



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do uso de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne sobre a
atividade adaptogênica e na expressão de biomarcadores do estresse
oxidativo em cérebro de animais com estresse induzidos**

Aluno: Hélen Lara Machado

Orientador: Foued Salmen Espindola

Co-Orientador: Renata Roland Teixeira

UBERLÂNDIA - MG
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do uso de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne sobre a
atividade adaptogênica e na expressão de biomarcadores do estresse
oxidativo em cérebro de animais com estresse induzidos**

Aluno: Hélen Lara Machado

Orientador: Dr. Foued Salmen Espindola

Co-Orientador: Dra. Renata Roland Teixeira

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Bioquímica).

UBERLÂNDIA - MG
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

-
- M149a
2014
- Machado, Hélien Lara, 1988-
Avaliação do uso de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne sobre a atividade adaptogênica e na expressão de biomarcadores do estresse oxidativo em cérebro de animais com estresse induzidos / Hélien Lara Machado. - 2014.
55 f. : il.
- Orientador: Foued Salmen Espindola.
Coorientadora: Renata Roland Teixeira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Bioquímica - Teses. 2. Stress oxidativo - Teses. I. Espindola, Foued Salmen. II. Teixeira, Renata Roland. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

PALAVRAS-CHAVES: *Hymenaea stigonocarpa*, Adaptógenos, Estresse, atividade antioxidante, estresse oxidativo, neuroproteção



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do uso de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne sobre a
atividade adaptogênica e na expressão de biomarcadores do estresse
oxidativo em cérebro de animais com estresse induzidos**

Aluno: Hélen Lara Machado

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Foued Salmen Espindola

Examinadores: Dr. Fulvio Rieli Mendes (UFabc)
Dr. Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa (UNESP)

Data da Defesa: 05/12/2014

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas

(Dr. Foued Salmen Espindola)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ângela M. R. Machado e Abner M. Andrade, pelo amor, carinho, força e incentivo. Essa conquista é nossa!

“Tudo posso n'Aquele que me fortalece”.

(Fl 4,13)

AGRADECIMENTOS

À Santíssima Trindade por todas as bênçãos e graças recebidas. Pela força, perseverança e coragem para enfrentar todas as dificuldades. *Sem Ti nada posso fazer.* A Santíssima Virgem Maria por me amparar, acolher as minhas orações e acalmar o meu coração, por iluminar e guiar os meus passos. *Sou todo seu ó Mãe.* E a minha madrinha Santa Teresinha do Menino Jesus, pela “chuva de rosas” que derrama em minha vida e da minha família.

Aos meus pais, Ângela M. R. Machado e Abner M. Andrade, por todos os sacrifícios, apoio e ajuda. Eu nunca teria conseguido sem vocês. Todo o amor, respeito e gratidão. Amo muito vocês!

À Neide L. Machado, Antônio M. Reis, Clênio M. Reis, Dimas C. Machado e Cléofas M. Reis, por me acolherem por tantos anos e pelos ensinamentos de amor, união e humildade. Obrigada por tudo que fizeram por mim, eu nunca conseguirei retribuir ou agradecer à altura. Eu desejo todas as bênçãos de Deus para cada um de vocês. Meu amor e minha gratidão!

Aos meus queridos irmãos, Éder F. Machado, Suelle C. Machado, Francielle M. Machado, pela amizade, descontração e apoio.

A todos os meus familiares e de forma especial, a minha vizinha Áurea M. Jesus, pelo carinho e as orações.

Aos sobrinhos mais lindos deste mundo, Ana Clara Machado, Luís Otávio Machado e Sabrina M. Costa por todo o carinho, amor e alegria. Minha vida se ilumina com a presença de vocês. A titia ama vocês!

Ao meu namorado Everaldo C. Melo, pela compreensão, companheirismo e respeito.

Ao meu orientador Prof. Foued S. Espindola, pela confiança, pelas oportunidades oferecidas e por todos os conhecimentos compartilhados. Eu pude aprender e crescer muito nesses anos. Obrigada por tudo!

À minha querida co-orientadora, Renata R. Teixeira por toda a dedicação, amizade e força. Obrigada por tudo! Eu sou muito grata pela sua ajuda em todas as etapas deste trabalho. Eu agradeço muito a Deus a oportunidade que Ele me deu de trabalhar com você. Eu te admiro muito, você é uma grande pesquisadora e uma pessoa maravilhosa. Muitas bênçãos e paz na sua vida.

Ao Leonardo G. Peixoto, por todas as contribuições científicas e auxílio na escrita do artigo e nos experimentos.

À Neire M. Gouveia, pela amizade e força nos momentos de grandes dificuldades. Obrigada pelas conversas e por me ajudar a continuar lutando e a não desistir.

Ao Prof. Moacir Wajner e em especial a sua aluna Carolina G. Fernandes pelo auxílio nas técnicas de estresse oxidativo, que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Eu agradeço por toda receptividade e a ajuda.

Ao Prof. Celso R. Franci pelas análises realizadas, pois a sua colaboração foi fundamental neste trabalho.

Ao Prof. Fulvio R. Mendes que prontamente respondeu aos meu e-mails e esclareceu todas as dúvidas do experimento de indução do estresse. Obrigada pela imensa contribuição na realização deste trabalho.

À Prof.^a Luciana K. Calábria, pelo auxílio e incentivo em etapas importantes do meu mestrado. Obrigada pela ajuda e contribuições científicas.

A todos os “Vochysianos”, Luciana K. Calábria, Neire M. Gouveia, Izabela B. Moraes, Alice V. Costa, Aline B. Rodovalho, Camilla M. Martins, Douglas C. Caixeta, pelo aprendizado, amizade e pelos conhecimentos adquiridos no grupo de estudos.

Agradeço de forma muito carinhosa as lindonas Francielle B. R. Moura e Izabela B. Moraes, pela amizade e pelos desabafos. Vocês me ajudaram muito com palavras de apoio e incentivo.

Aos membros do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular pela ajuda na realização dos experimentos e pelos momentos de descontração. À Prof.^a Françoise V. Botelho pelas contribuições e por estar sempre solícita a tirar as minhas dúvidas. E de forma especial a Adriele V. Souza, Danielle D. Vilela, Douglas C. Caixeta, Eduardo M. Simões, Nathalia B. Bathista, que auxiliaram na realização dos experimentos e por tornarem os meus dias mais leves e alegres, com muitas risadas.

A FAPEMIG e a Rede FitoCerrado, pelo apoio financeiro na realização do projeto.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, contribuindo para a realização deste estudo.

APRESENTAÇÃO

O formato desta dissertação obedece às normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Ela é composta de dois capítulos, sendo o capítulo 1 referente a fundamentação teórica, que embasa o capítulo 2.

Capítulo 1 - Fundamentação Teórica.

Capítulo 2 - Avaliação do efeito antiestresse e neuroprotetor do extrato aquoso de frutos de *Hymenaea stigonocarpa*

SUMÁRIO

Capítulo 1: Fundamentação Teórica.....	1
1. Estresse e Funcionamento do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA).....	2
2. Estresse oxidativo e Sistema Nervoso.....	4
3. Adaptógenos e estresse.....	9
3.1. Princípios ativos das plantas adaptogênicas.....	13
3.2. Mecanismo de ação das plantas adaptogênicas.....	14
4. <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. exHayne: potencial adaptogênico.....	14
5. Referências bibliográficas.....	19
Capítulo 2: Avaliação do efeito antiestresse e neuroprotetor do extrato aquoso dos frutos de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	30

Resumo

Hymenaea stigonocarpa Mart. ex Hayne (Fabaceae), conhecida como "jatobá-do-cerrado" é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro e popularmente usada como fortificante, afrodisíaco e estimulante cerebral. Neste estudo, ratos Wistar tratados com *H. stigonocarpa* por 14 dias e submetidos ao estresse crônico por restrição e frio durante 7 dias, diminuíram os níveis séricos de corticosterona e normalizou os parâmetros bioquímicos. O tratamento com *H. stigonocarpa* não causou toxicidade, promoveu uma melhora no estado redox em regiões do cérebro (cerebelo, córtex cerebral, estriado e hipocampo) e aumentou a capacidade antioxidante total, demonstrando um potencial efeito adaptogênico e neuroprotetor em relação às alterações causadas pelo estresse.

Palavras chaves: *Hymenaea stigonocarpa*, Adaptógenos, Estresse, atividade antioxidante, estresse oxidativo, neuroproteção

Abstract

Hymenaea stigonocarpa Mart. ex Hayne (Fabaceae) known as “jatobá-do-cerrado” is a species native to the Brazilian savannah. The plant is popularly used as fortifier, aphrodisiac and brain stimulant. In this study, we show that Wistar rats treated with *H. stigonocarpa* for 14 days and subjected to chronic stress by restriction and cold for 7 days, decreased levels of corticosterone and normalized serum biochemical parameters. The treatment of *H. stigonocarpa* showed no toxicity, promoted an improved redox state in brain regions (cerebellum, cerebral cortex, striatum and hippocampus) and increased total antioxidant capacity, suggesting a potential adaptogenic and neuroprotective effect against stress-induced changes.

Keywords: *Hymenaea stigonocarpa*, adaptogens, stress, antioxidant activity, oxidative stress, neuroprotection

Capítulo 1

Fundamentação Teórica

1. Estresse e Funcionamento do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA)

Constantemente os indivíduos são expostos a situações estressantes (intrínsecas ou extrínsecas) que ameaçam o bem-estar físico e/ou psicológico e consequentemente o equilíbrio dinâmico (homeostase). Dessa forma, o estresse pode ser definido como uma ameaça real ou potencial à homeostase ou ao bem-estar e que resulta em alterações fisiológicas e comportamentais que visam restabelecer o equilíbrio (Chrousos, 2007; Ulrich-Lai e Herman, 2009).

Em situações de estresse há alterações no organismo tanto a nível central quanto periférico. As adaptações fisiológicas ocorrem para promover um redirecionamento energético e para destinar o oxigênio e nutrientes ao Sistema Nervoso Central (SNC) e a outros locais em que forem necessários. Há um aumento das funções cardiovasculares, frequência respiratória e estímulo das reações metabólicas. Concomitantemente, às alterações comportamentais provocam um aumento da excitação, estado de alerta, vigilância, melhora da cognição; atenção e euforia e inibem as funções vegetativas, tais como o apetite, sono e reprodução (Chrousos, 2007; 2009).

O restabelecimento e a manutenção da homeostase no estresse envolvem a ativação coordenada dos sistemas neuroendócrino e autônomo (SNA) (Ulrich-Lai e Herman, 2009). A resposta ao estresse é resultado da ativação de dois sistemas distintos, mas inter-relacionados, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e eixo simpático adrenomedular (SAM). Eles são considerados os reguladores chave na resposta ao estresse e são importantes na integração e coordenação fisiológica das células, tecidos e órgãos com o meio ambiente (Koolhaas *et al.*, 2011).

O SNA promove uma resposta imediata ao estresse e é responsável pelo controle das funções cardiovasculares, respiratórias, gastrointestinais, renais, endócrinas e de outros sistemas, que são regulados pelo sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático (SNP) (Chrousos, 2007; Ulrich-Lai e Herman, 2009). O eixo SAM é um componente do sistema do SNA, responsável pela liberação das catecolaminas, principalmente a epinefrina (adrenalina) pelas células da medula supra-renal. A exposição a agentes estressores resulta na ativação dos neurônios simpáticos da medula espinhal, que estimulam as células

cromafins da medula adrenal a secretar as catecolaminas. As catecolaminas se ligam aos receptores adrenérgicos e provocam aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial e também atuam na mobilização dos substratos energéticos nas reações de luta e fuga. A epinefrina estimula a glicogenólise hepática e muscular, gliconeogênese no fígado e a lipólise no tecido adiposo. A noradrenalina produzida principalmente no *locus coeruleus* age como um neurotransmissor estimulando o SNS e causando excitação, vigilância, aumento da atenção e diminuição das funções vegetativas (Gunnar e Quevedo, 2007).

A ativação do eixo HPA é resultado de sinais neurais e endócrinos que ativam os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). No PVN existem neurônios parvocelulares que sintetizam principalmente fator de liberação de corticotropina (CRH) e outros peptídeos como a vasopressina. Esses neurônios liberam o CRH, que por sua vez ativa a hipófise anterior a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação para interagir com receptores específicos nas membranas plasmáticas das células da zona fasciculada do córtex adrenal e estimular a síntese e secreção de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em ratos) (Ulrich-Lai e Herman, 2009).

Os glicocorticoides participam no controle da homeostase e na resposta do organismo ao estresse, inibindo a liberação do ACTH por meio do mecanismo de feedback negativo. Esse mecanismo de retroalimentação é importante para limitar a exposição do organismo a esses hormônios e assim, minimizar os seus efeitos catabólicos, lipogênicos, antireprodutivos e imunossupressores (Tsigos e Chrousos, 2002; Chrousos, 2007).

Embora todas essas adaptações metabólicas em resposta ao estresse agudo sejam necessárias para a sobrevivência, em situações de estresse crônico são deletérias. A exposição prolongada a eventos estressantes é um fator de risco tanto na etiologia quanto na progressão de patologias, como as doenças endócrinas (diabetes), cardiovasculares (hipertensão), imunossupressão, distúrbios psiquiátricos (depressão e ansiedade), disfunções sexuais e cognitivas (aprendizagem e memória) (Seely e Singh, 2007; Habbu *et al.*, 2012; Pawar e Shivakumar, 2012). O estresse crônico tem efeitos negativos sobre as funções cerebrais, provavelmente devido à geração de radicais livres (Zaidi e Banu, 2004; Gunnar e Quevedo, 2007).

2. Estresse oxidativo e Sistema Nervoso

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas e radicais livres (espécies químicas com um ou mais elétrons desemparelhados) que possuem um oxigênio com alta capacidade para promover modificações oxidativas (Cui *et al.*, 2004). As ROS podem ser radicalares, como o radical hidroxil ($\text{OH}^\bullet$) e radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Há também as espécies reativas de nitrogênio (RNS), como o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), peroxinitrito (ONOO^-) e o dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2^\bullet$) (Echtay, 2007). As ROS e RNS são geradas no metabolismo aeróbico por processos enzimáticos e não enzimáticos. Os seres humanos estão constantemente expostos a fontes endógenas e exógenas que desencadeiam a geração dessas espécies reativas (Tabela 1) (Dasuri, Zhang e Keller, 2013).

Tabela 1: Fontes exógenas e endógenas de espécies reativas

Exógenas	Endógenas
Radiação UV	Macrófagos
Xenobióticos	Mitocôndria
Estresse	NADPH oxidase
Agentes infecciosos	Neutrófilos
Radiação ionizante	Óxido nítrico sintase
Fármacos	Ciclooxygenases

Fonte: Adaptado de Dasuri, Zhang e Keller, 2013.

Nos organismos aeróbicos, a maioria das ROS é produzida na cadeia respiratória mitocondrial, onde o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). No entanto, mesmo em condições fisiológicas o oxigênio não é completamente reduzido e são formados intermediários metabólicos reativos e com grande instabilidade, como os ânions superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e hidroxil ($\text{OH}^\bullet$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Rains e Jain, 2011).

As ROS são benéficas e podem desempenhar funções celulares importantes na defesa contra agentes infecciosos, sinalização celular como

mensageiros secundários e na indução da resposta mitogênica. No entanto, a produção excessiva de ROS pode provocar danos nas membranas biológicas (peroxidação lipídica) e modificar moléculas essenciais, como o DNA, proteínas e lipídeos, causando alterações na integridade funcional e estrutural celular (Valko *et al.*, 2006; Valko *et al.*, 2007; Rains e Jain, 2011).

O ânion superóxido é formado pela redução do oxigênio molecular por um único elétron. O radical hidroperoxil é instável em pH fisiológico e se dissocia produzindo o ânion superóxido. O íon superóxido não atravessa as membranas celulares, mas a dismutação do ânion superóxido produz peróxido de hidrogênio, que também pode ser produzido por enzimas. O peróxido de hidrogênio é uma molécula menos reativa, mas ao contrário do superóxido pode atravessar as membranas biológicas. Tanto o peróxido de hidrogênio quanto o radical superóxido pode sofrer novas transformações na presença de metais de transição (principalmente ferro e cobre) para dar origem aos radicais hidroxil (Reação de Haber-Weiss ou Fenton). O radical hidroxil é altamente reativo e lesivo para as células (Tabela 2) (Cui *et al.*, 2004).

Tabela 2: Formação de ROS na cadeia de transporte de elétrons

Reações de formação de ROS
(ii) $O_2 + e + H^+ \rightarrow HO_2$ (radical hidroperoxil)
(ii) $HO_2 \rightarrow H^+ + O_2^{\cdot -}$ (radical superóxido)
(iii) $O_2^{\cdot -} + 2H^+ + e \rightarrow H_2O_2$ (peróxido de hidrogênio)
(iv) $H_2O_2 + e \rightarrow OH^{\cdot -} + OH$ (radical hidroxil)
(v) $O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot -} + OH + O_2$ (reação de Haber-Weiss)
(vi) $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot -} + OH + Fe^{3+}$ (reação de Fenton)

Fonte: Adaptado de Cui *et al.* (2004).

A peroxidação lipídica é um dos principais danos produzidos pelas ROS e induz alterações na integridade, fluidez, permeabilidade e causa perda funcional das membranas biológicas. A lipoperoxidação consiste em reações em cadeia entre as ROS com os ácidos graxos poli-insaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, levando a formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído (Niki, 2009).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas, a depleção das defesas antioxidantes ou ambos (Echtay, 2007; Halliwell, 2007). Para neutralizar os efeitos oxidantes e restaurar o equilíbrio redox, as células possuem mecanismos de defesas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (compostos endógenos ou antioxidantes dietéticos). No sistema de defesa antioxidante enzimático, inclui-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx); enquanto que o ácido ascórbico, glutathione reduzida (GSH), compostos fenólicos, tocoferóis e o ácido úrico, estão incluídos nas defesas não enzimáticas (Figura 1) (Echtay, 2007; Valko *et al.*, 2007; Roberts e Sindhu, 2009).

A superóxido dismutase catalisa a conversão do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é então removido pela ação da catalase ou glutathione peroxidase. Em humanos há três isoformas dessa enzima: SOD 1 (CuZn-SOD) citosólica, a SOD 2 (Mn-SOD) mitocondrial e a SOD 3 extracelular (Dasuri, Zhang e Keller, 2013).

A catalase é uma hemoproteína, localizada principalmente nos peroxissomos. Esta enzima tem a função de decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, usando o ferro ou manganês como cofator (Valko *et al.*, 2006; Limon-Pacheco e Gonsebatt, 2009; Dasuri, Zhang e Keller, 2013).

Além da catalase, a glutathione peroxidase também catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio e de peróxidos orgânicos em água e álcool, em uma reação de oxidação da glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada (GS-SG). A glutathione peroxidase pode eliminar peróxidos que são utilizados na reação de Fenton. Há dois tipos dessa enzima, uma que é dependente de selênio e outra independente de selênio (glutathione-S-transferase, GST). Essas enzimas estão presentes tanto no citosol quanto na mitocôndria (Valko *et al.*, 2006; Limon-Pacheco e Gonsebatt, 2009; Roberts e Sindhu, 2009; Dasuri, Zhang e Keller, 2013).

Os antioxidantes não enzimáticos exercem a sua ação na ausência de reações enzimáticas nos sistemas celulares. Estas moléculas neutralizam e/ou removem as ROS, através da inibição das fontes oxidantes celulares ou pelo aumento dos sistemas de defesa antioxidantes. Os antioxidantes não enzimáticos são compostos endógenos (glutathione, ácido úrico, ácido lipóico, L-arginina e

transferrina), produzidos por reações metabólicas celulares ou exógenos, obtidos de fontes naturais ou sintéticas, como a vitamina E, vitamina C, β -caroteno, cisteína, compostos fenólicos (Uttara *et al.*, 2009; Dasuri, Zhang e Keller, 2013) e os minerais selênio, cobre, zinco, ferro e manganês, que atuam como cofatores para as enzimas antioxidantes (Limon-Pacheco e Gonsebatt, 2009)

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo (L- γ -glutamil-L-cisteinil glicina), que atua como importante substrato para a GPx e GST e participa como antioxidante nas reações de detoxificação de peróxidos e de xenobióticos. A razão GSH:GSSG é utilizada como um indicador do estado redox celular. A GSSG é reduzida a GSH, pela ação da glutathiona redutase (GR), utilizando NADPH como aceptor de elétrons (Dringen e Hirrlinger, 2003; Dasuri, Zhang e Keller, 2013).

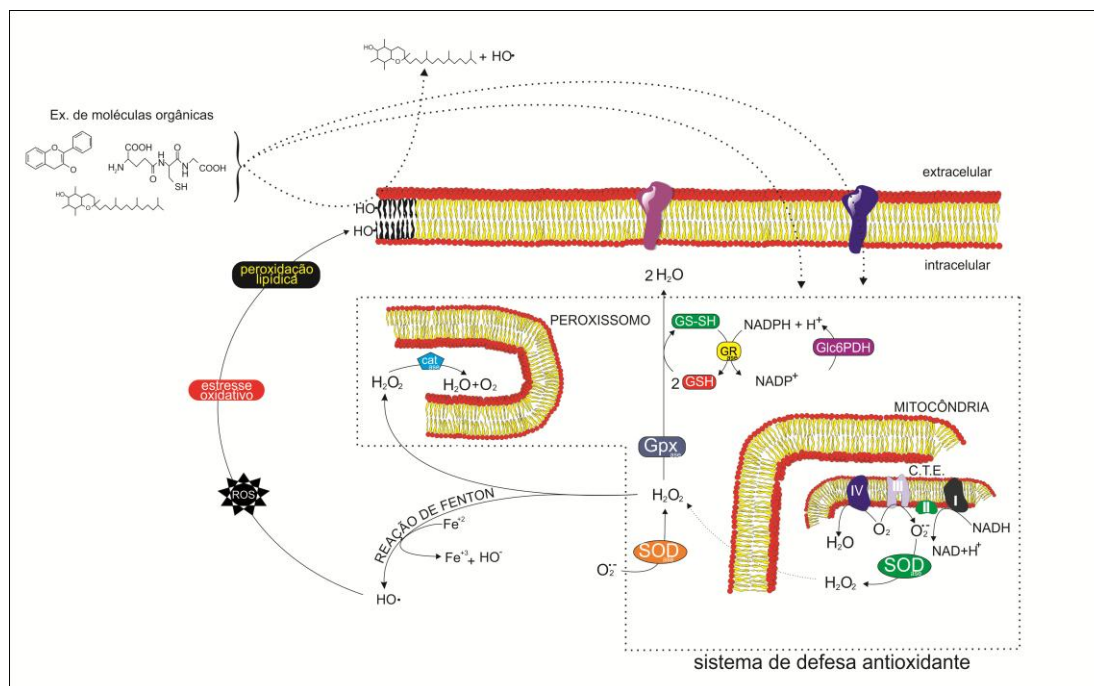


Figura 1: Esquema representando as principais fontes de espécies reativas de oxigênio (ROS) e os sistemas de defesa antioxidante enzimático e não enzimático celular. As ROS são geradas principalmente pela cadeia transportadora de elétrons e são neutralizadas pelos antioxidantes, incluindo a enzimas SOD, CAT e GPx e pelo sistema da GSH. Abreviações: SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase), GPx (glutathiona peroxidase), GSH (glutathiona reduzida), GSSG (glutathiona oxidada), GR (glutathiona redutase), Glc6PDH (glicose-6-fosfato desidrogenase).

O cérebro é vulnerável aos danos causados pelo estresse oxidativo principalmente devido: a) ao elevado consumo de oxigênio para a geração de ATP; b) alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, que são susceptíveis aos danos oxidativos; c) o líquido cefalorraquidiano contém complexos moleculares de cobre e ferro que catalisam a formação de radicais hidroxil; d) a liberação dos neurotransmissores excitatórios (glutamato) e a oxidação da dopamina induz a liberação de ROS; e) o cérebro possui baixos níveis de enzimas antioxidantes (catalase e GPx) e de antioxidantes não enzimáticos (vitamina E); f) a interação do óxido nítrico com o radical superóxido leva a degeneração neuronal; g) os neurônios são células não replicáveis e danos cerebrais provocados pelas ROS são cumulativas ao longo do tempo (Cui *et al.*, 2004; Aoyama, Watabe e Nakaki, 2008).

Em resposta ao estresse físico e/ou psicológico há um aumento dos níveis de glicocorticoides. E aumento prolongado dos níveis desses hormônios no cérebro provoca danos aos neurônios, ao córtex e ao estriado (Mcintosh e Sapolsky, 1996) e principalmente ao hipocampo, que possui uma elevada

concentração de receptores de glicocorticóides (Mcintosh e Sapolsky, 1996; You *et al.*, 2009). Os glicocorticoides podem interferir tanto na produção de ROS quanto nos sistemas de defesa antioxidantes. Estudo realizado em culturas celulares de hipocampo demonstrou que os glicocorticoides provocaram um aumento de 10% nas ROS (Mcintosh e Sapolsky, 1996). Assim, o estresse pode afetar a homeostase do SNC, perturbando parâmetros neuroquímicos e endócrinos e consequentemente levar a um desequilíbrio do estado antioxidante (Oishi *et al.*, 1999; Dal Santo *et al.*, 2014).

3. Adaptógenos e estresse

Devido às exigências físicas e psicológicas do atual estilo de vida e às desordens relacionadas com o estresse, há necessidade de desenvolver agentes para superar essas anormalidades. Os adaptógenos estão ganhando cada vez mais importância e estão sendo investigados na terapêutica como agentes antiestresse (Sheikh *et al.*, 2007).

Historicamente a pesquisa com os adaptógenos teve início com a Segunda Guerra Mundial, devido à necessidade de buscar substâncias que pudessem aumentar a resistência e o desempenho dos soldados, pilotos, marinheiros e de civis envolvidos na produção de armas e materiais bélicos (Panossian e Wagner, 2011). Os primeiros estudos científicos sobre os efeitos estimulantes e tônicos de *Schisandra chinensis* (Schisandraceae) foram publicados em revistas militares soviéticas. O interesse russo surgiu a partir de investigações etnofarmacológicas da utilização dessa espécie como um tônico, para reduzir a sede, fome, exaustão e para melhorar a visão noturna (Panossian e Wikman, 2008).

No início dos anos de 1960 houve uma intensa investigação da ex-União Soviética sobre os adaptógenos. Foram mais de 1.000 estudos publicados até 1982 e a maioria destes trabalhos foi realizada com extratos ou substâncias isoladas de: *Eleutherococcus senticosus* (Araliaceae), *Panax ginseng* (Araliaceae) e *Rhodiola rosea* (Crassulaceae). No entanto, esses estudos foram publicados em língua russa, o que dificultava o acesso. Na década de 80, houve um aumento

números de artigos publicados em língua inglesa, o facilitou o acesso e conhecimento sobre essa temática (Panossian e Wagner, 2011).

O objetivo da pesquisa com o estresse foi o desenvolvimento de fármacos capazes de estimular os mecanismos adaptativos intrínsecos do organismo para ajudá-lo a sobreviver em situações de estresse intenso ou prolongado e ao mesmo tempo manter a capacidade de trabalho físico e mental (Panossian e Wikman, 2010). O termo adaptógeno foi inicialmente utilizado para descrever substâncias capazes de “aumentar a resistência não específica” no estresse, tornando o organismo capaz de responder melhor ao estresse e adaptar-se ao agente agressor, promovendo um estado de adaptação à situação excepcional (Brekman e Dardymov, 1969; Wagner, Norr e Winterhoff, 1994; Panossian, Wikman e Wagner, 1999).

O conceito de adaptógenos pode ser mais bem entendido com base na teoria da Síndrome de Adaptação Geral proposta por Hans Selye (Selye, 1938), que definiu o estresse como um estado de homeostase ameaçada, provocado por estímulos estressores de qualquer natureza, que levam a uma perturbação do estado de equilíbrio do organismo (Wagner, Norr e Winterhoff, 1994). A resposta ao estresse pode ser dividida em três fases: fase de alarme, fase de resistência e fase de exaustão (Selye, 1938; Wagner, Norr e Winterhoff, 1994).

A fase de alarme é uma resposta imediata do organismo ao estresse, caracterizada pelo estímulo da atividade simpática e do eixo HPA, o que provoca aumento dos níveis de adrenalina, noradrenalina e cortisol (Wagner, Norr e Winterhoff, 1994; Mendes, 2011b).

Na fase de resistência o organismo desenvolve uma certa habituação ou adaptação ao estresse e consegue reponder ao estressor sem grandes prejuízos para o seu funcionamento. O organismo mobiliza as reservas energéticas de forma a responder adequadamente ao agente estressor (Wagner, Norr e Winterhoff, 1994; Mendes, 2011b).

Dependendo da duração e/ou a intensidade do estresse, o organismo não consegue responder de forma adequada e entra em um estado de saturação. Na fase de exaustão o organismo fica sujeito aos danos, como descontrole hormonal, baixa imunidade, dentre outros. Há uma depleção das reservas energéticas e a perda dos mecanismos de autocontrole do eixo HPA (Wagner, Norr e Winterhoff,

1994; Mendes, 2011b). O organismo possui uma capacidade limitada para lidar com o estresse e essa capacidade pode diminuir com a exposição contínua a tal agressão, resultando em distúrbios na saúde (Carlini, 2003).

Neste sentido adaptógenos aumentam a capacidade de resistência ao estresse devido à diminuição das reações negativas na fase de alarme e por retardar ou impedir o estabelecimento da fase de exaustão (Wagner, Norr e Winterhoff, 1994).

Originalmente foi definido que uma planta medicinal deveria possuir três requisitos para ser considerado um adaptógeno (Brekman e Dardymov, 1969):

- possuir ação inespecífica, ou seja, aumentar a resistência do organismo a agentes nocivos de natureza biológica (infecções virais e bacterianas), física (variações de pressão, calor e frio) e química (venenos e agentes tóxicos);
- ser inócua e causar perturbações mínimas nas funções fisiológicas do organismo. Isto significa que em um indivíduo saudável e não submetido ao estresse, o adaptógeno não pode produzir efeito;
- ter uma ação normalizadora, independentemente da direção da mudança do estado patológico anterior. Por exemplo, aumentar resistência tanto ao calor quanto ao frio, com o objetivo de equilibrar o organismo nas situações adversas.

Embora estes critérios sejam ainda mencionados eles são questionados uma vez que foram baseados em conhecimentos empíricos sobre plantas medicinais usadas tradicionalmente. Além disso, os adaptógenos também podem promover alterações bioquímicas em indivíduos saudáveis. Outra questão está relacionada ao critério de inocuidade e segurança que dependerá da dose a ser utilizada. Portanto, estes conceitos são considerados imprecisos tornando difícil definir se as plantas utilizadas como adaptogênicas cumprem a todos estes critérios (Panossian e Wikman, 2009; Mendes, 2011a).

Os adaptógenos não são utilizados somente para combater o estresse e os seus danos. Eles têm sido usados de forma crônica na manutenção da saúde, para melhorar a resistência física ou atenuar os danos decorrentes do envelhecimento, como perda de memória, atenção, cansaço, fraqueza, impotência sexual, dentre outros. Os adaptógenos também podem ser usados por indivíduos saudáveis, não só de forma profilática e não curativa, mas para

melhorar o desempenho cognitivo e físico (Mendes e Carlini, 2007; Mendes, 2011a; Mendes, 2011b).

As plantas adaptogênicas possuem compostos bioativos que possuem a capacidade de proteger os organismos dos danos causados pelo estresse oxidativo, produtos químicos tóxicos, infecção, neoplasias, calor, frio, radiação, hipóxia, esforço físico e estresse psicológico (Gerbarg e Brown, 2013). Esse conhecimento sobre os benefícios dos adaptógenos têm incentivado vários pesquisadores a avaliar o potencial de plantas medicinais com essa propriedade como *Bacopa monniera* (Rai, Bhatia, Palit, et al., 2003), *Heteropterys tomentosa* (Paula-Freire et al., 2013), *Ocimum sanctum* (Sood et al., 2006), *Valeriana wallichii* (Sharma et al., 2012), *Gingko biloba* e *Panax ginseng* (Rai, Bhatia, Sen, et al., 2003).

No Brasil embora o termo adaptógeno não seja muito utilizado popularmente, há um grande número de termos e expressões que são empregados para os mesmos propósitos descritos aos adaptógenos tais como: fortificantes, tônicos, afrodisíaco, estimulante sexual, rejuvenescedor, fraqueza geral, falta de atenção, desânimo, falta de memória, esgotamento físico e mental, estresse, indisposição, estimulante da atividade cerebral, dentre outros (Mendes e Carlini, 2007; Mendes, 2011a).

Foi realizada no Brasil uma pesquisa com o objetivo de encontrar plantas nativas que são utilizadas popularmente para fins semelhantes aos de um adaptógeno. As espécies mais citadas foram: *Anemopaegma arvense*, *Hymenaea courbaril*, *Ptychopetalum olacoides*, *Paullinia cupanae* *Chenopodium ambrosioides*. Dentre todas as espécies mencionadas, apenas quatro foram previamente estudadas em relação a essa propriedade adaptógena: *H. aphrodisiaca*, *P. cupana*, *P. olacoides* e *T. diffusa*. Com base nesse estudo, pode-se observar que apesar do Brasil possuir plantas com potencial efeito adaptogênico, poucas espécies são submetidas a estudos para validar essa indicação (Mendes e Carlini, 2007).

Há uma grande variedade de modelos estressores que são empregados para avaliar os agentes adaptógenos. Os distúrbios resultantes da exposição ao estresse podem variar devido ao tipo, intensidade e duração do agente estressor, sexo e do tempo de avaliação de algum parâmetro específico. Dentre os vários

protocolos de estresse, o de imobilização tem sido amplamente aceito e usado, pois produz tanto estresse físico quanto psicológico (Pacak e Palkovits, 2001; Kioukia-Fougia *et al.*, 2002).

3.1. Princípios ativos das plantas adaptogênicas

As plantas adaptógenas possuem diferentes compostos químicos, portanto essa propriedade terapêutica não pode ser atribuída a uma única classe de substâncias. De uma forma em geral, os princípios ativos interagem sinergicamente para produzir o efeito benéfico das plantas adaptogênicas, assim como os ginsenósidos presentes em *P. ginseng*, os eleuterosídeos do *Eleutherococcus senticosus* e os ginkgolídeos e bilobalídeos do *Ginkgo biloba* (Mendes, 2011b; Pawar e Shivakumar, 2012).

Os efeitos regulatórios das plantas adaptogênicas podem ser devido à semelhança estrutural dos compostos presentes nessas espécies com as moléculas endógenas e hormônios do organismo e são divididos em três grupos químicos principais: compostos fenólicos, triterpenos e oxilipinas (Panossian, 2003; Pawar e Shivakumar, 2012).

Os compostos fenólicos, tais como os fenilpropanoides e derivados de feniletano (salidroside, rosavina, siringina, triandrina, tirosol) e lignanas (eleuterosídeos), são estruturalmente semelhantes às catecolaminas, que são mediadores da ativação do sistema nervoso simpático. Esses compostos estão presentes em *Eleutherococcus senticosus*, *Rhodiola rosea* e *Schisandra chinensis*. Os constituintes triterpênicos e algumas saponinas como diglicosídeos da cucurbitacina R, ginsenósídeos, possuem estrutura similar aos corticosteroides, que são hormônios que modulam a resposta do organismo ao estresse. Esse grupo de substâncias adaptogênicas estão contidas em extratos de *Bryonia alba* e *Withania somnifera* e *Panax ginseng* (Panossian, 2003; Panossian e Wagner, 2011; Pawar e Shivakumar, 2012). As oxilipinas, que são ácidos graxos poli-insaturados estruturalmente semelhantes aos leucotrienos e lipoxinas. Esse terceiro grupo de compostos adaptogênicos foram encontrados

em *Bryonia alba* e *Glycyrrhiza glabra* (Panossian, 2003; Pawar e Shivakumar, 2012).

3.2. Mecanismo de ação das plantas adaptogênicas

O mecanismo de ação dos adaptógenos está associado com a manutenção da homeostase através de adaptações bioquímicas celulares e no organismo como um todo. Eles agem principalmente através da modulação dos sistemas neuroendócrino e imunológico, manutenção da homeostase e do metabolismo energético e pela regulação do eixo HPA e dos mediadores-chave da resposta ao estresse, tais como: as catecolaminas, o neuropeptídeo Y (NPY), o óxido nítrico, o cortisol e o receptores de glicocorticoides, os receptores acoplados a proteína G, que funcionam por meio de segundos mensageiros (AMPC, fosfolipase C e fosfatidilinositol), proteínas de choque térmico 70 (Hsp70, Hsp 16), c-Jun N-terminal quinase (JNK1), fator de transcrição FOXO (DAF-16), beta-endorfinas e pela biossíntese de ATP (Panossian e Wagner, 2011; Panossian, 2013).

4. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: potencial adaptogênico

O Brasil é um dos países megadiversos e possui mais de 40.000 espécies de plantas diferentes, o que representa 20% da flora mundial (Oliveira *et al.*, 2012). O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul e ocupa cerca de 20 a 25% do território nacional (Dias, Luzia e Jorge, 2013). Devido à sua localização geográfica e extensão territorial, possui uma grande diversidade de frutos nativos, que têm potencial econômico para geração de renda, desenvolvimento sustentável, usos medicinais e utilização na dieta humana (Cardoso *et al.*, 2013).

O clima quente, semi-úmido, com verões chuvosos e invernos secos, solo pobre em nutrientes e às queimadas periódicas são provavelmente os fatores

responsáveis pela grande biodiversidade desse bioma. As plantas adaptadas a esse clima adverso e nessas condições climáticas desenvolvem mecanismos de defesas, principalmente sobre a forma compostos bioativos (Siqueira *et al.*, 2013).

As substâncias bioativas presentes nas plantas medicinais tornaram-se importantes como fontes de compostos terapêuticos para auxiliar na prevenção e/ou tratamento de doenças. No entanto, são necessários estudos para validação e comprovação da eficácia e segurança, bem como estudos agrônômicos, sobre a sua ecologia e conservação (Oliveira *et al.*, 2012).

Em relação às espécies nativas do Brasil podemos destacar o gênero *Hymenaea*. L., pertencente à família Fabaceae e subfamília Caesalpinoideae (Faria, Sano e Agostini-Costa, 2006). As espécies desse gênero são encontradas na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal e engloba 12 espécies de ocorrência no Brasil: *Hymenaea aurea* Y.T.Lee & Langenh., *Hymenaea courbaril* L., *Hymenaea eriogyne* Benth., *Hymenaea intermedia* Ducke, *Hymenaea maranhensis* Lee & Lang., *Hymenaea martiana* Hayne, *Hymenaea oblongifolia* Huber, *Hymenaea parvifolia* Huber, *Hymenaea reticulata* Ducke, *Hymenaea rubriflora* Ducke, *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne, *Hymenaea velutina* Ducke (Lima e Pinto, 2014).

Dentre essas espécies uma que se destaca é *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Figura 2). O jatobazeiro é uma espécie arbórea conhecida popularmente por jatobá, jatobá-do-cerrado e jataí (Faria, Sano e Agostini-Costa, 2006). A sua floração ocorre de outubro a abril e alcança o ápice entre dezembro e março. A frutificação ocorre nos meses de abril e julho, sendo que os frutos maduros podem ser encontrados a partir de julho (Faria, Sano e Agostini-Costa, 2006). Os frutos de *H. stigonocarpa* são em forma de vagens arredondadas e escuras e possuem sementes envolvidas por uma polpa farinácea amarelo-pálida, adocicada, comestível, de sabor e aroma característicos (Silva *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2013).



Figura 2: Espécie de *H. stigonocarpa* Mart. ex Hayne

Estudos etnofarmacológicos demonstram que diferentes partes de *H. stigonocarpa* são usadas para o tratamento de dores pulmonares, inflamações na bexiga (cistite aguda), hemorragias (Nunes *et al.*, 2003), depurativo, anti-inflamatório, estimulante do apetite e fortificante rico em ferro (De Souza e Felfili, 2006). A casca do caule e ramos é usada no tratamento de bronquite, tosses, coqueluche, adstringente, afecções da bexiga e próstata (Rodrigues e Carvalho, 2001), a casca do caule também é usada em inflamações dentárias (Borba e Macedo, 2006), dores de estômago, do peito e das costas, em fraturas (Neto, 2006), bronquite, câncer de próstata, dores, gripe e tosse (Bieski *et al.*, 2012). O fruto é usado como vermífugo (Rodrigues e Carvalho, 2001) e laxativo (Brandão, 1991). A resina da casca do caule é utilizada no tratamento de sinusite (Neto, 2006), como afrodisíaca, tônica e para o tratamento de cistite (Brandão, 1991). O vinho preparado da seiva é usado como fortificante (Neto, 2006). As cascas e frutos também são utilizados para o tratamento de úlceras, diarreia, vermífugo, expectorante, asma, gripe, tosse, anemia, estomáquico, adstringente e como tônico para o cérebro (Grandi *et al.*, 1989).

Trabalhos fitoquímicos realizados com espécies do gênero *H. stigonocarpa* indicam a presença de esteroides, terpenos e flavonoides (7-metoxi-catequina, hultenina, taxifolina e quercetina) no cerne da madeira dessa árvore (Oliveira *et al.*, 2010; Santana *et al.*, 2010; Maranhão *et al.*, 2013). As folhas apresentam sesquiterpenos (Langenheim *et al.*, 1986). O perfil fitoquímico da casca do caule e da polpa indicou a presença de compostos fenólicos (flavonoides, taninos condensados e terpenos), enquanto que na casca também foram encontradas saponinas (Orsi, Bonamin, Severi, *et al.*, 2012) e cumarinas (Dimech *et al.*, 2013).

As sementes apresentam em sua composição lipídeos, principalmente os ácidos graxos insaturados (linoleico, linolênico e oleico) e ácidos graxos saturados (palmítico, esteárico, eicosanoico) (Matuda e Netto, 2005).

Estudos toxicológicos demonstraram que a administração do extrato metanólico da casca do caule de *H. stigonocarpa* (5000 mg/Kg) em camundongos (machos e fêmeas) não causou alterações no peso corporal e no peso dos órgãos analisados e não houve mortes de animais. A análise de toxicidade realizada em modelo de cicatrização (14 dias) em ratos não revelou nenhum efeito tóxico do extrato metanólico da casca do caule de *H. stigonocarpa* e da dieta com polpa desse fruto. Não foram observadas mudanças no comportamento, peso corporal e peso dos órgãos. As análises bioquímicas de AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina amino transferase), γ -GT (γ -glutamiltransferase), creatinina, glicose e ureia não apresentaram nenhuma alteração (Orsi, Bonamin, Severi, *et al.*, 2012).

Estudos realizados com o objetivo de investigar e comprovar em modelos experimentais a ação *H. stigonocarpa* no tratamento de inflamações e doenças do trato gastrointestinal, demonstraram que a dieta com a polpa do fruto e o extrato metanólico apresentaram atividade anti-inflamatória intestinal e ação cicatrizante de úlceras gástricas. Essas ações farmacológicas podem estar associadas à ação antioxidante, devido à presença de compostos fenólicos na casca e polpa do fruto de *H. stigonocarpa* (Orsi, Bonamin, Aparecida Severi, *et al.*, 2012; Orsi, Seito e Di Stasi, 2014).

O conhecimento sobre o potencial nutricional dos frutos do Cerrado é um elemento importante para a realização de pesquisas sobre os benefícios de sua ingestão na saúde humana (Marin, Siqueira e Arruda, 2009; Cardoso *et al.*, 2013). Trabalhos anteriores já vêm demonstrando o uso da farinha de *H. stigonocarpa* na preparação de biscoitos do tipo “cookies” e “snacks” (Chang *et al.*, 1998; Silva, Da Silva e Chang, 1998; Silva, Borges e Martins, 2001; Silva *et al.*, 2001). A polpa apresenta um teor de umidade reduzido, elevado conteúdo de fibras alimentares, carboidratos, proteínas, cinzas e valor energético, sendo fonte de vitamina C, folatos (Cardoso *et al.*, 2013), minerais (principalmente de cobre e magnésio), além de possuir um alto teor de compostos fenólicos (Marin, Siqueira e Arruda, 2009). Por isso tem um grande potencial para ser incorporada na dieta e para ser

usada como ingrediente em produtos alimentícios, como mingaus, pães, bolos e biscoitos em geral (Cardoso *et al.*, 2013).

Estudo realizado por Sales (2011) demonstrou uma potencial atividade hipoglicemiante e hipolipemiante da farinha de *H. stigonocarpa* em modelo experimental de diabetes. Outro estudo recente também avaliou o efeito da resposta glicêmica de pães com a adição da farinha de *H. stigonocarpa* em 11 indivíduos e foi observado que a polpa desse fruto proporcionou a obtenção de produtos com alto conteúdo de fibras alimentares e promoveu a redução do índice glicêmico (Silva, 2013). No entanto, o consumo da polpa do fruto por indivíduos obesos e diabéticos deve ser avaliado, devido ao elevado seu elevado conteúdo de sacarose (25%) (Jayaprakasam *et al.*, 2007).

As cascas do caule de *H. stigonocarpa* demonstraram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e pode ser uma terapia complementar no tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos resistentes a múltiplos fármacos (Dimech *et al.*, 2013).

Apesar de suas indicações etnofarmacológicas e de sua utilização como um possível adaptógeno, não há estudos que busquem validar tal indicação. O estudo apresentado no Capítulo 2 desta dissertação avaliou o potencial efeito antiestresse e neuroprotetor do extrato aquoso da polpa de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne

5. Referências Bibliográficas

- ABIDOV, M. et al. Effect of extracts from *Rhodiola rosea* and *Rhodiola crenulata* (Crassulaceae) roots on ATP content in mitochondria of skeletal muscles. **Bull Exp Biol Med**, v. 136, n. 6, p. 585-7, Dec 2003. ISSN 0007-4888 (Print) 0007-4888.
- ALMEIDA, A. et al. Inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide: its role in glucose metabolism and neuroprotection. **J Neurosci Res**, v. 79, n. 1-2, p. 166-71, Jan 1-15 2005. ISSN 0360-4012 (Print) 0360-4012.
- AOYAMA, K.; WATABE, M.; NAKAKI, T. Regulation of neuronal glutathione synthesis. **J Pharmacol Sci**, v. 108, n. 3, p. 227-38, Nov 2008. ISSN 1347-8613 (Print) 1347-8613.
- ARNSTEN, A. F. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 410-22, Jun 2009. ISSN 1471-003x.
- ASEA, A. et al. Evaluation of molecular chaperons Hsp72 and neuropeptide Y as characteristic markers of adaptogenic activity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 20, n. 14, p. 1323-9, Nov 15 2013. ISSN 0944-7113.
- BIESKI, I. G. C. et al. Ethnopharmacology of Medicinal Plants of the Pantanal Region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 36, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/272749>>.
- BORBA, A. M.; MACEDO, M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. **Acta Bot Bras**, v. 20, n. 4, p. 771-82, 2006.
- BREKHMEN, I.; DARDYMOV, I. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. **Annual review of pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 419-430, 1969. ISSN 0362-1642.
- BROWN, G. C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1504, n. 1, p. 46-57, Mar 1 2001. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.
- BROWN, G. C.; BORUTAITE, V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 11, p. 1440-50, Dec 1 2002. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849.

CARDOSO, L. D. M. et al. 'Jatobá do cerrado'(Hymenaea stigonocarpa): chemical composition, carotenoids and vitamins in an exotic fruit from the Brazilian Savannah. **Fruits**, v. 68, n. 02, p. 95-107, 2013. ISSN 1625-967X.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 75, n. 3, p. 501-12, Jun 2003. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057.

CHANG, Y. K. et al. Development of extruded snacks using jatobá (Hymenaea stigonocarpaMart) flour and cassava starch blends. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 78, n. 1, p. 59-66, 1998. ISSN 1097-0010.

CHEN, Q. G. et al. The effects of Rhodiola rosea extract on 5-HT level, cell proliferation and quantity of neurons at cerebral hippocampus of depressive rats. **Phytomedicine**, v. 16, n. 9, p. 830-8, Sep 2009. ISSN 0944-7113.

CHROUSOS, G. P. Organization and Integration of the Endocrine System. **Sleep Med Clin**, v. 2, n. 2, p. 125-145, Jun 2007. ISSN 1556-407X (Print) 1556-407x.

_____. Stress and disorders of the stress system. **Nat Rev Endocrinol**, v. 5, n. 7, p. 374-81, Jul 2009. ISSN 1759-5029.

CUI, K. et al. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28, n. 5, p. 771-99, Aug 2004. ISSN 0278-5846 (Print) 0278-5846.

DAL SANTO, G. et al. Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain. **Neurosci Lett**, v. 558, p. 103-8, Jan 13 2014. ISSN 0304-3940.

DASURI, K.; ZHANG, L.; KELLER, J. N. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, n. 0, p. 170-185, 9// 2013. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584912011410>>.

DAVIS, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 239-52, Oct 13 2000. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

DE SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

DIAS, L. S.; LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Physicochemical and bioactive properties of Hymenaea courbaril L. pulp and seed lipid fraction. **Industrial Crops**

and Products, v. 49, n. 0, p. 610-618, 2013. ISSN 0926-6690. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092666901300294X>>.

DIMECH, G. S. et al. Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84893873161&partnerID=40&md5=b2e8becd756d5690ba19d67d9e12140e>>.

DRINGEN, R.; HIRRLINGER, J. Glutathione pathways in the brain. **Biol Chem**, v. 384, n. 4, p. 505-16, Apr 2003. ISSN 1431-6730 (Print) 1431-6730.

EATON, K.; SALLEE, F. R.; SAH, R. Relevance of neuropeptide Y (NPY) in psychiatry. **Curr Top Med Chem**, v. 7, n. 17, p. 1645-59, 2007. ISSN 1568-0266.

ECHTAY, K. S. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? **Free Radic Biol Med**, v. 43, n. 10, p. 1351-71, Nov 15 2007. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849.

FARIA, J. P.; SANO, S. M.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Jatobá-do-Cerrado. In: VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. D. S., et al (Ed.). **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. cap. 11, p.174-186.

FERREIRA, R. et al. Neuropeptide Y modulation of interleukin-1 β (IL-1 β)-induced nitric oxide production in microglia. **J Biol Chem**, v. 285, n. 53, p. 41921-34, Dec 31 2010. ISSN 0021-9258.

FLETCHER, M. A. et al. Plasma neuropeptide Y: a biomarker for symptom severity in chronic fatigue syndrome. **Behav Brain Funct**, v. 6, p. 76, 2010. ISSN 1744-9081.

FUJIMOTO, M.; NAKAI, A. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. **Febs j**, v. 277, n. 20, p. 4112-25, Oct 2010. ISSN 1742-464x.

GALVAO, S. M. et al. *Heteropterys aphrodisiaca* (extract BST0298): a Brazilian plant that improves memory in aged rats. **J Ethnopharmacol**, v. 79, n. 3, p. 305-11, Mar 2002. ISSN 0378-8741 (Print) 0378-8741.

GERBARG, P. L.; BROWN, R. P. Phytomedicines for prevention and treatment of mental health disorders. **Psychiatr Clin North Am**, v. 36, n. 1, p. 37-47, Mar 2013. ISSN 0193-953x.

GRANDI, T. S. M. et al. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 3, n. 2, p. 185-224, 1989. ISSN 0102-3306.

GUNNAR, M.; QUEVEDO, K. The neurobiology of stress and development. **Annu Rev Psychol**, v. 58, p. 145-73, 2007. ISSN 0066-4308 (Print) 0066-4308.

HABBU, P. et al. Protective effect of Habenaria intermedia tubers against acute and chronic physical and psychological stress paradigms in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 568-579, 2012. ISSN 0102-695X. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2012000300015&nrm=iso>.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 5, p. 1147-50, Nov 2007. ISSN 0300-5127 (Print) 0300-5127.

HARA, M. R.; CASCIO, M. B.; SAWA, A. GAPDH as a sensor of NO stress. **Biochim Biophys Acta**, v. 1762, n. 5, p. 502-9, May 2006. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

HENDERSON, S. T.; JOHNSON, T. E. daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Curr Biol**, v. 11, n. 24, p. 1975-80, Dec 11 2001. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822.

HIRSCH, D.; ZUKOWSKA, Z. NPY and stress 30 years later: the peripheral view. **Cell Mol Neurobiol**, v. 32, n. 5, p. 645-59, Jul 2012. ISSN 0272-4340.

JAYAPRAKASAM, B. et al. Terpenoids from Stinking toe (*Hymenocallis courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 485-490, // 2007. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460700338X>>.

KAMPKOTTER, A. et al. The Ginkgo biloba extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. **Pharmacol Res**, v. 55, n. 2, p. 139-47, Feb 2007. ISSN 1043-6618 (Print) 1043-6618.

KEMPNA, P. et al. Neuropeptide Y modulates steroid production of human adrenal H295R cells through Y1 receptors. **Mol Cell Endocrinol**, v. 314, n. 1, p. 101-9, Jan 15 2010. ISSN 0303-7207.

KENNEDY, D. O. et al. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 79, n. 3, p. 401-11, Nov 2004. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057.

KIOUKIA-FOUGIA, N. et al. The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 26, n. 5, p. 823-30, Jun 2002. ISSN 0278-5846 (Print) 0278-5846.

KISHIMOTO, J. et al. Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and protein in hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. **Brain Res**, v. 720, n. 1-2, p. 159-71, May 13 1996. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993.

KO, K. M. et al. Long-term schisandrin B treatment mitigates age-related impairments in mitochondrial antioxidant status and functional ability in various tissues, and improves the survival of aging C57BL/6J mice. **Biofactors**, v. 34, n. 4, p. 331-42, 2008. ISSN 0951-6433.

KOOLHAAS, J. M. et al. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, n. 5, p. 1291-301, Apr 2011. ISSN 0149-7634.

KUO, L. E.; ABE, K.; ZUKOWSKA, Z. Stress, NPY and vascular remodeling: Implications for stress-related diseases. **Peptides**, v. 28, n. 2, p. 435-40, Feb 2007. ISSN 0196-9781 (Print) 0196-9781.

LAI, F. J. et al. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase mRNA and protein in adrenal medulla of water-deprived rats. **J Histochem Cytochem**, v. 53, n. 1, p. 45-53, Jan 2005. ISSN 0022-1554 (Print) 0022-1554.

LANGENHEIM, J. H. et al. Hymenaea and Copaifera leaf sesquiterpenes in relation to lepidopteran herbivory in southeastern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 1, p. 41-49, 1986. ISSN 0305-1978. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0305197886900840>>.

LIMA, H.C. de; PINTO, R.B. *Hymenaea* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22971>>. Acesso em: 13 Mai. 2014

LIMON-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutat Res**, v. 674, n. 1-2, p. 137-47, Mar 31 2009. ISSN 0027-5107 (Print) 0027-5107.

MALVA, J. O. et al. Multifaces of neuropeptide Y in the brain--neuroprotection, neurogenesis and neuroinflammation. **Neuropeptides**, v. 46, n. 6, p. 299-308, Dec 2012. ISSN 0143-4179.

MANNUCCI, C. et al. Serotonin involvement in Rhodiola rosea attenuation of nicotine withdrawal signs in rats. **Phytomedicine**, v. 19, n. 12, p. 1117-24, Sep 15 2012. ISSN 0944-7113.

MARANHÃO, C. A. et al. Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 79, p. 9-13, 2013. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84873901542&partnerID=40&md5=afbd474e71e98a81867d3dc7409b5482>>.

MARIN, A. M.; SIQUEIRA, E. M.; ARRUDA, S. F. Minerals, phytic acid and tannin contents of 18 fruits from the Brazilian savanna. **Int J Food Sci Nutr**, v. 60 Suppl 7, p. 180-90, 2009. ISSN 0963-7486.

MATUDA, T. G.; NETTO, F. M. Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-cerrado (Mart.) *Hymenaea stigonocarpa*. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 25, p. 353-357, 2005.

MCINTOSH, L. J.; SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. **Exp Neurol**, v. 141, n. 2, p. 201-6, Oct 1996. ISSN 0014-4886 (Print) 0014-4886.

MENDES, F. R. Tonic, fortifier and aphrodisiac: adaptogens in the Brazilian folk medicine. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 754-763, 2011a. ISSN 0102-695X.

_____. Modelos Animais para Avaliação de Plantas Adaptógenas. In: CARLINI, E. A. e MENDES, F. R. (Ed.). **Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental: um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais**. São Paulo: Fap - Unifesp, 2011b, cap. 12, p.323-354.

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 493-500, 2007. ISSN 0378-8741.

MURPHY, C. T. et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 424, n. 6946, p. 277-83, Jul 17 2003. ISSN 0028-0836.

NETO, G. G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais ea educação ambiental. **REMEA. Julho a dezembro, FURG/PPGEA**, 2006.

NIKI, E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 5, p. 469-84, Sep 1 2009. ISSN 0891-5849.

NUNES, G. et al. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Rev Bras Farmacogn**, v. 13, n. 2, p. 83-92, 2003.

OISHI, K. et al. Oxidative stress and haematological changes in immobilized rats. **Acta Physiol Scand**, v. 165, n. 1, p. 65-9, Jan 1999. ISSN 0001-6772 (Print) 0001-6772.

OLIVEIRA, L. S. et al. Natural resistance of five woods to *Phanerochaete chrysosporium* degradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 8, p. 711-715, 12// 2010. ISSN 0964-8305. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830510001423>>.

OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170-179, 8// 2012. ISSN 0963-9969. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912001123>>.

OLSSON, E. M.; VON SCHEELE, B.; PANOSSIAN, A. G. A randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study of the standardised extract shr-5 of the roots of *Rhodiola rosea* in the treatment of subjects with stress-related fatigue. **Planta Med**, v. 75, n. 2, p. 105-12, Feb 2009. ISSN 0032-0943 (Print) 0032-0943.

ORSI, P. R. et al. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 81-90, 8/30/ 2012. ISSN 0378-8741. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874112003881>>.

_____. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 81-90, 8/30/ 2012. ISSN 0378-8741. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874112003881>>.

ORSI, P. R.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 151, n. 1, p. 380-5, Jan 10 2014. ISSN 0378-8741.

PACAK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocr Rev**, v. 22, n. 4, p. 502-48, Aug 2001. ISSN 0163-769X (Print) 0163-769x.

PANOSSIAN, A. et al. The adaptogens *rhodiola* and *schizandra* modify the response to immobilization stress in rabbits by suppressing the increase of phosphorylated stress-activated protein kinase, nitric oxide and cortisol. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 39-54, 2007. ISSN 1177-3928.

_____. Synergy and Antagonism of Active Constituents of ADAPT-232 on Transcriptional Level of Metabolic Regulation of Isolated Neuroglial Cells. **Front Neurosci**, v. 7, p. 16, 2013. ISSN 1662-4548 (Print) 1662-453x.

_____. Comparative study of Rhodiola preparations on behavioral despair of rats. **Phytomedicine**, v. 15, n. 1-2, p. 84-91, Jan 2008. ISSN 0944-7113 (Print) 0944-7113.

PANOSSIAN, A.; WAGNER, H. A review of their history, biological activity, and clinical benefits **HerbalGram**, v. 90, p. 52–63, 2011.

PANOSSIAN, A.; WIKMAN, G. Pharmacology of Schisandra chinensis Bail.: an overview of Russian research and uses in medicine. **J Ethnopharmacol**, v. 118, n. 2, p. 183-212, Jul 23 2008. ISSN 0378-8741 (Print) 0378-8741.

_____. Evidence-based efficacy of adaptogens in fatigue, and molecular mechanisms related to their stress-protective activity. **Curr Clin Pharmacol**, v. 4, n. 3, p. 198-219, Sep 2009. ISSN 1574-8847.

_____. Effects of Adaptogens on the Central Nervous System and the Molecular Mechanisms Associated with Their Stress—Protective Activity. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 1, p. 188-224, 2010. ISSN 1424-8247. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1424-8247/3/1/188>>.

PANOSSIAN, A. et al. Adaptogens exert a stress-protective effect by modulation of expression of molecular chaperones. **Phytomedicine**, v. 16, n. 6-7, p. 617-22, Jun 2009. ISSN 0944-7113.

_____. Adaptogens stimulate neuropeptide y and hsp72 expression and release in neuroglia cells. **Front Neurosci**, v. 6, p. 6, 2012. ISSN 1662-453x.

PANOSSIAN, A.; WIKMAN, G.; WAGNER, H. Plant adaptogens. III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. **Phytomedicine**, v. 6, n. 4, p. 287-300, Oct 1999. ISSN 0944-7113 (Print) 0944-7113.

PANOSSIAN, A. G. Adaptogens: tonic herbs for fatigue and stress. **Alternative & Complementary Therapies**, v. 9, n. 6, p. 327-331, 2003. ISSN 1076-2809.

_____. Adaptogens in mental and behavioral disorders. **Psychiatr Clin North Am**, v. 36, n. 1, p. 49-64, Mar 2013. ISSN 0193-953x.

PARK, H. S. et al. Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 26, p. 14382-7, Dec 19 2000. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

PAULA-FREIRE, L. I. et al. Comparison of the chemical composition and biological effects of the roots, branches and leaves of *Heteropterys tomentosa* A. Juss. **J Ethnopharmacol**, v. 145, n. 2, p. 647-52, Jan 30 2013. ISSN 0378-8741.

PAWAR, V. S.; SHIVAKUMAR, H. A current status of adaptogens: natural remedy to stress. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, Supplement 1, n. 0, p. S480-S490, // 2012. ISSN 2222-1808. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2222180812602072>>.

RAI, D. et al. Adaptogenic effect of *Bacopa monniera* (Brahmi). **Pharmacol Biochem Behav**, v. 75, n. 4, p. 823-30, Jul 2003. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057.

_____. Anti-stress effects of *Ginkgo biloba* and *Panax ginseng*: a comparative study. **J Pharmacol Sci**, v. 93, n. 4, p. 458-64, Dec 2003. ISSN 1347-8613 (Print) 1347-8613.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radic Biol Med**, v. 50, n. 5, p. 567-75, Mar 1 2011. ISSN 0891-5849.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sci**, v. 84, n. 21-22, p. 705-12, May 22 2009. ISSN 0024-3205.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. D. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande-Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

SALES, A. L. C. C. **Efeito de suplementação com aveia, linhaça, gergelim, semente de girassol e jatobá sobre parâmetros relacionados ao diabetes mellitus em ratos**. 2011. 97p. (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Terezina.

SANTANA, A. L. B. D. et al. Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 7-12, 1// 2010. ISSN 0964-8305. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830509001747>>.

SEELY, D.; SINGH, R. Adaptogenic potential of a polyherbal natural health product: report on a longitudinal clinical trial. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 4, n. 3, p. 375-80, Sep 2007. ISSN 1741-427X (Print) 1741-427x.

SELYE, H. Experimental evidence supporting the conception of “adaptation energy”. **Am. j. physiol**, v. 123, p. 758-765, 1938.

SHARMA, P. et al. Adaptogenic activity of *Valeriana wallichii* using cold, hypoxia and restraint multiple stress animal model. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 2, n. 4, p. 198-205, 10// 2012. ISSN 2210-5220. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210522012000329>>. Acesso em: 2012/12//.

SHEIKH, N. et al. Effect of *Bacopa monniera* on stress induced changes in plasma corticosterone and brain monoamines in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 111, n. 3, p. 671-6, May 22 2007. ISSN 0378-8741 (Print) 0378-8741.

SILVA, C. P. D. **Efeito da adição de farinha de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) na resposta glicêmica de pães**. 2013. 75p. (Mestrado em Nutrição em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, M.; BORGES, S.; MARTINS, K. Avaliação química, física e sensorial de biscoitos enriquecidos com farinha de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata como fonte de fibra alimentar. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, n. 73, p. 163-70, 2001.

SILVA, M. R.; DA SILVA, M. A. A.; CHANG, Y. K. Utilização da farinha de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) na elaboração de biscoitos tipo cookie e avaliação de aceitação por testes sensoriais afetivos univariados e multivariados. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 18, n. 1, p. 25-34, 1998. ISSN 0101-2061.

SILVA, M. R. et al. Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 22, p. 173-182, 2001.

SIQUEIRA, E. M. D. A. et al. Brazilian Savanna Fruits Contain Higher Bioactive Compounds Content and Higher Antioxidant Activity Relative to the Conventional Red Delicious Apple. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e72826, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072826>>.

SOOD, S. et al. Effect of *Ocimum sanctum* Linn. on cardiac changes in rats subjected to chronic restraint stress. **J Ethnopharmacol**, v. 108, n. 3, p. 423-7, Dec 6 2006. ISSN 0378-8741 (Print) 0378-8741.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **J Psychosom Res**, v. 53, n. 4, p. 865-71, Oct 2002. ISSN 0022-3999 (Print) 0022-3999.

TSUCHIYA, T.; KISHIMOTO, J.; NAKAYAMA, Y. Marked increases in neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and NADPH-diaphorase histostaining in adrenal cortex after immobilization stress in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 21, n. 3, p. 287-93, Apr 1996. ISSN 0306-4530 (Print) 0306-4530.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397-409, 2009. ISSN 1471-003X.

UTTARA, B. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Curr Neuroparmacol**, v. 7, n. 1, p. 65-74, Mar 2009. ISSN 1570-159X (Print) 1570-159x.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. ISSN 1357-2725 (Print) 1357-2725.

_____. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar 10 2006. ISSN 0009-2797 (Print) 0009-2797.

WAGNER, H.; NORR, H.; WINTERHOFF, H. Plant adaptogens. **Phytomedicine**, v. 1, n. 1, p. 63-76, Jun 1994. ISSN 0944-7113 (Print) 0944-7113.

WIEGANT, F. A. et al. Plant adaptogens increase lifespan and stress resistance in *C. elegans*. **Biogerontology**, v. 10, n. 1, p. 27-42, Feb 2009. ISSN 1389-5729.

WOLFF, S. et al. SMK-1, an essential regulator of DAF-16-mediated longevity. **Cell**, v. 124, n. 5, p. 1039-53, Mar 10 2006. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

YANG, P. C. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for stress protocol-induced modification of hippocampal synaptic plasticity. **J Biol Chem**, v. 283, n. 5, p. 2631-43, Feb 1 2008. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

YOU, J. M. et al. Mechanism of glucocorticoid-induced oxidative stress in rat hippocampal slice cultures. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 87, n. 6, p. 440-7, Jun 2009. ISSN 0008-4212.

ZAIDI, S. M.; BANU, N. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. **Clin Chim Acta**, v. 340, n. 1-2, p. 229-33, Feb 2004. ISSN 0009-8981 (Print) 0009-8981.

Capítulo 2

**Avaliação do efeito antiestresse e neuroprotetor do extrato aquoso de
Hymenaea stigonocarpa Mart. ex Hayne**

Artigo científico que será submetido à
revista *Journal of Ethnopharmacology*
(Fator de impacto: 2.939)

Evaluation of anti-stress and neuroprotective effects of aqueous extract of the fruit of *Hymenaea stigonocarpa*

Hélen Lara Machado^a, Renata Roland Teixeira^a, Leonardo Gomes Peixoto^a, Danielle Diniz Vilela^a, Adriele Vieira de Souza^a, Antônio Vicente Mundim^b, Celso Rodrigues Franci^c, Foued Salmen Espindola^{a,*}

^aInstituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil

^bFaculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil

^cDepartamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

Corresponding author

Foued Salmen Espindola

Universidade Federal de Uberlândia, INGEb, Av. Pará 1720, Blc 2E/237, Uberlândia, MG, 38400-902, Brazil

Email: foued@ufu.br

Phone: (+55-34) 3225-8439

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae) –known as “jatobá-do-cerrado” in Portuguese – is a species native to the Brazilian savannah. The plant is popularly used as fortifier, aphrodisiac and brain stimulant.

Aim of the study: To evaluate the anti-stress and neuroprotective effects of aqueous extract obtained from the pulp of the fruit *H. stigonocarpa* in rats subjected to chronic stress.

Materials and Methods: Wistar rats were treated by gavage with *H. stigonocarpa* (500mg/kg) for 14 days and subjected to chronic stress by restriction and cold for seven days. Blood was collected for biochemical analysis and total antioxidant capacity by FRAP analysis; corticosterone levels were measured by radioimmunoassay. Adrenals, spleen and thymus were weighed. Cerebellum, cerebral cortex, striatum and hippocampus were used for evaluating changes in the antioxidant defense system of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), considering levels of reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation (TBARS).

Results: In comparison with stress group, the group treated with *H. stigonocarpa* showed normalized biochemical parameters of triglycerides and γ -GT, unchanged thymus and spleen weights as well as reduced corticosterone levels ($p<0.05$). As to the antioxidant defense system, the extract increased serum total antioxidant capacity ($p<0.01$) and uric acid levels. Although no change was observed in enzymes SOD, CAT and GR activities in treated animals, extract of *H. stigonocarpa* led to an increased GPx activity, prevented GSH depletion, attenuated G6PD and diminished lipid peroxidation in different brain regions.

Conclusions: Treatment with aqueous extract of the fruit pulp of *H. stigonocarpa* improved redox state in different brain regions, caused no toxicity in animals, increased total antioxidant capacity and decreased corticosterone levels, showing an anti-stress and neuroprotective effect in response to changes caused by chronic stress.

Keywords: *Hymenaea stigonocarpa*, adaptogens, stress, antioxidant activity, oxidative stress, neuroprotection

1.Introduction

Chronic stress has negative effects on brain functions, can cause neurotoxicity and neurogenesis inhibition and can also damage neuronal plasticity, probably by increasing reactive oxygen and nitrogen species (Gunnar and Quevedo, 2007; Zaidi and Banu, 2004). The prolonged increase in glucocorticoids causes damage to neurons, lipid peroxidation in hippocampus and in frontal cortex in rats, impairing cognitive functions, decreasing antioxidant defenses and causing redox imbalance in this tissue (Abidin et al., 2004; Manoli et al., 2000; McIntosh and Sapolsky, 1996; You et al., 2009).

In order to neutralize such oxidant effects and restore redox balance, cells have antioxidant enzymatic and nonenzymatic defense mechanisms (endogenous compounds or diet antioxidants). The enzymatic antioxidant defense system includes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx); while the nonenzymatic defense system includes ascorbic acid, reduced glutathione (GSH), phenolic compounds, tocopherols and uric acid (Echtay, 2007; Roberts and Sindhu, 2009). The action mechanisms of such enzymes and of nonenzymatic compounds on the brain are well-documented (Cui et al., 2004; Dasuri et al., 2013; Gilgun-Sherki et al., 2001).

Adaptogenic plants have bioactive compounds capable of protecting the organism against oxidative damage and promoting adaptations in stressful situations (Asea et al., 2013; Panossian et al., 1999; Panossian, 2003). *H. stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae) – "jatobá-do-cerrado" in Portuguese – a species native to the Cerrado, the Brazilian savannah, is known for its potential adaptogenic action. Ethnopharmacological studies have demonstrated that its stem bark and fruit are commonly used for treating ulcer, diarrhea and for fortifying the brain (Grandi et al., 1989). This species has steroids, terpenes and flavonoids in the heartwood (Maranhão et al., 2013; Oliveira et al., 2010; Santana et al., 2010), sesquiterpenes in the leaves (Langenheim et al., 1986) and phenolic compounds in the stem bark and fruit pulp (Orsi et al., 2012).

Despite its recommendation and use as a potential adaptogen, there are no studies about its action on the enzymatic or nonenzymatic antioxidant defense systems on brain of rats subjected to stress. Thus, the aim of this study was to

evaluate the anti-stress and neuroprotective effect of aqueous extract of *H. stigonocarpa* pulp in rats subjected to chronic stress by restriction and cold.

2. Materials and methods

2.1 Botanical material

H. stigonocarpa fruits were collected from Cerrado Biome in the rural area of Uberlândia, in Brazil's southeastern state of Minas Gerais, between September and October, 2011 (Coordinates: UTM 22K, East 783392, North 783392). Botanical material was authenticated by agronomer MSc. André Furtado Carvalho and deposited at the Herbarium Uberlandense (HUFU 43687). The plant name was checked at www.theplantlist.org at October 01, 2015.

2.2 Aqueous extract preparation

Fruits were opened, pulp was collected and seeds rejected. Aqueous extract was obtained by maceration (1:10 w/v) in three successive one-hour extractions. After each extraction, extract was centrifuged at 4400 x g for 10 min at 4 °C; supernatant was collected and further freeze-dried.

2.3 *In vitro* determination of antioxidant activity by DPPH[•] method

Antioxidant activity of aqueous extract of *H. stigonocarpa* fruit pulps was analyzed *in vitro* by sequestering DPPH[•] free radical (Prado et al., 2014). During assay, 250 µL water or extract dissolved in water was added to 1 mL DPPH[•] methanolic solution (0.06 mM) in order to obtain extract final concentrations of 0.1-1000 µg/mL. After 30 min of incubation under low luminosity conditions, samples absorbance was determined at 510 nm. Assays were performed in duplicate by using methanol as blank and ascorbic acid as positive control. Extract concentration capable of decreasing samples absorbance at 50% (IC₅₀) was calculated by nonlinear regression analysis (hyperbolic equation) using GraphPad Prism software.

2.4 Animals

Male Wistar rats (207-250 g) were kept under standard conditions ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$, humidity $60\pm 5\%$, 12-light/12-dark cycle) with free access to food and water. All experiments with animals were performed under the recommendations of the Brazilian Laboratory Animal Science Association and the Ethics Committee on Animal Use of Universidade Federal de Uberlândia, Brazil (CEUA/UFU 132/11).

2.4.1 Groups and treatments

Animals were divided into three groups ($n=9-10$ rats/group): No Stress (NS), Stress (S) and Stress treated with *H. stigonocarpa* aqueous extract (500mg/kg, body weight orally) (S+HS). Animals were treated for 14 days and groups NS and S received water by gavage. Animals were weighed at the beginning and end of experiment.

2.4.2 Chronic stress induced by restriction and cold

Animals were subjected to stress induced by restriction and cold after day 7 of treatment (Paula-Freire et al., 2013). Animals received supplementation 45 min after restriction in acrylic restrainers (45 mm x 52 mm x 205 mm) for 2 h in the morning (9:00-10:00 h) and kept in cold room at 10°C for 2 h in late afternoon (4:00-6:00 h). On day 14, animals were simultaneously subjected to the two restrainers for 2 h and euthanized immediately after stress sessions. Group NS was kept without any contact with stress-inducing agents (Figure 1).

2.5 Serum biochemical parameters

At the end of experiment, blood was collected ($n=7-8$ rats/group) and samples were individually centrifuged at $1500 \times g$ at 4°C for 10 min in order to obtain serum used for biochemical doses of triglycerides, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), γ -glutamyltransferase (γ -GT), uric acid and urea. All these parameters were measured at the Laboratory

of Clinical Analyses, School of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Uberlândia, with an automatic analyzer (Cobas Mira; Roche Diagnostic Systems, Basel, Switzerland), by using commercial kits (Labtest Diagnóstica; Lagoa Santa, Brazil). Corticosterone doses were performed by radioimmunoassay (n=7-8 rats/group) (Reis et al., 2012). Glucose levels were measured before and after last session of stress by tail vein puncture, using reactive strips (n=9-10 rats/group) (Accu-Chek Performa; Roche Diagnostic Systems, Basel, Switzerland).

2.6 Total antioxidant capacity by ferric reducing antioxidant power (FRAP) analysis

Total antioxidant capacity was evaluated by reducing Fe^{+3} to Fe^{+2} , which was then chelated by TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine) in order to form the deep-blue colored Fe^{+2} -TPTZ (Benzie and Strain, 1999). 10 μL serum (n=7-8 rats/group) was added to the reaction medium containing 300 mM sodium acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ in 40 mM HCl and 20 mM ferric chloride (10:1:1; respectively). Samples were incubated for 6 min at 37 °C and absorbance was at 593 nm. Antioxidant capacity was calculated by using trolox standard calibration curve. Results were expressed in $\mu\text{mol/L}$.

2.7 Tissue preparation

Cerebellum and brain (n=3-4 rats/group) were rapidly removed, cerebral cortex, striatum and hippocampus were separated and individually homogenized in 20 mM sodium phosphate buffer, containing 140 mM KCl, pH 7.4 (1:10 w/v). Homogenates were centrifuged at 800 x g for 10 min at 4 °C. Sediment was discarded and supernatant was collected for dosing oxidative stress parameters. Adrenals, spleen and thymus were dissected and weighed.

2.8 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

For determining thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), 100 μL sample, 200 μL 10% trichloroacetic acid and 300 μL 0.67% thiobarbituric acid (TBA) in 7.1% sodium sulfate were mixed in microtubes (Yagi, 1998). Solutions

were incubated for 2 h in a boiling water bath (95 °C). Further, samples were cooled in ice bath for 5 min. The resulting pink-colored complex was extracted using 400 µL butanol. The organic-phase fluorescence was evaluated at 515 nm (excitation) and at 553 nm (emission). A calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane and subjected to the same treatment of samples. TBA-RS levels were calculated as nmol TBARS/mg of protein. Results were expressed as percentage of NS group.

2.9 Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity is based on the autoxidation capacity of pyrogallol, a process highly dependent on the superoxide radical (Fernandes et al., 2011). The inhibition of pyrogallol autoxidation occurs in the presence of SOD, the activity of which can be directly analyzed by using a spectrophotometer at 420 nm, in solution containing 50 mM Tris buffer with 1mM EDTA (pH 8.2), 80 U/mL catalase, 0.38 mM pyrogallol and 15 µl sample. A calibration curve was performed using purified SOD as standard. The inhibition of 50% autoxidation of pyrogallol is defined as a SOD unit. Results were calculated in U/mg of protein and expressed as percentage of NS group.

2.10 Catalase (CAT) activity

Catalase activity was determined based on the decreased absorbance of hydrogen peroxide (H_2O_2) at 240 nm, in a reaction medium containing 20 mM H_2O_2 , 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 10 µL sample (Aebi, 1984). A CAT unit defined as 1 µmol H_2O_2 consumed per minute and the specific activity was calculated in U/mg of protein. Results were expressed as percentage of NS group.

2.11 Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was evaluated using tert-butyl-hydroperoxide as substrate (Wendel, 1981). NADPH consumption was monitored at 340 nm in solution

containing 100 mM potassium phosphate buffer and 1mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (pH 7.7), 2 mM GSH, 0.1 U/mL glutathione reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl hydroperoxide, 1 mM NADPH and 25 μ L sample. A GPx unit is defined as 1 μ mol NADPH consumed per minute and the specific activity is represented by U/mg of protein. Results were expressed as percentage of NS group.

2.12 Reduced glutathione (GSH) concentrations

For quantifying GSH levels, 150 μ L sample was added to 150 μ L metaphosphoric acid and then centrifuged at 7000 x g for 10 min at 4°C (Browne and Armstrong, 1998). After the removal of 30 μ L supernatant, 185 μ L sodium phosphate buffer (100 mM, pH 8.0), containing 5 mM EDTA and 15 μ L o-phthaldialdehyde (1 mg/mL in methanol) were added. The mixture was incubated in dark at room temperature for 15 min and fluorescence was at 350 nm (excitation) and at 420 nm (emission). GSH concentrations were calculated using standard curve of GSH (0.001-0.1 mM) as nmol/mg of protein. Results were expressed as percentage of NS group.

2.13 Glutathione reductase (GR) activity

GR activity was evaluated using oxidized glutathione (GSSG) and NADPH as substrates (Carlberg and Mannervik, 1985). Activity of that enzyme was determined based on the consumption of NADPH at 340 nm in a medium containing sodium phosphate buffer (200 mM, pH 7.5), 6.3 mM EDTA, 1 mM GSSG, 1 mM NADPH and 30 μ L sample. A GR unit is defined as 1 μ mol reduced GSSG per minute. The specific activity was calculated as U/mg of protein. Results were expressed as percentage of NS group.

2.14 Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity

G6PD activity was determined in a medium containing 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl_2 , 0.5 mM NADP^+ , 1 mM glucose-6-phosphate and 15 μ L

sample (Leong and Clark, 1984). Reading was performed in a spectrophotometer at 340 nm. A unit of G6PD corresponds to 1 mmol substrate converted into one minute and activity was calculated as U/mg of protein. Results were expressed as percentage of NS group.

2.15 Protein dosage

Determination of total protein concentration was performed by Bradford method (Bradford, 1976), using the protein of bovine serum albumin (BSA) as standard.

2.16 Statistical analyses

Results were shown as means $\pm$ SEM, using GraphPad Prism version 5.0 software. Results were compared by Student's t-test or by analysis of variance (ANOVA), as appropriate. In order to verify differences among groups, Tukey's test was used. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Effect of *H. stigonocarpa* aqueous extract on chronic stress induced by restriction and cold.

Stress induced by restriction and cold promoted an increase in corticosterone serum levels in S group animals (244.2 ± 32.93 ng/mL, $p < 0.05$) compared to NS group (153.8 ± 17.77 ng/mL). The treatment with *H. stigonocarpa* extract prevented the increase of corticosterone levels (154.60 ± 19.01 ng/mL, $p < 0.05$) and the dosage of the hormone remained on levels similar to those of NS group (Figure 2).

3.2 Evaluation of weight gain and serum biochemical parameters

Animals subjected to chronic stress showed lower weight gain ($p<0.05$) and lower triglycerides levels ($p<0.05$) compared with those of NS group. The group treated with *H. stigonocarpa* extract did not show alteration in accumulated weight and the triglycerides levels was similar to those of NS group. Serum dosages of AST, ALT and urea remained unchanged in all groups. There was a reduction in γ -GT ($p<0.01$) in *H. stigonocarpa* group compared with S group and uric acid levels showed an increase in extract-treated animals ($p<0.05$) (Table 2). Similarly, there was an increase in serum total antioxidant capacity of such animals (54.15 ± 3.70 $\mu\text{mol/L}$) compared with that of NS group (40.89 ± 2.56 $\mu\text{mol/L}$, $p<0.05$) and that of S group (39.14 ± 0.99 $\mu\text{mol/L}$, $p<0.01$). Besides, *H. stigonocarpa* aqueous extract showed *in vitro* antioxidant activity by DPPH[•] method with IC₅₀ of 190.2 ± 8.08 $\mu\text{g/mL}$.

There was an increase in blood glucose levels in S group animals after inducing stress by restriction and cold (36%, $p<0.001$). Treatment with *H. stigonocarpa* attenuated the glycemia increase (17%, $p<0.01$) (Figure 3).

3.3 Oxidative stress analyses

Figure 4 shows evaluative parameters of oxidative stress in cerebellum, cerebral cortex, striatum and hippocampus. Restriction and cold stress-inducing promoted an increase of lipid peroxidation in cerebral cortex (44%, $p<0.05$), cerebellum (29%, $p<0.05$) and hippocampus (41%, $p<0.001$). Treatment with *H. stigonocarpa* significantly decreased that parameter to values similar to those of NS group (Figure 4 A). No change was observed in striatum among groups.

Enzymes SOD and CAT remained unaltered among groups (Figure 4 B-C). On the other hand, stress caused a decrease in glutathione peroxidase (GPx) activity in cerebral cortex (38%, $p<0.01$) and in striatum (25%, $p<0.01$) and no change was observed in hippocampus and cerebellum (Figure 4 D).

Besides, significant depletion of GSH in hippocampus (35%, $p<0.001$) and in cerebellum (19%, $p<0.01$) was observed. That depletion in cerebral cortex (13%) and in striatum (6%) was not significant (Figure 4 E).

The use of *H. stigonocarpa* caused an increase of GPx activity in cerebral cortex ($p<0.05$) and prevented the depletion of GSH in hippocampus ($p<0.05$) and in cerebellum ($p<0.05$). GR activity showed no difference among groups (Figure 4 F) and G6PD activity remained unaltered in cerebellum, cerebral cortex and hippocampus, but showed a decrease in striatum (23%, $p<0.05$) in S group, revealing that the supplementation kept levels of that enzyme similar to those of NS group, re-establishing glutathione antioxidant pathways (Figure 4 G).

4. Discussion

In order to evaluate stress induced by restriction and cold, corticosterone levels were compared among the groups studied. Glucocorticoid is an important stress marker, since it is released by adrenals when animals are exposed to potentially noxious stimuli such as cold, immobilization and sleep deprivation (Bhatia et al., 2011; Paula-Freire et al., 2013; Tsigos and Chrousos, 2002). *H. stigonocarpa* extract inhibited the increase of corticosterone, showing therefore a potential anti-stress effect probably by controlling its release when animals were subjected to chronic stress stimuli. Similar results were described for extract of other plants with adaptogenic properties (Siripurapu et al., 2005).

Another factor evaluated in response to stress was weight change of thymus, spleen and adrenals. The literature about the effect of stress and the action of adaptogenic plants on the weight of those organs shows controversial results (Marin et al., 2007; Mendes et al., 2007). Whereas some research has shown adrenal hypertrophy (Paula-Freire et al., 2013; Rai et al., 2003), our study demonstrates that *H. stigonocarpa* extract did not alter thymus and spleen weight, maintaining their average weight. Rai et al. (2003) observed the same effect using *Bacopa monniera* and *Panax quinquefolium* extracts.

Considering the accumulated weight and the seric biochemical parameters in animals subjected to chronic stress and treated with *H. stigonocarpa* extract, we observed that the group also subjected to chronic stress, but not receiving the extract, showed lower weight gain. This can be explained by the induction of catabolic reactions from the increased release of glucocorticoids (Bhatia et al., 2011; Sood et al., 2006) and also by the decrease of triglyceride levels in that

group; thus, confirming the results presented by Rai et al. (2003). Therefore, treatment with *H. stigonocarpa* extract kept animals' weight unchanged and normalized triglycerides levels, which may be related to the attenuation response to stressor stimuli, from the decrease in corticosterone levels and the reestablishment of metabolic homeostasis.

Besides, as expected, there was an increase in glycemia in S group after inducing restriction and cold, probably by the action of glucocorticoids in hepatic metabolism in response to stressor stimuli; the treatment with *H. stigonocarpa* extract attenuated that increase. These results show that the improved glycemic control is due to the decrease in corticosterone and/or the increase in glucose uptake, confirming data presented in studies with *Withania somnifera*, *Habenaria intermedia* (Habbu et al., 2012) and curcumin (Bhatia et al., 2011).

With respect to some effects on serum biomarkers of liver and kidney function, in stressed animals treated with *H. stigonocarpa* extract, it was observed that they were not specific because the levels of AST, ALT and urea were not altered among the groups. Furthermore, there was a reduction in γ -GT, suggesting that the *H. stigonocarpa* extract probably caused no kidney or liver damage in these animals.

It is well-documented that glucocorticoids released in response to stress may, directly or indirectly, induce changes in antioxidant enzymes activity, promoting imbalance in redox balance (McIntosh et al., 1998; Rasheed et al., 2011; Zafir and Banu, 2009). *H. stigonocarpa* extract showed significant *in vitro* antioxidant activity by DPPH[•] method. Antioxidant activity may occur due to the presence of phenolic compounds, such as flavonoids, tannins and terpenes present in the fruit (Orsi et al., 2012). Other studies have also demonstrated that the fruit showed *in vitro* antioxidant activity by the lipid peroxidation method in rat brains and was capable of preventing the depletion of GSH levels as well as the content of malondialdehyde (Orsi et al., 2012; Orsi et al., 2014). By evaluating uric acid levels in animals receiving the *H. stigonocarpa* extract, an increase in that important serum antioxidant was observed; a similar result was observed when using *Curcuma longa* extract (Zafir and Banu, 2007).

That result could explain the increased serum total antioxidant capacity in those animals. In addition, under stressful conditions, cellular stimuli leads to the

increased production of reactive oxygen species (ROS) that triggered the antioxidant defense, as illustrated in Figure 5, which may affect SNC homeostasis, causing an imbalance in antioxidant state (Dal Santo et al., 2014; Oishi et al., 1999). Inducing stress by restriction and cold promoted an increase in lipid peroxidation levels and the treatment with *H. stigonocarpa* extract significantly decreased that parameter to values similar to those of the non-stressed group. Other studies have also observed an increase in lipid peroxidation levels in brain and in different brain regions (hippocampus, cerebral cortex, frontal cortex and striatum) in animals subjected to stress by immobilization (Abidin et al., 2004; Balk Rde et al., 2010; Budni et al., 2013; Fontella et al., 2005; Freitas et al., 2014; Sahin and Gumuslu, 2004). No change was observed in striatum among the groups, which may evidence the differences in the antioxidant defense system in brain regions (Ahmad et al., 2012; Dal Santo et al., 2014; Zaidi and Banu, 2004).

Although no change was observed in SOD, CAT and GR activity in supplemented animals, *H. stigonocarpa* extract led to an increase in GPx activity, preventing GSH depletion and attenuating G6PD decrease. Stress by restriction and cold may cause an increase in nitric acid synthesis; nitric acid may react with superoxide anion to form peroxynitrite anion (ONOO^-), which is highly reactive (Madrigal et al., 2002; Madrigal et al., 2001). The exacerbated increase of peroxynitrite overloads the antioxidant defense system leading to GSH depletion (Madrigal et al., 2001). On the other hand, nitric acid, like glucocorticoids, can also cause GPx inactivation (Asahi et al., 1995), decreasing the enzyme activity or decreasing GSH substrate; consequently, leading to an increased lipid peroxidation. Corticosterone can also cause a decrease in NADPH, which is necessary for regenerating GSH from oxidized glutathione (GSSG) (Patel et al., 2002). The use of *H. stigonocarpa* fruit promoted improved redox balance due to its potential antioxidant and anti-stress action, by decreasing glucocorticoids release, increasing GPx activity and GSH levels, as well as contributing to lower lipid peroxidation.

As demonstrated in our study, stressor agents can affect different brain regions and cause changes in antioxidant defense system, leading to higher oxidative stress. It is then postulated that *H. stigonocarpa* aqueous extract can have antioxidant capacity, contributing to beneficial actions by inhibiting higher

oxidative stress and its deleterious effects on rats subjected to stress by restriction and cold.

5. Conclusion

H. stigonocarpa aqueous extract of the fruit pulp caused modulation in HPA axis after stress induction, by diminishing corticosterone levels. In addition, chronic stress induced by restriction and cold stimuli caused an increased oxidative stress in different regions of rat brain. The treatment with the extract attenuated *H. stigonocarpa* the damage by restoring the levels of GSH increased GPx activity and decreasing lipid peroxidation

Based on those observations, the use of *H. stigonocarpa* fruits showed no toxicity, promoted an improved redox state in several brain regions and increased total antioxidant capacity, suggesting a potential adaptogenic and neuroprotective effect against stress-induced changes.

6. Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (APQ-02659-12) and the Support Programme for University Extension of the Ministry of Education (PROEXT/MEC-SESU 2012). We would also like to thank Douglas Carvalho, Francielle B. R. de Moura and Nathalia B. Bathista (Universidade Federal de Uberlândia) for contributions to experimental procedures, and Moacir Wajner and Carolina G. Fernandes (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) for advisory and technical support. We are thankful to Carlos E. Tucci and Alessandro Tucci for the permission to collect the jatobá fruits. HLM, LGP and DDV, received graduate fellow ships from CAPES and CNPq. FSE is grant recipient of CNPq.

7. References

- Abidin, I., Yargicoglu, P., Agar, A., Gumuslu, S., Aydin, S., Ozturk, O., Sahin, E., 2004. The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress. *Int J Neurosci* 114, 683-699.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105, 121-126.
- Ahmad, A., Rasheed, N., Ashraf, G.M., Kumar, R., Banu, N., Khan, F., Al-Sheeha, M., Palit, G., 2012. Brain region specific monoamine and oxidative changes during restraint stress. *Can J Neurol Sci* 39, 311-318.
- Asahi, M., Fujii, J., Suzuki, K., Seo, H.G., Kuzuya, T., Hori, M., Tada, M., Fujii, S., Taniguchi, N., 1995. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. *J Biol Chem* 270, 21035-21039.
- Asea, A., Kaur, P., Panossian, A., Wikman, K.G., 2013. Evaluation of molecular chaperons Hsp72 and neuropeptide Y as characteristic markers of adaptogenic activity of plant extracts. *Phytomedicine* 20, 1323-1329.
- Balk Rde, S., Bridi, J.C., Portella Rde, L., Carvalho, N.R., Dobrachinski, F., da Silva, M.H., Amaral, G.P., Dias, G.R., Barbosa Nde, V., Soares, F.A., 2010. Clomipramine treatment and repeated restraint stress alter parameters of oxidative stress in brain regions of male rats. *Neurochem Res* 35, 1761-1770.
- Benzie, I.F., Strain, J.J., 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 299, 15-27.
- Bhatia, N., Jaggi, A.S., Singh, N., Anand, P., Dhawan, R., 2011. Adaptogenic potential of curcumin in experimental chronic stress and chronic unpredictable stress-induced memory deficits and alterations in functional homeostasis. *J Nat Med* 65, 532-543.
- 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.
- Browne, R.W., Armstrong, D., 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108, 347-352.
- Budni, J., Zomkowski, A.D., Engel, D., Santos, D.B., dos Santos, A.A., Moretti, M., Valvassori, S.S., Ornell, F., Quevedo, J., Farina, M., Rodrigues, A.L.S., 2013. Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. *Experimental Neurology* 240, 112-121.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113, 484-490.
- Cui, K., Luo, X., Xu, K., Ven Murthy, M.R., 2004. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28, 771-799.
- Dal Santo, G., Conterato, G.M., Barcellos, L.J., Rosemberg, D.B., Piato, A.L., 2014. Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain. *Neurosci Lett* 558, 103-108.
- Dasuri, K., Zhang, L., Keller, J.N., 2013. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* 62, 170-185.

- Echtay, K.S., 2007. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med* 43, 1351-1371.
- Fernandes, C.G., Borges, C.G., Seminotti, B., Amaral, A.U., Knebel, L.A., Eichler, P., de Oliveira, A.B., Leipnitz, G., Wajner, M., 2011. Experimental evidence that methylmalonic acid provokes oxidative damage and compromises antioxidant defenses in nerve terminal and striatum of young rats. *Cell Mol Neurobiol* 31, 775-785.
- Fontella, F.U., Siqueira, I.R., Vasconcellos, A.P., Tabajara, A.S., Netto, C.A., Dalmaz, C., 2005. Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus. *Neurochem Res* 30, 105-111.
- Freitas, A.E., Bettio, L.E.B., Neis, V.B., Santos, D.B., Ribeiro, C.M., Rosa, P.B., Farina, M., Rodrigues, A.L.S., 2014. Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 50, 143-150.
- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D., 2001. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40, 959-975.
- Grandi, T.S.M., Trindade, J.A.d., Pinto, M.J.F., Ferreira, L.L., Catella, A.C., 1989. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 3, 185-224.
- Gunnar, M., Quevedo, K., 2007. The neurobiology of stress and development. *Annu Rev Psychol* 58, 145-173.
- Habbu, P., Smita, D., Mahadevan, K., Shastry, R., Biradar, S., 2012. Protective effect of *Habenaria intermedia* tubers against acute and chronic physical and psychological stress paradigms in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22, 568-579.
- Langenheim, J.H., Convis, C.L., Macedo, C.A., Stubblebine, W.H., 1986. *Hymenaea* and *Copaifera* leaf sesquiterpenes in relation to lepidopteran herbivory in southeastern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* 14, 41-49.
- Leong, S.F., Clark, J.B., 1984. Regional development of glutamate dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem* 43, 106-111.
- Madrigal, J.L., Hurtado, O., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Castrillo, A., Bosca, L., Leza, J.C., 2002. The increase in TNF- α levels is implicated in NF- κ B activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. *Neuropsychopharmacology* 26, 155-163.
- Madrigal, J.L., Olivenza, R., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Rodrigo, J., Leza, J.C., 2001. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 24, 420-429.
- Manoli, L.P., Gamaro, G.D., Silveira, P.P., Dalmaz, C., 2000. Effect of chronic variate stress on thiobarbituric-acid reactive species and on total radical-trapping potential in distinct regions of rat brain. *Neurochem Res* 25, 915-921.
- Maranhão, C.A., Pinheiro, I.O., Santana, A.L.B.D., Oliveira, L.S., Nascimento, M.S., Bieber, L.W., 2013. Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. *International Biodeterioration and Biodegradation* 79, 9-13.
- Marin, M.T., Cruz, F.C., Planeta, C.S., 2007. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav* 90, 29-35.

- McIntosh, L.J., Cortopassi, K.M., Sapolsky, R.M., 1998. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: kainic acid studies. *Brain Res* 791, 215-222.
- McIntosh, L.J., Sapolsky, R.M., 1996. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. *Exp Neurol* 141, 201-206.
- Mendes, F.R., Tabach, R., Carlini, E.A., 2007. Evaluation of *Baccharis trimera* and *Davilla rugosa* in tests for adaptogen activity. *Phytother Res* 21, 517-522.
- Oishi, K., Yokoi, M., Maekawa, S., Sodeyama, C., Shiraishi, T., Kondo, R., Kuriyama, T., Machida, K., 1999. Oxidative stress and haematological changes in immobilized rats. *Acta Physiol Scand* 165, 65-69.
- Oliveira, L.S., Santana, A.L.B.D., Maranhão, C.A., de Miranda, R.d.C.M., Galvão de Lima, V.L.A., da Silva, S.I., Nascimento, M.S., Bieber, L., 2010. Natural resistance of five woods to *Phanerochaete chrysosporium* degradation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64, 711-715.
- Orsi, P.R., Bonamin, F., Severi, J.A., Santos, R.C., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., Di Stasi, L.C., 2012. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models. *Journal of Ethnopharmacology* 143, 81-90.
- Orsi, P.R., Seito, L.N., Di Stasi, L.C., 2014. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. *J Ethnopharmacol* 151, 380-385.
- Panossian, A., Wikman, G., Wagner, H., 1999. Plant adaptogens. III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. *Phytomedicine* 6, 287-300.
- Panossian, A.G., 2003. Adaptogens: tonic herbs for fatigue and stress. *Alternative & Complementary Therapies* 9, 327-331.
- Patel, R., McIntosh, L., McLaughlin, J., Brooke, S., Nimon, V., Sapolsky, R., 2002. Disruptive effects of glucocorticoids on glutathione peroxidase biochemistry in hippocampal cultures. *J Neurochem* 82, 118-125.
- Paula-Freire, L.I., Mendes, F.R., Molska, G.R., Duarte-Almeida, J.M., Carlini, E.A., 2013. Comparison of the chemical composition and biological effects of the roots, branches and leaves of *Heteropterys tomentosa* A. Juss. *J Ethnopharmacol* 145, 647-652.
- Prado, L.C., Silva, D.B., de Oliveira-Silva, G.L., Hiraki, K.R., Canabrava, H.A., Bispo-da-Silva, L.B., 2014. The gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica*(Myrtaceae) leaf extract: the possible role of condensed tannins. *Biol Pharm Bull* 37, 722-730.
- Rai, D., Bhatia, G., Palit, G., Pal, R., Singh, S., Singh, H.K., 2003. Adaptogenic effect of *Bacopa monniera* (Brahmi). *Pharmacol Biochem Behav* 75, 823-830.
- Rasheed, N., Ahmad, A., Al-Sheeha, M., Alghasham, A., Palit, G., 2011. Neuroprotective and anti-stress effect of A68930 in acute and chronic unpredictable stress model in rats. *Neurosci Lett* 504, 151-155.
- Reis, F.M., Albrechet-Souza, L., Franci, C.R., Brandao, M.L., 2012. Risk assessment behaviors associated with corticosterone trigger the defense reaction to social isolation in rats: role of the anterior cingulate cortex. *Stress* 15, 318-328.
- Roberts, C.K., Sindhu, K.K., 2009. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci* 84, 705-712.
- Sahin, E., Gumuslu, S., 2004. Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behav Brain Res* 155, 241-248.

- Santana, A.L.B.D., Maranhão, C.A., Santos, J.C., Cunha, F.M., Conceição, G.M., Bieber, L.W., Nascimento, M.S., 2010. Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64, 7-12.
- Siripurapu, K.B., Gupta, P., Bhatia, G., Maurya, R., Nath, C., Palit, G., 2005. Adaptogenic and anti-amnesic properties of *Evolvulus alsinoides* in rodents. *Pharmacol Biochem Behav* 81, 424-432.
- Sood, S., Narang, D., Thomas, M.K., Gupta, Y.K., Maulik, S.K., 2006. Effect of *Ocimum sanctum* Linn. on cardiac changes in rats subjected to chronic restraint stress. *J Ethnopharmacol* 108, 423-427.
- Tsigos, C., Chrousos, G.P., 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53, 865-871.
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77, 325-333.
- Yagi, K., 1998. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol* 108, 101-106.
- You, J.M., Yun, S.J., Nam, K.N., Kang, C., Won, R., Lee, E.H., 2009. Mechanism of glucocorticoid-induced oxidative stress in rat hippocampal slice cultures. *Can J Physiol Pharmacol* 87, 440-447.
- Zafir, A., Banu, N., 2007. Antioxidant potential of fluoxetine in comparison to *Curcuma longa* in restraint-stressed rats. *Eur J Pharmacol* 572, 23-31.
- Zafir, A., Banu, N., 2009. Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress* 12, 167-177.
- Zaidi, S.M., Banu, N., 2004. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta* 340, 229-233.

Figures

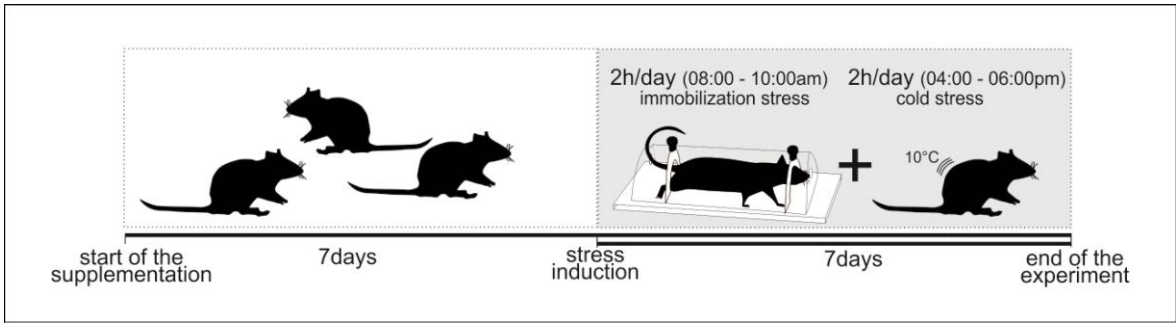


Figure 1: Scheme demonstrating the model of stress induction by restriction and cold in Wistar rats.

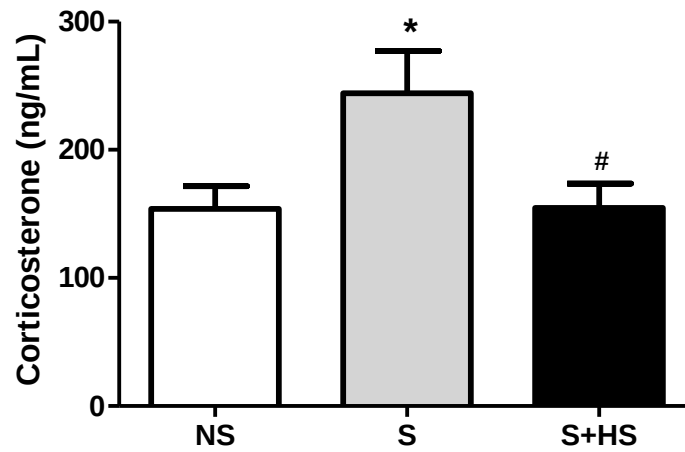


Figure 2: Serum corticosterone levels of no stressed rats (NS), stressed (S) by restriction and cold and stressed treated with *H. stigonocarpa* (S+HS) submitted to restriction and cold. Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$ vs. NS; # $p < 0.05$ vs. S (ANOVA followed by Tukey's test, $n = 7-8$).

Table 1: Adrenals, spleen and thymus weight of no stressed rats (NS), stressed (S) by restriction and cold and stressed treated with *H. stigonocarpa* (S+HS) submitted to restriction and cold.

Group	Adrenals Glands		Spleen		Thymus	
	Absolute Weight ^a	Relative Weight ^b	Absolute Weight	Relative Weight	Absolute Weight	Relative Weight
NS	59.80±2.91	0.22±0.01	783.40±11.65	2.90±0.04	630.30±37.00	2.34±0.14
S	65.90±2.95	0.26±0.01	636.20±36.31***	2.43±0.11***	372.60±18.47***	1.44±0.07***
S+HS	67.38±5.32	0.24±0.02	584.30±13.93***	2.16±0.04***	440.80±37.79***	1.59±0.11***

^aAbsolute weight (mg). ^bRelative weight (Organ weight (mg)/weight(g)). Stress (S), No Stress (NS), Stress treated with *H. stigonocarpa* (S+HS). Values are expressed as means ± S.E.M.***p<0.001 vs. NS. (ANOVA followed by Tukey's test, n=7-8).

Table 2: Accumulated weight and serum biochemical parameters of non stressed rats (NS), stressed (S) by restriction and cold and stressed treated with *H. stigonocarpa* (S+HS) submitted to restriction and cold.

	NS	S	S+HS
Accumulated weight(g)	54.22±2.60	44.88±1.93*	47.00±2.67
Triglycerides (mg/dL)	45.23±5.89	28.48±2.99*	46.62±5.14 [#]
Urea (mg/dL)	39.92±5.03	46.89±2.72	38.60±4.00
Uric acid (mg/dL)	0.77±0.07	0.66±0.13	1.04±0.10 [#]
γ-GT (U/L)	9.69±1.19	16.94±1.89**	11.71±0.85 [#]
AST (U/L)	96.50±4.41	95.00±1.64	85.89±3.53
ALT (U/L)	44.78±4.48	48.22±1.67	48.44±3.71

γ-glutamyltransferase (γ-GT), Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT). Values are expressed as means±S.E.M. *p<0.05, **p<0.01 vs. NS, [#]p<0.05 vs. S. (ANOVA followed by Tukey's test, n=7-8).

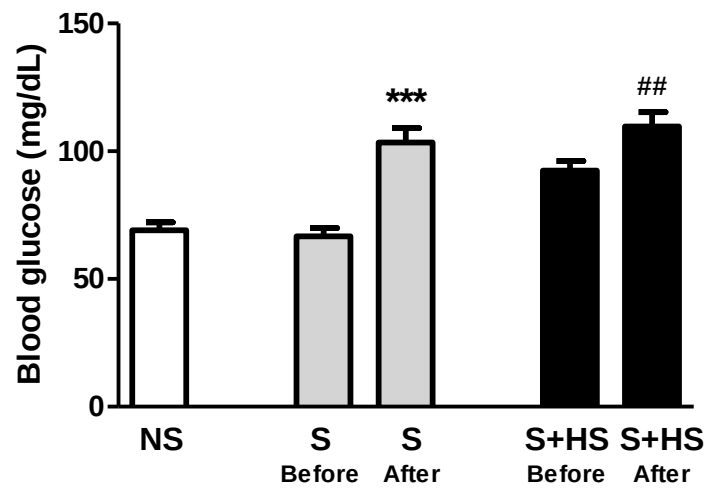


Figure 3: Blood glucose levels of no stressed rats (NS), stressed (S) by restriction and cold and stressed treated with *H. stigonocarpa* (S+HS) before and after de last session of stress induction. Values are expressed as means±S.E.M. ***p<0.001 vs. S_{before}; ##p<0.01 vs. S+HS_{before} (paired Student's t Test, n=9-10).

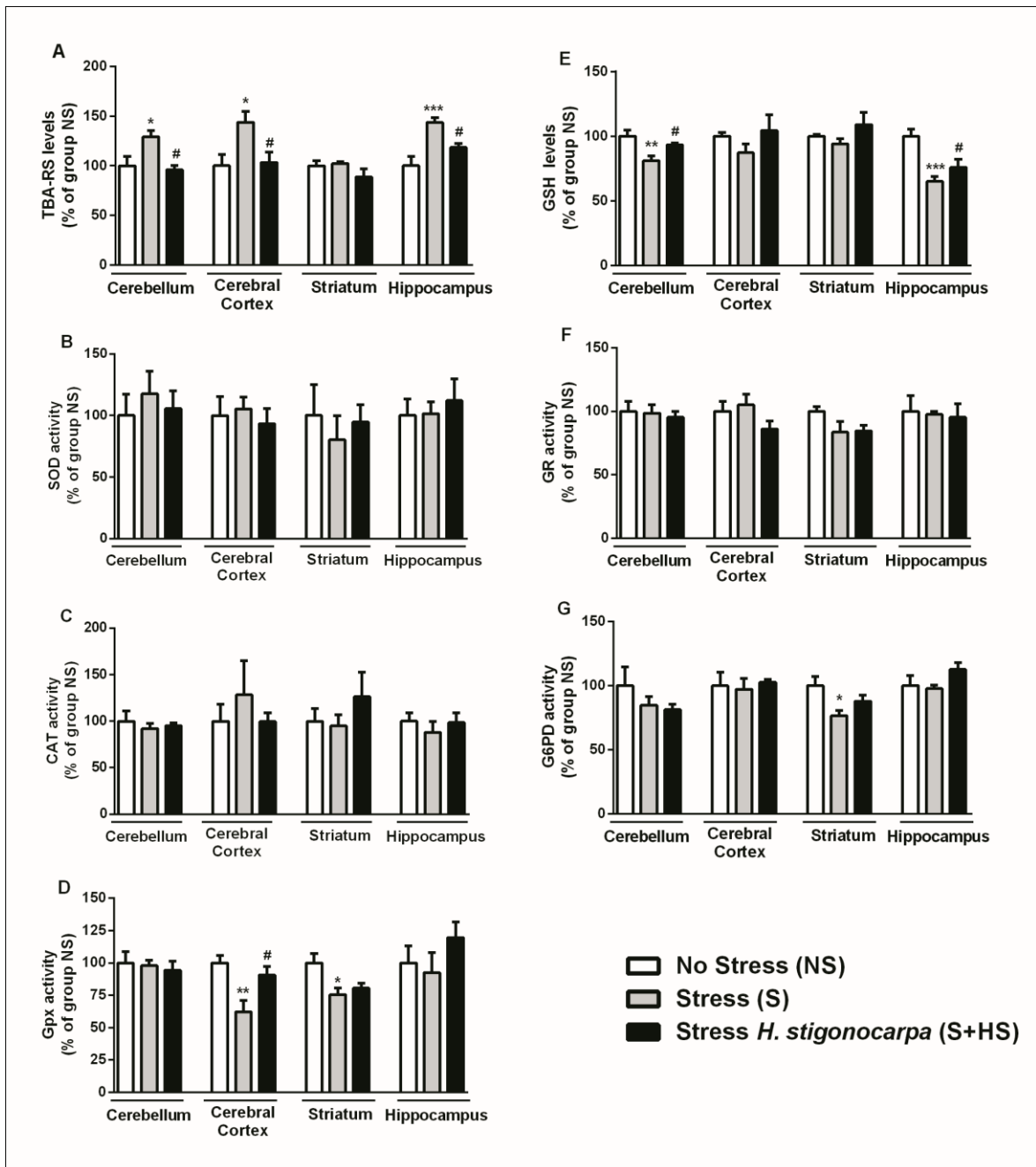


Figure 4: Evaluation of oxidative stress parameters in cerebellum, cerebral cortex, striatum and hippocampus of no stressed rats (NS), stressed (S) by restriction and cold and stressed treated with *H. stigonocarpa* extract (S+HS): (A) Lipid peroxidation (TBARS) levels, (B) SOD (superoxide dismutase) activity, (C) CAT (catalase) activity, (D) GPx (glutathione peroxidase) activity, (E) GSH (reduced glutathione) levels, (F) GR (glutathione reductase) activity, (G) G6PD (glucose-6-phosphate dehydrogenase) activity. Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. and represented as percentage of NS group, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.01 vs. NS; # p <0.05 vs. S (ANOVA followed by Tukey's test, n =3-4).

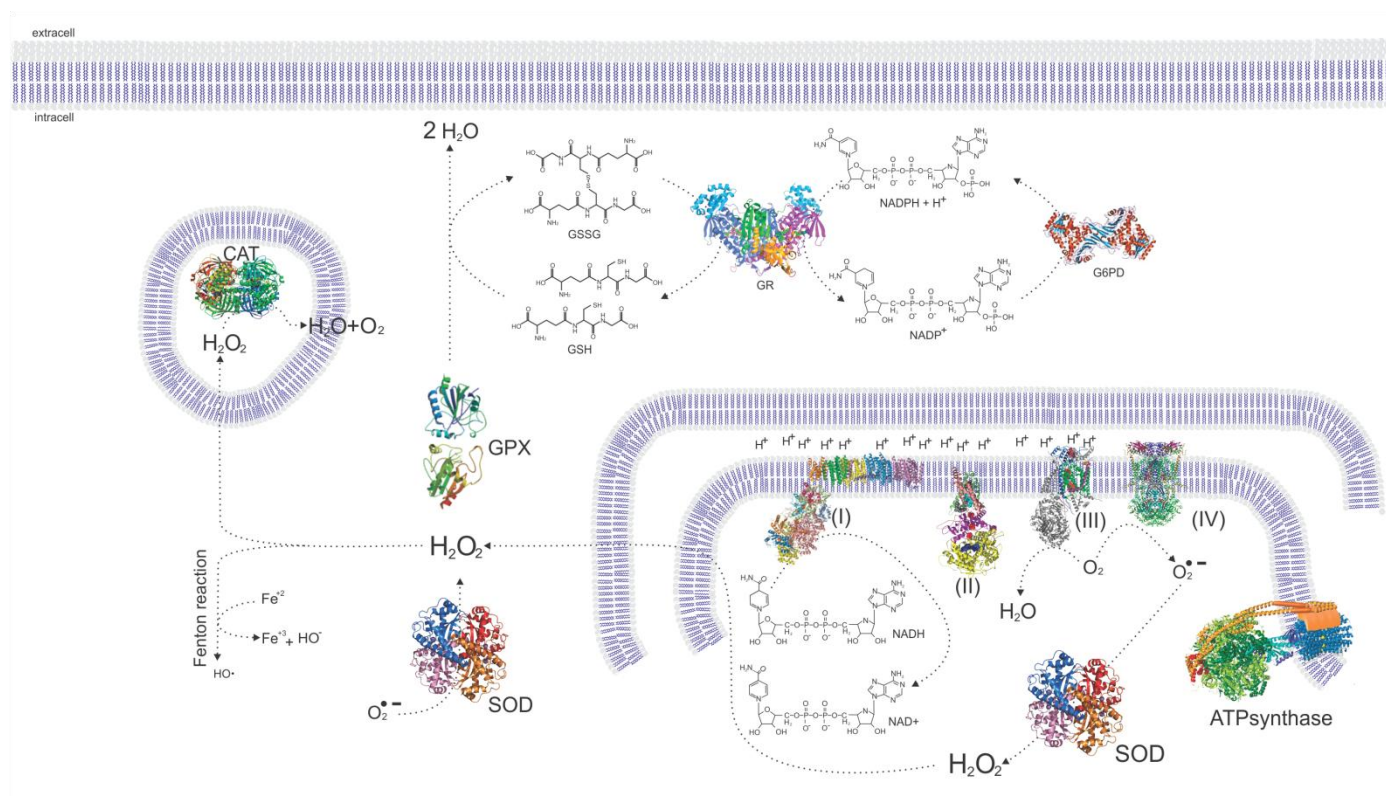


Figure 5. Scheme representing the generation of reactive oxygen species (ROS) and of enzymatic and nonenzymatic antioxidant defense systems in nervous system. Reactive species are mainly produced by electron transport chain, and are neutralized by antioxidants, including SOD, CAT, and GPx and by GSH system. Abbreviations: SOD (superoxide dismutase), CAT (catalase), GPx (glutathione peroxidase), GSH (reduced glutathione), GSSG (oxidized glutathione), GR (glutathione reductase), G6PD (glucose-6-phosphate dehydrogenase).