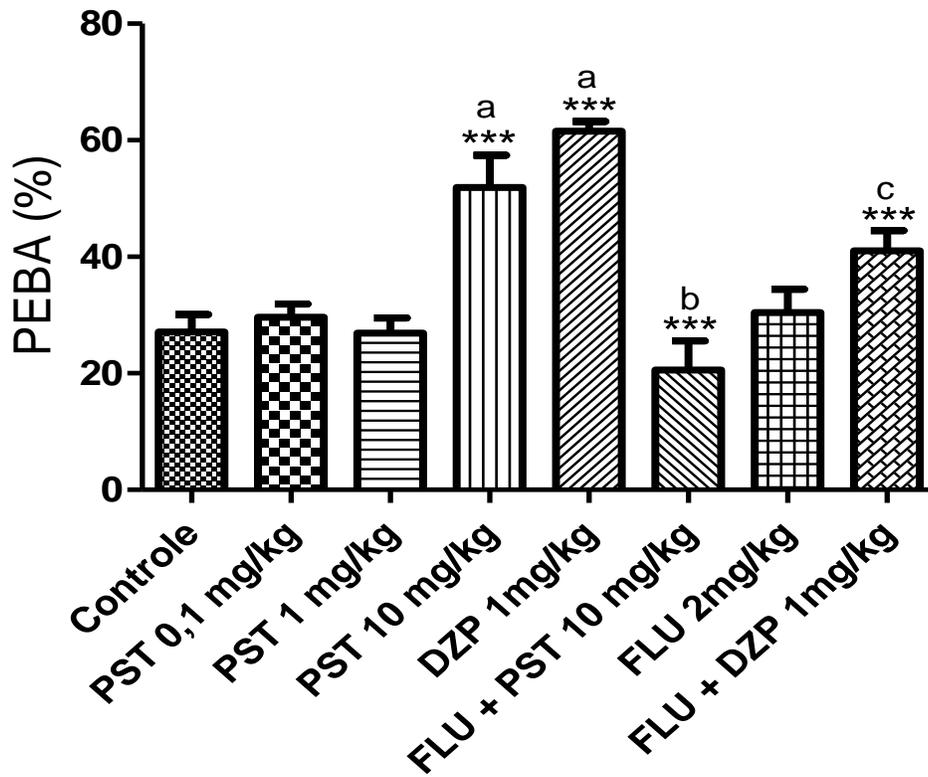
O grupo DZP, pré-tratados com flumazenil, reduziu todos os parâmetros analisados quando comparados ao grupo diazepam 1 mg/kg: NEBA [DZP 1 mg/kg: $10,0 \pm 0,6$ (6); FLU + DZP 1 mg/kg: $5,9 \pm 0,6$ (10)] (Figura 9); PEBA [DZP 1 mg/kg: $61,5 \pm 1,6$ (7); FLU + DZP 1 mg/kg: $41,0 \pm 3,4$ (10)] (Figura 10); TPBA [DZP 1 mg/kg: $146,1 \pm 13,1$ (8); FLU + DZP 1 mg/kg: $76,2 \pm 3,6$ (9)] (Figura 11); PTBA [DZP 1 mg/kg: $52,1 \pm 3,9$ (7); FLU + DZP 1 mg/kg: $40,7 \pm 2,4$ (8)] (Figura 12).

Figura 9: Efeito dos PST, Diazepam e Flumazenil sobre o número de entradas no braço aberto no teste de LCE em camundongos.



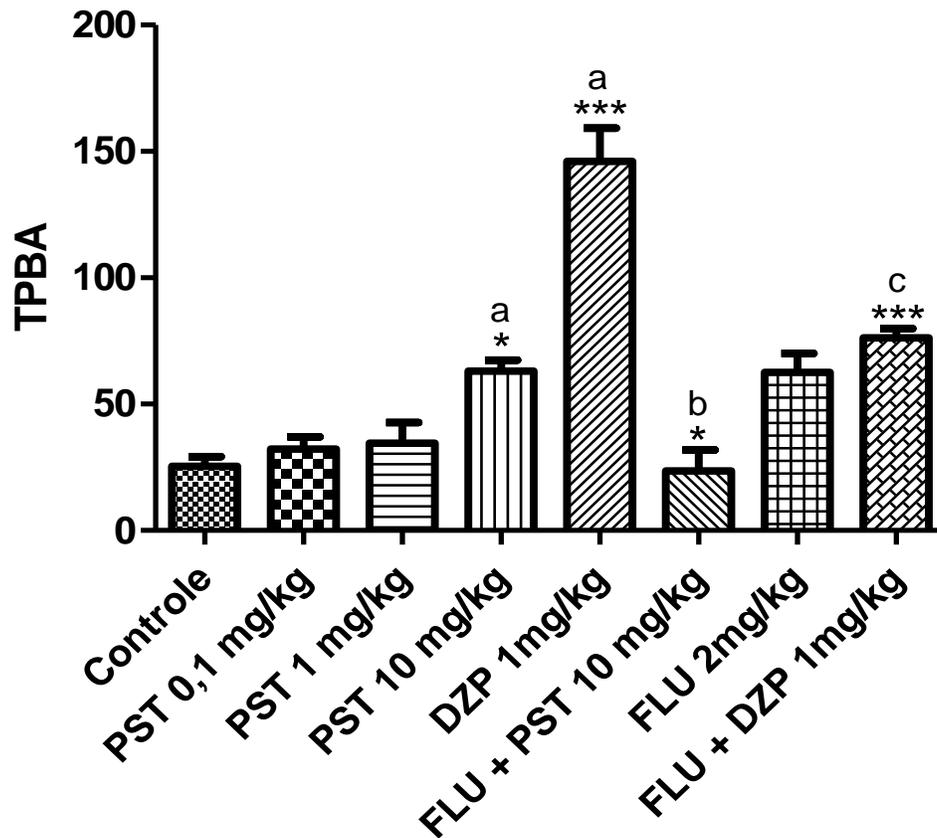
Controle (veículo), PST (0,1, 1 ou 10 mg/kg) e diazepam (2 mg/kg) e flumazenil (2 mg/kg) foram administrados 30 min antes do experimento, flumazenil foi pré-tratado 15 min antes da associação com PST (10 mg/kg) ou DZP (2 mg/kg). Os valores representam a média ± EPM do NEBA durante 5 min. A letra (a) representa a significância quando comparado ao controle; a letra (b) representa a significância quando comparado ao grupo PST 10 mg/kg; a letra (c) representa a significância quando comparado ao grupo diazepam 1 mg/kg. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Figura 10: Efeito dos PST, Diazepam e Flumazenil sobre a percentagem de entradas no braço aberto no teste de LCE em camundongos.



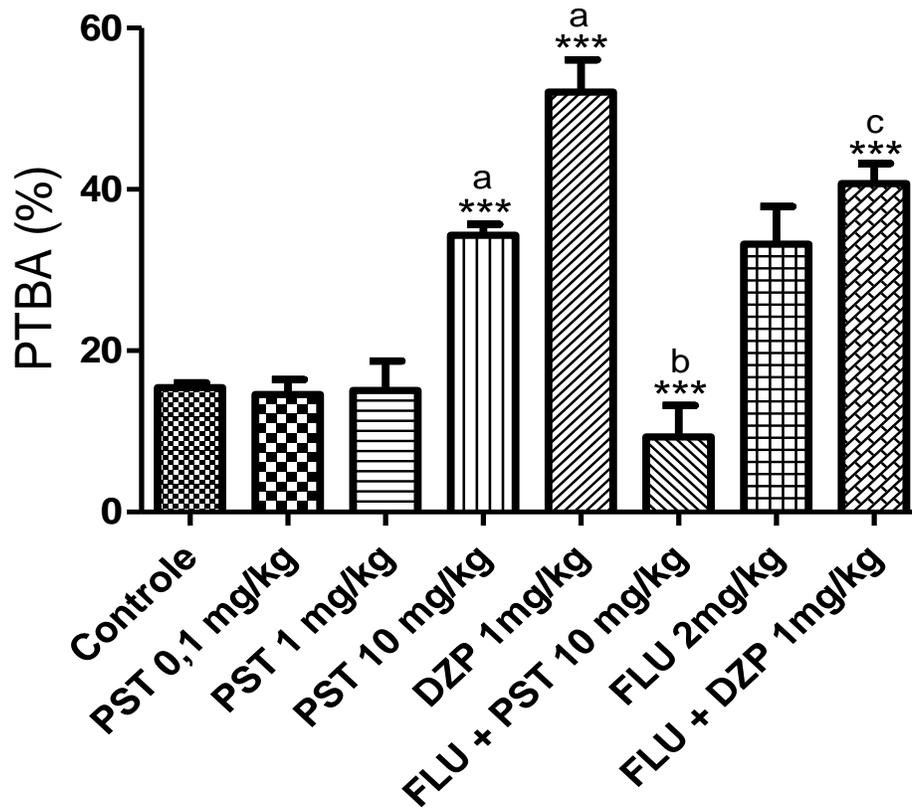
Controle (veículo), PST (0,1, 1 ou 10 mg/kg) e diazepam (2 mg/kg) e flumazenil (2 mg/kg) foram administrados 30 min antes do experimento, flumazenil foi pré-tratado 15 min antes da associação com PST (10 mg/kg) ou DZP (2 mg/kg). Os valores representam a média \pm EPM do PEBA durante 5 min. A letra (a) representa a significância quando comparado ao controle; a letra (b) representa a significância quando comparado ao grupo PST 10 mg/kg; a letra (c) representa a significância quando comparado ao grupo diazepam 1 mg/kg. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos (***) $p < 0,001$.

Figura 11: Efeito dos PST, Diazepam e Flumazenil sobre o tempo de permanência nos braços abertos no teste de LCE em camundongos.



Controle (veículo), PST (0,1, 1 ou 10 mg/kg) e diazepam (2 mg/kg) e flumazenil (2 mg/kg) foram administrados 30 min antes do experimento, flumazenil foi pré-tratado 15 min antes da associação com PST (10 mg/kg) ou DZP (2 mg/kg). Os valores representam a média \pm EPM do TPBA durante 5 min. A letra (a) representa a significância quando comparado ao controle; a letra (b) representa a significância quando comparado ao grupo PST 10 mg/kg; a letra (c) representa a significância quando comparado ao grupo diazepam 1 mg/kg. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Figura 12: Efeito dos PST, Diazepam e Flumazenil sobre a percentagem no tempo de permanência nos braços abertos no teste de LCE em camundongos.



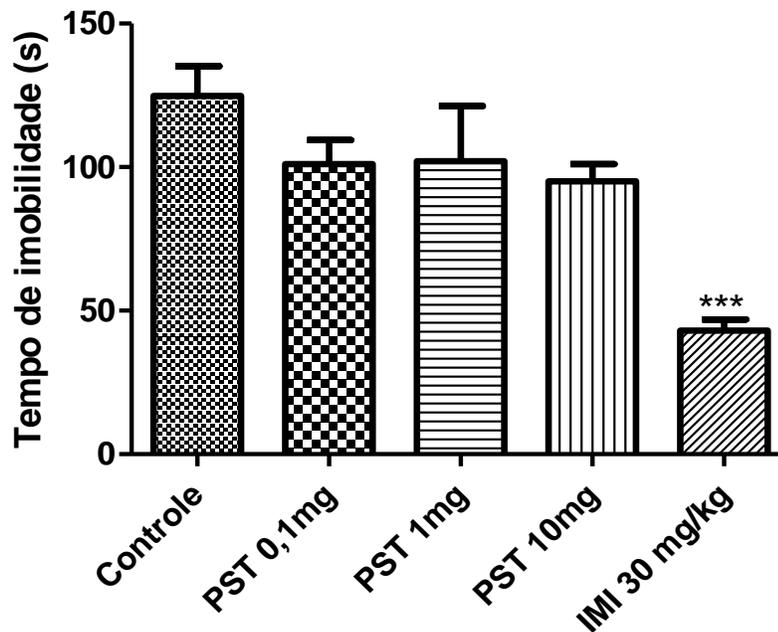
Controle (veículo), PST (0,1, 1 ou 10 mg/kg) e diazepam (2 mg/kg) e flumazenil (2 mg/kg) foram administrados 30 min antes do experimento, flumazenil foi pré-tratado 15 min antes da associação com PST (10 mg/kg) ou DZP (2 mg/kg). Os valores representam a média \pm EPM do PTBA durante 5 min. A letra (a) representa a significância quando comparado ao controle; a letra (b) representa a significância quando comparado ao grupo PST 10 mg/kg; a letra (c) representa a significância quando comparado ao grupo diazepam 1 mg/kg. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos (***) $p < 0,001$.

4.3 Avaliação da Atividade Antidepressiva:

4.3.1 Teste da Suspensão de Cauda

Os resultados decorrentes do tratamento agudo dos polissacarídeos sulfatos totais extraídos da *Gracilaria cornea* mostrou não ter alteração significativa na imobilidade dos animais nas três doses utilizadas [PST 0,1 mg/kg: $101,0 \pm 8,4$ (7); PST 1 mg/kg: $102,0 \pm 19,3$ (8); PST 10 mg/kg: $95,5 \pm 5,9$ (11)] quando comparado ao controle [controle: $124,8 \pm 10,3$ (10)] (Figura 13). A imipramina (30 mg/kg, i.p.), utilizada como controle positivo, reduziu o tempo de imobilidade [IMI 30 mg/kg: $43,0 \pm 3,8$ (6)] em relação ao controle.

Figura 13: Efeito dos PST e Imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste da suspensão de cauda em camundongos.

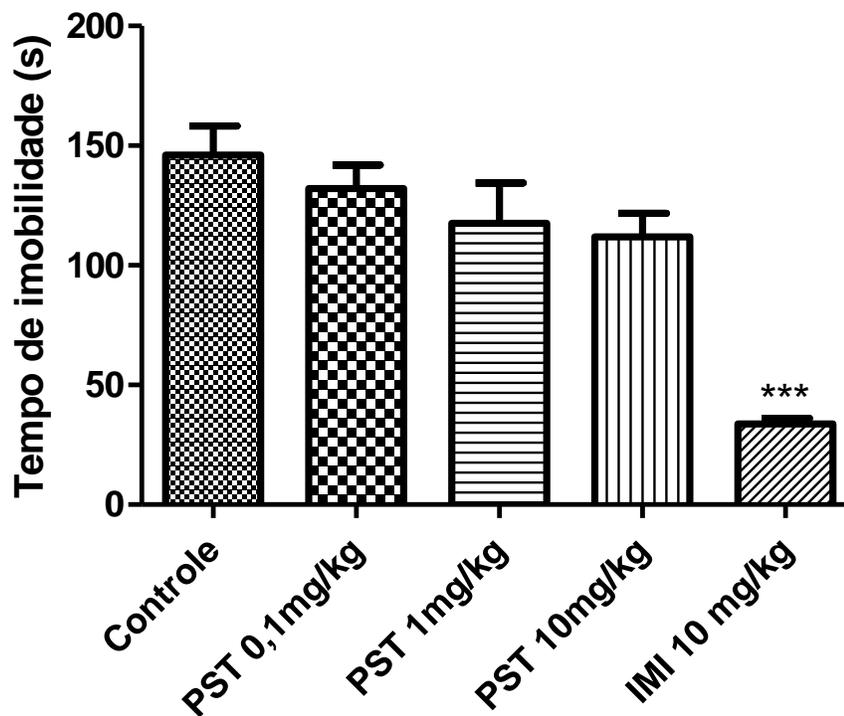


Controle (veículo), PST (0,1, 1 ou 10 mg/kg) e imipramina (30 mg/kg) foram administrados 30 min antes do experimento. Os valores representam a média ± EPM sobre o tempo de imobilidade dos animais, durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valor significativo (***) $p < 0,001$.

4.3.2 Teste do Nado Forçado

Nesse teste os PST nas doses utilizadas, também não alteraram o tempo de imobilidade dos animais quando comparados ao controle [controle: $146,0 \pm 12,1$ (6)]. Já a imipramina (10 mg/kg), utilizada como controle positivo, diminuiu significativamente esse parâmetro quando comparada ao controle [IMI 10 mg/kg: $33,7 \pm 2,2$ (9)] (Figura 14).

Figura 14: Efeito dos PST e Imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste de nado forçado em camundongos.



Controle (veículo), PST (0,1, 1 ou 10 mg/kg) e imipramina (10 mg/kg) foram administrados 30 min antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM sobre o tempo de imobilidade dos animais, durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valor significativo (***) $p < 0,001$.

5 DISCUSSÃO

A literatura tem demonstrado estudos relatando que vários tipos de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas apresentam resultados promissores a níveis de sistema nervoso central. Dentre esses estudos podemos destacar as atividades neuroantioxidante (WIJESEKARA *et al.*, 2010), neuroinflamatória (CUI *et al.*, 2010) e neurotóxica e neuroprotetora (LUO *et al.*, 2009). Entretanto, estudos relacionados as desordens neurocomportamentais, tais como ansiedade e depressão, ainda não foram descritos para polissacarídeos sulfatados de algas.

Diversos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas descritos na literatura têm apresentado efeitos anti-inflamatórios, e pesquisas recentes mostram que polissacarídeos que apresentaram este efeito, também foram capazes de apresentar efeitos neuroprotetores em modelos experimentais de animais, principalmente através da modulação negativa de processos neuroinflamatórios e inibição da morte de células neurais (PANGESTUTI; KIM, 2011; GAO *et al.*, 2012). Em estudos realizados com os PST da alga *G. cornea* Coura *et al.*, (2012) demonstraram que os referidos polissacarídeos além de apresentarem um efeito anti-inflamatório, mostraram possuidores de uma ação antinociceptiva a nível de SNC. Portanto, é de grande interesse dar continuidade os estudos relacionados aos distúrbios neurocomportamentais com essas moléculas, a fim de contribuir para elucidação dos mecanismos envolvidos nessas doenças que afetam milhares de pessoas no mundo.

Neste estudo, os efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais extraídos da alga *G. cornea* foram observados em vários modelos neurocomportamentais em animais, como campo aberto, *rota rod*, labirinto em cruz elevada, placa perfurada, nada forçado e suspensão de cauda. Estes testes são empregados como *screening* de efeitos no sistema nervoso central, fornecendo portanto, informações sobre as atividades locomotora, ansiolítica e antidepressiva.

Nos modelos de ansiedade, placa perfurada e labirinto em cruz elevada, o efeito dos PST da alga *G. cornea* foi comparado ao diazepam na dose de 1 mg/kg. Nos testes do campo aberto e *rota rod*, que tem por finalidade avaliar a atividade locomotora e o relaxamento muscular do animal, respectivamente, a dose do diazepam utilizada em comparação aos PST foi de 2 mg/kg. Enquanto, para a avaliação da atividade antidepressiva nos modelos de suspensão de cauda e nada forçado, utilizou-se imipramina 30 e 10 mg/kg, respectivamente, em comparação aos efeitos dos PST.

O teste de campo aberto é empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar da tensão e do conflito causado por este ambiente (MONTGOMERY, 1958). Dessa forma, a locomoção, o *rearing* e o *grooming* em roedores são os parâmetros comportamentais mais usados para descrever influências da vida ou da administração de drogas no SNC (ARAKAWA; IKEDA, 1991; REX, STEPHENS, FINK, 1996), possibilitando, também, discutir a especificidade do efeito de uma droga, caso ela seja estimulante, sedativa, ansiolítica ou ansiogênica (LISTER, 1987).

Neste estudo, os resultados no teste de campo aberto mostraram que somente os PST (10 mg/kg), apresentaram efeito de aumentar a atividade locomotora quando comparado ao controle. Estes resultados sugerem uma ação excitatória sobre o SNC e um efeito ansiolítico. Dados na literatura demonstram que o aumento ou diminuição na locomoção espontânea do animal, dá uma indicação do nível de excitabilidade do SNC, podendo, assim, ser utilizado como medida para o nível de ansiedade (MANSUR; MARTZ; CARLINI, 1971; CRAWLEY, 1985; PELLOW, 1985). E, essa atividade locomotora envolve principalmente a ação do sistema dopaminérgico na área cerebral do corpo estriado, cuja região está relacionada com o movimento do animal (NORONHA, 2006).

Estudos com *rearing* estão voltados a avaliação do aspecto de comportamento exploratório (JOHANSSON; AHLENIUS, 1998), enquanto que o aumento de *grooming* é observado em roedores apreensivos (ARCHER, 1973). Tem sido relatado em vários estudos que drogas ansiolíticas reduzem o número de *grooming* no campo aberto (DUNN *et al.*, 1981; MOODY; MERALI; CRAWLEY, 1993; BARROS *et al.*, 1994). Neste trabalho, os resultados obtidos mostraram que houve um aumento no número de *rearing*, confirmando desta maneira que os PST estão envolvidos com o comportamento exploratório, no entanto, nenhum efeito foi observado no número de *grooming*.

A coordenação motora é um comportamento complexo e pode refletir no equilíbrio e na força muscular. A utilização de testes neurocomportamentais fica prejudicada quando existe dificuldade no desempenho motor do animal. Para observar se os PST de *G. cornea* causavam alguma alteração no equilíbrio dos animais, foi realizado o teste do *rota rod*, que consiste em uma barra giratória, proposto por Dunham & Miya, (1957), que mede o efeito de relaxamento muscular ou incoordenação motora (CARLINI; BURGOS, 1979), onde quanto mais intenso for o efeito, menor será o tempo em que o animal consegue se equilibrar sobre a barra. No entanto,

esse teste é um método não-específico, uma vez que mede indistintamente, efeitos neurológicos, estimulantes e depressores sobre a coordenação motora, aos quais também denominam-se o termo neurotoxicidade (DALLMEIER; CARLINI, 1981). Os PST de *G. cornea* não alteraram a coordenação motora dos animais no teste do rota *rod* nas doses utilizadas, diferentemente do diazepam (2 mg/kg, efeito relaxante muscular nessa dose), que aumentou o número de quedas e diminuiu o tempo de permanência na barra. Esses resultados sugerem que os efeitos dos PST são exercidos a nível central, pois não houve alteração a nível neuromuscular periférico.

Para a descoberta de novos fármacos com ação ansiolítica, modelos de animais são de extrema importância. Dentre os modelos temos o teste da placa perfurada e o teste do labirinto em cruz elevada. O teste da placa perfurada foi estudado para explorar o potencial ansiolítico dos PST da *G. cornea* através do comportamento exploratório dos roedores (FILE; WARDILL, 1975). O número de vezes que o animal coloca a cabeça no orifício 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, aumentam o número de *head dips* em camundongos, enquanto seus antagonistas o reduzem (CRAWLEY, 1985; TAKEDA *et al.*, 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 dips*, os resultados deste estudo forneceram evidências de que os PST de *G. cornea* (10 mg/kg), apresentaram efeito ansiolítico, pois mostrou aumento deste comportamento.

O teste do labirinto em cruz elevada baseia-se no fato de que os roedores têm aversão a lugares abertos e elevados (MONTGOMERY, 1958). Neste modelo, os animais geralmente restringem a maioria de suas atividades aos braços fechados. Uma atividade relativamente baixa nos braços abertos é indicativa de ansiedade. No entanto, o LCE é o modelo mais popular para pesquisas de novos agentes ansiolíticos com ação semelhante aos benzodiazepínicos (PELOW *et al.*, 1985; BARBOSA *et al.*, 2008). Este modelo experimental é muito sensível para determinar a influência do receptor gabaérgico no processo de ansiedade, pois, roedores submetidos ao tratamento com ansiolíticos como, por exemplo, diazepam cruzam mais vezes pelos braços abertos e permanecem mais tempo nestes braços quando comparados aos animais controle (ZANGROSSI JR., 1997). Por outro lado, drogas como buspirona, que atua em receptores serotoninérgicos, apresenta resultados muito variáveis em relação a este teste.

No presente estudo, o LCE foi usado para confirmar o efeito ansiolítico dos PST da alga *G. cornea*, sugerido pelo teste de campo aberto e evidenciado no teste da placa perfurada. A alteração comportamental observada, após a administração dos PST, no modelo LCE mostraram que os PST (10 mg/kg), reduziram a aversão dos animais aos braços abertos, pois aumentou todos os parâmetros observados. Assim, nossos resultados mostraram que os PST na dose de 10 mg/kg apresentam um efeito ansiolítico tanto no teste da placa perfurada quanto no teste do labirinto em cruz elevada.

Agentes ansiolíticos aumentam e agentes ansiogênicos reduzem a entrada e o tempo gasto nos braços abertos do LCE (PELLOW *et al.*, 1985). De fato, trabalhos anteriores mostram que o flumazenil, antagonista competitivo do receptor GABAA/benzodiazepínico, preveniu os efeitos ansiolíticos do diazepam no LCE (KURIBARA; MARUYAMA, 1996; KURIBARA *et al.*, 1998; LUSCOMBE *et al.*, 1991). Com a finalidade de investigar o mecanismo de ação do efeito ansiolítico dos PST de *G. cornea* (10 mg/kg), 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). Os resultados mostraram que o flumazenil reverteu o efeito ansiolítico dos PST em todos os parâmetros analisados, do mesmo modo que reverteu os efeitos do diazepam, sugerindo assim, que os PST apresentam efeito ansiolítico e este efeito parece estar relacionado com o sistema gabaérgico, mais especificamente envolvido com os receptores GABA_A/Benzodiazepínico.

Assim, nossos resultados sugerem que os PST (10 mg/kg.), tratados de forma aguda, apresentam ação ansiolítica e conseqüentemente apresentam um potencial terapêutico como fármaco para ansiedade.

Vários trabalhos científicos mostram que a ansiedade tem relação direta com os sintomas da depressão (humor e distúrbio do pânico) (SIMON *et al.*, 2003; SIMON *et al.*, 2005; TAYLOR *et al.*, 1996). Diante do exposto, resolvemos investigar se os PST da alga *G. cornea* apresentam, também, alguma ação antidepressiva. Os modelos animais de depressão são tipicamente baseados na exposição de animais a condições estressantes (situação ameaçadora) e, existem vários testes específicos para medir as respostas comportamentais e psicológicas, como o da suspensão de cauda e nado forçado. Esses testes são bastante sensíveis e relativamente específicos para as maiorias das classes de drogas antidepressivas, incluindo, os antidepressivos tricíclicos, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, os inibidores da MAO

(monoamina oxidase) e os atípicos (STERU *et al.*, 1985; DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995; PORSOLT; ANTON; JALFRE, 1987).

O fenômeno comportamental observado nesses testes parece ser resultado da exposição a uma situação inescapável, onde o animal divide seu comportamento em períodos de atividade vigorosa (tentativa de escapar) e de imobilidade (comportamento de espera) (STERU *et al.*, 1985). No teste do nado forçado, o animal é colocado em um recipiente com água onde é impossível escapar, já no modelo de suspensão de cauda, o animal é preso pela cauda onde, também, não há forma de sair dessa situação. 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 (GARDIER *et al.*, 2001), é bem demonstrado que drogas com atividades depressivas aumentam o tempo de imobilidade do animal. (PORSOLT; ANTON; JALFRE, 1987; FERNANDEZ-TERUEL *et al.*, 1990). O teste do nado forçado é 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; ANTON; JALFRE, 1987).

Os resultados deste trabalho mostraram que os PST da alga *G. cornea* não alteraram o tempo de imobilidade dos animais, tanto no teste de suspensão de cauda como no teste do nado forçado. Assim, os PST são desprovidos de atividade antidepressiva.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- No teste do campo aberto, os PST (10mg/kg) aumentaram a atividade locomotora espontânea e o rearing nos animais, sugerindo uma ação excitatória e um efeito ansiolítico.
- No teste Rota rod, a coordenação motora dos animais não foi alterada, mostrando que os efeitos dos PST no campo aberto não estão relacionados com o bloqueio neuromuscular periférico, mas com ação central.
- No teste da placa perfurada e LCE, os PST (10 mg/kg) comprovou seu efeito ansiolítico, sendo assim, esse é o primeiro relato com polissacarídeos sulfatados nessa desordem neurocomportamental.
- O mecanismo de ação ansiolítico dos PST provavelmente está relacionado com o receptor Gabaérgico/benzodiazepínico, visto que seu efeito ansiolítico foi revertido pelo flumazenil.
- Os PST não apresentaram efeitos antidepressivos, nos testes estudados.

7 CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu concluir que os polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha *G cornea* apresentam um efeito ansiolítico no Sistema Nervoso Central na maior dose testada (10 mg/kg i.p.) estando provavelmente relacionados com o sistema gabaérgico. No entanto, mostraram-se desprovidos de atividade antidepressiva.

Assim, um aprofundamento nos estudos com esses polissacarídeos sulfatados seria importante, pois poderia ser uma perspectiva para sua posterior utilização na indústria farmacêutica.

REFERÊNCIAS

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 2, n. 1, p. 367-373, 2000.

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 affect on single and paired rat open-field behavior. **Physiol. Behav.**, v. 50, p. 189-194, 1991.

ARBORELIUS, L.; OWENS, M. J.; PLOTSKY, P. M.; NEMEROFF, C. B. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. **J Endocrinol.**, n. 160, p. 1-12, 1999.

ARCHER, J. Test for emotionality in rat and mice. A review. **Anim. Behav.**, v. 21, p. 205-235, 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. Brupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity. **J. Clin. Psychiatry**, v. 56, p. 395-401, 1995.

ASSREUY, A. M. S. GOMES, D. M.; SILVA, M. S. J. TORRES, V. M.; SIQUEIRA, R.C. L.; PIRES, A. F.; CRIDDLE, D. N.; ALENCAR, N. M. N.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. **Biol. Pharm. Bull.**, v.31, n.4, p.691-695, 2008.

BASLOW, M. H. **A study of toxins and other biological active substances of marine origin.** In: **Marine Pharmacology.** Baltimore, Wiliams & Wilkins. Co; 286 pp. 1969.

BARBOSA, P. R.; VALVASSORI, S. S.; BORDIGNON Jr, C. L.; KAPPEL, V. D.; MARTINS, M. R.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J.; REGINATTO, F. H. *et. al.* The Aqueous Extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. **J. Med. Food**, v. 11, n. 2, p. 282-288, 2008.

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

BARROW, C.; SHAHIDI, F. Marine nutraceuticals and functional foods. New York, USA: CRC Press, 2008.

BERNHEIMER, H.; BIRKMAYER, W.; HORNYKIEWICZ, O.; JELLINGER, K.; SEITELBERGER, F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. **J. Neurol. Sci.**, v. 20, p. 415–455, 1973.

BIRD, C. J.; OLIVEIRA, E. C.; MCLACHLAN, J. *Gracilaria cornea*, the correct name for the western Atlantic alga hitherto known as *G. debilis* (Rhodophyta, Gigartinales). **Can. J. Bot.** v. 64, p. 2045-2051, 1986.

BLANCHARD, C. D.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci Biobehav.**, v. 25, p. 205-218, 2001.

BORMANN, J., “The “ABC” of GABA receptors,” **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, p. 16-19, 2000.

BOWERY, N. G. GABA_B receptor pharmacology. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 33, p. 109-147, 1993.

BROWN, A. S.; GERSHON, S. Dopamine and depression. **J. Neural Transm. Gen. Sect.**, v. 91, p. 75-109, 1993.

CARLINI, E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.

CAMPOS, V. L.; KAWANO, D. F.; SILVIA, D. B.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review. **Carbohydr. Polym.**, v. 77, n. 2, p. 167-180, 2009.

CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. **Int. J. Pharm.**, v. 242, p. 259-262, 2002.

CHOTIGEAT, W.; TONGSUPA, S.; SUPAMATAYA, K.; PHONGDARA, A. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**, v. 233, p. 23-30, 2004.

CLARK, G.; KOSTER, A. G.; PERSON, D. W. **Psychopharmacology**, v. 20, p. 169-171, 1971.

COURA, C. O.; ARAÚJO, I. W. F.; VANDERLEI, E. S. O.; RODRIGUES, J. A. G.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; MENEZES, D. B.; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J. B.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Sulphated Polysaccharides from the Red Seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 110, p. 335-341, 2012.

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

CUI, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, T.; LUO, D.; JIA, Y.; GUO, Z.; ZHANG, Q.; WANG, X.; WANG, X.M. Inhibitory effect of fucoidan on nitric oxide production in lipopolysaccharide activated primary microglia. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v.37, p. 422-428, 2010.

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

DAVIS, T. A., VOLESKY, B., MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. **Water Res.** v. 37, p. 4311-4330, 2003.

DAWES, C.J.; ORDUÑA-ROJAS, J.; ROBLEDO, D. Response of the tropical red seaweed *Gracilaria cornea* to temperature, salinity and irradiance. **J. Appl. Phycol.**, v.10, p. 419-425, 1999.

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

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, n.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.

ERREA, M. I.; MATULEWICZ, M. C. Unusual structures in the polysaccharides from the red seaweed *Pterocladia capillacea* (Gelidiaceae, Gelidiales). **Carbohydr. Res.**, v. 338, p. 943-953, 2003.

ESPINOZA-AVALOS, J.E.; HERNÁNDEZ-GARIBAY, E.; ZERTUCHE-GONZÁLEZ, J. A.; CASTILLO, M. E. M. Agar from two coexisting species of *Gracilaria* (Gracilariales) from the Mexican Caribbean. **Ciências Marinas**, v. 29, p. 211-218, 2003.

EVANS, D. L.; CHARNEY, D. S.; LEWIS, L.; GOLDEN, R. N.; GORMAN, J. M.; KRISHNAN, K. R., et al. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. **Biol. Psychiatry.**, v. 58, n. 3, p. 175-189, 2005.

FARIAS, W.R.L.; VALENTE, A.P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans. **J. Biol. Chem.**, v.275, n. 38, p.29299-29307, 2000.

FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S. QUENZER, L. F. Catecholamines. In: _____ . **Principles of neuropsychopharmacology**. Suderland, Mass: Sinauer Associates, p. 277-344, 1997.

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

FONSECA, R.J.C.; OLIVEIRA, S. N. M. C. G.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MOURÃO, P. A. S. Slight differences in sulfation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thromb. Haemost.** v.99, n. 03, p.539-545, 2008.

GAO, Y.; LI, C.; YIN, J.; SHEN, J.; WANG, H.; WU, Y.; JIN, H. Fucoidan, a sulfated polysaccharide from brown algae, improves cognitive impairment induced by infusion of AB peptide in rats. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 33, n. 2, p. 304-311, 2012.

GARAKANI, A. M. D; MATHEUS, S. J. M. D.; CHARNEY, D. S. M.D. Neurobiology of Anxiety. Disorders and Implications for treatment. **Mount Sinai J. Med.**, v.73, p. 941-949, 2006.

GEDENNE, V.; LEBRUN, L.; JOUENNE, T.; THEBAULT, P. Antiadhesive activity of ulvan polysaccharides covalently immobilized onto titanium surface. **Colloids Surf B Biointerfaces.** v. 112, p. 229-236, 2013.

GILDENGERS, A. G.; WHYTE, E. M.; DRAYER, R. A.; SORECA, I.; FAGIOLINI, A.; KILBOURNE, A. M.; et al. Medical burden in-life bipolar major depressive disorders. **Am. J. Geriatr. Psychiatry.**, v. 16, n. 3, p. 194-200, 2008.

GOLAN, D. E. **Princípios de Farmacologia. Farmacologia da Neurotransmissão GABAérgica e Glutamatérgica. Guanabara Koogan**, 3ª edição, 2009.

GOODWIN, F. K.; BUNNEY, J. R. W. E. Depression following reserpine: are-evaluation. **Semin. Psychiatry**, v. 3, n. 4, p. 435-448, 1971.

GUZMÁN-URIÓSTEGUI, A.; ROBLEDO, D. Factors affecting sporulation of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) carposporophytes from Yucatan, Mexico. **Hydrobiologia**, v. 398/399, p. 285-290, 1999.

GUIMARÃES, M; PLASTINO, E. M.; OLIVEIRA, E. C. The life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophuta) from Brazil. **Botanica marina**, v. 42, p. 481-482, 1999.

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

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, S. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. **Mar. Drugs.**, v.9, n. 2, p. 196-223, 2011.

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. Neuropharmacol.**, v. 10, n. 4, p. 223-228, 2000.

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

JOHNSTON, G. A. R. GABA_A antagonists. **Seminars in Neuroscience**, v. 3, p. 205-210, 1991.

JOLY, A. B. Flora marinha do litoral norte do Estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo**, série Botânica, v. 21, n. 294, p. 5- 393, 1965.

KALUEFF, A. V.; MURPHY, D. L. The Importance of cognitive phenotypes in experimental modeling of animal anxiety and depression. **Neural Plasticity** 2007.

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

KNOL, M. J.; TWISK, J. W.; BEEKMAN, A. T.; HEINE, R. J.; SNOEK, F. J.; POWWER, F. Depression as a risk factor for the onset type 2 diabetes millitus. A meta-analysis. **Diabetologia**, v. 49, n. 5, p. 837-845, 2006.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. *Nature*, v. 445, p. 894-902, 2008.

KURIBARA, H.; MARUYAMA, Y. The anxiolytic effect of oriental herbal medicines by na improved plus maze test in mice: involvement of benzodiazepine receptors. **Jpn. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 18, p. 179-190, 1996

KURIBARA, H.; STAVINOHA, W. B.; MARUYAMA, Y. Behavioral pharmacological characteristics of honokiol, na anxiolytic agent in extracts of magnólia bark, evaluated by na elevated plus maze test in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 50, p. 819-826, 1998.

LAHAYE, M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physicochemistry. **J. Appl. Phycol.**, v. 13, p. 597-652, 2001.

LAHAYE, M.; ROCHAS, C. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. **Hydrobiol.** V. 221, p. 137-148, 1991.

LEE, H.; DO, H.; LEE, S.; SOHN, E.; PYO, S.; SON, E. Effects of Fucoïdan on Neuronal Cell Proliferation: Association with NO Production through the iNOS Pathway. **J. Food. Sci. Nutr.**, v. 12, p. 74-78, 2007.

LEITE, E. L.; MEDEIROS, M.G.L.; ROCHA, H. A. O.; FARIAS, G. G. M.; SILVA, L. F.; CHAVANTE, S. F.; ABREU, L. D.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schröderi*. **Plant. Sci.**, v. 132, n. 2, p. 215-228, 1998.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios**: conceitos fundamentais de neurociências. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004.

LEON, R. E. R. Experimental cultivation of an agarophyte alga: *Gracilaria cornea* in the northwest coast of Venezuela. **In Cultivation of seaweed in Latin America** (E.C. Oliveira & N.Kautzky, eds) Workshop – Universidade de São Paulo/ International Foundation for Science, São Sebastião, p65-67, 1990.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 29, p. 180-185, 1987.

LLOYD, C. Life events and depressive disorders reviewed. Events as precipitating factors. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 37, p. 541-548, 1980.

LUO, D.; ZHANG, Q.; WANG, H.; CUI, Y.; SUN, Z.; YANG, J.; ZHENG, Y.; JIA, J.; YU, F.; WANG, X. Fucoïdan protects against dopaminergic neuron death in vivo and in vitro. **Euro. J. Pharmacol.**, v. 617, p. 33–40, 2009.

LUSCOMBRE, G. P.; MAZURKIEWICZ, S. E.; BUCKETT, W. R. Flumazenil antagonizes the anxiolytic effect of chlordiazepoxide, buspirone and dothiepin in the elevated plus maze. **Br. J. Pharmacol.**, v. 104, p. 216, 1991.

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. Effect of acute and chronic administration of cannabis sativa and (-) 9- *trans* tetrahydrocannabinol on the behaviour of rats in open field arena. **Phytopharmacology**, v. 19, p. 338-397, 1971.

MAO, Q. Q.; IP, S. P.; TSAI, S. H.; CHE, C. T. Antidepressant-like effect of peony glycosides in mice. **J. Ethopharmacol.**, v. 119, n. 2, p. 272-275, 2008.

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.

MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C.; CARDOSO, M. L.; MONTEIRO, G. R.; OLIVEIRA, F. W.; CHAVANTE, S. F.; GUIMARÃES, L. A.; ROCHA, H. A.; LEITE. Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: anticoagulant and anti-inflammatory properties. **Biochem (Mosc.)**, v. 73, p. 1018-1024, 2008.

MELO, K. R., CAMARA, R. B., QUEIROZ, M. F., JACOME, V. A. A., LIMA, C. R., MELO-SILVEIRA, R. F., ALMEIDA-LIMA J., ROCHA, H. A. Evaluation of sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Dictyopteria justii* as antioxidant agents and as inhibitors of the formation of calcium oxalate crystals. **Molecules**, v. 18, p. 14543-14563, 2013.

MELO, M. R. S.; FEITOSA, J. P. A.; FREITAS, A. L. P.; PAULA, R. C. M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydr Polym.**, v. 49, n. 4, p. 491-498, 2002.

MIRANDA, G. E. C. Avaliação do impacto da exploração da alga agarófita *Gracilaria caudata* J. Agardh (Rhodophyta) no litoral do estado da Paraíba. **Dissertação de mestrado**. Universidade São Paulo. São Paulo. 160p, 2000.

MORANO, P. E.; BRIAND, X. Excessive Growth of Macroalgae: a symptom of environmental disturbance. **Botanica Marina**. v. 39, 1991.

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

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.

NA, Y. S.; KIM, W. J.; KIM, S. M.; PARK, J. W.; LEE, S. M.; KIM, S. O. Purification, characterization and immune stimulant activity of a water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. **Int Immunopharmacol.**, v. 10, p. 364-370, 2010.

NANDINI, C. D.; MIKAMI, T.; OHTA, M.; ITOH, N.; AKIYAMA-NAMBU, F.; SUGAHARA, K. Structural and Functional Characterization of Oversulfated Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate Hybrid Chains from the Notochord of Hagfish. **J. Bio. Chem.**, v. 279, n. 49, p. 50799-50809, 2004.

NORONHA, E. C. Ação de drogas agonistas e antagonistas dos sistemas colinérgicos e dopaminérgicos: estudo comportamental e neuroquímico em corpo estriado de rato. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 170p, 2006.

OLIVEIRA, E. C.; MIRANDA, G. E.C. Aspectos sociais e econômicos da exploração de algas marinhas no Brasil. **In: congresso latinoamericano de Ficologia**, v. 5, p. 138-156, 1998.

PAINTER, T. J., in ASPINALL, G.O. (Ed.) **Algal polysaccharides**, Academic Press, New York, v. 2, p. 195-285, 1983.

PANGESTUTI, R.; KIM, S. Neuroprotective Effects of Marine Algae. **Mar. Drugs**, v. 9, p. 803-818, 2011.

PATERSON, A.; WHITTING, P. J.; GRAY, J. A.; FLINT, J.; DAWSON, G. R. Lack of consistent behavioural effects of Maudsley reactive and non-reactive rats in a number of animal tests of anxiety and activity. **Psychopharmacol.**, v.154, p. 336-342, 2001.

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, n. 3, p. 149-167, 1985.

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

PHELPS, E. A.; LeDOUX, J. E. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. **Neuro**, v. 48, p. 175-187, 2005.

PLASTINO, E. M.; OLIVEIRA, E. C. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical south American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. **Phycologia**, v. 41, p. 389-396, 2002.

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

QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; VANDERLEI, E. S. O.; QUEIROZ, I. N. L.; RODRIGUES, J. A. G.; ARAÚJO, I. W. F.; JORGE, R. J. B.; MENEZES, D. B.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Peripheral antinociception and anti-edematogenic effect of a sulfated polysaccharide from *Acanthophora muscoides*. **Pharmacology. Res.**, v. 65, p. 600-613, 2013.

RABANAL, M., PONCE, N. M., NAVARRO, D. A., GÓMEZ, R. M., STORTZ, C. A. The system of fucoidans from the brown seaweed *Dictyota dichotoma*: Chemical analysis and antiviral activity. **Carbohydr Polym.**, v. 101, p. 804-811, 2014.

RABBANI, M.; SAJJADI, S. E.; MOHAMMADI, A. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss. In mice. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 5, n. 2, p. 181-186, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

RAVEN P.H.; EVERT R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7 th ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2007.

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.

ROBERTS, E. In: **GABA in Nervous System Function**. Roberts E., Chase T. N. And Tower D.B., Raven Press, New York, p. 1-6, 1996.

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

RODRIGUES, J.A.G.; VANDERLEI, E. S. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B.P.; BENEVIDES, N. M. B. Polissacarídeos sulfatados isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* – extração, fracionamento e atividade anticoagulante. **Acta. Sci. Biol. Sci.**, v. 32, n. 2, p. 113-120, 2010a.

RODRIGUES, J. A. G.; ARAÚJO, I. W. F.; PAULO, G. A.; BESSA, E. F.; LIMA, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. Isolamento, fracionamento e atividade anticoagulante de iotacarragenanas da *Soliliera filiformis*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2310-2316, 2010b.

RODRÍGUEZ, M. C.; MATULEWICZ, M. C.; NOSEDA, M. D.; DUCATTI, D. R. B.; LEONARDI, P. I. Agar from *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) of the Patagonic coast of Argentina – Content, structure and physical properties. **Bioresour Technol.**, v. 100, p. 1435-1441, 2009.

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, n. 3, p. 313-315, 1993.

RUPEREZ, P.; AHRAZEM, O.; LEAL, A. Potential antioxidant capacity of sulphated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 840-845, 2002.

SANGE, D. J. Animal models of anxiety and the screening and development of novel anxiolytic drugs in Boulton A, Barker G and Martin-Iverson M (eds.) **Neuromethods**, v.19, animal models in Psychiatry, II, 1991.

SATO, Y.; NAKANISHI, K.; TOKITA, Y.; KAKIZAWA, H.; IDA, M.; MAEDA, H.; MATSUI, F.; AONO, S.; SAITO, A.; KURODA, Y.; KAYAKAWA, M.; KOJIMA, S.; OOHIRA, A. A highly sulfated chondroitin sulfate preparation, CS-E, prevents excitatory amino acid-induced neuronal cell death. **J. Neurochem.** v. 104, p. 1565-1576, 2008.

SHENG, X.; ZHANG, N.; SONG, S.; LI, M.; LIANG, H.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; JI, A. Morphological transformation and proliferation of rat astrocytes as induced by sulfated polysaccharides from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. **Neurosciences Letters**, v. 503, p. 37-42, 2011.

SHERRILL, J. T.; ANDERSON, B.; FRANK, E.; REYNOLDS, C.; TU, X. M.; PATTERSON, D.; RITENOUR, A.; KUPFER, D. J. Is life stress more likely to provoke depressive disorders in women than in men? **Depress Anxiety**, v. 6, n. 3, p. 395-405, 1997.

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

SINHA, R. P.; KLISCH, M.; GRONIGER, A.; HADER, D. P. Mycosporine-like amino acids in the marine red algae *Gracilaria cornea*: effects of UV and heat. **Environ. Exp. Bot.**, v.43, p. 33-43, 2000.

SILVA, F. R. F.; DORE, C. M. P. G.; MARQUES, C. T.; NASCIMENTO, M. S.; BENEVIDES, N. M. B.; ROCHA, H. A. O.; CHAVANTE, S. F.; LEITE, E. L. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans. **Carbohyd. Polym.**, v. 79, n. 1, p. 29-33, 2010.

SILVILOTTI, L.; NISTRI, A. GABA receptor mechanisms in the central nervous system. **Prog. Neurobiol.**, v. 36, p. 35-92, 1991.

SIMON, N. M.; SMOLLER, J. W.; FAVA, M.; SACHS, G.; RACETTE, S. R.; PERLIS, R.; SONAWALLA, S.; ROSENBAUM, J. F. Comparing anxiety disorders and anxiety-related traits in bipolar disorder and unipolar depression. **Journal of Psychiatric Res.**, v. 37, p. 187-192, 2003.

SIMON, N. M.; OTTO, M. W.; FISCHMANN, D.; RACETTE, S.; NIERENBERG, A. A.; POLLACK, M. H.; SMOLLER, J. W. Panic disorder and bipolar disorder: Anxiety sensitivity as a potential mediator of panic during manic states. **Journal of Affective Disorders.**, v. 87, p. 101-105, 2005.

SIMONATO, M.; BENNETT, J.; BOULIS, N. M.; CASTRO, M. G.; FINK, D. J.; GOINS, W. F.; GRAY, S. J.; LOWENSTEIN, P. R.; VANDENBERGHE, L. H.; WILSON, T. J.; WOLF, J. H.; GLORIOSO, J. C. Progress in gene therapy for neurological disorders. **Nature Ver. Neurology.** v.9, p. 277-291, 2013.

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

STRUB, R. L.; BLACK, F. W. Organic Brain Syndromes: An Introduction to Neurobehavioral Disorders. **J Neuro Neurosurg Psychiatry.**, v. 44, p. 858, 1981.

STORTZ, C. A.; CASES, M. R.; CEREZO, A. S. The system of agaroids and carrageenans from the soluble fraction of the tetrasporic stage of the seaweed *iridea undulosa*. **Carbohydr. Res.**, v. 34, p. 61-65, 1997.

STORTZ, C.A., CEREZO, A.S. Novel findings in carrageenans, agaroids and “hybrid” red seaweed galactans. **Current Topics in Phytochemistry**, v.4, p.121-134, 2000.

SYNYTSYA, A.; KIM, W. J.; KIM, S.M.; POHL, R.; SYNYTSYA, A.; KVASNICKA, F. et. al. Structure and antimumor activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean seaweed *Undaria pinnatifida*. **Carbohydr. Polym.**, v. 81. p. 41-48, 2010.

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

TAYLOR, S.; HOCH, W. J.; WOODY, S.; McLEARN, P. Anxiety sensitivity and depression: How are they related? **Journal of Abnormal Psychology.**, v. 105, p. 474-479, 1996.

TURK, S.S.; SCHNEIDER, R. Printing properties of a high substituted guar gum and its mixture with alginate. **Dye Pigment.**, v. 47, p. 269-275, 2000.

USOV, A. I.. NMR Spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carragenans and xylans. **Bot Mar**, v.27, p. 189-202, 1984.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae. An introduction to phycology.** Cambridge University Press, Cambridge, p. 627, 1999.

VAN DE VELDE, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMA, H. S. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 2309-2313, 2004.

VANDERLEI, E. S.; ARAÚJO I. W.; QUINDERE, A. L.; FONTES, B. P.; ELOY, Y. R.; RODRIGUES, J. A.; SILVA, A. A.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J.; MENEZES, D. B.; EVANGELISTA, J. S.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflamm. Res.**, v. 60, p.1121–1130, 2011.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p.139-145, 2004.

VILLANUEVA, R. D.; ROMERO, J. B.; RAGASA, A. L. R.; MONTAÑO, M. N. E. Agar from the red seaweed, *Laurencia flexilis* (Ceramiales, Rhodophyta) from northern Philippines. **Phycol. Res.**, v. 58, p. 151-156, 2010.

WANG, Y.F; ZHANG, L.N; LI, Y.Q; HOU, X.H; ZENG, F.B. Correlation of structure to antitumor activities of five derivatives of a β -glucan from *Poria cocos* sclerotium. **Carboh. Res.**, v.339, n.15,p.2567-2574, 2004.

WIDLÖCHER, D. J. Psychomotor retardation: clinical, theoretical and psychometric aspects. **Psychiatric Clinics of North América**, v. 6, p. 27-40,1983.

WIJESEKARA, I.;KIM, S. K. Angiotensin-I-convertingenzyme (ACE) inhibitors from marine sources: Prospects is the pharmaceutical industry. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1080-1093, 2010.

YANG, Y.; LIU, D.; CHEN, Y.; WANG, S. In vitro antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Corallina officinalis*. **Inter. J. Biol. Macromolecules.**, p. 1-7, 2011.

YOKOYA, N. S.; OLIVEIRA, E. C. Temperature responses of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian waters. **J. Appl. Phycol.**, v. 4, p.339- 345, 1992.

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, p. 85-120, 1997.

ZASLER, N. D.; MARTELLI, M. F.; JACOBS, H. E. Neurobehavioral disorders. **Handb. Clin. Neurol.** v. 110, p. 377-388, 2013.

ZHANG, Y.; SONG, D.; LIANG, H.; WANG, W.; JI, A. Proliferative effects on neural stem/progenitor cells of a sulfated polysaccharide purified from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. **J. Biosc. Bioeng.**, v. 109, n. 1, p. 67-72, 2010.

ZHOU, G.; SUN, Y.P; XIN, H.; ZHANG, Y.N; LI, Z.; XU, Z.H. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacol. Res.**, v.50, n.1, p.47-53, 2004.