



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

VALDÉCIO SILVANO MONTEIRO

EFEITO ANSIOLÍTICO DA AGARANA SULFATADA DA ALGA MARINHA
Gracilaria cornea **EM CAMUNDONGOS: ESTUDO**
NEUROCOMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICO

FORTALEZA

2019

VALDÉCIO SILVANO MONTEIRO

EFEITO ANSIOLÍTICO DA AGARANA SULFATADA DA ALGA MARINHA *Gracilaria
cornea* EM CAMUNDONGOS: ESTUDO NEUROCOMPORTAMENTAL E
NEUROQUÍMICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Norma Maria Barros Benevides.

FORTALEZA

2019

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

- S585 Silvano Monteiro, Valdécio.
Efeito ansiolítico da agarana sulfatada da alga marinha Gracilaria cornea em camundongos: estudo neurocomportamental e neuroquímico / Valdécio Silvano Monteiro. – 2019.
65 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.
1. Ansiedade. 2. Sistema GABAérgico. 3. Agarana sulfatada. I. Título.

CDD 572

VALDÉCIO SILVANO MONTEIRO

EFEITO ANSIOLÍTICO DA AGARANA SULFATADA DA ALGA MARINHA *Gracilaria
cornea* EM CAMUNDONGOS: ESTUDO NEUROCOMPORTAMENTAL E
NEUROQUÍMICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovado em: 30/ 01/2019

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Renata Line da Conceição Rivanor
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr. Luis Rafael Leite Sampaio
Universidade Regional do Cariri (URCA)

Prof^a. Dr^a. Edna Maria Camelo Chaves
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof^a. Dr^a Ticiania Monteiro Abreu
Centro Universitário da Grande Fortaleza (UNIGRANDE)

À minha família, em especial aos meus pais,
*Valderi Xavier Monteiro e Maria Anunciação
Monteiro*

AGRADECIMENTOS

Meu Agradecimento especial a Deus por sempre me iluminar em momentos difíceis.

Em especial à minha família, principalmente minha querida mamãe, que sempre esteve comigo em todos os momentos, aconselhando e me encorajando a não desistir dos meus sonhos.

Ao Meu Paizão que sempre me apoiou em minhas decisões, que sei que muitas foram duras para aceitar, mas que soube compreender e entender e sempre esteve junto comigo.

A Prof.^a. Dra. Norma Maria Barros Benevides, minha orientadora, por quem tenho admiração e respeito, sempre me aconselhando. Sua paciência por mim não tem tamanho. Foram nove anos que ficaram marcados em minha vida acadêmica.

A Prof.^a. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos, que me iniciou no mundo da pesquisa, no qual me apaixonei e não quero mais sair. Em seu laboratório de pesquisa foram onde me desenvolvi cientista. Obrigado por confiar.

A Prof.^a. Dra. Edna Maria Camelo pelo seu incentivo e apoio nessa caminhada, fazendo experimentos tanto na UFC como na UECE.

Ao Prof. Dr. Rafael Sampaio, que foi meu companheiro de laboratório e que se prontificou alegremente a participar da minha banca de defesa.

Ao Prof. Dr. Eduardo Honório-Jr e amigo, por sempre me incentivar nos experimentos e sempre estar disponível para analisar os resultados comigo, como também nos momentos de coffee break do laboratório.

Aos integrantes do Laboratório Carbolec: Renata Line, Neto, Ticiana Brito, Ticiana Abreu, Vitória, Cirlanio, Ricardo Basto, Anyta Frota, Natássia e Felipe. Sempre prontos a ajudar nos experimentos e também aconselhando em momentos difíceis.

A alguns amigos que nunca me esquecerei do laboratório de Neurofarmacologia, Sarah, Cáren, Manoel, Germana, Vilani e Lena.

As minhas irmãs, Viviane e Valdenisia, nas brigas e nas alegrias.

Aos meus sobrinhos Vivian e Gabriel, que tanto amo e me contagia por suas alegrias.

Aos Meus colegas de profissão, os professores Rigoberto, Júlio Cesar, Newton, Jairo, Adalberto, Alison, David, Wellington, Gil, Kelly (pessoa maravilhosa), Jorginho, Sales, Glaydiane, Sandra, Mariana, Jerfesson, Paulão, Camila, Ângelo, Aline, Fabrício Maia e Eduardo.

Amélia, da Escola José Maria Pontes da Rocha, e Marconi, da Escola Presidente José Sarney, que possibilitaram minha iniciação na vida acadêmica.

Aos meus amigos Tereza Pinheiro e Rigoberto soares, Wanderson.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

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

“O tempo as vezes é alheio à nossa vontade,
mas só o que é bom dura tempo bastante para
se tornar inesquecível”.

(Charlie Brown Jr.)

RESUMO

Os polissacarídeos sulfatados são encontrados em vários organismos marinhos e apresentam grande interesse nas ciências médicas por conta de suas propriedades biológicas, tais como: capacidade imunomoduladora, anti-inflamatória e antitumoral. Recentemente, um polissacarídeo sulfatado do tipo agarana, caracterizado previamente por ressonância magnética nuclear, obtido da macroalga marinha *Gracilaria cornea*, demonstrou efeito antinociceptivo com ações central e periférica, efeito anti-inflamatório e ausência de toxicidade *in vivo*. Doenças relacionadas às desordens no sistema nervoso central (SNC), principalmente a ansiedade e a depressão, acometem milhares de pessoas no mundo, principalmente na população idosa. Entretanto, desordens neurológicas afetivas ainda carecem de estratégias farmacológicas consideradas efetivas para o tratamento sintomático isento de efeitos adversos. Diante do exposto, o presente estudo visa avaliar o efeito ansiolítico e o mecanismo de ação bioquímico envolvido no SNC da Agarana Sulfatada (AS-Gc) obtida da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*, a fim de contribuir para a busca por uma melhor alternativa terapêutica para essas doenças. Inicialmente, os polissacarídeos sulfatados totais (PST) foram extraídos por digestão enzimática com papaína, em tampão de acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Em seguida, os PST foram fracionados por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose e a fração II foi utilizada para avaliar as atividades neurocomportamentais, através de análise comportamental em modelos experimentais de camundongos (labirinto em cruz elevado - LCE), campo aberto, placa perfurada e rota *rod*), e análise bioquímica de áreas cerebrais (córtex pré-frontal - PF e hipocampo - HC). 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 AS-Gc nas doses de 0,1, 1 ou 10 mg/kg, via intraperitoneal. Trinta minutos após o tratamento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Em seguida, os animais foram devidamente eutanasiados e dissecados e as áreas cerebrais PF e HC retiradas para realização das análises dos aminoácidos Glutamato (GLU) e ácido gama-aminobutírico (GABA). Os resultados mostraram que AS-Gc, 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, antagonista dos receptores GABA_A/ Benzodiazepínicos, reverteu o efeito ansiolítico nos dois teste avaliados. No teste de campo aberto a dose de 10 mg/kg aumentou o número de

quadrantes e no teste de rota *rod* não houve alteração. Na análise bioquímica das concentrações dos aminoácidos no PF e no HC, a AS-Gc não provocou aumento de GLU e GABA. Em conclusão, nossos resultados sugerem que o tratamento agudo com AS-Gc na dose de 10 mg/kg apresentou efeito ansiolítico sendo revertidos pelo uso de flumazenil, sugerindo que está relacionado ao mecanismo de ação GABAérgico. A análise bioquímica confirmou essa ação pelo aumento de GABA, um potente aminoácido inibitório presente no SNC, no PF e HC. Além disso, em contraste com o diazepam, o AS-Gc (10mg/kg) não apresentou efeito sedativo ou propriedades miorelaxantes e não alterou a atividade locomotora.

Palavras-chave: Ansiedade. Sistema GABAérgico. Agarana sulfatada.

ABSTRACT

Sulphated polysaccharides are found in several marine organisms and are of great interest in the medical sciences due to their biological properties, such as: immunomodulatory, antiinflammatory and antitumor capacity. Recently, a sulfated polysaccharide of the agarane type, previously characterized by nuclear magnetic resonance, obtained from the marine macroalgae *Gracilaria cornea*, has demonstrated antinociceptive effect with central and peripheral action, anti-inflammatory effect and absence of toxicity in vivo. Diseases related to central nervous system (CNS) disorders, especially anxiety and depression, affect thousands of people worldwide, especially in the elderly population. However, affective neurological disorders still lack pharmacological strategies considered effective for symptomatic treatment free of adverse effects. In view of the above, the present study aims to evaluate the anxiolytic effect and the mechanism of biochemical action involved in the CNS of Agarana Sulfatada (AS-Gc) obtained from the red sea kelp *Gracilaria cornea*, in order to contribute to the search for a better therapeutic alternative for these diseases. Initially, total sulfated polysaccharides (PST) were extracted by enzymatic digestion with papain in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0. Then the PST were fractionated by ion exchange chromatography on a DEAE-cellulose column and fraction II was used to evaluate the neurobehavioral activities, through behavioral analysis in experimental models of mice (high cross-maze (LCE), open field, Perforated plaque, rotated rod), and biochemical analysis of cerebral areas (prefrontal cortex (PF) and hippocampus (HP)). For the experiments, Swiss mice, weighing 25-32g, were used, from the breeding stock of the Federal University of Ceará. Animals were treated acutely with AS-Gc at 0.1, 1 or 10 mg / kg intraperitoneally. Thirty minute after treatment, the animals were submitted to behavioral tests. The animals were then euthanized and dissected and the PF and HP brain areas removed for the amino acid analyzes Glutamate (GLU) and gamma-aminobutyric acid (GABA). The results showed that AS-Gc at the dose of 10 mg / kg presented an anxiolytic effect in the LCE and perforated plate models, since it increased all the parameters analyzed in the LCE, as well as the number of holes in the holes of the perforated plate. This effect is probably related to the GABAergic system, since flumazenil, GABAA/Benzodiazepine receptor antagonists, reversed the anxiolytic effect in the two tests evaluated. In the open field test the dose of 10 mg / kg increased the number of quadrants and in the test of rotating rod there was no change. In the biochemical analysis of amino acid concentrations in PFC and hippocampus, SA-Gc did not increase GLU and GABA. In conclusion, our results suggest that the acute treatment with SA-Gc at a dose of 10 mg/kg

presented an anxiolytic effect being reversed by the use of flumazenil, suggesting that it is related to the mechanism of GABAergic action. Biochemical analysis confirmed this action by increasing GABA, a potent inhibitory amino acid present in the CNS, in PFC and HC. In addition, in contrast to diazepam, SA-Gc (10mg/kg) had no sedative effect or myorelaxing properties and altered locomotor activity.

Keywords: Anxiety. GABAergic System. Agarar Sulfated.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese e metabolismo do GABA	18
Figura 2 – Receptor GABA _A	18
Figura 3 – Alga marinha vermelha <i>Gracilaria cornea</i>	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AS-Gc	Agarana sulfatada <i>Gracilaria cornea</i>
DZP	Diazepam
E.P.M.	Erro Padrão Médio
FLU	Flumazenil
GABA	Ácido γ -aminoburítico
GAD	Glutamato descarboxilase
HC	Hipocampo
i.p.	Intraperitoneal
LCE	Labirinto em cruz elevada
mg	Miligrama
mL	Milímetros
NEBA	Número de entradas nos braços abertos
NEBF	Numero de entrada nos braços fechados
PEBA	Porcentagem de entradas nos braços abertos
PEBF	Porcentagem de entradas nos braços fechados
PF	Córtex pré-frontal
PST	Polissacarídeos sulfatados totais
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Sistema Nervoso Central	15
2.2	Desordens neurocomportamentais	16
2.1.1	<i>Ansiedade</i>	16
2.3	Neurotransmissão: Sistema GABAérgico	17
2.4	Modelos de estudo de desordens neurocomportamentais para análise da ansiedade em animais	19
2.5	Algas	20
2.5.1	<i>Gênero Gracilaria</i>	21
2.6	Polissacarídeos sulfatados	22
2.6.1	<i>Galactanas sulfatadas de algas vermelhas</i>	22
2.6.2	<i>Polissacarídeos sulfatos de algas marinhas e suas atividades biológicas</i>	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo Geral	25
3.2	Objetivo específico	25
4	ARTIGO DA TESE	26
5	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Desordens neurocomportamentais, como ansiedade e depressão, afetam milhares de pessoas no mundo, principalmente as pessoas mais idosas. Essas desordens são compostas por um grande grupo de deficiências neurológicas, as quais estão associadas, também a outras doenças, tanto cerebrais transitórias (esclerose múltipla, demência e condições neuro-oncológicas) como cerebrais permanentes (encefalopatites metabólica e tóxica) e/ou ocasionadas por injúrias (como trauma, hipoxia e/ou isquemia). (ZASLER; MARTELLI; JACOBS, 2013). O estudo da ansiedade e da depressão tem 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; Skolnick, 2012).

Na atualidade, as práticas médicas e cirúrgicas padrões mostram-se com poucos avanços para a resolução ou tratamento destas desordens neurológicas, e fármacos apropriados são insuficientes e apresentam diversos efeitos colaterais nas desordens neurocomportamentais (SIMONATO *et al.*, 2013, Neumann *et al.*, 2019). Para o sucesso do desenvolvimento de novos fármacos efetivos no tratamento dessas desordens, é crucial a prospecção de 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 promissor recurso vegetal, devido à presença de uma variedade de moléculas bioativas, dos quais se encontram os polissacarídeos com a presença de grupos sulfatados em suas estruturas químicas e por isso denominados de polissacarídeos sulfatados (JIAO *et al.*, 2011).

O Brasil apresenta-se como um grande potencial para a pesquisa e exploração na área de organismos marinhos, principalmente entre as espécies de macroalgas, pois existem mais de 700 espécies distribuídas pelo litoral (Oliveira *et al.*, 2010), porém há poucos estudos mostrando o potencial terapêutico das macroalgas brasileira. Nesse sentido, o Brasil apresenta-se, podendo contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos.

Na investigação de novas estratégias neurocomportamentais, as moléculas de elevada massa molecular, como os polissacarídeos têm sido negligenciados em modelos de desordens neurológicas por causa de suas estruturas complexas. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado polissacarídeos sulfatados (PS) com potencial atividade neuroprotetora, modulação de mediadores neuroinflamatórios e regulação de mecanismos apoptóticos em células neurais (GAO *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2019).

Os polissacarídeos sulfatados obtidos da macroalga marinha vermelha *Gracilaria cornea* foram caracterizados quimicamente por Melo e colaboradores (2002), mostrando que estes PS estão na forma de agarana sulfatada. Recentemente, investigou-se os efeitos desse bioativo em modelos *in vivo* de inflamação e nocicepção, relatando ausência de toxicidade e ação anti-inflamatória e antinociceptiva, sendo este último demonstrado possuir ação tanto central quanto periférica (COURA *et al.*, 2012) e atividade neuroprotetora em doença de Parkinson (Sousa *et al.*, 2017). Recentemente, estudos com extrato de PS da *G. cornea* mostraram efeito ansiolítico com um possível envolvimento do sistema Gabaérgico (MONTEIRO, 2016).

Devido a esses efeitos no sistema nervoso central, o presente estudo visou utilizar uma fração polissacarídica sulfatada da macroalga marinha vermelha *Gracilaria cornea* na elucidação do mecanismo de ação bioquímico em determinadas áreas cerebrais ligadas à ansiedade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema Nervoso Central

O Sistema nervoso humano apresenta uma complexidade totalmente diferente daquela observada em qualquer outro sistema orgânico. Em sua estrutura estão presente mais de 10 bilhões de neurônios, formando milhares de conexões sinápticas. 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 (SNC) e os locais somáticos e viscerais. Assim 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, também, é responsável por funções importantes, como: percepção, incluindo processamentos sensitivo, auditivo e visual; estado de vigília, linguagem e consciência (GOLAN, 2009).

As desordens neurológicas têm efeitos devastadores e são amplamente distribuídas em toda a população, sendo especialmente prevalente na população mais idosa. São classificadas como 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).

2.2 Desordens Neurocomportamentais

As desordens ou transtornos neurocomportamentais foram classificadas como distúrbios comportamentais, cognitivos e emocionais associados a danos ou disfunções no sistema nervoso central (STRUB; BLACK, 1981), os quais também estão associados a processos de degeneração neural (BERNHEIMER *et al.*, 1973). Entre essas desordens neurocomportamentais, podem-se citar as doenças afetivas, como a depressão e a ansiedade (WIDLÖCHER, 1983).

2.2.1 Ansiedade

A ansiedade, a qual consiste em um estado de tensão ou apreensão cujas causas nem sempre são produtoras de medo, mas sim da expectativa de algo, nem sempre ruim, que acontecerá num futuro próximo. 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 alguns tipos de ansiedade, sendo os mais comuns: distúrbios do pânico, transtorno do estresse pós-traumático e as fobias (GARAKANI; MATHEUS; CHARNEY, 2006).

Segundo os critérios do Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DMS-IV-TR), a ansiedade generalizada é caracterizada por preocupação excessiva e tensão contínua durante os vários eventos diários da vida, com duração de, pelo menos, 6 meses, e incapacidade em controlar estes sentimentos. Esta condição vem acompanhada por, no mínimo, três ou mais sintomas adicionais, que podem ser psíquicos, como agitação, dificuldade de concentração, irritabilidade, ou somáticos, incluindo fadiga, tensão muscular e distúrbios do sono (GARAKANI; MATHEUS; CHARNEY, 2006).

Os transtornos de ansiedade generalizada (TAG) são considerados os mais frequentes entre todas as doenças psiquiátricas, com a ansiedade generalizada representando a patologia mais comum nos indivíduos atendidos nos serviços de saúde. O medo pode ser definido como uma reação a uma situação perigosa real, bem definida, e, é visto por vários

autores como entidade independente da ansiedade. Embora, por vezes, pode ser difícil uma separação entre as duas (LENT, 2004).

Embora a fisiopatologia dos transtornos de ansiedade, ainda não estarem totalmente elucidadas, existem possíveis mecanismos relacionados que são citados, tais como o fluxo sanguíneo cerebral na região frontal, parietal, temporal e áreas do cíngulo; metabolismo na região frontal, temporal, parietal, cerebelo, tálamo, sistema límbico e gânglios basais; alteração nos neurotransmissores GABA, noradrenalina e serotonina e o sistema neuroendócrino (RANG *et al.*, 2011). Ressalta-se que os benzodiazepínicos (BZD) são as classes de medicamentos tradicionalmente utilizadas no tratamento dos transtornos de ansiedade, por exercer efeito rápido, aumentando a sinalização GABA-A no cérebro (SANCAR, CZAJKOWSKI, 2011). Porém estas drogas apresentam efeitos como: sedação; indução do sono; redução da ansiedade e de comportamentos agressivos; na redução do tônus muscular e da coordenação motora; anticonvulsivante; além de amnésia anterógrada (RANG *et al.*, 2011).

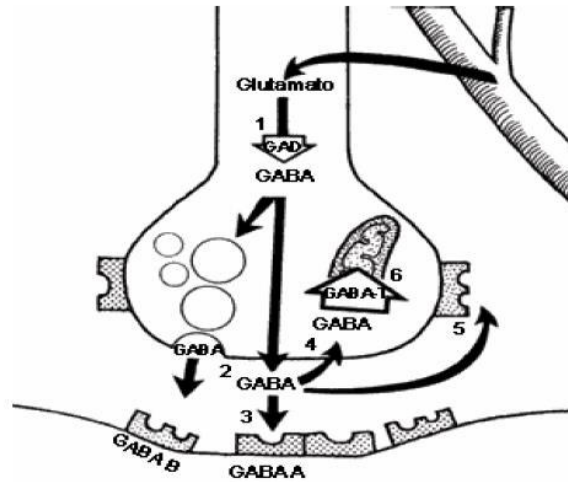
2.3 Neurotransmissão: sistema GABAérgico

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 abrem os canais de cloreto e são antagonizados pela picrotoxina e bicuculina, ambas provocando convulsões generalizadas (BORMANN, 2000; SILVILOTTI; NISTRI, 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).

Os receptores GABA_A são os de maior importância por possuírem um papel central na regulação da excitabilidade cerebral, através dos seus efeitos inibitórios, e, muitas drogas importantes tais como os benzodiazepínicos, proporcionam vários efeitos relacionados com este receptor, tais como a sedação e a indução do sono, a redução da ansiedade e da agressão, a redução do tônus muscular e da coordenação, efeito anticonvulsivante além de amnésia anterógrada. Estes efeitos dos benzodiazepínicos acontecem através da potencialização em resposta ao GABA por facilitar a abertura dos canais de cloretos ativados pelo GABA. Eles se ligam de um modo específico em um sítio regulador do receptor, distinto

do sítio ligante de GABA, e agem de modo alostérico aumentando a afinidade do GABA pelo receptor (RANG *et al.*, 2011) (Figura 1).

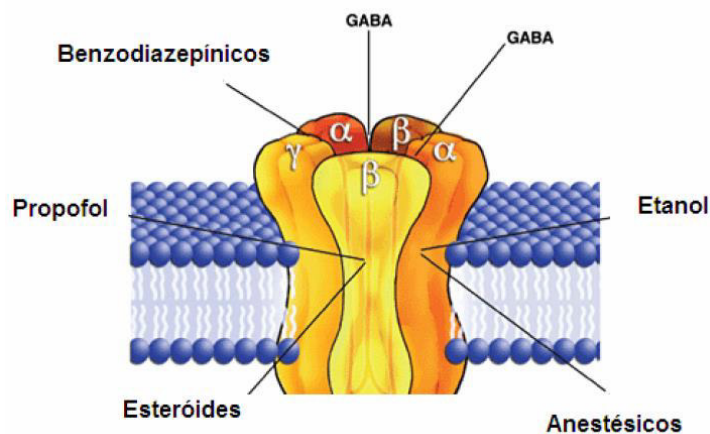
Figura 1- Síntese e metabolismo do GABA.



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

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 2).

Figura 2 - Receptor $GABA_A$



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

2.4 Modelos de estudo de desordens neurocomportamentais para análise de ansiedade em animais

Os modelos de estudos comportamentais em animais desempenham um papel central na investigação científica dos mecanismos fisiológicos e nos processos que estão envolvidos no controle 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).

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 às principais manifestações evidenciadas em indivíduos com transtornos de ansiedade. Entre esses modelos, pode-se citar o teste do labirinto em cruz elevado (LCE), no qual 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 ansiolíticos, o qual indica o referido modelo como um dos mais adequados para análise de novos bioativos com potencial efeito terapêutico para distúrbios de ansiedade (PELLOW; FILE, 1986).

Assim, o desenvolvimento de novas drogas ou a utilização de diferentes estratégias farmacológicas para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas continua sendo de extrema importância, e a busca por novos compostos mais efetivos e com baixa toxicidade, possuindo efeitos adversos mínimos, vem sendo alvo de muitas pesquisas (Monteiro *et al.*, 2016).

Nesse contexto, as algas marinhas são consideradas uma fonte potencial na bioprospecção de novos fármacos, pois são ricas em diversos compostos químicos biologicamente ativos, como os polissacarídeos sulfatados, que possuem capacidade anti-inflamatória, antinociceptiva e ansiolítica (Coura *et al.* 2012; SINGH; THAKUR; BANSAL, 2013; ABREU *et al.*, 2016).

2.5 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, dulcícolas, 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 frequentemente 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).

2.5.1 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 (Figura 3) 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).

Figura 3 - Alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*



Fonte: taibif.org.tw

2.6 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 e reino animal, porém sem relatos nas plantas superiores terrestres (JIAO *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2008).

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 (FARIAS *et al.*, 2000).

2.6.1 Galactanas sulfatadas 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 (VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004). Algumas unidades de α -

como: proliferação de células neurais (ZHANG *et al.*, 2010; SHENG *et al.*, 2011); antineurotoxicidade (GAO *et al.*, 2012); antioxidante (YANG *et al.*, 2011); e anti-neuroinflamatório, através da modulação de mediadores inflamatórios como óxido nítrico (NO) (LEE *et al.*, 2007).

Outras atividades biológicas foram descritas para PSs extraídos de algas marinhas, tais como: antibacteriana (GEDENNE *et al.*, 2013), antioxidante (MELO *et al.*, 2013), antiviral (RABANAL, *et al.*, 2014), antitumoral (ZHOU *et al.*, 2004), antitrombótica (FONSECA *et al.*, 2008), anti-endematogênica (QUINDERÉ *et al.*, 2013) antinociceptiva (COURA *et al.*, 2012), anti-inflamatória (VANDERLEI *et al.*, 2011), anticoagulante (RODRIGUES *et al.*, 2010) e anticancerígena (SYNYTSYA *et al.*, 2010). Além disso, essas moléculas têm 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 efeito anti-inflamatório, também apresentam ação neuroprotetora em modelos experimentais de animais, (PANGESTUTI; KIM, 2011; GAO *et al.*, 2012). Sabe-se que os PS das espécies de alga marinhas vermelhas *Gracilaria cornea* também apresentam efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo, com ação periférica e central (COURA *et al.*, 2012). Estudos recentes mostraram que o extrato de PS da *G. cornea* apresentou efeito ansiolítico com um possível envolvimento do sistema Gabaérgico (MONTEIRO, 2014). Portanto, a agarana sulfatada é um potencial agente para avaliação neuroprotetora e neuroquímica nos distúrbios neurocomportamentais (ansiedade e depressão).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o mecanismo de ação do efeito ansiolítico da agarana sulfatada presente na macroalga marinha vermelha *Gracilaria cornea* (AS-Gc).

3.2 Objetivos específicos

- Obter as frações de agarana sulfatadas da alga marinha *G. cornea*;
- Estudar a atividade motora e relaxante muscular nos modelos de campo aberto e rota rod, respectivamente;
- Verificar a atividade ansiolítica nos modelos de labirinto em cruz elevada e placa perfurada e o mecanismo de ação do sistema GABAérgico;
- Analisar o potencial neuroquímico da AS-Gc através das dosagens bioquímicas de aminoácidos (ácido aminobutírico e glutamato) em áreas cerebrais (córtex pré-frontal e Hipocampo) de camundongos.

4 ARTIGO DA TESE

Anxiolytic-like effect of Sulfated Agaran from the red seaweed Gracilaria cornea is dependent on the action of neurotransmitters GLU e GABA in GABAergic system

Anxiolytic-like effect of Sulfated Agarans from the red seaweed *Gracilaria cornea* is dependent on the action of neurotransmitters GLU and GABA in GABAergic system

Valdécio Monteiro^a, José Eduardo Honório Jr.^b, Edna Chaves^b, Renata Rivano^a, Pedro Silva-jr.^a, Ticiane Abreu^a, Silvânia Vasconcelos^b, Norma Benevides^{a,*}

^a Laboratory of Carbohydrates and Lectins, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará. Avenida Humberto Monte, s/n, Campus do Pici, CEP 60.451-970, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^b Laboratory of Neuropsychopharmacology, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará. Rua Cel. Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo, CEP 60.430-270, Fortaleza, Ceará, Brazil.

* Corresponding author.

E-mail address: nmbb@ufc.br (Benevides, Norma M.B.)

ABSTRACT:

Sulfated polysaccharides (SP) are found in various marine organisms and their biomedical properties, namely the immunomodulatory, anti-inflammatory capacity and antitumoral have aroused great interest in the medical sciences. This work presents the behavioral effects of SP isolated from the red marine alga *Gracilaria cornea* (Sulfated agaran from *G. cornea* (SA-Gc)) in animal models, such as the elevated plus maze (EPM), hole board, open field and rota rod and amino acids dosage. The SA-Gc was administered intraperitoneally to male mice at single doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg, while diazepam 1 or 2 mg/kg was used as a standard drug and flumazenil 2 mg/kg was used to evaluate the participation of benzodiazepinic receptors. After behavioral tests, these animals were sacrificed and had their prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HC) dissected for assaying amino acids (glutamate-GLU and Gammaaminobutyric acid-GABA). The results showed that SA-Gc 10 mg/kg significantly modified all the observed parameters in the EPM and hole board tests, without altering the general motor activity in the open field and rota rod. The effects of the SA-Gc on amino acid concentration in PFC and hippocampus showed increased GLU and GABA. Flumazenil reversed not only the diazepam effect but also the SA-Gc 10 mg/kg effect. The results showed that SA-Gc 10 mg/kg presented an anxiolytic-like effect that probably is related to GABAergic mechanism of action, disproving sedative effects.

Keywords: *GABAergic sistem; anxiolytic; sulfated Agaran; Natural product;*

1. Introduction

Neurobehavioral disorders, such as anxiety, have affected many people throughout the world and are among the major psychiatric disorders that decrease quality of life (Katzman et al., 2014; Craske et al., 2018). In recent decades, pharmacological treatment of anxiety disorders has extensively used benzodiazepine, a class of drugs that allosterically modulate gamma-aminobutyric acid type A (GABA_A) ionotropic receptors (Lerma and Marques, 2013). Several agents known to mediate GABA neurotransmission have shown great potential for use in the management of anxiety. The benzodiazepines, as a result of their selective mechanism of action targeting the GABA_A, have been widely used to manage anxiety disorders (Uhlenhuth et al., 1999). However, some adverse effects have been reported, including sedation, muscle relaxation, anterograde amnesia, and physical dependence (Zarrindast et al., 2008; Barbosa et al., 2008; Skolnick, 2012). Thus, there is a growing interest in the development of new pharmacological agents based on biologically active natural products as alternative therapeutic for the management of this disorder (Teixeiras et al., 2011).

Currently, new neuroprotective strategies are being sought and molecules with high molecular weight have been neglected because they have complex structures. However, studies have shown several types of sulphated animal and plant polysaccharides with neuroprotective effects, such as neural cell proliferation (Chen et al., 2018; Li et al., 2019), antineurotoxic (Luo et al., 2009; Gao et al., 2012), and antioxidant activity (Yang et al., 2011; Chen and Huang, 2018).

Sulphated agar is a type of sulphated polysaccharides found in the kelp *Garcilaria cornea*. They are complex macromolecules that can interact with a wide variety of matrix and cell proteins because of their chemical structure, which is rich in polyanions (Arfors and Ley, 1993). The chemical structure of the sulfated agar of *G. cornea* was

previously characterized with spectroscopic analyzes of FTIR and NMR. The structural components of this polysaccharide are mainly 3,6-anhydro- α -L-galactose (3.6 AG). Minor components, such as 6-O-methylgalactose, glucose, xylose and sulfate groups were detected as previously described (Melo et al., 2002). As the sulphated polysaccharides from *G. cornea* showed an antinociceptive effect (Coura et al., 2012), Neuroprotective (Souza et al., 2017) and anxiolytic effect on the central nervous system with the possible involvement of gabaergic system (Monteiro et al., 2016). This led us to investigate mechanism of action the anxiolytic effect of sulfated agarane through neurochemical dosing of glutamate and gammaaminobutyric Acid in cerebral brain areas of mice.

2. Materials and methods

2.1. Algae

The Specimens of *G. cornea* were collected along the Flecheiras Beach, at the city of Trairí, state of Ceará, Brazil, and was taken to the Carbohydrates and Lectins Laboratory (CarboLec, Fortaleza, Ceará, Brazil), Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, and cleaned of epiphytes, washed with distilled water and stored at -20°C until use. A voucher specimen (no. 34739) was deposited in the Herbarium Prisco Bezerra in the Department of Biological, Federal University of Ceará, Brazil.

2.2. Animals

Male Swiss mice (20-30 g) were used in each experiment and animals were maintained at a controlled temperature ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) with a 12h dark/light cycle with free access

to water and food. For the complete study, a total of 64 mice were used. Animals were treated in accordance with the current law and the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals. The study was performed under the consent and surveillance of the Committee of Ethics in Animal Research under protocol number 45/13, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Ceará, Brazil.

2.3. Obtation of sulphated agaran

Approximately 5 g of the algae dried tissue was submitted to papain digestion (6 h, 60°C) in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing cysteine and EDTA (5 mM) for the extraction and purification of total sulphated polysaccharides as previously described by Farias et al., 2000 with modification according to Coura et al. (2012). After these processes, it obtained the sulfated Agaran were called SA-Gc. The total sugar content was estimated by phenol–sulphuric acid analysis using D-galactose as the standard (Dubois et al., 1956). After acid hydrolysis of the soluble polysaccharides (1 M HCl, 110°C, 5 h), free sulphate was measured by the gelatin–barium method previously described, using Na₂SO₄ as a standard (Dodgson and Price, 1962). The protein content was measured by staining with Coomassie Brilliant Blue G-250, using BSA as the standard (Bradford, 1972). To verify the presence of possible pollutants, such as nucleic acids, the absorbance was measured using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). SA-Gc was also characterized by FT-IR spectroscopy. The FT-IR spectroscopic data were recorded using a Shimadzu IR spectrophotometer (model 8300; Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) between 400 and 2000 cm⁻¹. The samples were analysed as a KBr pellet.

2.4. Drugs and doses

SA-Gc were solubilized in 0.9% sterile NaCl (saline). Animals were treated with the substance at doses of 0.1, 1 or 10 mg/kg, intraperitoneally (i.p.), 30 min before the experiments. Controls received vehicle (saline with 0.9%) at the same volume (10 ml/kg) administered by the same route as the treated groups.

Diazepam (DZP) 1 or 2 mg/kg used as standard were intraperitoneally injected after dissolution in distilled water. It is well known that benzodiazepines act as anxiolytics (at low doses) and also produce sedation and myorelaxant effect at higher doses (Novas et al., 1988). Thereby our group has used diazepam at 1 mg/kg in elevated plus maze test and hole-board tests as standard drug for anxiolytic effect, as well as diazepam 2 mg/kg in open field and rota rod tests as standard drug for sedative and miorelaxant effects, respectively. Flumazenil (FLU), a recognized competitive antagonist at the central benzodiazepine receptor, was intraperitoneally injected after dissolution in distilled water 15 min before the treatment with SA-Gc to elucidate a possible action mechanism GABA_A/benzodiazepine related.

2.5. Experimental protocol

The animals were tested during the light period and observed in a closed room at constant temperature (25 ± 1 °C) which was poorly illuminated with a 15-V red light.

2.6. Pharmacological tests

2.6.1. Elevated plus maze test (EPM)

The elevated plus maze test for mice (Lister, 1987) consisted of two perpendicular open arms (30×5 cm) and two closed arms (30×5×25 cm) also in perpendicular position. The open and closed arms were connected by a central platform (5×5 cm).

The platform and the lateral walls of the closed arms were made of transparent acrylic and the floor of black acrylic. The maze was 45 cm above the floor. After treatment, the animal was placed at the center of the plus maze with its nose in the direction of one of the closed arms, and observed for 5 min, according to the following parameters: number of entries in the open and closed arms, and time of permanence in each of them. The time of permanence measures the time spent by the animal in the open and closed arms. Anxiolytic compounds reduce the animal's aversion to the open arms and promote the exploration thereof. The parameters observed were: percentages of entries into open arms (PEOA), number of entries in the open arms (NEOA), time of permanence in open arms (TPOA) and percentage of time of permanence in the open arms (PTOA).

To this test, the animals were divided into eight groups of 10–15 animals each. The different groups were treated with: saline (control), SA-Gc (0.1, 1 or 10 mg/kg), DZP (1 mg/kg), FLU (2 mg/kg) + SA-Gc (10 mg/kg), FLU (2mg/kg) + DZP (1mg/kg) and FLU (2 mg/kg).

2.6.2. Hole-board test

The hole-board test for exploratory behavior in mice was used as described previously by Clark et al. (1971). The apparatus used was an Ugo Basile of 60×30 cm with 16 evenly spaced holes with built-in infrared sensors. In brief, adult male mice were randomly divided into five groups with 8 mice per group. The mice were divided randomly in five groups: group treated with doses SA-Gc (0.1, 1 or 10 mg/kg); positive control group treated with DZP (1 mg/kg) and negative control group (0.9% saline). Thirty minutes after the intraperitoneally administration of DZP or SA-Gc, the number of head dips into the holes was counted for each animal for 5 min.

2.6.3. Open-field test

The open-field area was made of acrylic (transparent walls and black floor, 30×30×15 cm) divided into nine squares of equal area. The open-field was used to evaluate the exploratory activity of the animal for 5 min of the 6 min testing period (Archer, 1973). The observed parameters were as follows: number of squares crossed (with the four paws). The animals were divided into five groups of 10-15 animals each. The different groups were treated with: saline (control), SA-Gc (0.1, 1 or 10 mg/kg) and DZP (2 mg/kg).

2.6.4. Rota rod

Animals were selected for the rota rod test before the pharmacological test. Mice, 8 per group, were divided in five groups and treated with: saline (control), SA-Gc (0.1, 1 or 10 mg/kg) and DZP (2 mg/kg). Thirty minutes after intraperitoneally administration of treatments, mice were placed with the four paws on a 2.5 cm diameter bar, 25 cm above the floor and the time of permanence on the bar was measured for 1 min, for each animal. The rotating speed was of 12 rpm (Dunham and Miya, 1957).

2.6.5. Amino acids concentration measurement

Immediately after experimental behavior tests, the animals were sacrificed by rapid decapitation and the brains were quickly removed and placed on aluminum foil in a Petri dish on ice. Prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HC) and were dissected for the measurement of aminoacids. After dissection, the area has been removed and stored at -70 ° C for amino acid determination.

Analyses of the amino acids glutamate and gammaaminobutyric Acid were assayed by reverse-phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with UV-VIS spectrophotometric detector. Reverse phase column (Shim-pack, CLC-ODS 150x4.6mm;

Shimadzu, Kyoto, Japan), an amperometric detector (Shimadzu, L-ECD-6A), and a liquid chromatography work station were used. A fluorimetric detection method was used, as previously described (Lindroth and Mopper, 1979). The area of each peak was determined with Shimadzu software and compared to the peak area of the corresponding external standard. Amino acid concentration was expressed as $\mu\text{mol/g}$ of tissue.

2.6.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Graph Pad Prism 5.0 for Windows, Graph Pad Software (SanDiego, CA, USA). The behavioral results were evaluated by one-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls's post hoc test. All results are expressed as means \pm S.E.M (standard errors of the mean). Results were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Elevated plus maze test (EPM)

Elevated plus-maze test was conducted to investigate anxiety-like behavior of the animals. Fig. 1 shows the effect of SA-Gc in the EPM test in all doses. The results demonstrated that the intraperitoneally treatment of SA-Gc 10 mg/Kg and Diazepam 1 mg/Kg, significant increase all parameters analysed, NEOA, PEOA, TPOA and PTOA when compared with the respective controls: NEOA [control: 2.66 ± 0.23 (9); SA-Gc 0.1mg/kg: 4.25 ± 0.41 (8); SA-Gc 1mg/kg: 4.25 ± 0.31 (8); SA-Gc 10 mg/kg: 6.50 ± 0.42 (8); DZP 1 mg/kg: 6.44 ± 0.37 (8)]; PEOA [control: 23.34 ± 2.55 (8); SA-Gc 0.1mg/kg: 30.04 ± 2.69 (8); SA-Gc 1mg/kg: 33.74 ± 2.18 (8); SA-Gc 10mg/kg: 38.17 ± 1.60 (8); DZP 1 mg/kg: 36.01 ± 1.09 (8)]; TPOA [control: 34.71 ± 3.58 (8); SA-Gc 0.1mg/kg: 48.17 ± 4.86 (8); SA-Gc 1mg/kg: 49.86 ± 4.43 (8); SA-Gc 10 mg/kg: 59.00 ± 3.14 (8); DZP 1mg/kg: $49,20 \pm 2.43$ (8)]

and PTOA [control: 17.52 ± 1.51 (8); SA-Gc 0.1mg/kg: 21.62 ± 3.04 (8); SA-Gc 1mg/kg: 23.26 ± 2.35 (8); SA-Gc 10 mg/kg: 34.93 ± 2.18 (8); DZP 1 mg/kg: 29.67 ± 1.26 (8)].

The results showed that the group SA-Gc 10 mg/kg pretreated with flumazenil (2 mg/kg) decreased all parameters analysed when compared with the SA-Gc 10 mg/kg group: NEOA [SA-Gc 10 mg/kg: 6.50 ± 0.42 (8); FLU 2 mg/kg + SA-Gc 10 mg/kg: 3.00 ± 0.23 (8)]; PEOA [SA-Gc 10mg/kg: 38.17 ± 1.60 (8); FLU 2 mg/kg + SA-Gc 10 mg/kg: 26.87 ± 1.30 (8)]; TPOA [SA-Gc 10 mg/kg: 59.00 ± 3.14 (8); FLU 2 mg/kg + SA-Gc 10 mg/kg: 30.78 ± 2.36 (8)]; PTOA [SA-Gc 10 mg/kg: 34.93 ± 2.18 (8); FLU 2 mg/kg + SA-Gc 10 mg/kg: 19.14 ± 1.73 (8)].

The diazepam group pretreated with flumazenil also decreased all parameters analysed when compared with the diazepam group: NEOA [DZP 1 mg/kg: 6.44 ± 0.37 (8); FLU 2 mg/kg + DZP 1mg/kg: 3.22 ± 0.27 (8)]; PEOA [DZP 1 mg/kg: 36.01 ± 1.09 (8); FLU 2 mg/kg + DZP 1mg/kg: 23.41 ± 0.55 (8)]; TPOA [DZP 1mg/kg: $49,20 \pm 2.43$ (8); FLU 2 mg/kg + DZP 1mg/kg: 34.60 ± 3.61 (8)]; PTOA: [DZP 1 mg/kg: 29.67 ± 1.26 (8); FLU 2 mg/kg + DZP 1mg/kg: 18.38 ± 0.99 (8)].

3.2. Hole-board test

Hole-board test was another method used to measure the anxiety-like behavior of the animals. Similar to diazepam 1 mg/kg, SA-Gc 10 mg/kg (Fig. 2) increased significantly the number of head dips [control: 18.25 ± 1.47 (8); SA-Gc 10 mg/kg: 32.38 ± 1.56 ; DZP 1 mg/kg: 31.63 ± 1.52 (8)], as compared to control. As expected, these effects too were reverted by pre-treatment with flumazenil [SA-Gc 10 mg/kg: 32.38 ± 1.56 (8); FLU 2 mg/kg + SA-Gc 10 mg/kg: 26.87 ± 1.30 (8)].

3.3. Open-field test

Fig. 3 shows that SA-Gc (0.1, 1 and 10 mg/kg) did not alter the number of crossings as compared to control group. The animals treated with diazepam (2 mg/kg) had a decreased number of crossings [control: 56.00 ± 3.09 (8); DZP 2 mg/kg: 25.22 ± 1.53 (8)].

3.4 Rota rod test

The absolute values of the number of falls and the time of permanence are presented in Fig. 4. No alteration was observed in both parameters after treatment with SA-Gc (0.1, 1 and 10 mg/kg) compared with the control, while diazepam (2 mg/kg) in a muscle relaxant dose, as an example, increased the number of falls [control: 0.40 ± 0.16 (8); DZP 2 mg/kg: 2.60 ± 0.16 (8)] and decreased the time of permanence on the bar [control: 59.63 ± 0.18 (8); DZP 2 mg/kg: 47.63 ± 2.02 (8)].

3.5 Amino acids concentration measurement

Figure 5A shows the concentration of amino acids in prefrontal cortex of mice after SA-Gc treatment. The administration of SA-Gc 10mg/kg and DZP 1mg/kg increased GLU and GABA concentration, respectively [control: 552.80 ± 19.04 (8); SA-Gc 10 mg/kg: 1536 ± 43.49 (8); DZP 1mg/kg: 1590 ± 47.71 (8)], [control: 373.00 ± 31.54 (8); SA-Gc 10 mg/kg: 1070 ± 99.30 (8); DZP 1mg/kg: 1364 ± 60.38 (8)].

In hippocampus (Fig. 5B), Glutamate and GABA concentrations increased in treatment of SA-Gc 10mg/kg and DZP 1mg/kg, respectively [control: 1671 ± 164.5 (8); SA-Gc 10 mg/kg: 2504 ± 152.8 (8); DZP 1mg/kg: 2355 ± 136.30 (8)], [control: 1289 ± 38.28 (8); SA-Gc 10 mg/kg: 3265 ± 160.50 (8); DZP 1mg/kg: 3054 ± 195.2 (8)]. Figure 5C shows the concentration reduced of amino acids in mice after SA-Gc pretreated with flumazenil (2

mg/kg) [control: 1289 ± 38.28 (8); SA-Gc 10 mg/kg: 3265 ± 160.50 (8); FLU 2 mg/kg SA-Gc 10 mg/kg: 1460 ± 91.80 (8)].

4. Discussion

In the present study, the behavior effects of SA-Gc were studied in several classic animal models, such as EPM, hole-board, open-field, and rota rod tests, in order to investigate its possible activity on the central nervous system. These classic animal model tests are used to screening of activities on the central nervous system providing information on anxiety and psychomotor performance (Prut and Belzung, 2003).

The effect of SA-Gc was comparable to diazepam, a benzodiazepine anxiolytic. Benzodiazepines have two characteristics, at low doses they act as anxiolytics and anticonvulsants, and at high doses they produce sedative and myorelaxant effects (Melo et al., 2006). Thereby diazepam 1 mg/kg was used in the EPM and hole-board test and 2 mg/kg in open field and rota rod tests, as standard drug.

In the search for new benzodiazepine anxiolytic agents, The EPM test is considered one of the most widely validated tests (Rodgers and Dalvi, 1997; Mizushige et al., 2013), is based on the natural aversion of rodents for open spaces (Almeida et al., 2012). Therefore, the greater the exploratory capacity of the animals, that is the longer in the open arms, the lower their level of anxiety. (Casarrubea et al., 2013). Currently, benzodiazepines are widely prescribed in the medical clinic due to their selective activity in the inhibitory complex of the GABA_A receptor and depression in the central nervous system. Benzodiazepines increase the frequency of chloride- channels opening and, therefore, the flow through the GABA_A receptor, enhancing the inhibitory effect of GABA (Lilly and Tietz, 2000; Ishola et al., 2013).

Our results showed that SA-Gc at dose of 10 mg/kg was able to increase significantly all the parameters (PEOA, NEOA, PTOA and TPOA) in the EPM test, as compared to the control group. Similar results were also observed with the diazepam treated group at a recognized anxiolytic dose (1 mg/kg) (Chaves et al., 2018), suggesting an anxiolytic-like effect from SA-Gc. Flumazenil is a recognized competitive antagonist at the central benzodiazepine receptor and was used to elucidate the possible mechanism by which the SA-Gc is acting in this model. The results showed that flumazenil reversed not only the diazepam effect but also the SA-Gc (10 mg/kg) effect, indicating that both drugs might present a similar mechanism of action.

In order to confirm the anxiolytic activity observed in the EPM test, we decided to use the hole-board test, in which it is also observed that the exploration is gradually inhibited by anxiety (Crawley, 1985). In this way, similar to EPM, this test is also useful for modeling anxiety and anxiolytics agents have been shown to increase the number of head dips (Siegel and Sanacora, 2012). Our results showed that SA-Gc (10 mg / kg) significantly increased the number of head sags, indicating anxiolytic action. Flumazenil reverted again the SA-Gc effect (10 mg/kg), confirming a mechanism of action similar to benzodiazepines.

Open field test is able to evaluate exploratory activity and locomotor effects of drugs in mice. Drugs that increase motor activity can often provide false-positive/negative results in the number of open-arm entries and the number of head-drops in EPM tests and holes, respectively (Novas et al., 1988). Our findings showed that the animals treated with SA-Gc (10 mg/kg) dose which produced anxiolytic-like effects, did not induce changes in locomotion of mice in the open-field arena, differently DZP (2 mg/kg), decreased this parameter, showing a sedative effect. Therefore, the effects produced by SA-Gc observed in the plus-maze and hole-board tests are not related to the stimulation of motor activity.

Rota rod test is classic animal model used to evaluate peripheral neuromuscular blockage. A deficit in motor coordination would affect performance in the EPM, hole-board test and open-field tests (Venâncio et al., 2011). The findings showed that SA-Gc (0.1, 1 and 10 mg/kg), different from diazepam (2 mg/kg), had no significant effect on the motor coordination of the animals on rota rod test, suggesting that the anxiolytic-like effect might be not involved to peripheral neuromuscular blockage, but rather by neurons that act on the central nervous system (Amos et al., 2001).

Our work have shown in the behavioral tests that SA-Gc indicated that its anxiolytic action seems to be related to the GABAergic system, we decided to study the effect of this SA-Gc 10mg/kg, on excitatory (GLU) and inhibitory (GABA) amino acid concentrations in brain areas (PFC and HC) related to anxiety disorders (Francisco and Guedes, 2015).

Studies show that human social and affective function is related to the neural network of the prefrontal cortex and is considered central to the pathophysiology of mood and anxiety disorder (Motzkin et al., 2015). It is well known GABA_A receptors are widely expressed in the hippocampus and modulate memory related synaptic plasticity and learning (Sperk et al. 1997; Fritschy and Brunig 2003), been closely related to negative emotions such as depression, anxiety, catastrophizing and stress (Kjelstrup et al. 2002).

The acute administration of SA-Gc 10mg/kg increased the levels of Glu e GABA amino acids both in PFC and HP. This result suggests that SA-Gc has an impact important in the central nervous system which could mediate functions significant such as learning, and memory and even as anxiety disorders.

Anxiolytic effects are known to exert their neuropharmacological actions by changing the neurotransmitter levels in mice. (Martínez-Vázquez et al., 2011; Sotoing et al., 2012) and drugs that increase GABA concentrations in brain regions such hippocampus and

prefrontal cortex have demonstrated anxiolytic action (Etkin, 2009). Benzodiazepine actions act through modulation subtype of a subunit present in the GABA_A receptor leading to increased subsequent chloride conductance inducing the activity of GABA. (Smith et al., 2001; Nielsen, 2015). The increase GABA the major inhibitory neurotransmitter amino acid in the central nervous system, resulting in a slowing of neurotransmission and sedative and anxiolytic effects (Phan et al., 2005).

Glutamate is the main excitatory amino acid in CNS and an important precursor of GABA. His role in the pathophysiology of anxiety is still unclear. Clinical study demonstrated that, increased cortical glutamate concentrations were positively correlated with anxiety symptoms in patients, suggesting that hyperfunction of cortical glutamatergic neurons may be an important contributing factor for the etiology of anxiety and related disorders (Modi et al., 2014, Chaves et al., 2017).

Our results showed that SA-Gc significantly increased GABA and Glu concentrations the cerebral cortex and the hippocampus suggests that this molecule might have a similar effect found in anxiolytic drugs.

5. Conclusions

In conclusion, our results suggest that the acute treatment with SA-Gc at a dose of 10 mg/kg presented an anxiolytic effect being reversed by the use of flumazenil, suggesting that it is related to the mechanism of GABAergic action. Biochemical analysis confirmed this action by increasing inhibitory amino acid GABA in PFC, HC. In addition, in contrast to diazepam, SA-Gc (10mg/kg) had no sedative effect or myorelaxing properties and did not alter locomotor activity.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazilian Coordination for Professorship Improvement for Higher Education (CAPES), and Research Foundation of the State of Ceará (FUNCAP), all from Brazil.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Almeida, A. A. C., Costa, J. P., Carvalho, R. B. F., Sousa, D. P., Freitas, R. M., 2012. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain. Res.** 1448, 56-62.
- Amos, S., Kolawole, E., Akah, P., Wambebe, C., Gamaniel, K., 2001. Behavioral effects of the aqueous extract of *Guiera senegalensis* in mice and rats. **Phytomedicine** 8, 356–361.
- Archer, J., 1973. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.** 21, 205-235.
- Arfors, K. E., Ley, K., 1993. Sulfated polysaccharides in inflammation. **J. Lab. Clin. Med.** 121, 201-202.
- Barbosa, P. R., Valvassori, S. S., Bordignon, C. L. J., Kappel, V. D., Martins, M. R., Gavioli, E. C., Quevedo, J., Reginatto, F. H., 2008. The aqueous extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. **J. Med. Food.** 11, 282-288.
- Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. **Anal Biochem.** 72, 248-254.
- Casarrubea, M., Roy, V., Sorbera, F., Magnusson, M. S., Santangelo, A., Arabo, A., Crescimanno, G., 2013. Temporal structure of the rat's behavior in elevated plus maze test. **Behav Brain Res.** 237, 290-299.

Chaves, E. M. C., Honório-Júnior, J. E. R., Sousa, C. N. S., Monteiro, V. S., Nonato, D. T. T., Dantas, L.P., Lúcio, A. S. S. C., Barbosa-Filho, J. M., Patrocínio, M. C. A., Viana, G.S.B., Vasconcelos, S.M.M., 2018. The anxiolytic-like effect of 6-styryl-2-pyrone in mice involves GABAergic mechanism of action. **Metab. Brain. Dis.** 33, 139-149.

Chen J., Shi X., Chen Y., Liang H., Cheng C., He Q., 2018. Neuroprotective effects of chloroform and aqueous fractions of noni juice against t-Butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. **Food Nutr Res.** 19, 62.

Chen L., Huang G., 2018. Antioxidant activities of sulfated pumpkin polysaccharides. **Int J Biol Macromol.** 126, 743-746.

Clark, G., Koster, A. G., Person, D. W., 1971. Exploratory behavior in chronic disulfoton poisoning in mice. **Psychopharmacol.** 20, 169-171.

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., 2012. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Sulphated Polysaccharides from the Red Seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.** 110, 335-341.

Craske, M.G., Hermans, D., Vervliet, B., 2018. State-of-the-art and future directions for extinction as a translational model for fear and anxiety. **Philos. Trans. Biol. Sci.** 373, 1742-1760.

Crawley, J.N., 1985. Exploratory behavior models of anxiety in mice. **Neurosci. Behav. Ver.** 9, 37-44.

Dodgson, K. S., Price, R. G., 1962. A note on the determination of the ester sulfate content of sulfated polysaccharides. **Biochem J.** 84, 106-110.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chem.** 28, 350-356.

Dunham, N. W., Miya, T. S., 1957. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.** 46, 208-209.

Etkin, A., 2009. Functional neuroanatomy of anxiety: a neural circuit perspective. In: SteinMB, Steckler T (eds) Behavioral neurobiology of anxiety and its treatment. Springer Verlag, Berlin, pp 251-77.

Farias, W. R. L., Valente, A. P., Pereira, m. s., Mourão, P. A. S., 2000. 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 from invertebrates. **J. Biologic. Chem.** 75, 29299-29307.

Francisco, E. S., Guedes, R. C., 2015. Neonatal taurine and alanine modulate anxiety-like behavior and decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes. **Amino Acids.** 47, 2437-2445.

- Fritschy, J. M., Brünig, I., 2003. Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. **Pharmacol. Ther.** 98, 299-323.
- Gao, Y., Li, C., Yin, J., Shen, J., Wang, H., Wu, Y., Jin, H., 2012. Fucoidan, a sulfated polysaccharide from brown algae, improves cognitive impairment induced by infusion of AB peptide in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 304-311.
- Ishola, I. O., Chatterjee, M., Tota, S., Tadigopulla, N., Adeyemi, O.O., Palit, G., Shukla, R., 2012. Antidepressant and anxiolytic effects of amentoflavone isolated from *Cnestis ferruginea* in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 103, 322-331.
- Katzman, M. A., Bleau, P., Blier, P., Chokka, P., Kjernisted, K., Van Ameringen, M., 2014. Canadian clinical practice guidelines for the management of anxiety, posttraumatic stress and obsessive-compulsive disorders. **BMC Psychiatry.** 14, 1-S1.
- Kjelstrup, K. G., Tuvnes, F.A., Steffenach, H.A., Murison, R., Moser, E. I., Moser, M. B., 2002. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 99, 10825-10830.
- Lerma, J., Marques J.M., 2013. Kainate receptors in health and disease. **Neuron.** 80, 292-311.
- Li, Q., Zhang, Z., Li, H., Pan, X., Chen, S., Cui, Z., Ma, J., Zhou, Z., Xing, B., 2019. Lycium barbarum polysaccharides protects H9c2 cells from hypoxia-induced injury by down-regulation of miR-122. **Biomed. Pharmacother.** 110, 20-28.
- Lilly, S.M., Tietz, E. I., 2000. Chronic cocaine differentially affects diazepam's anxiolytic and anticonvulsant actions. Relationship to GABA(A) receptor subunit expression. **Brain. Res.** 882 139-148.
- Lindroth, P., Mopper, V., 1979. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. **Anal Chem.** 51, 667-1674
- Lister, R. G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacol.** 92, 180-185.
- Luo, D.; Zhang, Q., Wang, H., Cui, Y., Sun, Z., Yang, J., Zheng, Y., Jia, J., Yu, F., Wang, X., 2009. Fucoidan protects against dopaminergic neuron death in vivo and in vitro. **Euro. J. Pharmacol.** 617, 33-40.
- Martínez-Vázquez, M., Estrada-Reyes, R., Araujo Escalona, A. G., Ledesma Velázquez, I., Martínez-Mota, L., Moreno, J., Heinze, G., 2012. Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice **J. Ethnopharmacol.** 139, 164-170.
- Melo, C. T. V., Monteiro, A. P., Leite, C. P., Araújo, F.L.O., Lima, V. T., Barbosa-Filho, J. M., 2006. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6 dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) MEZ (Lauraceae) in mice. **Biol. Pharm. Bull.** 29, 451-454.

- Mizushige, T., Kanegawa, N., Yamada, A., Ota, A., Kanamoto, R., Ohinata, K., 2013. Aromatic amino acid-leucine dipeptides exhibit anxiolytic-like activity in young mice. **Neurosci.Lett.** 543,126-129.
- Modi, S., Rana, P., Kaur, P., Rani, N., Khushu, S., 2014. Glutamate level in anterior cingulate predicts anxiety in healthy humans: a magnetic resonance spectroscopy study. **Psychiatry. Res.** 224, 34-41.
- Monteiro, V. S., Teles, F. B., Coura, C. O., Souza, R. B., Lima, C. N. C., Costa, D. V.S., Honório Junior, E. R., Escudeiro, S. S., Chaves, E. M. C., Vasconcelos, S. M. M. Benevides, N.M.B., 2016. Involvement of the GABAergic system in the anxiolytic effect of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **J. Appl. Phycol.** 28, 1997-2004.
- Motzkin, J. C., Philippi, C. L., Wolf, R., Baskaya, M. K., Koenigs, M., 2015. Ventromedial prefrontal cortex is critical for the regulation of amygdala activity in humans. **Biol. Psychiatry.** 77,276-284
- Nielsen, S., 2015. Benzodiazepines. In: Geyer MA, Ellenbroek BA, Marsden CA, Barnes ThRE (ed) *Curr Top Behav Neurosci.* Springer, pp 1-19.
- Novas, M. L., Wolfman, C., Medina, J. H., De Robertis, E., 1988. Proconvulsant and anxiogenic effects of n-butyl- β -carboline-3-carboxilate on endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 30, 331-336.
- Phan, K. L., Fitzgerald, D. A., Cortese, B. M., Seraji-Bozorgzad, N., Tancer, M. E., Moore, G. J., 2005. Anterior cingulate neurochemistry in social anxiety disorder: 1H-MRS at 4 Tesla. **Neuroreport.** 16,183-186.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs an anxiety-like behavior: a review. **Eur. J. Pharmacol.** 46, 3-33.
- Rodgers, R. J., Dalvi, A., 1997. Anxiety, defense and the elevated plus-maze. **Neurosci. Biobehav.** 21, 801-810.
- Siegel, S., Sanacora, G., 2012. The roles of glutamate receptors across major neurological and psychiatric disorders. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 100, 653-555.
- Skolnick, P., 2012. Anxiolytic: on a quest for the Holy Grail. **Trends Pharmacol. Sci.** 33, 611-620.
- Smith, A. j., Alder, L., Silk, J., Adkins, C., Fletcher, A. E., Scales, T., Kerby, J., Marshall, G., Wafford, K. A., McKernan, R. M., Atack, J. R., 2001. Effect of alpha subunit on allosteric modulation of ion channel function in stably expressed human recombinant gamma-aminobutyric (A) receptorsdetermined using Cl ion flux. **Mol. Pharmacol.** 59, 1108-1118.
- Sotoing Taiwe, G., Ngo Bum, E., Talla, E., Dawe, A., Okomolo Moto, F. C., Temkou Ngoupaye, G., Sidiki, N., Dabole, B., Djomeni Dzeufiet, P. D., Dimo, T., De Waard, M., 2012. Antipsychotic and sedative effects of the leaf extract of *Crassocephalum bauchiense* (Hutch.) Milne-Redh (Asteraceae) in rodents **J. Ethnopharmacol.** 143, 213- 220.

Souza, R. B., Frota, A. F., Sousa, R. S., Cezario, N. A., Santos, T. B., Souza, L. M., Coura, C. O., Monteiro, V. S., Cristino Filho, G., Vasconcelos, S.M., Cunha, R. M., Aguiar, L. M., Benevides, N. M., 2017. Neuroprotective Effects of Sulphated Agar from Marine Alga *Gracilaria cornea* in Rat 6-Hydroxydopamine Parkinson's Disease Model: Behavioural, Neurochemical and Transcriptional Alterations. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 120, 159-170.

Sperk, G., Schwarzer, C., Tsunashima, K., Fuchs, K., Sieghart, W., 1997. GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus I: immunocytochemical distribution of 13 subunits. **Neuroscience.** 80, 987-1000.

Teixeira, C. P., Melo, C. T., Araújo, F. L., Carvalho, A. M., Silva, M. I., Barbosa-Filho, J. M., Macedo, D. S., Viana, G. S. B., Sousa, F. C., 2011. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundam. Clin. Pharmacol.** 27, 129-137.

Uhlenhuth, E.H., Balter, M.B., Ban, T.A., Yang, K., 1999. International study of expert judgment on therapeutic use of benzodiazepines and other psychotherapeutic medications: IV. Therapeutic dose dependence and abuse liability of benzodiazepines in the long-term treatment of anxiety disorders. **J. Clin. Psychopharmacol.** 19, 23-29.

Venâncio, E. T., Rocha, N. F. M., Rios, E. R. V., Feitosa, M. L., Linhares, M. I., Melo, F. H. C., Matias, M. S., Fonseca, F. N., Sousa, F. C. F., Leal, L. K. A. M., Fonteles, M. M. F., 2011. Anxiolytic-like Effects of Standardized Extract of *Justicia pectoralis* (SEJP) in Mice: Involvement of GABA/Benzodiazepine in Receptor. **Phytother. Res.** 25, 444-450.

Yang, Y., Liu, D., Chen, Y., Wang, S., 2011. In vitro antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Corallina officinalis*. **Inter. J. Biol. Macromolecules.** 49,1031-1037.

Zarrindast, M. R., Babapoor-Farrokhran, S., Rezayof, A., 2008. Involvement of opioidergic system of the ventral hippocampus, the nucleus accumbens or the central amygdala in anxiety-related behavior. **Life Sci.** 82, 1175-1181.

Graphical abstract

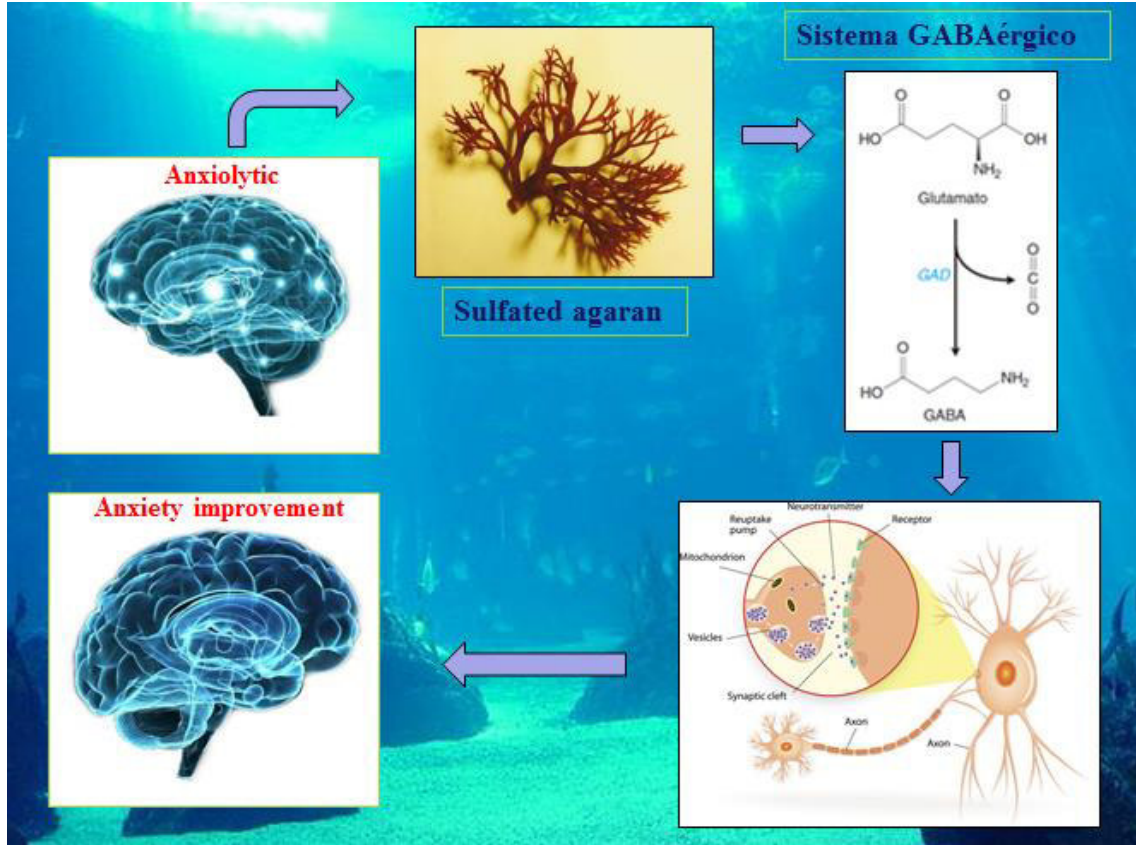


Figure legends

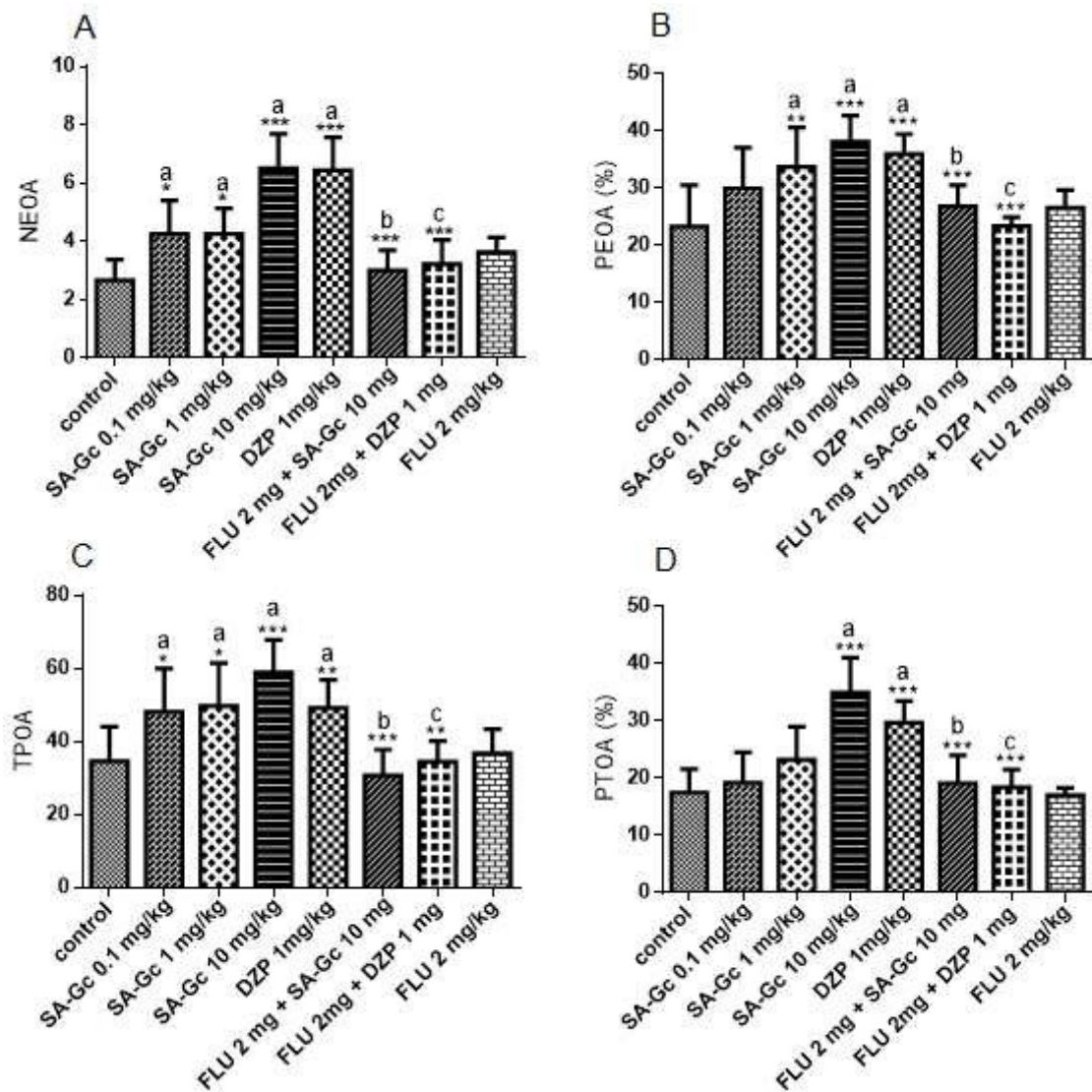


Fig.1. Plus maze test of groups of mice which received vehicle, SA-Gc (0.1, 1 and 10 mg/kg), DZP (1 mg/kg) or FLU (2 mg/kg). (A) NEOA, number of entries into open arms; (B) PEOA, percentage of entries into open arms; (C) TPOA, time of permanence in the open arms; (D) PTOA, percentages of permanence in the open arms. The results are presented as mean \pm SEM. ^aSignificant difference when compared with the control; ^bsignificant difference when compared with SA-Gc 10 mg/kg; ^csignificant difference when compared with diazepam 1 mg/kg. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) ANOVA and Student–Newman–Keuls’s as the *post hoc* test.

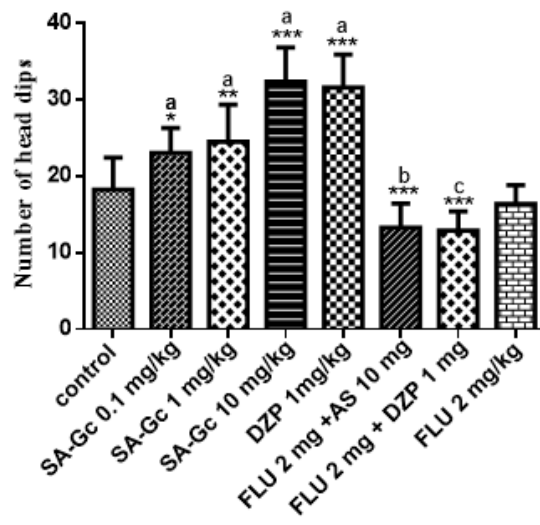


Fig. 2. Hole-board test of groups of mice which received vehicle, SA-Gc (0.1, 1 and 10 mg/kg), and diazepam (DZP 1 mg/kg). Number of head dips. The results are presented as means \pm S.E.M. Significant difference compared with control (** $p < 0.01$). ANOVA and Student–Newman–Keuls's as the post hoc test.

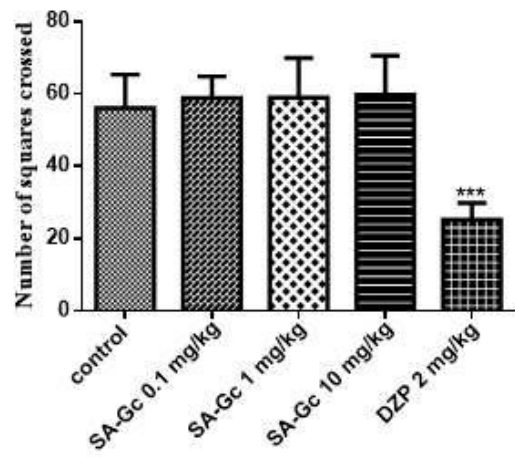


Fig. 3. Open-field test of groups of mice which received vehicle, SA-Gc (0.1, 1 and 10 mg/kg), and diazepam (DZP 2 mg/kg). The parameters analyzed were: number of squares crossed. The results are presented as mean \pm S.E.M. Significant difference compared with control (** $p < 0.01$). ANOVA and Student–Newman–Keuls's as the post hoc test.

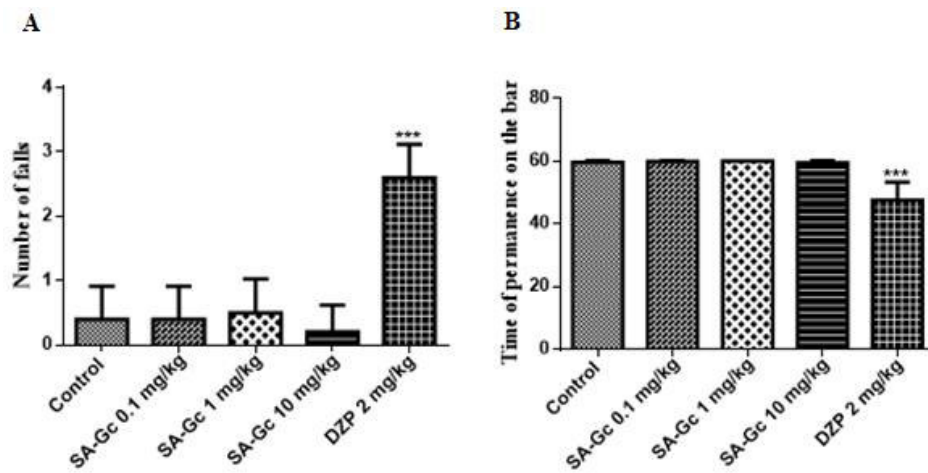


Fig. 4. Rota rod test of groups of mice which received vehicle, SA-Gc (0.1, 1 and 10 mg/kg), DZP (2 mg/kg). (A) Number of falls. (B) Time on the bar. The results are presented as mean \pm SEM. Significant difference compared with control (*** $p < 0.001$) ANOVA and Student–Newman–Keuls's as the *post hoc* test.

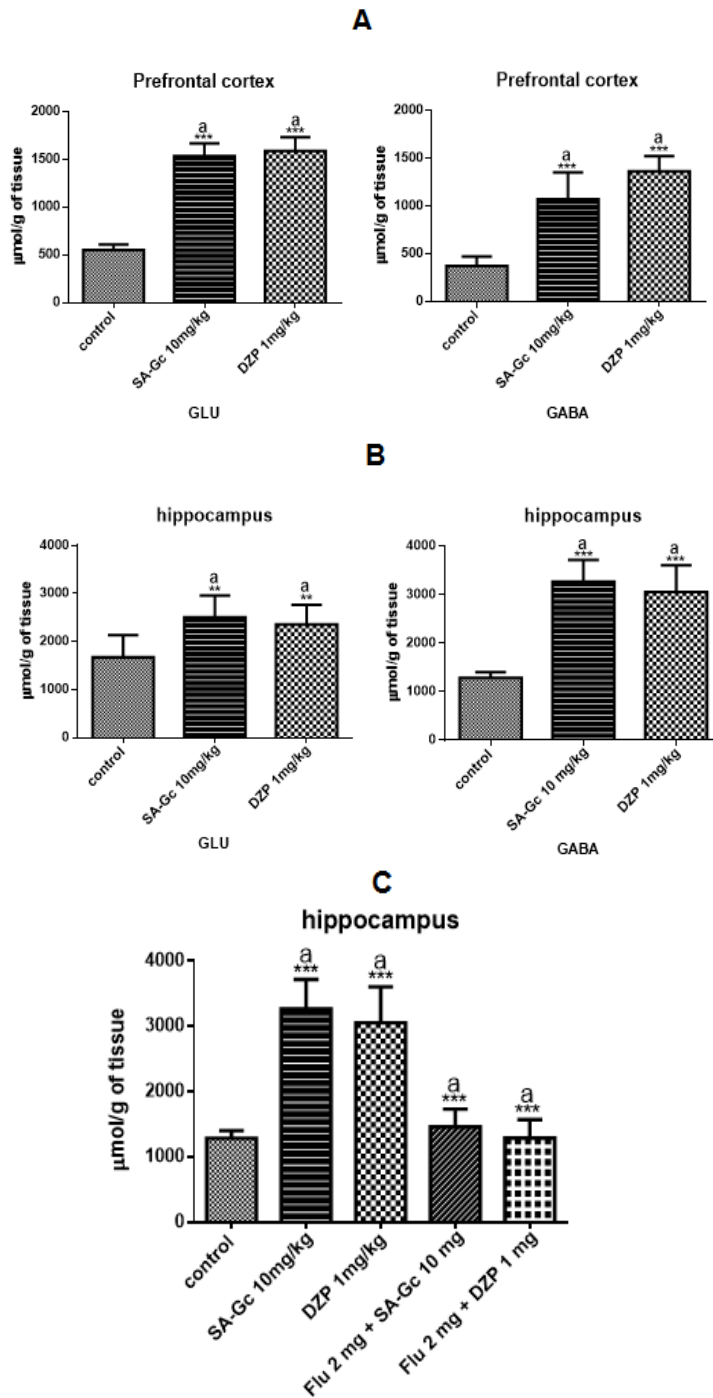


Fig.5. Amino acids concentration measurement of groups of mice which received vehicle, SA-Gc (10 mg/kg), DZP (1 mg/kg). (A) Prefrontal cortex. (B) hippocampus. (C) Hippocampus, SA-Gc (10 mg/kg) or FLU (2 mg/kg). The results are presented as mean \pm SEM. ^aSignificant difference when compared with the control. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) ANOVA and Student–Newman–Keuls’s as the *post hoc* test.

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados sugerem que o tratamento agudo com AS-Gc na dose de 10 mg/kg apresentam efeito ansiolítico sendo revertido pelo uso de flumazenil, sugerindo que está relacionado ao mecanismo de ação GABAérgica. Análises bioquímicas confirmaram essa ação aumentando o aminoácido inibitório GABA no PF e HC.

Além disso, ao contrário do diazepam, o AS-Gc (10mg/kg) não apresentou efeito sedativo ou miorelaxante e não alterou a atividade locomotora.

Assim, um aprofundamento nos estudos com a AS-Gc seria importante, pois poderia ser uma perspectiva para sua posterior utilização na indústria farmacêutica.

REFERÊNCIAS

- ABREU, T.M.; MONTEIRO, V.S.; MARTINS, A.B.S.; TELES, F.B.; DA CONCEIÇÃO RIVANOR, R.L.; MOTA, E.F.; MACEDO, D.S.; VASCONCELOS, S.M.M.; JÚNIOR, J. E.R.H.; BENEVIDES, N.M.B.. Involvement of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of the lectin isolated from the red marine alga *Solieria filiformis* in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 534-541, 2018.
- ABREU, T. M. ; RIBEIRO, N.A. ; CHAVES, H.V. ; JORGE, R.J.B. ; BEZERRA, M.M. ; MONTEIRO, H.S.A.M. ; VASCONCELOS, S. M. ; MOTA, E.F. ; BENEVIDES, N.M. B.. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Lectin from Marine Red Alga *Solieria filiformis*. **Planta Medica**, v. 82, p. 596-605, 2016.
- 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.; FEIGNER, J. P.; FERRIS, R. M.; FIBIGER, H. C.; GOLDEN, R. N.; MARTIN, P.; POTTER, W. Z.; RICHELSON, E.; SULSER, F. Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity. **J. Clin. Psychiatry**, v. 56, p. 395-401, 1995.
- 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, Williams & 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.; BIRKMEYER, 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.

CRASKE, M.G., HERMANS, D., VERVLIET, B. State-of-the-art and future directions for extinction as a translational model for fear and anxiety. **Philos. Trans. Biol. Sci.** 373, 1742-1760. 2018.

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.

FERNÁNDEZ-TERUEL A.; ESCORIHUELA, R.M.; BOIX, F.; LONGONI, B.; CORDA, M.G.; TOBEÑA, A. Imipramine and desipramine decrease the GABA-stimulated chloride uptake, and antigabaergic agents enhance their action in the forced swimming test in rats. **Neuropsychobiology**. v. 23, n.3, p. 147-152, 1990.

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.

GARDIER, A.M.; TRILLAT, A.C.; MALAGIÉ, I.; DAVID, D.; HASCOËT, M.; COLOMBEL, M.C.; JOLLIET, P.; JACQUOT, C.; HEN, R.; BOURIN, M. 5-HT1B serotonin receptors and antidepressant effects of selective serotonin reuptake inhibitors. **Acad. Sci.** v. 324, n. 05, p. 433-441, 2001.

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, Rhodophyta) 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 mellitus. 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.

LI, Q., ZHANG, Z., LI, H., PAN, X., CHEN, S., CUI, Z., MA, J., ZHOU, Z., XING, B. Lycium barbarum polysaccharides protects H9c2 cells from hypoxia-induced injury by down-regulation of miR-122. **Biomed. Pharmacother.** 110, 20-28. 2019.

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. **Psychopharmacology**, 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. Ethnopharmacol.**, 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 *Dictyopterus 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*. **Carbohyd Polym.**, v. 49, n. 4, p. 491-498, 2002.
- MIRANDA, G. E. C. Avaliação do impacto da exploração da alga agarófito *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 envirometal 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 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.
- NEUMANN, W. J., TURNER, R. S., BLANKERTZ, B., MITCHELL, T., KÜHN, A. A., RICHARDSON, R. M. Toward Electrophysiology-Based Intelligent Adaptive Deep Brain Stimulation for Movement Disorders. **Neurotherapeutics**. 15, 1-14. 2019.
- 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.
- OLIVEIRA, E. C.; HORTA, P. A.; AMANCIO C. E. Algas e angiospermas marinha bênticas do litoral brasileiro: diversidade, exploração e conservação. **Plantas marinhas on line**, 2010.

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., Ravan 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 imipramini. **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 anxyolytic 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 sulted polysaccharides from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. **Neurosciences Letters**, v. 503, p. 37-42, 2011.

SHERILL, 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 man? **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. **Carbohydr. Polym.**, v. 79, n. 1, p. 29-33, 2010.

SILVILOTTI, L.; NISTRÌ, 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.

Skolnick, P., 2012. Anxiolytic anxiolytics: on a quest for the Holy Grail. **Trends Pharmacol. Sci**

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.. 33, 611-620.

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.