



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO
MOLECULAR



**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO-SÍMILE DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L.
(GRAVIOLA)**

CRISTINA KELLY DE SOUZA RODRIGUES

CRATO – CE

2015

CRISTINA KELLY DE SOUZA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO-SÍMILE DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L.
(GRAVIOLA)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri- URCA, como requisito parcial de obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Área de Concentração: Farmacologia de Produtos Naturais.

Orientadora:

Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf Mendonça

Co-orientador:

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe

CRATO – CE

2015

CRISTINA KELLY DE SOUZA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO-SÍMILE DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L.
(GRAVIOLA)**

Dissertação submetido à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Farmacologia de Produtos Naturais.

Aprovado em: ___/___/2015

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dra.. Marta Regina Kerntopf Mendonça
Departamento de ciências biológicas- URCA

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe - Co-Orientador
Universidade Federal da Paraíba-UFPB

Prof^ª. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa – Membro externo
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC

Prof^ª. Dra. Roseli Barbosa – Membro interno
Departamento de ciências biológicas- URCA

CRATO-CE

2015

“Buscai em primeiro lugar o reino de Deus e a Sua justiça e todas as outras coisas vos Serão Acrescentadas”.

Mateus 6:33

“Entrega teu caminho ao Senhor, confia nele e o mais ELE fará”.

Salmo 37:5

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho e todo o aprendizado
que vou levar para a vida a **Joaquim Martins de Souza Filho**(In memória),
meu amado avô, que pelo seu exemplo de vida e caráter excepcional,
me ensinou e lembrou os valores primordiais para a vida.*

*Ao meu amado esposo, **Mauricio Antonio dos Santos**,
amigo, companheiro, cúmplice. Presente maravilhoso de Deus.
Pelo apoio constante, compreensão e por fazer valer a
pena cada minuto da nossa vida **JUNTOS**.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão do que sou e quero ser. Por Sua misericórdia, amor e graça, presente constantemente em minha vida, direcionando os meus passos e renovando minha fé a cada dia, direcionando-me na realização deste trabalho. A ELE toda honra e toda Glória.

Aos meus pais Marinalva de Souza Rodrigues e Francisco José Rodrigues e meus irmãos Francisco Bruno de Souza Rodrigues e Samuel de Souza Rodrigues, pela compreensão da ausência em alguns momentos familiares e pelo apoio e amor constante.

A minha sogra Maria de Jesus dos Santos, um presente de Deus, que cuidou e cuida de mim como uma mãe.

A minha orientadora, Dra. Marta Regina Kentopf, que com sua forma singular de ser fez-se presente na fundação da minha formação acadêmica, intelectual e pessoal. Por ser mais que uma orientadora, uma amiga. Meu MUITO OBRIGADA.

Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe, pelo grande apoio dado, paciência e compreensão, pelo profissionalismo que teve para realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Irwin Alencar de Menezes, pelo apoio à pesquisa e valiosos conhecimentos compartilhados, e pela oportunidade de fazer parte do LFQM.

À Profa. Dra. Roseli Barbosa, pelo o exemplo de profissionalismo e doçura, que se somam a sua humanidade.

Ao Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa e todos que fazem parte do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LPPN pela colaboração;

Aos meus amigos – irmãos: Valter Santos, Alefe Monteiro, Maria Cristina, Norma Fernandes, Erika Nascimento, Luzia Paulo, Larissa Rolim, Rodolfo Nóbrega. Agradeço não só pela construção de um trabalho, mas de uma grande amizade e pela contribuição no meu crescimento pessoal.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia e Química Molecular - LFQM: Andreza Guedes, Andressa Alencar, Datiane Morais, Severino Denício, Demontier, Emilly Balbino, Érica Nascimento, Anita Oliveira, Rodolfo Nóbrega, Luzia, Renata, Luiz Pereira, Gyllyanderson Delmondes, Maria Cristina, Norma Fernandes, Rayane Oliveira, Tatielly, Geovanna, Tais, Luana, Bruno, Victor Afonso.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, por serem sempre solícitos quando precisei. Em especial: Saulo Tintino, Fernando Figueredo e João Vitor.

Ao Sr. Luiz pela amizade e cafezinhos, que nos intervalos dos testes alegrava nossa tarde. Ao Sr. Fred que sempre esteve à disposição para nos ajudar na busca de animais e materiais necessários.

À Universidade Federal de Santa Maria - RS, pela ajuda nos testes realizados de cromatografia do extrato, em especial a Aline Augusti Boligon e a Margareth Linde Athayde. Obrigada!

Ao Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima – HCDAL, coordenado pela professora Dra. Maria Arlene Pessoa, pela identificação do espécime botânico.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, pelos ensinamentos a nós transmitidos. Muito obrigada!

Às secretárias do Mestrado, Andecieli e Lenira, por serem sempre solícitas e dispostas a nos atender e nos ajudar. Muito obrigada!

A CAPES, CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro, para a realização da pesquisa.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a concretização deste trabalho, Muito Obrigado!

RESUMO

O transtorno depressivo é uma doença de curso crônico e recorrente, que apresenta alta incidência e prevalência. O tratamento deste transtorno é feito com drogas que, a despeito da eficácia, apresentam muitos efeitos colaterais. Isto tem levado à pesquisa de plantas e de produtos delas derivados que apresentem eficácia no tratamento da depressão e baixa toxicidade. A espécie *Annona muricata* L., conhecida popularmente como graviola, é empregada na medicina popular como sedativo, anticonvulsivante, hipoglicemiante e antidepressivo. Este trabalho teve como objetivo caracterizar o efeito antidepressivo-símile do extrato hidroetanólico das folhas de *Annona muricata* L. (EHFAM) em camundongos, através de testes comportamentais específicos. Inicialmente, uma análise fitoquímica do extrato indicou a presença de flavonóides e alcalóides. Posteriormente o extrato foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a qual indicou a presença dos seguintes compostos fenólicos: ácido caféico, ácido gálico, ácido clorogênico, rutina, quercetina, caempferol, catequina, epicatequina, quercitrina e ácido elágico. Do ponto de vista farmacológico, a administração intraperitoneal do EHFAM, na dose de 5 mg/kg, apresentou efeito antidepressivo-símile em camundongos submetidos ao teste do nado forçado; tal efeito foi evidenciado pela redução do tempo de imobilidade do animal no cilindro com água. Ressalta-se que o efeito anteriormente citado foi potencializado quando o material vegetal foi associado aos antidepressivos bupropiona, fluoxetina e imipramina. Em animais pré-tratados com reserpina, a administração intraperitoneal do extrato, também na dose de 5 mg/kg, reverteu a acinesia induzida pelo alcaloide. Quando os animais tratados com o EHFAM foram submetidos ao campo aberto, foi observado que o extrato apresentou um efeito sedativo nos camundongos, o qual foi evidenciado pela redução do número de cruzamentos, de *grooming* e de *rearing*, demonstrando que efeito antidepressivo-símile não é decorrente de uma possível estimulação motora. O EHFAM aumentou o limiar de convulsão em animais tratados com PTZ, nas doses de 5, 10 20 mg/kg, indicando que o mesmo é destituído de efeito pró-convulsivante comumente observado em alguns antidepressivos. No teste dos tremores induzidos por oxotremorina, o EHFAM na dose de 5 mg/kg apresentou discreta ação antimuscarínica ao antagonizar parcialmente os tremores induzidos pelo agonista colinérgico em camundongos. Tomados em conjunto, os resultados demonstram que o EHFAM apresenta potencial efeito sedativo e antidepressivo-símile em doses baixas, sendo este último efeito mediado possivelmente pela interação de um ou mais componentes do extrato com o sistema monoaminérgico. Além disso, o extrato é destituído de ação pró-convulsivante, um efeito comum a alguns antidepressivos clássicos.

Palavras-chaves: *Annona muricata*, alcalóides, flavonóides, depressão , monoaminas.

ABSTRACT

The depressive disorder is a chronic and recurrent course of illness, which has a high incidence and prevalence. Treatment of the disorder is made with drugs that, in spite of the effectiveness, have many side effects. This has led to research plants and natural products that have efficacy in treating depression and low toxicity. The *Annona muricata* L. species, popularly known as “graviola”, is used in folk medicine as a sedative, anticonvulsant, antidepressant and hypoglycemic. This study aimed to characterize the antidepressant-like effect of hydroethanolic extract from the leaves of *Annona muricata* L. (EHFAM) in mice through specific behavioral tests. Initially, a phytochemical analysis of the extract indicated the presence of flavonoids and alkaloids. Then the extract was subjected to high-performance liquid chromatography (HPLC), which indicated the presence of the following phenolic compounds: caffeic acid, gallic acid, chlorogenic acid, rutin, quercetin, kaempferol, catechin, epicatechin, quercitrin and ellagic acid. From the pharmacological point of view, the intraperitoneal administration of EHFAM at a dose of 5 mg/kg showed antidepressant-like effect in mice subjected to forced swimming test; this effect was evidenced by the reduction in the animal's immobility time in the cylinder of water. It is noteworthy that the effect mentioned above was potentiated when the plant material was associated with antidepressants bupropion, fluoxetine and imipramine. In reserpine-pretreated animals, intraperitoneal administration of the extract, also at a dose of 5 mg/kg reversed alkaloid-induced akinesia. When the animals treated with EHFAM were subjected to the open field test, it was observed that the extract had a sedative effect in mice, which was evidenced by the decrease of the number of crossings, grooming and rearing, indicating that antidepressant-like effect is not due to a possible motor stimulation. The EHFAM increased the seizure threshold in animals treated with PTZ, at a dose of 5, 10, 20mg/kg, indicating that it is devoid of pro-convulsant effect commonly observed in some antidepressants. In the test of oxotremorine-induced tremors, EHFAM at a dose of 5 mg/kg showed a slight antimuscarinic action to partially antagonize the cholinergic agonist-induced tremors in mice. Taken together, the results demonstrate that EHFAM has the potential sedative and antidepressant-like at low doses, the latter effect is possibly mediated by the interaction of one or more extract components with monoaminergic system. Moreover, the extract is devoid of pro-convulsant actions, a common effect of some classical antidepressants.

Keywords: *Annona muricata*, alkaloids, flavonoids, depression, monoamines.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
APA	Área de Preservação Ambiental
ANOVA	Análise de Variância
ATC's	Antidepressivos Tricíclicos
ATRO	Atropina
BUP	Bupropiona
CA	Campo Aberto
CEME	Central de Medicamentos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
COMT	Catecol-O-metiltransferase
DAD	Arranjo de diodos
DZP	Diazepam
EHFAM	Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Annona muricata</i> L.
EPM	Erro Padrão da Média
FLU	Fluoxetina
g	Gramas
LC	Latência de 1ª Convulsão
LM	Latência de Morte
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
5-HIAA	Ácido 5-Hidroxi-indolacético
HVA	Ácido Homovanílico
IMI	Imipramina
i.p.	Intraperitoneal
IT	Intensidade do Tremor
MAO	Monoamina Oxidase
mg	Miligrama

Kg	Quilograma
mL	Militros
NC	Número de Cruzamentos
NG	Número de Grooming
NR	Número de Reaning
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXO	Oxotremorina
PTZ	Pentilenotetrazol
TCA	Teste do Campo Aberto
TI	Tempo de Imobilidade
TNF	Teste do Nado Forçado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Teoria monoaminérgica da depressão	22
Figura 2	Biossíntese de dopamina (DA), noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) no SNC.	23
Figura 3	Vias dopaminérgicas no SNC.	24
Figura 4	Vias serotoninérgicas no SNC.	26
Figura 5	Vias noradrenérgicas no SNC.	27
Figura 6	Mecanismos gerais dos antidepressivos	29
Figura 7	<i>Floresta Nacional do Araripe - Chapada do Araripe</i>	38
Figura 8	Mapa de distribuição geográfica da família Annonaceae	39
Figura 9	Espécie <i>Annona muricata</i> L.(Graviola)	42
Figura 10	Localização geográfica do Sítio Barreiro Grande, município de Crato-CE.	59
Figura 11	Exsicata da espécie <i>Annona muricata</i> L.	60
Figura 12	Fluxograma do processo de obtenção do EHFAM.	64
Figura 13	Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas.	67
Figura 14	Teste para alcaloides.	68
Figura 15	Esquema representativo da avaliação do efeito antidepressivo do EHFAM no teste de nado forçado (TNF).	73
Figura 16	Esquema de realização do teste de acinesia com reserpina.	75
Figura 17	Esquema representativo da avaliação da atividade locomotora no teste do campo aberto (TCA).	77
Figura 18	Esquema de avaliação do envolvimento dos sistemas monoaminérgicos, noradrenergicos e dopaminérgicos no efeito tipo-antidepressivo do EHFAM.	79
Figura 19	Esquema representativo da investigação do efeito do EHFAM sobre o limiar de convulsão em animais tratados com PTZ.	81
Figura 20	Esquema representativo do teste de tremores induzidos por oxotremorina.	83
Figura 21	Cromatograma do EHFAM (detecção UV a 325nm).	87

Figura 22	Efeito do EHFAM (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) sobre o tempo de imobilidade (TI) em camundongos submetidos ao teste do nado forçado (TNF).	91
Figura 23	Efeito do EHFAM sobre camundongos submetidos ao teste da acinesia induzida por reserpina.	92
Figura 24	Efeito do EHFAM (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) sobre o número de cruzamentos.(NC)	96
Figura 25	Efeito do EHFAM (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) sobre o número de <i>grooming</i> .	97
Figura 26	Efeito do EHFAM (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) sobre o número de <i>rearing</i> .	98
Figura 27	Teste de potencialização da atividade antidepressiva do EHFAM com fluoxetina.	101
Figura 28	Teste de potencialização da atividade antidepressiva do EHFAM com Bupropiona.	102
Figura 29	Teste de potencialização da atividade antidepressiva do EHFAM com Imipramina.	103
Figura 30	Efeito do EHFAM (5,10,20 mg/Kg, i.p.) em associação com antidepressivos padrões sobre a Latência de 1°convulsão.	106
Figura 31	Efeito do EHFAM (5,10,20 mg/Kg, i.p.) em associação com antidepressivos sobre o parâmetro tempo de morte.	107
Figura 32	Efeito do EHFAM (5,10,20 mg/Kg, i.p.) sobre os tremores induzidos por oxotremorina.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Propriedades farmacológicas de <i>Annona Muricata</i> L.	48
Tabela 2	Drogas e reagentes utilizados nos modelos comportamentais	61
Tabela 3	Identificação dos metabólitos secundários (Antocianinas, Antocianidinas, Flavonas, Flavonóis, Xantonas, Auronas, Chalconas, Flavononóissentes).	66
Tabela 4	Identificação dos metabólitos secundários (Leucoantocianidinas, Catecnas, Flavononas).	67
Tabela 5	Grupos experimentais e drogas administradas no teste de nado forçado (TNF)	72
Tabela 6	Grupos experimentais e drogas adminstradas no teste de acinesia induzida por reserpina.	74
Tabela 7	Grupos experimentais e respectivas drogas administradas no teste do campo aberto (TCA).	76
Tabela 8	Grupos experimentais e respectivas drogas administradas no teste de potencialização do efeito tipo antidepressivo do EHFAM.	78
Tabela 9	Grupos experimentais e drogas administradas no teste de avaliação do efeito do EHFAM sobre o limiar de convulsão em animais tratados com PTZ.	80
Tabela 10	Grupos experimentais e drogas administradas no teste tremores induzidos por oxotremorina	82
Tabela 11	Análise fitoquímica do EHFAM.	86
Tabela 12	Análise da composição química do EHFAM por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).	88

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	14
1.1 DEPRESSÃO	18
1.2. BASES FISIOPATOLÓGICAS DOS TRANSTORNOS DEPRESSIVOS.....	20
1.2.2. Vias serotoninérgicas.....	25
1.2.3. Vias Noradrenergica.....	26
1.3. TERAPÊUTICA FARMACOLÓGICA DOS TRASNTORNOS DEPRESSIVOS.....	29
1.3.1. Antidepressivos Tricíclicos	30
1.3.2. Inibidores da MAO.....	31
1.3.4. Inibidor seletivo de recaptura de 5-HT/NE (ISRSN)	34
1.4. PLANTAS MEDICINAIS E DEPRESSÃO	36
1.4.1. Família Annonaceae.....	40
1.5. <i>Annona muricata</i> L. (graviola).....	42
1.5.1. Atividade no sistema nervoso central.....	44
1.5.2 Atividade citotóxica e antitumoral	45
1.5.3 Atividades antibacteriana e antiparasitárias	46
1.5.4 Atividade antiofídica	47
1.5.5 Atividade anti-viral.....	48
1.6. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	56
2. OBJETIVOS	58
2.1. OBJETIVO GERAL	58
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
3. MATERIAL E MÉTODO	62
3.1. MATERIAL VEGETAL:	59
3.2. DROGAS E REAGENTES	62
3.3. ANIMAIS.....	62
3.4 EXIGÊNCIAS LEGAIS - ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	63
3.5. OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>ANNONA MURICATA</i> L. (EHFAM).....	64
3.6. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EHFAM:.....	64
3.6.1. Preparação de extratos:.....	66
3.6.2. Teste para fenóis e taninos:	67
3.6.3. Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides:.....	67

3.6.4. Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas:.....	66
3.6.5. Teste para alcalóides.....	66
3.7. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DO EHFAM:	70
3.8. PROTOCOLOS COMPORTAMENTAIS:	71
3.8.1. Teste de Natação forçada.....	73
3.8.2. Teste da acinesia induzida por reserpina:	75
3.8.3. Teste do campo aberto (TCA):	77
3.8.4. Teste da potencialização do efeito tipo antidepressivo do EHFAM.	79
3.8.5. Avaliação do efeito do EHFAM sobre o limiar de convulsão em animais tratados com PTZ.	81
3.8.6. Teste dos tremores induzidos por oxotremorina:	83
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	85
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
4.1. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EHFAM:	88
4.2. ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	89
4.3. Efeito do EHFAM (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) sobre o tempo de imobilidade (TI) em camundongos submetidos ao teste do nado forçado (TNF).....	92
4.4. Efeito do EHFAM sobre camundongos submetidos ao teste da acinesia induzida por reserpina.....	92
4.5. Teste do campo aberto	97
4.6. Potencialização da atividade tipo antidepressiva do EHFAM no teste do nado forçado (TNF).....	102
4.7. Efeito do EHFAM sobre o limiar da convulsão induzida por pentilenotetrazo.....	107
4.8. Efeito do EHFAM sobre os Tremores induzidos por oxotremorina.....	110
5. CONCLUSÕES	114
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	116
7. REFERÊNCIAS	122

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 DEPRESSÃO

A depressão é um transtorno mental incapacitante, de curso crônico e recorrente, caracterizado por comprometimento do estado físico e psicológico do indivíduo. Os principais sintomas clínicos da depressão são: anorexia, anedonia, fadiga, letargia, distúrbios do sono, perda de interesse por atividades que normalmente geravam prazer, baixa autoestima, sentimento de culpa e idéias suicidas (DSM-V, 2014; Gottlieb et al., 2011). Quevedo (2009), afirma que esses sintomas podem ocorrer com frequência e combinar-se entre si. Segundo Sarin (2013), podem ser observados ainda, déficits cognitivos e de concentração, incluindo o impedimento da habilidade de pensamento e tomada de decisões. O sentimento de tristeza é natural em momentos adversos da vida, portanto, para ser dado o diagnóstico de depressão, paciente deverá exibir pelo menos quatro sintomas adicionais por um período mínimo duas semanas (VISMARI, ALVES, PALERMONETO, 2008; RAPOSO 2010; DAVIDSON, 2011; WHO, 2012).

A depressão é transtorno do humor mais comum na prática clínica com uma prevalência global de 4,7% para o sexo masculino e 6% para o feminino. Sua incidência anual é de 1,59%, com a média de idade de início entre os 20 e 40 anos. Apesar do tratamento, as taxas de suicídio ainda são elevadas acometendo, aproximadamente, 15% dos pacientes, especialmente os homens (FOUNTOULAKIS, 2010). O transtorno depressivo é responsável por 4,3% do impacto de todas as doenças na saúde global, e corresponde à terceira principal causa de doenças, com estimativas para os países de baixa e média renda em 3,2% e 5,1%, respectivamente. Proporciona grandes implicações sociais, uma vez que os pacientes deprimidos exibem limitação de atividades e bem-estar, e maior utilização de serviços de saúde (NEMEROFF, 2007). Segundo Alencastro (2012), será a doença que mais gerará custos econômicos e sociais para os governos, devido aos gastos com tratamento e às perdas de produção.

Recente estudo resultante do último *Global Burden of Disease* (GBD, 2010), refere que a incapacidade, importante indicador de morbidade, tem na depressão sua principal causa quanto ao total de anos vividos com incapacidade (YLD¹), avaliada como a quarta causa quanto ao total de anos de vida ajustados para incapacidade (DALYs²). Identificou ainda, que somente o transtorno depressivo respondeu por 8,2% de anos vividos com incapacidade (years lived with disability - YLDs), tornando-se a segunda principal causa nesta particu-

laridade, onde os adultos na idade ativa de trabalho (15 a 64 anos) foram os mais atingidos.

Além disto, foi observado que a depressão contribuiu para o crescimento dos índices de suicídio e doença isquêmica cardíaca, sendo considerado fator de risco para estes agravos (Ferrari et al., 2013).

Segundo Organização Mundial de Saúde OMS o quadro clínico caracterizado como transtorno depressivo foi diagnosticado em 64 milhões de pessoas, o equivalente a 2,2% da população mundial no ano de 2010. Por outro lado, em 2011 os dados estimados indicaram um aumento para cerca de 75 milhões de pessoas, o que corresponde a 2,7% de toda a população (OMS, 2013). No Brasil, aproximadamente 10 milhões de pessoas que sofrem desse distúrbio. Os números são alarmantes, e ainda assim é preciso salientar que pessoas acometidas pela doença muitas vezes não são diagnosticadas corretamente devido a erros de médicos(WANCATA, FRIEDRICH, 2011; LOBO, 2012).

Os critérios para o diagnóstico e classificação dos transtornos depressivos se encontram no Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, em sua quinta edição, elaborado pela APA (*American Psychiatric Association*, 1994) e na Classificação Internacional de Doenças, décima edição, CID-10 (APA, 2013).

A DSM-V descreve que o quadro de depressão é multideterminado, resultante de fatores genéticos, bioquímicos, psicológicos e sociofamiliares, classifica-o como um conjunto de perturbações que variam em duração, frequência e intensidade.

Segundo postulados semelhantes, a Classificação Internacional de Doenças – 10a revisão (CID-10), a depressão encontra-se classificada nos itens F32-F33 seguindo alguns especificadores usados para descrever a condição clínica e as características atuais em episódio em: leve, moderado, grave sem características psicóticas, grave com características

1 Para estimar YLD (*Years of Life due of Disability*, ou anos de vida com incapacidade) por uma causa particular em um determinado período de tempo, o número de casos de doença em que o período multiplicado pela duração média da doença e fator de peso. Esse indicador reflete a gravidade da doença em uma escala de zero (saúde perfeita) a um (mortos).

2 Um DALY (*Disability Adjusted Life Years*) pode significar cada ano perdido de vida saudável. A soma desses DALYs compreende o impacto da doença, podendo ser considerada uma medida da diferença entre estado de saúde atual e uma situação ideal de saúde. É a somatória dos anos de vida perdidos pela incapacidade (YLL- *years of life lost*) devida à mortalidade prematura na população e os anos perdidos devido à incapacidade para casos incidentes da condição de saúde. YLL significa “anos de vida perdidos”, correspondendo basicamente ao número de mortes multiplicado pela expectativa de vida padrão na idade em que a morte ocorre (OMS, 2013).

psicóticas, crônico, com características ansiosa, mista, catatônica, melancólica, atípica, sazonal e pós-parto (EULÁLIO,2015). A evolução dos transtornos depressivos é individual e variável, estando relacionada ao diagnóstico precoce, correto e que tratamento adequado seja instituído.

Apesar dos avanços científicos que abrangem estudos genéticos, neurobiológicos, psicossociais, sociológicos, econômicos e terapêuticos, os transtornos depressivos ainda são um desafio para a psiquiatria e a medicina devido a alta prevalência na população, e grande impacto na morbidade, mortalidade e igualdade de vida, gerando ônus para a sociedade e para os indivíduos afetados (TENG, CEZAR, 2010; LOPEZ et al, 2011).Esses dados desafiam a ciência a buscar formas mais efetivas de tratamento, conduzindo os pacientes deprimidos a uma remissão sintomática e a um desaparecimento do processo fisiopatológico.

1.2. BASES FISIOPATOLÓGICAS DOS TRANSTORNOS DEPRESSIVOS

A fisiopatologia exata dos transtornos depressivos é considerada complexa e heterogênea. Pode ser desencadeada por fatores psicológicos ou emocionais de origem variada, alterações do funcionamento cerebral ou de algumas partes do cérebro e, ainda, ser secundária a enfermidades clínicas como esclerose múltipla, derrame, hepatite, hipotireoidismo, apneia do sono, hipertensão, insuficiência cardíaca e diabetes, além das doenças terminais como câncer e HIV (NEIRA,2013). Alguns fármacos ou drogas também podem causar quadros de transtornos depressivos como: cortisona, anfetaminas, pílulas anticoncepcionais, quimioterapia, álcool e algumas drogas de abuso como *crack*, *ecstasy*, maconha entre outros (COSTA, 2010).

Nos últimos anos, as pesquisas nesta área foram direcionadas para melhorar o entendimento sobre a fisiopatologia da doença. Atualmente, tem-se comprovação da participação de fatores biológicos, psicológicos e sociais no desencadeamento da doença (ANSSEAU et al., 2009). Esta multiplicidade de fatores, pode também explicar a cronicidade do diagnóstico devido à relação dinâmica entre eles (AGUIAR et al, 2011).

A fisiopatologia da depressão tem sido explicada por várias teorias que apontam déficits de neurotransmissores (serotonina, noradrenalina, dopamina, glutamato e GABA), hormônios (disfunção do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e no ciclo circadiano (HANSLER, 2010). Entre elas a que tem sido considerada a teoria clinicamente relevante por cerca de 30 anos é a teoria monoaminérgica.

A hipótese monoaminérgica da depressão surgiu por volta 1965, e postula que o maior processo neuroquímico envolvido na depressão é a disfunção na neurotransmissão monoaminérgica e concomitante diminuição das monoaminas (noradrenalina – NE e/ou serotonina – 5-HT) na fenda sináptica, e também pode ser estendida para dopamina (DA) (SHILDKRAUT, 1965; COOPEN, 1967) (Figura 1). Segundo esse pensamento, o sistema neurotransmissor monoaminérgico pode estar disfuncional em diversos circuitos cerebrais, com diferentes neurotransmissores envolvidos, dependendo do perfil de sintomas do paciente, podendo provavelmente ser secundária a um evento primário (STAHL, 2010; HASLER, 2010).

Esta hipótese foi originada a partir de observações clínicas, onde foi visto que a imipramina e a iproniazida, dois compostos não relacionados estruturalmente e que não eram utilizados na terapêutica psiquiátrica, apresentavam potentes efeitos antidepressivos em humanos. Posteriormente, descobriu-se que essas substâncias aumentavam a transmissão central de monoaminas que incluem as catecolaminas (dopamina e noradrenalina) e a 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina). Outra evidência clínica foi o uso da reserpina, um antigo agente antihipertensivo que atua depletando os estoques de monoaminas e produz sintomas depressivos em humanos (NESTLER, 2008). Embora a hipótese das monoaminas, em sua forma simples, seja insuficiente como uma explicação da depressão, a manipulação farmacológica da transmissão monoaminérgica permanece como a melhor abordagem terapêutica de sucesso.

Estudos neurobiológicos também estão de acordo com a hipótese monoaminérgica e indicam que importantes alterações no sistema serotoninérgico e noradrenérgico estão relacionadas com o sucesso do tratamento, onde drogas que elevavam o nível dos neurotransmissores teriam ação antidepressiva (AGUIAR et al., 2011).

Esta hipótese é sustentada principalmente pelo fato de a maioria dos antidepressivos utilizados na clínica aumentarem os níveis de monoaminas no cérebro através da inibição da recaptação de 5-HT, NE ou DA e/ou ainda pela inibição da enzima monoamina oxidase, enzima que biotransforma as monoaminas (NEMEROFF, 2007). Desta maneira a concentração de monoaminas pode ser alterada através de uma perturbação na síntese, armazenamento ou liberação, ou estes podem manter-se inalterados, mas as atividades dos receptores e/ou mensageiros intracelulares podem estar alteradas.

Os neurotransmissores são moléculas pequenas que na sua maioria são derivados de precursores de proteína, eles são encontrados geralmente em vesículas pré-sinápticas

neuronal, são sintetizadas em pequenos núcleos no tronco cerebral e mesencéfalo e através de vias próprias projetam-se difusamente, principalmente pelo córtex, sistema límbico. Esses neurotransmissores são a noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e dopamina (DA), responsáveis por efeitos de modulação e integração sobre outras atividades corticais e subcorticais, estando envolvidos na regulação da atividade psicomotora, apetite, sono e humor (VASWANI, LINDA, RAMESH, 2003)

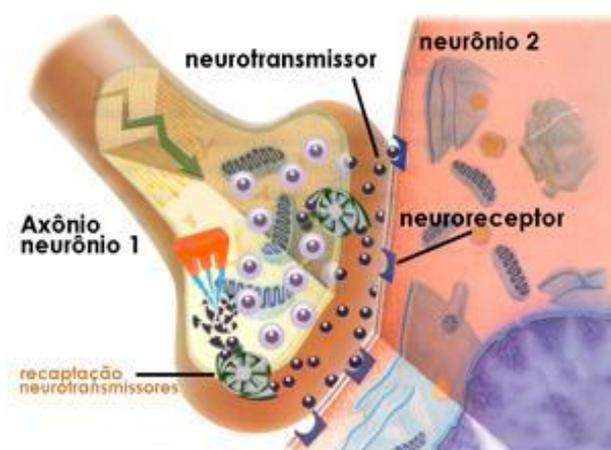


Fig. 1 - Situação normal: níveis normais de neurotransmissores e de neuroreceptores

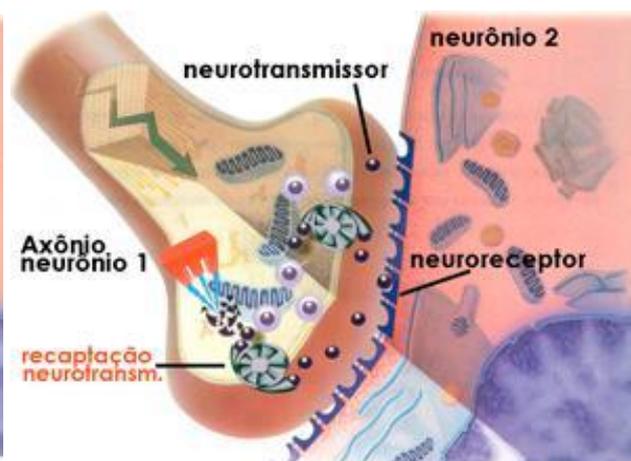


Fig.2 - Na Depressão existe um número aumentado de neuroreceptores e níveis baixos de neurotransmissores

Figura 1: Teoria monoaminérgica da depressão

Fonte: Adaptado de: <http://www.psiqweb.med.br/site/?area=NO/LerNoticia&idNoticia=57>.

Acesso em: 10 maio de 2014

São liberados na fenda sináptica e captados por terminais pós-sinápticos (por meio de receptores localizados na membrana pós-sináptica) quando a passagem do impulso nervoso de uma célula para a outra, o que chamamos de transmissão sináptica. De acordo com a propriedade funcional dos neurotransmissores e do terminal pós-sináptico, promovem resposta excitatória ou inibitória entre neurônios através das sinapses químicas (SILVA, 2006; ANDRADE e SILVA, 2008).

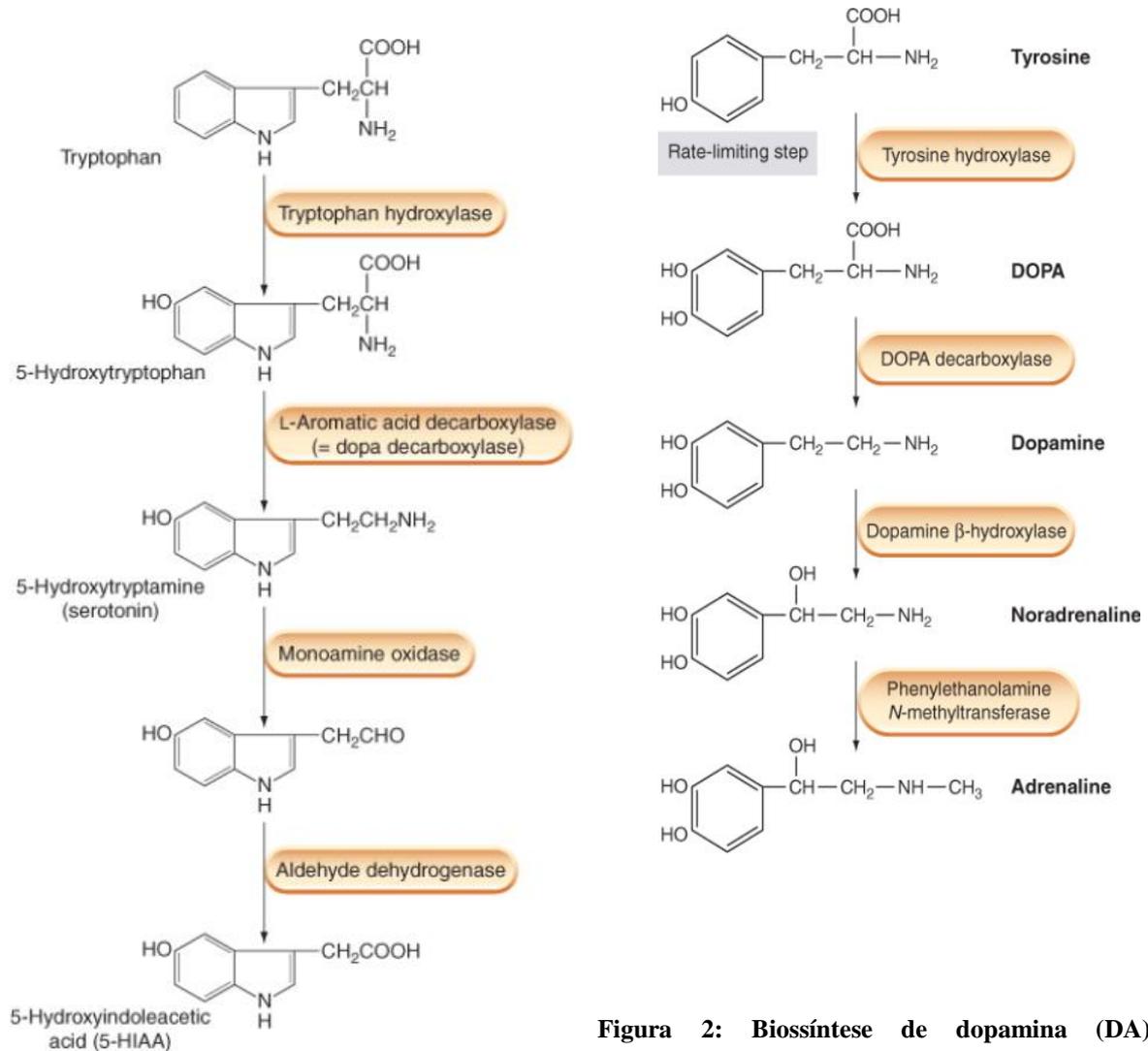


Figura 2: Biossíntese de dopamina (DA), noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) no SNC.

Fonte: RANG&DALE, 7ª Ed. p.195.2012.

1.2.1. Vias dopaminérgicas

A dopamina é uma catecolamina cuja síntese se inicia com a captação ativa do aminoácido L-tirosina no citoplasma do neurônio (Figura 2), posteriormente é transportada no interior de vesículas secretoras para armazenamento e liberação. O precursor para a síntese duas reações transformam a tirosina em dopamina: a primeira é catalisada pela enzima tirosina-hidroxilase (TH) a qual converte tirosina em L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (LIMA, 2005). A tirosinahidroxilase é considerada a enzima limitante desta via (FELDMAN

et al., 1997). O segundo passo é a descarboxilação da DOPA, catalisada pela enzima L-aminoácido descarboxilase (AADC), a qual produz dopamina (FELDMAN et al., 1997).

Os neurônios dopaminérgicos centrais originam-se, em sua maior parte, em áreas distintas do cérebro, e possuem projeções divergentes. A dopamina constitui em torno de 80% do conteúdo de catecolaminas no cérebro. Projeções originadas de áreas cerebrais que sintetizam este neurotransmissor se estendem para regiões do mesencéfalo formando quatro vias dopaminérgicas: (1) nigroestriatal; (2) mesolímbica; (3) mesocortical e (4) tuberoinfundibular (Figura 3). O estriado é assim designado pelo aspecto listrado dos tratos de fibras brancas que correm por ele; a substância negra é assim denominada pela pigmentação negra que resulta da decomposição da DA em melanina (PATEL,2010).

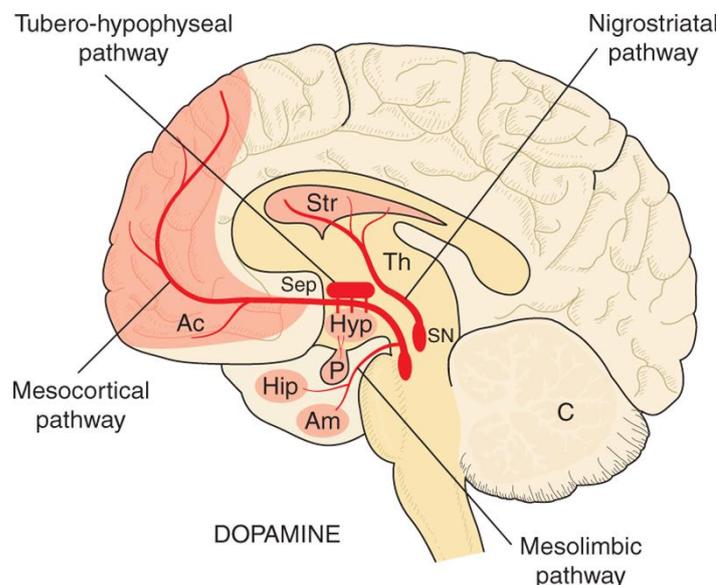


Figura 3: Vias dopaminérgicas no SNC.

Fonte: RANG&DALE,7ªEd.p.463.2012.

Os neurônios dopaminérgicos do sistema nigroestriatal estão envolvidos na estimulação do movimento intencional, sua degeneração resulta em doença de Parkinson (VENÂNCIO, 2008). Medialmente à substância negra, existe uma área de corpos celulares dopaminérgicos no mesencéfalo, denominada área tegmental ventral (ATV). A ATV possui projeções amplamente divergentes que inervam muitas áreas do prosencéfalo, mais notavelmente o córtex cerebral, o núcleo accumbens e outras estruturas límbicas. Esses sistemas desempenham um papel importante e complexo (que ainda está pouco elucidado) na

motivação, no pensamento orientado para metas, na regulação do afeto e no reforço positivo (recompensa). O comprometimento dessas vias pode estar envolvido no desenvolvimento da esquizofrenia e depressivos (SALGADO *et al.*, 2012).

Estudos têm demonstrado que a dopamina apresenta importante papel nos transtornos afetivos através da regulação do humor (DAILLY *et al.*, 2004; MILLAN, 2004). De fato, alguns estudos mostram que os metabólitos da dopamina estão reduzidos no fluido cerebrospinal e no plasma de pacientes deprimidos (MITANI *et al.*, 2006; SHER *et al.*, 2006) e a administração de agonistas dopaminérgicos melhora o humor em pacientes bipolar (JIMERSON, 1987).

1.2.2. Vias serotoninérgicas

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma indolamina cuja síntese se inicia pela captação ativa do aminoácido triptofano (Figura 2). Apresenta características hidrofílicas a serotonina não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), Sua síntese ocorre através da captação ativa do triptofano plasmático por carreadores de aminoácidos neutros na BHE, por esta razão a variação do triptofano plasmático influencia profundamente a produção de serotonina nos núcleos da rafe (BLUNDEL, 1992). Ao sofrer ação da enzima triptofano hidroxilase, é transformada em 5-hidroxitriptofano e quase imediatamente, transformada em 5-HT pela ação de uma descarboxilase de aminoácidos. A 5-HT é captada pelas vesículas sinápticas. Quando se dá o impulso nervoso é liberada por processo de exocitose. Pós-sinápticamente pode atuar em receptores chamados de 5-HT₁ (A, B, D ou E), 5-HT₂ (A, B ou C), 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅ (A ou B), 5-HT₆ ou 5-HT₇. Existem ainda receptores pré-sinápticos inibitórios do tipo 5-HT_{1A} nos corpos celulares e os tipos 5-HT_{1B} ou 5-HT_{1D} (dependendo da espécie), nos terminais nervosos dos neurônios serotoninérgicos. Todos esses receptores, à exceção do 5-HT₃, ligados a canais iônicos, estão relacionados a proteína G. O principal mecanismo de retirada da 5-HT da fenda sináptica é a recaptação pelo terminal nervoso. Sua degradação intraneuronal ocorre pela enzima monoaminoxidase (MAO), sendo um de seus principais metabólitos o ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) (GUIMARÃES, 2001; GOLAN *et al.*, 2009). É importante ressaltar que a serotonina (5-HT) possui também um papel regulador na divisão celular e um papel crítico no controle da proliferação das células adultas neurais, fato que explicaria sua eficácia na melhora dos sintomas depressivos

considerando o papel da neurogênese hipocampal na fisiopatologia da depressão (Santarelli et al. 2003; Paizanis et al. 2007)

A serotonina tem sido implicada na regulação de atividades que regem o comportamento (JACOBS & FORNAL, 1999; WOODS et al., 2012), apetite (TRIFUNOVIC & REILLY, 2006; BELLO & LIANG, 2011), ritmo circadiano (JIANG et al., 2000), sono/vigília (THASE, 2000) e fenômenos cognitivos como aprendizado e memória e processos autonômicos (McNAMARA & SKELTON, 1993), além da regulação do estresse e depressão (STARR et al., 2012)

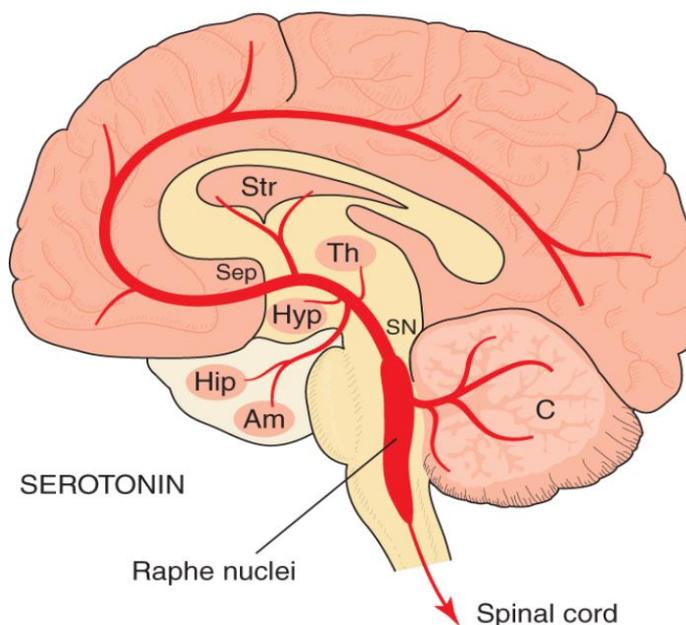


Figura 4: Vias serotonérgicas no SNC.
Fonte: RANG&DALE,7ªEd. p.467.2012.

1.2.3. Vias Noradrenergica

A noradrenalina é uma catecolamina cuja síntese se inicia com a captação ativa do aminoácido L-tirosina (Figura 2). Esse aminoácido é convertido, pela ação da enzima tirosina hidroxilase, primeiro em L-DOPA e posteriormente, pela ação da L-DOPA descarboxilase, em dopamina (DA). A dopamina é captada pelas vesículas sinápticas e sob a ação da dopamina beta-descarboxilase é transformada em noradrenalina (NA) (FELDMAN et al., 1997). Quando se dá o impulso nervoso a NA é liberada por processo de exocitose. Pós-

sinápticamente pode atuar em receptores chamados de alfa-1, alfa-2 e beta. Existem ainda receptores pré-sinápticos noradrenérgicos inibitórios de tipo alfa-2, que estão localizados tanto nos terminais como nos corpos celulares. Todos esses receptores são ligados a proteína G. O principal mecanismo de retirada da NA da fenda sináptica é a recaptação pelo terminal nervoso. Sua degradação intraneuronal ocorre pela enzima monoaminoxidase (MAO), sendo um de seus principais metabólitos o 3-metoxi-4-hidroxifeniletileno glicol (MHPG) (GUIMARÃES, 2001; GOLAN et al., 2009).

A manipulação do sistema noradrenérgico foi uma das primeiras ferramentas relevantes adaptadas para a compreensão dos eventos moleculares para a regulação do humor, desde a primeira observação empírica da administração da reserpina, apresentando efeitos depressivos (BAUMEISTER et al., 2003). Acredita-se que a noradrenalina modula o humor particularmente através da atividade dos receptores inibitórios α 2-pré-sinápticos. Uma vez ativados eles causam *downregulation* do tônus noradrenérgico no SNC causando depressão. A NA exerce efeitos inibitórios e excitatórios e essas ações distintas podem ser atribuídas a diferentes concentrações de NA liberadas levando a ativação de diferentes subtipos de receptores adrenérgicos específicos nos circuitos-alvo (SALGADO et al., 2012).

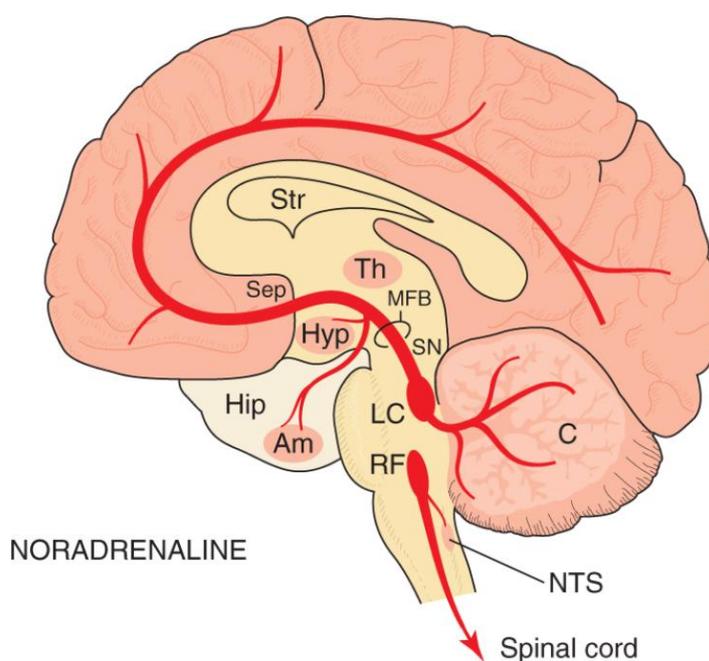


Figura 5: Vias Noradrenérgicas no SNC.
Fonte: RANG&DALE,7ªEd. p.462.2012.

1.3. TERAPÊUTICA FARMACOLÓGICA DOS TRANSTORNOS DEPRESSIVOS

A descoberta no final da década de 50 de drogas antidepressivas e sua utilização na prática clínica trouxeram um avanço importante no tratamento e no entendimento de possíveis mecanismos subjacentes aos transtornos depressivos. Os primeiros antidepressivos desenvolvidos – os antidepressivos tricíclicos (ADT) e os inibidores da monoaminoxidase (IMAOs) – foram descobertos a partir de observações clínicas. Os ADT apresentavam boa eficácia devido à sua ação, aumentando a disponibilidade de monoaminas nas fendas sinápticas. Seu uso foi limitado em função do bloqueio de receptores de histamina, colinérgicos, alfa1-adrenérgicos e dos canais de sódio no coração e no cérebro, que acarretavam efeitos colaterais levando à baixa tolerabilidade e risco de toxicidade (SALGADO *et al.*, 2012).

Da mesma forma, o uso dos IMAOs ficava comprometido em função do risco da interação com tiramina e o risco de crises hipertensivas potencialmente fatais. Nas últimas duas décadas, surgiram novas classes de antidepressivos a partir da pesquisa de moléculas desprovidas dos efeitos colaterais dos heterocíclicos (AGUIAR, 2011).

Sendo a depressão uma doença multifatorial e complexa, seu tratamento deve, igualmente, abranger todos os aspectos que contribuem para seu aparecimento (biológicos, psicológicos e sociais). O tratamento mais comum é a combinação de psicoterapia e medicamentos antidepressivos (COSTA, 2010).

A principal linha para a origem da depressão se baseia na teoria monoaminérgica, descrita como uma deficiência na neurotransmissão das aminas biogênicas em certos locais no cérebro. Assim, drogas que facilitam a ação de monoaminas, na fenda sináptica, são utilizadas como medicamentos antidepressivos. O aumento da atividade monoaminérgica pode ocorrer de várias vias, incluindo diminuição na recaptção do neurotransmissor por bloqueio da proteína transportadora, diminuição do metabolismo por inibição de enzimas de degradação e aumentando a liberação do neurotransmissor por bloqueio de auto-receptores inibitórios (NASH & NUTT, 2007).

São três as principais classes de antidepressivos. A primeira compreende os antidepressivos de primeira geração, os antidepressivos tricíclicos (ADTs) e os inibidores da monoaminoxidase (IMAOs). (Figura 6). Na classe dos antidepressivos de segunda geração encontram-se os inibidores seletivos da receptação da serotonina (ISRS). E a terceira classe de outros antidepressivos são medicamentos com mecanismos de ação únicos tais como a Trazodona, a Brupopiona e a Reboxetina. (ACCATTINI, 2007). Apesar de possuírem

mecanismos de ação diferentes, todos possuem diversos efeitos colaterais, tais como: insônia, cefaléia, aumento de peso, fadiga, disfunção sexual, tremores, náuseas, vômitos, diarreia, diminuição do apetite, boca seca, insônia, taquicardia e tonturas (COSTA 2010).

A nova geração de antidepressivos é composta por medicamentos que aumentam a concentração de um único neurotransmissor, como os inibidores seletivos de recaptação de serotonina – ISRS – ou de noradrenalina; ou que interferem em múltiplos neurotransmissores/receptores, como venlafaxina, bupropiona, trazodona, nefazodona e mirtazapina, sem ter como alvo outros sítios receptores cerebrais não relacionados com a depressão, tais como a histamina e a acetilcolina (LIMA,2012).

Atualmente as terapias antidepressivas disponíveis nem sempre recuperam totalmente os pacientes devido aos sintomas residuais da depressão que podem muitas vezes manter um considerável prejuízo funcional, ressaltando a necessidade e a importância de novos antidepressivos (LIEBERMAN,2008).

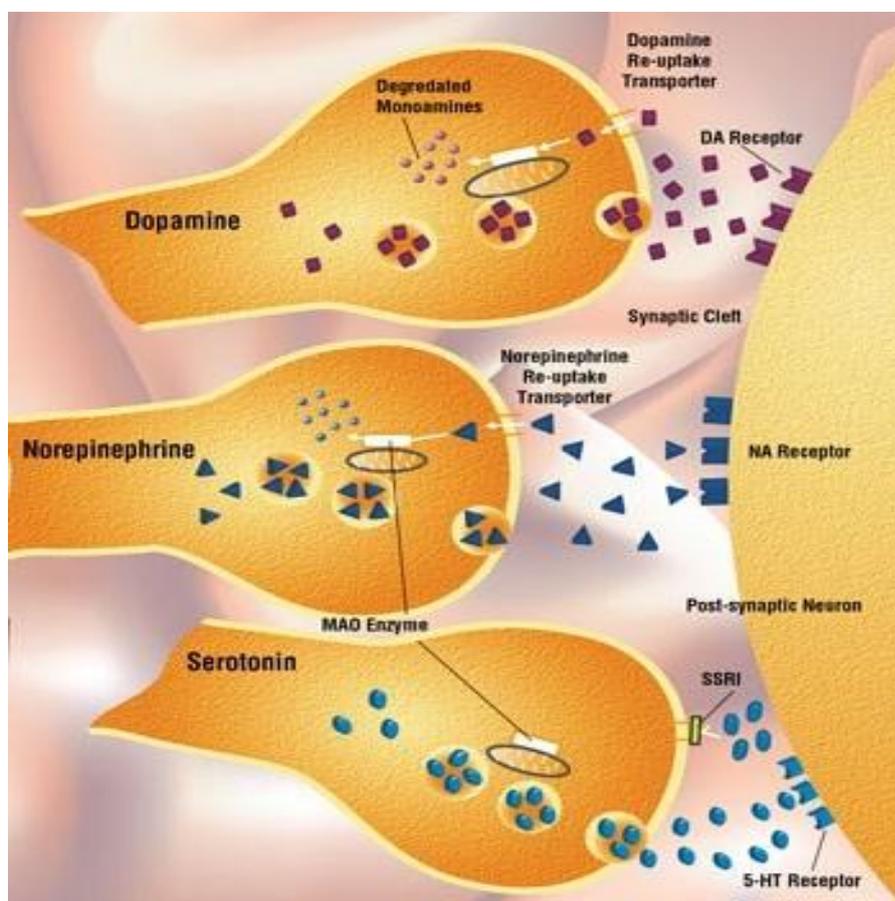


Figura 6: Mecanismos gerais dos antidepressivos. **Fonte:** Adaptado de: <http://www.psicofarmacos.info/?header=fisiologia>. Acesso em: 16 outubro de 2014.

Apesar dos contínuos avanços na compreensão dos efeitos celulares e bioquímicos produzidos por fármacos de ação central, o abismo entre a descrição da ação dos fármacos neste nível e a descrição em nível funcional e comportamental necessita de contínuos estudos (DUMAN, 2004).

1.3.1. Antidepressivos Tricíclicos

Os antidepressivos tricíclicos constituem a classe mais antiga de fármacos utilizados no tratamento da depressão. Apresentam sua estrutura química caracterizada por três anéis, sendo dois anéis aromáticos fixados a um anel de cicloheptano. Apresentam a capacidade de modular a neurotransmissão de outros neurotransmissores (histamina, acetilcolina e adrenalina) além da serotonina, noradrenalina e dopamina, sendo essa falta de especificidade dos ADT é responsável pela vasta gama de efeitos adversos decorrentes do uso desses medicamentos (PATEL et al, 2011).

Alguns fármacos mais conhecidos dessa classe são a amitriptilina, clomipramina, desipramina, imipramina, nortriptilina e a doxepina (SANCHEZ & HYTTEL, 1999; WING & SHOAI, 2007).

O mecanismo de ação desta classe consiste em inibir a recaptação de serotonina (5-HT) e noradrenalina da fenda sináptica através do bloqueio dos transportadores de recaptação da 5HT e da noradrenalina. Entretanto, alguns possuem predominância da atividade noradrenérgica (como desipramina, nortriptilina e maprotilina) e outros da serotoninérgica (como amitriptilina, clomipramina e imipramina) (SIMÕES,2011). A atividade pós-sináptica varia de acordo com o sistema neurotransmissor envolvido e geralmente é responsável pelos efeitos colaterais. A permanência prolongada do neurotransmissor na fenda sináptica gera uma ativação elevada dos receptores, os inibidores da recaptação intensificam as respostas pós-sinápticas. Embora as afinidades pelos transportadores de 5-HT e de noradrenalina sejam vastamente variáveis, os antidepressivos tricíclicos são bastante similares na eficácia clínica (NADAL-VICENS et al., 2009).

Os ADTs bloqueiam receptores muscarínicos (colinérgicos), histaminérgicos de tipo 1, α_2 e β -adrenérgicos, serotoninérgicos diversos e mais raramente dopaminérgicos. Essas ações não se correlacionam necessariamente com efeito antidepressivo, mas com efeitos colaterais (HIRSCH,2012).

Os efeitos anticolinérgicos são os mais frequentes, englobando constipação, xerostomia (boca seca), visão turva, sedação e retenção urinária. Também podem causar ganho

de peso (devido aos efeitos anti-histamínicos), arritmias (devido ao prolongamento do intervalo QT), hipotensão ortostática (devido ao bloqueio dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos), redução do limiar convulsivo e alterações cognitivas, efeitos mais sérios e potencialmente prejudiciais em idosos, população mais frágil e que muitas vezes apresenta comorbidades (ROGÓZ et al. 2005). Destaca-se que em muitos casos pode ocorrer ainda disfunção sexual, devido aos efeitos noradrenérgicos e serotoninérgicos (SAIZ, 2005; COHEN 1997).

A analgesia pode ser mediada por mudanças na concentração central de monoaminas, particularmente serotonina, além do efeito direto ou indireto dos ADTs nos sistemas opióides endógenos. Na bulimia nervosa parece haver efeito independente da melhora da depressão (DUNLOP *et al*, 2007).

O mecanismo de ação envolvido na incontinência urinária pode incluir atividade anticolinérgica, resultando no aumento da capacidade vesical, estimulação direta beta-adrenérgica e atividade agonista alfa-adrenérgica, resultando em aumento do tônus esfinteriano e também por bloqueio central de recaptção (GERON, 2014). Outras ações dos ADTs incluem efeito anticolinérgico periférico e central devido à potente e elevada afinidade de ligação por receptores muscarínicos; efeito sedativo pela forte afinidade de ligação por receptores histamina H1 e hipotensão ortostática devida a bloqueio alfaadrenérgico. Além disto, os ADTs são agentes antiarrítmicos da classe IA que, como a quinidina, em doses terapêuticas diminuem moderadamente a condução intraventricular e em doses elevadas podem causar bloqueio grave de condução e arritmias ventriculares. Destaca-se que em muitos casos pode ocorrer ainda disfunção sexual, devido aos efeitos noradrenérgicos e serotoninérgico (WANNMACHER, 2011).

1.3.2. Inibidores da MAO

Ainda pouco estudado, mecanismo de ação dos IMAO está ligado diretamente a atividade da enzima monoaminoxidase (MAO) está inibida. Os subtipos da MAO A e B, estão envolvidos no metabolismo de serotonina, noradrenalina e dopamina. Os IMAO são classificados com base na sua especificidade para as isoenzimas MAO-A e MAO-B e de acordo com a reversibilidade ou irreversibilidade de sua ligação (PATEL et al, 2011).

Os IMAO mais antigos não são seletivos, e a maioria deles, como a iproniazida, a fenelzina e a isocarboxazida, consiste em inibidores irreversíveis. Os IMAO mais recentes, como a moclobemida, a befloxatona e a brofaromina, são seletivos para a MAO-A e ligam-se de modo reversível, razão pela qual são denominados inibidores reversíveis da monoamina

oxidase A (IRMA). A selegilina, um inibidor da MAO-B, também inibe a MAO-A em doses mais altas. Os IMAO bloqueiam a desaminação das monoaminas através de sua ligação à flavina funcional da MAO inibindo-a. Ao inibir a degradação das monoaminas, os IMAO aumentam a 5HT e a NE disponíveis no citoplasma dos neurônios pré-sinápticos (HIRSCH,2012).

O aumento dos níveis citoplasmáticos dessas monoaminas leva não apenas a um aumento na captação e no armazenamento da 5HT e da NE nas vesículas sinápticas, como também a algum extravasamento constitutivo das monoaminas na fenda sináptica. A redução na atividade da MAO resulta em aumento na concentração desses neurotransmissores nos locais de armazenamento no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso simpático. O incremento na disponibilidade de um ou mais neurotransmissores tem sido relacionado à ação antidepressiva dos IMAOs. A inibição não seletiva dos IMAOs fenelzina, isocarboxazida e tranilcipromina resulta em subsensibilização de receptores α_2 - ou β -adrenérgicos e de serotonina (AGUIAR,2011).

Possivelmente as mudanças nas características dos receptores produzidas pela administração crônica de IMAOs se correlacionam melhor com a atividade antidepressiva do que o aumento na atividade do neurônio secundária ao aumento na concentração de neurotransmissores, e pode explicar a demora para início da ação terapêutica. Mais recentemente foram desenvolvidos IMAOs seletivos da MAO-A e da MAO-B, além de compostos reversíveis, que contornam o problema das crises hipertensivas. A moclobemida é um antidepressivo inibidor seletivo da MAO-A e reversível, que desamina 5-HT e NA, ao passo que inibidores seletivos da MAO-B, como a selegilina, não possuem ação antidepressiva significativa (SALGADO *et al.*, 2012).

O principal efeito adverso do consumo dessas drogas está relacionado toxicidade sistêmica da tiramina. Pacientes que usam IMAO devem adotar uma dieta pobre em tiramina (aminoácido precursor das catecolaminas) a fim de evitar o desenvolvimento de uma crise hipertensiva severa. Como a MAO gastrointestinal e hepática metaboliza a tiramina, o consumo de alimentos que contêm tiramina, como carnes processadas, queijos envelhecidos e vinho tinto, pode levar a níveis circulantes excessivos de tiramina (PATEL et al, 2011).

A tiramina é um simpaticomimético indireto, que tem a capacidade de estimular a liberação de grandes quantidades de catecolaminas armazenadas através de reversão dos transportadores da recaptação. Essa liberação descontrolada de catecolaminas pode induzir

uma crise hipertensiva, caracterizada por cefaléia, taquicardia, náusea, arritmias cardíacas e acidente vascular cerebral (FARAHANI,2015).

Os IMAO mais antigos não são mais considerados como terapia de primeira linha para a depressão, devido ao potencial de toxicidade sistêmica da tiramina; podem ser prescritos apenas para pacientes capazes de comprometer-se a seguir uma dieta desprovida de tiramina. Os IMAO mais recentes (isto é, os IRMA, que se ligam de modo reversível à MAO) são deslocados por concentrações elevadas de tiramina, resultando em metabolismo significativamente maior da tiramina e, conseqüentemente, menor toxicidade da tiramina.

Recentemente, a selegilina (considerada um inibidor da MAO-B, mas também com capacidade de inibir a MAO-A cerebral) foi aprovada na forma de disco transdérmico, transpondo, assim, o sistema GI. A selegilina transdérmica pode exercer uma inibição máxima sobre a MAO-A cerebral em doses que reduzem a MAO-A gastrintestinal em apenas 30 a 40%, diminuindo, assim, o risco de crise hipertensiva induzida por tiramina e permitindo ao paciente ter maior liberdade na sua dieta (SAIZ,2005).

1.3.3. Antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs)

Os Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS) estão entre os agentes antidepressivos mais prescritos, na atualidade. Foram desenvolvidos a partir dos ADTs, e classificados devido a sua baixa afinidade conhecida por receptores adrenérgicos, colinérgicos e histaminérgicos e maior afinidade pelo bloqueio das proteínas de recaptação da serotonina (ROSS, 2006)

Introduzidos na clínica no final da década de 80 (KENT, 2000), os ISRS agem bloqueando a ação do transportador de serotonina. Dessa forma eles impedem a recaptação do neurotransmissor, o que prolonga a sua exposição ao receptor, (VÁZQUEZ-PALACIOS, 2004) e aumentando a atividade do sistema monoaminérgico no cérebro (TSAI et al., 2009). Dentre os antidepressivos dessa classe a fluoxetina é o mais prescrito (DUNLOP & DAVIS, 2008). Outros ISRS incluem o citalopram, a fluvoxamina, a paroxetina, a sertralina e o escitalopram. Embora a eficiência dos ISRS seja semelhante à dos ATC no tratamento da depressão, tornaram-se os agentes de primeira linha para o tratamento da depressão, bem como para a ansiedade e o transtorno obsessivo-compulsivo, devido à sua maior seletividade e perfil reduzido de efeitos adversos (SOARES, 1999).

Os ISRS também são utilizados no tratamento das síndromes do pânico, transtorno obsessivo-compulsivo e transtorno de estresse pós-traumático. Inibem de forma potente e seletiva a recaptação de serotonina, resultando em potencialização da neurotransmissão serotoninérgica. (DAGTEKIN et al. 2010) A potência da inibição de recaptação da serotonina é variada, assim como a seletividade por noradrenalina e dopamina. Sertralina e paroxetina são os mais potentes inibidores de recaptação. A potência relativa da sertralina em inibir a recaptação de dopamina a diferencia farmacologicamente dos outros ISRSs (DIAZ & MAROTEAUX, 2011).

A afinidade por neuroreceptores, tais como sigmal, muscarínicos e 5-HT_{2c}, também difere muito. Mais ainda, a inibição da sintetase óxido-nítrica pela paroxetina e possivelmente por outros ISRSs, pode ter efeitos farmacodinâmicos significativos. Citalopram e fluoxetina são misturas racêmicas de diferentes formas quiral que possuem perfis farmacodinâmico e farmacocinético variados. Fluoxetina possui metabólito de ação prolongada e farmacologicamente ativo (DUNLOP & DAVIS, 2008; DENIZOT et al., 2009).

Os ISRSs também possuem perfis farmacocinéticos variados, que incluem meia vida, farmacocinética linear versus não linear, efeito da idade na sua depuração e no seu potencial de inibir isoenzimas metabolizadoras de medicamentos do citocromo P450 (CYP). Estas diferenças farmacológicas e farmacocinéticas sustentam as diferenças clínicas cada vez mais importantes dos ISRSs (SAÚDE, 2012).

1.3.4. Inibidor seletivo de recaptura de 5-HT/NE (ISRSN)

Uma classe mais recente de fármacos, os inibidores da recaptação de serotonina norepinefrina, que atualmente inclui a venlafaxina e a duloxetina, tem mostraparticularmente do boa efetividade. A venlafaxina bloqueia o transportador de recaptação de 5HT e o transportador de recaptação de NE através de um mecanismo que depende de sua concentração. Possui o metabólito ativo O-desmetilvenlafaxina (ODV), são inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSNs), e apresentam fraca atividade como inibidores da recaptação de dopamina, clinicamente significativo apenas com doses elevadas (SAYAR et al, 2003).

A venlafaxina e seu metabólito ODV apresentam menos efeitos adversos por não apresentam afinidade por receptores adrenérgicos alfa-1, receptores colinérgicos, receptores muscarínicos ou histamínicos e também não inibem a monoamino-oxidase. Fazem parte desse grupo de antidepressivos, os cloridratos de venlafaxina, nefazodona, duloxetina e

milnaciprana . A potência da inibição de recaptura de serotonina é superior à de recaptura de noradrenalina, ocorrendo em doses inferiores. Alteram a sensibilidade de receptores beta-adrenérgicos após dose única, diferente de outros antidepressivos que levam à dessensibilização desses receptores após doses repetidas (LEE; CHEN, 2010).

A duloxetine inibe a recaptura de 5-HT e de NA, com atividade equilibrada entre as duas monoaminas. É extensivamente metabolizada pelo fígado, e por isso não está indicada para hepatopatas. Inibe moderadamente a CYP 2D6, portanto, a coadministração de fármacos metabolizados por essa CYP deve ser feita com cautela. Os efeitos adversos mais comuns são os anticolinérgicos, tais como: náusea, constipação e xerostomia. Entretanto, podem ocorrer ainda: prurido, diarreia, vômito, disfunção sexual e alterações do sono.

Os antidepressivos tetracíclicos são uma nova classe de drogas utilizadas no tratamento da depressão, também chamados de atípicos, introduzidos depois da década de 80 (KENT, 2000). Dentre estes, o antidepressivo atípico mirtazapina atua especificamente sobre as transmissões noradrenérgica e serotoninérgica (*noradrenergic and serotonergic specific antidepressants*, NaSSA, em inglês) e é usado para tratar transtornos de humor e ansiedade (GAMBI et al., 2005; RAUGGI et al., 2005). A mirtazapina aumenta as transmissões noradrenérgica e serotoninérgica central através da inibição dos autoreceptores α_2 e heteroreceptores noradrenérgicos α_2 em sinapses serotoninérgicas (BENGTSSON et al., 2000; GAMBI et al., 2005). Além disso, é um agonista do receptor 5-HT_{1A} (Rogóz et al. 2005) e também age bloqueando receptores, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} e 5-HT₃ e histaminérgicos H₁ (HADDJERI, 1998; DAVIS & WILDE, 1996; ARNONE, 2009; DE BOER, 1995; RAUGGI et al. 2005). A mirtazapina não possui efeitos na recaptura de monoaminas, além de apresentar baixa afinidade para receptores dopaminérgicos, bloqueia seletivamente os receptores 2-adrenérgicos e muda a transmissão da noradrenérgico como também serotoninérgico (VALLADA et. al., 2004). Esse tem sido um bom tratamento para transtorno do pânico, bulimia, e TOC, e em segundo plano ele também pode agir em algumas síndromes de dor (BALLONE, 2004).

A bupropiona parece atuar de modo mecânico, como as anfetaminas, e mostra-se particularmente útil no tratamento da depressão atípica, visto que aumenta os níveis de serotonina e de dopamina no cérebro, sendo o antidepressivo com menores efeitos adversos sexuais (ROGÓZ et al., 2005). Apresenta efeitos noradrenérgicos e dopaminérgicos, sendo fraco inibidor da recaptura de DA (HIRSCH,2012). Elevadas doses não são recomendadas,

uma vez que há risco de convulsão, pelo fato de poderem reduzir o limiar convulsivo. Os principais efeitos adversos são cefaleia, insônia, ansiedade, irritabilidade, distúrbios visuais, xerostomia, constipação, náusea e perda moderada de apetite. Diferentemente dos ISRS, a bupropiona não causa disfunção sexual, estando indicada para esses casos (STOPPE, 2006).

De modo global, os antidepressivos atípicos apresentam relativamente poucos efeitos adversos e exibem eficácia clínica semelhante, a despeito de seus mecanismos de ação e alvos moleculares amplamente heterogêneos (PATEL,2010).

Apesar das extensas pesquisas, ainda não dispomos de uma explicação completa do funcionamento dos antidepressivos e nem de um tratamento definitivo para a depressão. Embora sejam muito eficazes, os antidepressivos atuais ainda apresentam efeitos colaterais indesejáveis o que justifica a necessidade de avanços nas pesquisas para o desenvolvimento de novos antidepressivos com início de ação mais rápida e uma redução na incidência dos efeitos colaterais (SILVA,2012)

1.4. PLANTAS MEDICINAIS E DEPRESSÃO

Embora vários antidepressivos estejam disponíveis há décadas, a maioria deles não é completamente eficaz, pois estima-se que 33% dos pacientes depressivos não sejam sensíveis à medicação antidepressiva (Trivedi et al., 2006), além destes medicamentos estarem associados a muitos efeitos adversos (ex: alteração do sono e apetite, alterações gastrintestinais (diarréia ou obstipação intestinal), retenção urinária, alergias de pele, sudorese, diminuição da libido ou retardo da ejaculação, aumento ou diminuição de peso, náusea, tontura, tremores). Com isso, pesquisas recentes concentram-se na possibilidade do uso de produtos naturais, especialmente flavonóides, para o desenvolvimento de medicamentos antidepressivos, ou como uma alternativa complementar para o tratamento da depressão (BORGES FILHO et al., 2013; LIU et al., 2014; MAO et al., 2014).

O interesse por substâncias antidepressivas provenientes de plantas com potencial terapêutico aumentou consideravelmente após os estudos com o *Hypericum perforatum*, cujo fitoterápico tem sido empregado em todo o mundo no tratamento da depressão endógena. *Hypericum perforatum* é uma planta perene herbácea, também conhecida como “Erva de São João”, a qual é rica em flavonóides e glicosídeos (PAULKE et al., 2006). Estudos clínicos e experimentais demonstraram que o medicamento exhibe propriedades análogas aos

antidepressivos convencionais, isto é, o bloqueio não seletivo da recaptação das monoaminas (RODRÍGUEZ-LANDA et al., 2003).

Novas espécies como o *Hypericum catarinense* L. e *Hypericum glandulosum*, estão sendo estudadas para o tratamento de depressões leves a moderadas (SÁNCHEZ-MATEO et al., 2007). Outras espécies de plantas encontradas em nossa flora também exibem propriedade antidepressiva. A *Cecropia glaziovii* (Cecropiaceae), popularmente conhecida como Embaúba e encontrada facilmente na costa de sudeste brasileira, contém como fitoconstituintes catequinas, procianidinas e flavonóides, compostos estes possivelmente responsáveis pelo efeito tipo antidepressivo da planta (TANAE et al., 2007).

Estudos realizados por Silva et al. (2006), demonstraram através do modelo de nado forçado a ação antidepressiva da espécie *Hippeastrum vittatum* (Amarillidaceae), uma planta ornamental popularmente conhecida por “Açucena”. Espécies do gênero de *Hippeastrum* são ricas em alcalóides, sugerindo que a ação antidepressiva observada no modelo pode ser relacionada a esses fitoconstituintes. Herrera-Ruiz et al. (2006), constataram que o extrato metanólico de *Galphimia glauca*, planta utilizada pela população do México, exibe ação antidepressiva, cujo efeito é atribuído ao composto isolado norsesotriterpeno, chamado de Galfinina-B.

Kielmeyera coriacea (Guttiferae) popularmente conhecida como “pau-santo”, é uma planta medicinal usada pela população brasileira no tratamento de várias doenças tropicais como a malária, leishmaniose e infecções fúngicas e bacterianas. Essa planta também é empregada na medicina popular como um fármaco antidepressivo. Sua ação se deve possivelmente em função das xantonas as quais constituem os compostos majoritários presentes no vegetal (FIGUEIREDO, 2014).

No Nordeste, o uso de plantas medicinais e preparações caseiras assumem importância fundamental no tratamento das patologias de ordem psicológica e física (MATOS, 2002). Esta postura é assumida em consequência da grande influência da transmissão oral dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora e, em muitos casos, devido à deficiência de acesso a assistência médica.

Na região do cariri localiza-se a Floresta Nacional do Araripe, representada na figura 1, com expressivo potencial ecológico. A Chapada do Araripe é definida por cotas de altitude entre as divisas dos estados do Ceará (500 m), Pernambuco (640 m) e Piauí (480 m), compreendidas entre latitudes delimitadas por cartas da Sudene (7°S e 8°S). Nela encontram-se diversas espécies da flora nativa que originam produtos de uso popular e científico, tais

como fibras, borrachas, gomas não elásticas, ceras, tanantes, oleaginosas, produtos alimentícios e aromáticos. A pesquisa acerca destes recursos vegetais, ainda em desenvolvimento, pode levar a identificação de metabólitos secundários valiosos que eventualmente serviram como drogas ou poderão conduzir ao desenvolvimento de novas terapêuticas para as mais diversas patologias, inclusive de ordem psicológica.

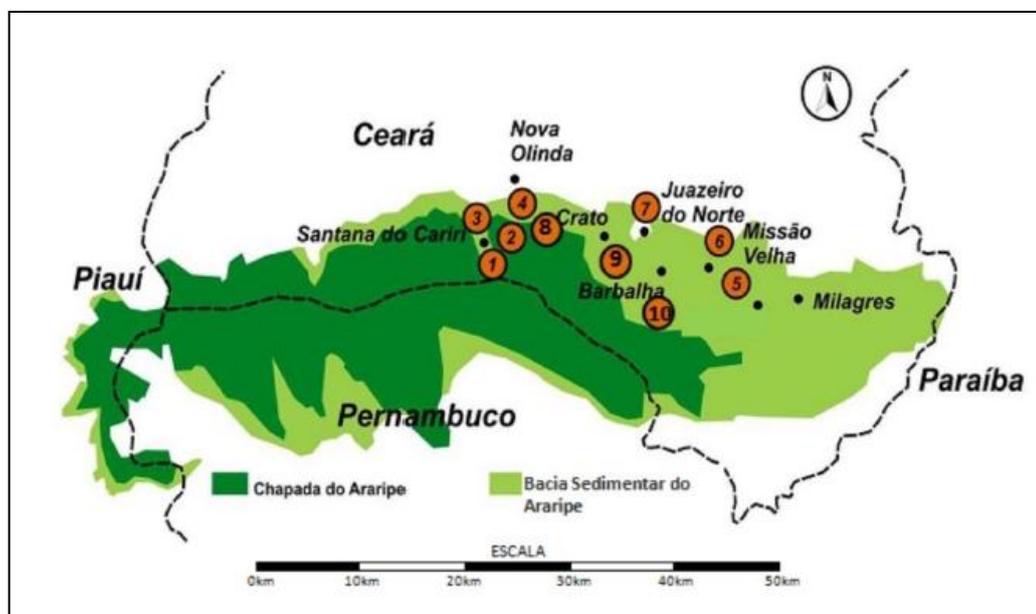


Figura 7: Floresta Nacional do Araripe - Chapada do Araripe

Fonte: Adaptado de: <http://ppegeo.igc.usp.br/>. Acesso em 20 de maio de 2014.

Comunidades tradicionais da Chapada do Araripe referem fazer uso medicinal da graviola nas suas diversas formas, o que corrobora com estudos etnobotânicos de Lorenzi & Matos (2002), que descrevem estudos sobre o uso de suas folhas, frutos e raízes de *Annona muricata* L., sob a forma de chá, devido às propriedades antiespasmódica, antidisentérica, hipoglicemiante, antidepressiva e tranqüilizante. Estes dados corroboram com alguns estudos que comprovam algumas destas atividades biológicas (BORIES et al.,1991; CORRÊA,1978; HASRAT,1997; MARTINS,1989; VASQUEZ, 1990).

1.4.1. Família Annonaceae:

A família Annonaceae, descrita por Antoine Laurent de Jussieu, apresenta uma combinação de caracteres marcantes, é uma das mais uniformes tanto do ponto de vista anatômico como estrutural. É constituída por aproximadamente 135 gêneros e 2500 espécies distribuídas principalmente pelas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, ocorrendo como árvores aromáticas, arvoretas ou lianas. Sobre a distribuição da família Annonaceae no mundo (Figura 8), 50 gêneros são encontrados na Ásia e Austrália e 34 gêneros ocorrem na África e América do Sul (CHATROU et al. 2012).

Todas as subfamílias da atual classificação estão representadas no Brasil, onde ocorrem 386 espécies, distribuídas em 29 gêneros (MAAS et al., 2013). A Amazônia abriga três quartos da diversidade de Annonaceae, com 27 gêneros e 280 espécies, e a Mata Atlântica, a maior parte restante: 15 gêneros e 91 espécies (MAAS et al., 2013). No Brasil as espécies mais cultivadas são: *Annona muricata*, *Annona cherimola*, *Annona careace*, *Annona reticulata*, *Annona tenuiflora* e *Annona squamosa* (SANTOS et al., 2008).

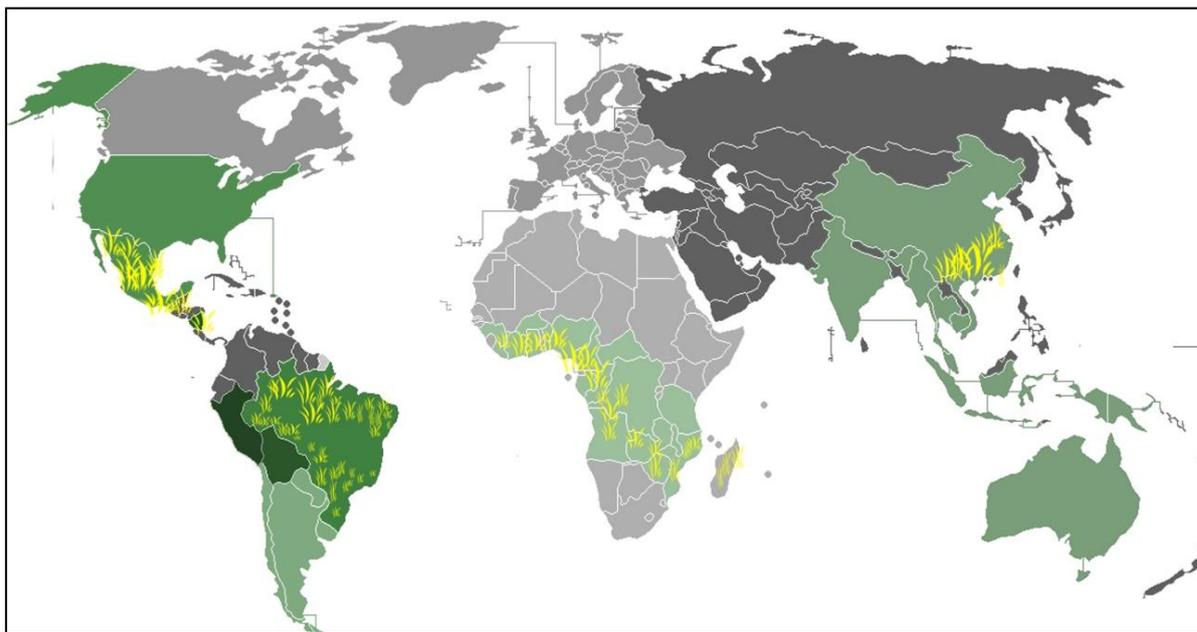


Figura 8: Mapa de distribuição geográfica da família Annonaceae

Fonte: Adaptado de: (Adaptado de: <http://www.tropicos.org/Name/42000007?tab=maps>
Acesso em: 14 novembro de 2014). Legenda: Áreas de distribuição geográfica da família Annonaceae, representado em amarelo.

Embora os estudos com espécies da família Annonaceae tenha se iniciado há muito tempo, o conhecimento sobre química e, em menor quantidade, sobre atividade farmacológica começaram a tomar destaque somente na última década, principalmente no que diz respeito ao isolamento de alcaloides (LÚCIO et al., 2014).

Várias espécies da família Annonaceae podem ser consideradas promissoras por apresentar atividade no SNC. O fruto e as folhas de *Annona muricata* são utilizados na medicina popular por apresentarem propriedades tranquilizantes e sedativas (LOPÉZ-RUBALCAVA et al., 2006). O constituinte majoritário da espécie *Annona diversifolia*, a palmitona, apresenta efeito ansiolítico, de forma diferente do que acontece com os benzodiazepínicos, já que sua ação não interfere na coordenação motora dos animais (SOUSA et al., 2008). O extrato hexânico das folhas de *Annona cherimolia* também apresenta efeito ansiolítico nos testes comportamentais de esconder esferas e de evasão exploratória (SOUSA et al., 2008), decorrente da interação com o sistema GABAérgico. Curiosamente, o extrato bruto de *Annona muricata* e *Annona montana* mostrou atividade em receptores 5-HT_{1A} (LÓPEZ-RUBALCAVA et al., 2006). *Annona senegalensis* apresentou propriedades anticonvulsivante, depressora e ansiolítica (OKOLI et al., 2010).

Vários estudos têm demonstrado grande quantidade de compostos de natureza química diversificada nas mais variadas partes da planta (ASANTE, 2014). Annonaceae é muito rica na biodiversidade de substâncias químicas como: substâncias aromáticas, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, substâncias benzênicas, catequinas, proantocianidina, óleos essenciais, terpenos, esteroides, alcaloides, acetogeninas, carboidratos, lipídios, proteínas, lactonas, vitaminas, carotenos, saponinas, entre outros (REIS, 2011; LIMA, 2007; LUNA, 2006). Os principais grupos de compostos químicos presentes em extratos preparados de cascas (CHEN et al., 2000), folhas e frutos (CHANG et al., 1998) são os alcalóides, as acetogeninas e os diterpenos (CHEN et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2002). Luna (2006), referencia o isolamento de compostos de diversas classes, tais como: alcalóides, terpenóides, carboidratos, polifenóis, lipídeos e ácidos aminados. Outros estudos sobre fitoquímica e atividade biológica das anonáceas apontam a presença das acetogeninas, que são uma classe de compostos com ampla atividade biológica (MATSUMOTO et al., 2010), tais como citotóxica, imunossupressora, pesticida, antiparasitária e antimicrobiana (LIMA et al., 2010). Algumas atividades biológicas de anonáceas são atribuídas, também, aos compostos presentes nos óleos essenciais, cuja composição é predominantemente de monoterpenos e sesquiterpenos (SILVA et al., 2009; TOSCAN, 2010). Outros metabólitos secundários, como os compostos fenólicos,

têm sido responsabilizados por algumas atividades, tais como antioxidante, antibacteriana, antiviral, expectorante, colerética e analgésica (SIMÕES et al., 2010).

1.5 *Annona muricata* L. (graviola)

A espécie *Annona muricata* L. pertence a família Annonaceae e ao gênero *Annona*. E também conhecida como graviola, guanabara, araticum, coração-de-rainha, frutado-conde, jaca-do-para, pinha, entre outros. Os frutos são do tipo baga com polpa mucilaginosa e levemente ácida. Originária da América tropical, principalmente das Antilhas e da América Central, e muito cultivada nos países de clima tropical, principalmente no Brasil (VIEIRA, 2010; CORREA, 1984).

Esta espécie foi introduzida no Brasil por Diogo Luís de Oliveira, Conde de Miranda (ARAÚJO et al., 2004). É também conhecida como graviola, guanabara, araticum, coração-de-rainha, fruta-do-conde, jaca-do-pará, pinha, coração-de-boi, condessa, jaca-de-pobre, araticum-manso entre outros. Sua árvore mede até 8 metros de altura, dotada de copa piramidal, com folhas obovado-oblongas, brilhantes, medindo 8-15 cm de comprimento (BRANDÃO, 2003).

Trata-se de uma fruta com riquíssima composição nutricional, e que apresenta inúmeras propriedades terapêuticas, podendo ser utilizada em sua totalidade. Dela aproveitam-se as folhas, as flores, os brotos, os frutos verdes ou maduros. Caracterizada como uma árvore frutífera tropical com origem nas Américas Central e do Sul, o termo “muricata” faz uma referência aos aparentes espinhos do fruto, conhecida também como: Jaca-de-pobre, Jaca-do-pará, Coração-de-rainha, Araticum Manso, dentre outras (PEREIRA et al, 2004). A graviola é uma importante fonte alimentícia para o homem; a polpa é consumida ao natural ou usada no preparo de refrescos, tortas e conservas, assim como na fabricação de sucos concentrados, polpas congeladas, néctar, geléias, cremes e bebidas. Além disso, folhas, frutos, sementes e raízes apresentam propriedades medicinais.

Vários estudos realizados por diversos pesquisadores relatam sobre as propriedades e ações: antibacteriana, anti-helmíntico, anticonvulsivante, antidepressiva, antifúngica, antimicrobiana, antineoplásica, antiparasitária, antiespasmódica, antiviral, adstringente, citotóxica, febrífugo, inseticida, hipotensora, calmante, pesticida, sedativa e estomáquica. A casca, folhas e raízes são consideradas sedativas, antiespasmódica, hipotensora e calmante. As folhas apresentam ação: hipotensora, inseticida, antibacteriana, antitumoral, antiparasitária, antimalárica. Já extratos de folhas, cascas, raízes, caule e das sementes de *Annona muricata*

possuem propriedade antibacteriana, enquanto que a casca é utilizada como antifúngica. (TAYLOR, 2002; BOSCOLO et al., 2008).

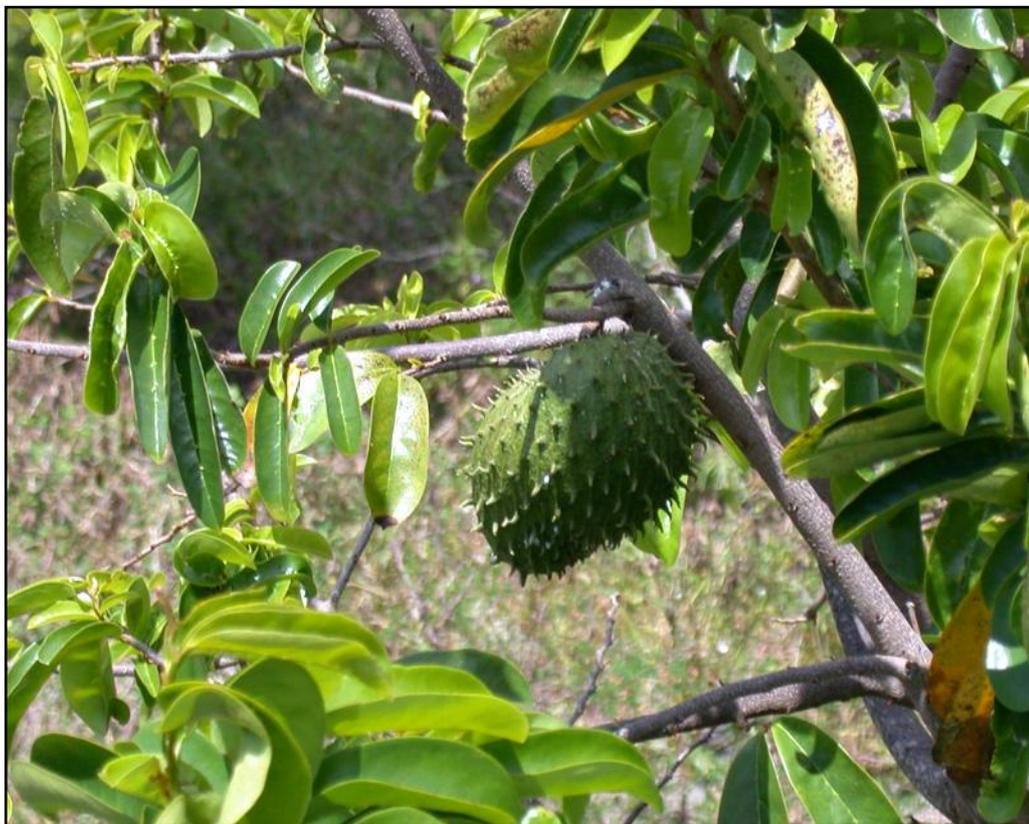


Figura 9. *Annona muricata* L. (Graviola).
Fonte: (Arquivo próprio).

Todas as partes deste vegetal são utilizadas na medicina popular: as sementes são consideradas adstringentes, eméticas, e estudos confirmaram a atividade antiparasitária, moluscicida e antivírus Herpes simplex, ao mesmo tempo em que se atribuem às cascas ação antidiabética e espasmolítica. A utilização do suco do fruto da *Annona muricata* L., é usado em bochechos no combate às aftas, internamente como antitérmico, diurético e no combate de insônias leves. A infusão das folhas secas é usada contra insônias graves, dores de cabeça e como emagrecedor. O decocto das folhas contém o óleo essencial com ação parasiticida, antirreumática e antinevrálgica (GONÇALVES, 2007; Luna et al., 2006).

Estudos químicos com a *A. muricata* conduziram ao isolamento de compostos de diversas classes, tais como acetogeninas, alcaloides, terpenoides, carboidratos, polifenóis, lipídeos e aminoácidos, e algumas dessas substâncias estão associadas ao sequestro dos radicais livres formados nos processos degenerativos (VILA-NOVA et al., 2013; ANGELO et al., 2007). Todavia, nos últimos anos, as pesquisas fitoquímicas acerca desta espécie se

dirigiram ao isolamento de compostos da classe das acetogeninas, principalmente a partir das folhas (RIBEIRO et al., 2010; LUNA, 2006).

Do ponto de vista fitoquímico, a avaliação da composição química do fruto mostrou a presença de açúcares, taninos, pectinas e vitaminas A, C e do complexo B. por sua vez, nas folhas, cascas e raízes foram identificados vários alcalóides. Para as sementes foram registradas acetogeninas, que são encontradas também nas folhas, casca e raízes da planta (FERELLI et al., 2005).

Como foi mostrada no parágrafo anterior, esta espécie é rica em compostos bioativos e diversos trabalhos têm demonstrado uma série de atividades biológicas. De fato, pesquisas etnofarmacológicas registraram diversos usos medicinais da planta, embora a eficácia e a segurança de suas preparações não tenham sido todas comprovadas ainda cientificamente (JUNQUEIRA et al., 2002).

Com a proposta de realizar um levantamento a cerca das atividades farmacológicas comprovadas Da espécie *Annona murica* L, foi realizada uma revisão sistemática. Esta consiste em uma revisão de uma pergunta claramente formulada que usa métodos sistemáticos e explícitos para identificar, selecionar e avaliar criticamente pesquisas relevantes, e coletar e analisar dados dos estudos selecionados (COCHRANE COLLABORATION, 2013).

As buscas foram realizadas em seis bases de dados a fim de ampliar o escopo da pesquisa, e escolhidas por maior abrangência de publicações, sendo elas: PsycInfo, Pubmed, Web of science ,Scopus, Cochrane, SciELO, através das palavras-chave “*annona muricata*” or “*graviola*” que foram cruzadas com o termo “herbal OR medicinal”. Subsequentemente, foi realizada a busca manual por material bibliográfico adicional em bancos de teses e dissertações da CAPES. As buscas foram realizadas desde a primeira publicação identificada nas bases de dados até Setembro de 2014. Com este delineamento e após a exclusão artigos repetidos, foram compilados 96 artigos constituíram a amostra final para traçar um panorama geral dos estudos realizados com *Annona muricata* L., evidenciando as propriedades farmacológicas estudadas até o ano de 2014(Tabela 01).

1.5.1. Atividade no sistema nervoso central:

Diversos artigos sobre a composição química propriedades farmacológicas da espécie *Annona muricata* e outras annonaceas confirmam a presença de alcaloides que possuem efeito modulador do SNC. A reticulina, por exemplo, é um estimulante do SNC, enquanto a estafarina e a aterospermina atuam como sedativos (CHANG et al., 2003). Estudos

preliminares realizados em animais por Bourne & Egbe (1979) mostraram que o extrato alcoólico do fruto diminui a atividade motora, agindo como hipnótico e sedativo.

As atividades antidepressiva e sedativa são atribuídas aos alcaloides isoquinolínicos e ao ácido aminobutírico (SERER, 1967). O mecanismo de ação desses alcaloides parece estar associado a receptores para a serotonina (HASRAT et al., 1997). O extrato dos frutos apresenta efeito neutralizador de estresse cerebral indicando ter um potencial adaptogênico (PADMA et al., 2001). Um teste realizado com ratos mostrou que 100 mg/kg de extrato etanólico da folha apresentou atividade anticonvulsivante (HASRAT et al., 1997; N'GOUEMO et al., 1997; JOSEPH, 1983).

Caparros-Lefebvre (2006), observou que efeito sedativo ou hipnótico da graviola é produzido pela reticulina (o benziltetrahydroisoquinolínico majoritário) que é precursora de opióide e tem mostrado tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo*, atividade antagonista dopaminérgica e agoniza serotoninérgica, as quais estão associadas a atividade antidepressiva. Entretanto, alta concentração desse alcaloide foi encontrada no fluido cerebrospinal de alguns pacientes parkinsonianos e portanto havendo possibilidade dessa substância estar associada a essa enfermidade agindo como um neurotóxico, mediado pelo glutamato ou por radicais livres (LANNUZEL, 2002)

1.5.2 Atividade citotóxica e antitumoral

A *Annona muricata L.* é considerada uma boa fonte natural de antioxidantes, sendo todas as suas partes utilizadas na medicina tradicional (BASKAR et al., 2007). A busca por substâncias com atividade citotóxica e potencialmente anticancerígena sempre foi uma das prioridades da química medicinal e um grande número de abordagens diferentes vem sendo utilizado nessa busca. Uma das maiores descobertas sobre a graviola foi a sua capacidade de agir contra células cancerígenas, mostrando em testes de laboratório um potencial extraordinário. Esta propriedade é consequência das acetogeninas presentes na graviola. Uma terapia natural em complemento às terapias tradicionais, como quimioterapia e radioterapia, está sendo investigada por não provocar efeitos secundários severos, como náuseas e perda de cabelo, efeitos decorrentes da quimioterapia. Evitar possíveis infecções protegendo o sistema imunológico também está sendo considerado possível com o uso da graviola, porque, diferente da quimioterapia, a graviola é seletiva, não destrói células saudáveis (SOUZA, 2009). Uma abordagem utilizada para se ter relação com atividade anticancerígena é a

atividade citotóxica frente à *Artemia salina*, onde o experimento consiste em medir qual a concentração do produto mata 50% da população de *Artemia*, fazendo assim uma alusão às células cancerosas (PERFEITO *et al.*, 2005).

As acetogeninas formam uma nova classe de compostos naturais de grande interesse. Sua ação primária está relacionada com sua capacidade de depleção dos níveis de ATP ao inibir o complexo I na cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias e inibindo a NADH oxidase do plasma de membranas, principalmente de células tumorais, uma vez que essas células possuem uma alta demanda de ATP (FERELLI *et al.*, 2005). Estudos têm avaliado a atividade antitumoral de várias acetogeninas presentes na *Annona muricata L.* contra diversas linhagens celulares tumorais *in vitro* como, por exemplo, contra células de carcinoma pancreático e prostático, carcinoma pulmonar, de mama, epidermóide (QUISPE *et al.*, 2006). Também tem sido observada a ação antioxidante dos extratos foliares (FREITAS *et al.*, 2007) e investigados os efeitos mutagênicos e antimutagênicos inclusive em frutos congelados, sugerindo os dados que o congelamento das frutas contribui para a prevenção contra danos biológicos (SPADA *et al.*, 2008).

1.5.3 Atividades antibacteriana e antiparasitárias

O estudo da resistência bacteriana, geralmente é baseado em micro-organismos de importância epidemiológica. Dentre estes, podemos citar as bactérias Gram-positivas e Gramnegativas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, responsáveis por diferentes processos etiológicos tanto em pacientes imunocompetentes quanto em pacientes imunodeprimidos (ANTUNES *et al.*, 2006).

Estudos realizados na Índia por Pathak *et al.* (2010), avaliaram o efeito antimicrobiano dos extratos metanólicos e aquosos das folhas de mudas de gravioleira frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumonia* e *Enterobacter aerogenes*. Verificou-se sensibilidade frente a bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), e Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris*). Os autores sugeriram o uso da *Annona muricata L.* no tratamento de doenças causadas por tais patógenos. O extrato de folhas de *Annona muricata* é utilizado no tratamento de uma variedade de bactérias doenças infecciosas, como pneumonia, diarreia, do trato urinário infecção e até mesmo algumas doenças de pele. *Annona muricata* extrato contém um amplo espectro de actividade contra um

grupo de bactérias que são responsáveis pelas doenças bacterianas mais comuns. Assim, o planta possui uma abundante do compostos antibacterianos (PATHAK, 2010).

Vieira et al. (2010), avaliando o potencial bactericida de extratos aquosos e etanólicos de sementes de moringa (*Moringa oleifera*) e casca de graviola (*Annona muricata* L.) frente a *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*, mostraram que os extratos aquosos de graviola apresentaram efeito bactericida frente a *S.aureus* e *V.cholerae*, entretanto, os extratos etanólicos dessa planta não mostraram atividade antibacteriana.

Jaramillo et al. (2000) investigando os constituintes químicos do pericarpo de *A. muricata* para avaliar sua atividade citotóxica e antileishmanial, verificaram ser a fração acetato de etila a mais efetiva contra linhagens celulares U-937 e cepas de promastigotas *Leishmania*.

1.5.4 Atividade antiofídica

Em um estudo pré-clínico realizado por Cremonez (2011) foi tratamentos com EFAm e com SAM não alteram de forma relevante o quadro clínico do envenenamento, Entretanto, o tratamento com suco parece agravar o quadro hipotensor do envenenamento e causar um aumento significativo das transaminases hepáticas. Por outro lado, é possível notar nos animais tratados menores alterações da hemostasia, bem como uma possível proteção contra a miotoxicidade da peçonha.

1.5.5 Atividade anti-viral

Segundo Gonzalez (2008), estudos com extrato etanólico de *Annona muricata* foi exibiram atividade contra Herpes simplex virus-1 (HSV-1) e do isolado clínico (obtido a partir de lesões humanas), a fim de verificar se eles inibem a efeito citopático do HSV-1 em células Vero que é indicativo de anti-HSV-1 potenciais. A concentração inibitória mínima de extrato etanólico de *A. muricata* verificou-se ser de 1 mg / ml, o qual mostra que o *A. muricata* poderia ser usado como o potencial antiherpético.

A diversidade de pesquisas acerca das atividades farmacológicas de *annona muricata* e outras espécies da família *annonáceae* ratificou seu potencial biológico. Estes dados tornam indispensável que novas pesquisas se somem às já existentes, dada a riqueza de seus

constituintes, ofertando cada vez mais produtos farmacêuticos de qualidade e eficácia comprovada, para a utilização como agentes terapêuticos, prioritariamente analisados segundo os métodos modernos de ensaios pré-clínicos e clínicos disponíveis, fornecendo a sociedade avanços nos tratamentos de diversas patologias.

Tabela 1: Propriedades farmacológicas de *Annona Muricata* L.

PARTE DA PLANTA	MATERIAL	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	REFERÊNCIA
Folhas	Extrato Aquoso	Atividade protetora/Antioxidante	Adewole, 2008.
Folhas	Extrato Metanólico	Atividade Hipoglicemiante	Adeyemi, 2010.
Raiz	Extrato etanólico	Atividade citotóxica	Ahalya, 2013.
Folhas	Extrato etanólico	Atividade hipoglicemiante	Arroyo, 2009.
Folhas	Extrato Metanólico	Atividade Inseticida	Barrera, 2013.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Antioxidante	Baskar , 2007.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Antioxidante	Baskar, 2007.
Folhas	Extrato Hidroalcoólico	Atividade Gastroprotetora e Antioxidante	Bento, 2010.
Folhas	Extrato Metanólico	Atividade Antiviral	Betancurl, 1999.
Folhas	Extrato Metanólico	Atividade Antiviral e Antitumoral	Betancurl,1999.
Sementes, flores, folhas, cascas, galhos e cascas de raízes	Extrato Aquoso e Etanólico	Atividade de Toxicidade Larvicida	Bobadilla, 2005.
Sementes	Extrato Hidroalcoólico	Atividade Antiparasitária	Bories , 1991.
Fruto verde	Extrato etanólico	Atividade Antidiarréico	Bories et al., 1991

Casca e Raiz	Extrato hidroalcoólico	Hipoglicemiantes	Bories et al., 1991.
Sementes	Extrato Alcoólico	Atividade Carrapaticida	Broglio, 2010
Frutos	Extrato Aquoso	Atividade Antioxidante	Correa , 2012.
Folhas	Extrato etanólico	Antiespasmódicas,antidisentéricas.	Corrêa,1978.
Folhas	Extrato etanólico	Antitumoral	Costa et al., 2013.
Folhas	Extrato aquoso	Atividade antiofídico	Cremonez, 2011.
Folhas	Extrato Hidroalcoólico	Atividade Anti-infecciosa	Dvorkin, 2008.
Folhas	Extrato Hidroalcoólico/frações	Hipoglicemiantes	Fenner, 2006.
Folhas	Extrato etanólico e frações	Antioxidante	Ferelli, 2013.
Casca	Extrato Aquoso e Etanólico	Atividade Antibactericida	Fernandes, 2010.
Folhas e Sementes	Extrato Aquoso	Atividade Antifúngica	Ferreira et al., 2014
Folhas	Extrato etanólico	Atividade anti-helmíntico	Ferreira et.al, 2013.
Folhas	Extrato Aquoso	Atividade Antidiabéticos e Antioxidantes	Florence, 2014.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Analgésica e Antiinflamatória	Foon et al., 2012.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Anti- inflamatória	Foong, 2012.
Sementes	Extrato Alcoólico	Atividade Acaricida	Forti , 2009.

Folhas	Extrato hidroalcoólico	Atividade Antitumoral	Francisco, 2011.
Folhas		Atividade Antifúngica	Frias, 2009.
Fruto	Extrato Hidroalcoólico	Atividade Antioxidante, antitumoral	Gavamukulya, 2011.
Folhas	Extrato Etanólico e Aquoso	Atividade Antioxidante	Gavamukulya, 2014.
Folhas,casas	Extrato n-butanólica	Atividade Antineoplásico	George, 2012.
Folhas	Extrato etanólico	Atividade sedativas e ansiolítica.	Gleye, 1997.
Folhas	Extrato Metanólico	Atividade Antiproliferativa	Gomes de melo, 2010.
Casca e Raiz	Extrato hidroalcoólico	Atividade antinocepiciva e analgésica	Gonçalves-filho, 2006.
Raízes e folhas, Fruto	Extrato Etanólico	Atividade Larmicida	Grzybowski, 2013.
Casca, folha, fruto	Extrato hidroalcoólico e aquoso	Efeito larvicida	Grzybowski, 2013.
Sementes	Extrato Etanólico	Atividade controladora do vetor da febre de dengue	Grzybowski, 2012.
Folhas	Extracto Etanólico	Atividade Anti-tumoral	Hamizah, 2012.
Raízes e folhas	Extrato etanólico	Atividade ansiolítica	Hasrat, 1997.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Inseticida	Henao, 2007.
Sementes	Extrato Alcoólico	Atividade Inseticida	Hincapié, 2008.
Fruto	Extrato etanólico	Atividade sedativas e ansiolítica.	Holanda et al., 2013.

Folhas	Extrato Hidroalcoólico	Atividade de biodistribuição de radiofármacos	Holanda, 2014.
Frutos	Extrato Aquoso	Atividade Analgésica e Anti-inflamatória	Ishola, 2014.
Folhas	Extrato de Acetato de Etila	Atividade Antileishmanial	Jaramillo, 2000.
Folhas	Extrato Hidroalcoólico	Atividade Citotóxica	Arroyo, 2005.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Hipoglicemiante	Arroyo, 2009.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Antinociceptiva e Anti-ulceras	Justin, 2012.
Folhas	Extrato Aquoso	Atividade Anti-Hipertensiva	Karou, 2011.
Fruto e Folhas	Extrato Aquoso	Parkinson	Lannuzel, 2007.
Folhas/caule	Extrato etanólico	Atividades anti-parasitária	Lima, 2011.
Folhas	Extrato Alcoólico e Acetato de Etila	Antioxidante	Luna, 2013.
Fruto,folhas	Extrato Alcoólico,Cetônico e Aquoso	Atividade Citostática	Lopez, 1979.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Moluscicida	Luna, 2006.
Folhas,	Extratos aquosos e etanólicos	Atividades anti-parasitária	Marsaro et al., 2013.
Sementes e folhas	Extrato etanólico/frações	Atividade sedativas e ansiolítica.	Martins,1989;
Fruto verde	Extrato etanólico	Atividade antileishmania	Medeiros et al., 2009.
Sementes	Extrato Hidroalcoólico	Atividade Inseticida	Mendonça, 2013.

Folhas	Extrato Hidroalcoólico	Atividade Anticancerígena	Moghadamtousi, 2014
Folhas	Extrato Acetato de etila	Atividade antiproliferativa	Moghadamtousi, 2014
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Antitumoral	Moghadamtousi, 2013
Folhas	Extrato Hidroalcoólico	Atividade Antioxidante	Nawwar, 2012.
Semente	Extrato hidroalcoólico	Atividade leishmanicida e citotoxicidade	Nova, 2011.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade anticonvulsivante	N'gouemo et al., 1997.
Frutos	Extrato Aquoso	Atividade Antioxidante	Nunes, 2011.
Folhas	Extrato Aquoso	Atividade Anti-hipertensivas	Nwokocha, 2012.
Folhas/caule	Extrato etanólico	Atividade antioxidante	Olmed, 2014.
Folhas	Extrato Hidroalcoólico	Atividade Antiprotozoária e Citotóxica	Osorio, 2007.
Folhas	Extrato Hexânico	Atividade Citotóxica	Osorio, 2007.
Fruto, folhas	Extrato Alcoólico e frações	Atividade Ansiolítica	Oviedo, 2009.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Antiviral	Padma,1998.
Folhas, fruto	Extrato Hidroalcoólico	Atividade Hepatoprotetora	Padma,1999.
Sementes	Extrato etanólico	Atividade anticancerígena	Paula, 2013.
Folhas	Extrato Hidroalcoólico	Atividade Citotóxica	Quispe, 2006.
Sementes	Extrato acetônico	Atividade Antitumoral	Rios, 2012.

Sementes	Extrato acetônico	Atividade citotóxica	Rios, 2013.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Moluscicida	Rocha e Matos, 2013.
Sementes	Extrato etanólico	Atividades anti-inflamatória	Rockenbach, 2007.
Folhas	Extrato etanólico	Efeitos antidiabéticos e antioxidantes	Rojas et al., 2006.
Sementes e folhas	Extrato etanólico/frações	Atividade citotóxica	Rojas et al., 2009.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Larvicida	Roseane, 2011.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividades antinociceptiva e anti-ulcerosas	Hamid, 2012.
Folhas	Extrato etanólico	Atividade antiulcerogênica	Roslida, 2012.
Folhas	Extrato Hidroalcoólico	Atividade antinociceptiva	Sampaio, 2011.
Folhas	Extrato Hidroalcoólico	Atividade Inseticida	Santiago et. al., 2012.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Moluscicida	Santos, 2000.
Folhas	Extrato etanólico/frações	Atividades anti-inflamatória	Santos, 2003.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Moluscicida	Santos, 2001.
Folhas	Extrato etanólico/frações	Atividade antibacteriana	Silva, 2009.
Casca, folha, fruto	Extrato hidroalcoólico e aquoso	Atividade antibacteriana	Silva, 2011.
Folhas	Extrato hidroalcoólico	Efeito antibacteriano	Silva, 2010.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Antinociceptiva e Antinflamator	Sousa, 2010.

Folhas	Extrato Etanólico	Atividades Antinociceptiva e Anti-inflamatórias	Sousa, 2010.
Folhas	Extrato etanólico	Atividade citoprotetora	Sousa, 2005.
Fruto	Extrato Aquoso	Atividade Antioxidante	Sousa, 2011.
Raízes e folhas	Extrato etanólico	Atividade Anti- inflamatória	Strasser, 2011.
Fruto	Extrato Aquoso	Atividade Antiproliferativa	Sun, 2014
Fruto, folhas	Extrato Hidroalcoólico	Atividade Antibacteriana	Takahashi, 2006.
Folhas	Extrato da Aquoso	Atividade Antineoplásica	Torres, 2012.
Raízes e folhas	Extrato etanólico	Antiparasitária	Vasquez, 1990.
Folhas,folhas	Extratos aquosos e etanólicos	Atividade antibacteriana	Viera et al., 2010.
Fruto	Extrato Vegetal	Atividade Leishmanicida	Vila-nova, 2013.
Sementes	Extrato Aquoso	Atividade Leishmanicida.	Vila-nova, 2011.
Folhas	Extrato Etanólico	Atividade Inseticida	Villegas, 2013.
Folhas	Extrato Hidroalcoólico	Atividade Citotóxica	Xavier, 2014.
Folhas	Extrato Hidroalcoólico	Atividade Antioxidante	Zamudio, 2014.
Fruto	Extratos aquosos e etanólicos	Atividade Antioxidante	Zielinski, 2014

1.6. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento da humanidade proporcionou ao longo do tempo diversos avanços. Dentre estes está a seleção das plantas não só com fins alimentícios, mas também para o alívio de inúmeros males e doenças. Frente a isso muitos povos passaram a dominar o conhecimento do uso de plantas, perpetuando-se até os dias atuais por meio da utilização consciente de medicamentos à base de ervas medicinais (FERREIRA ; PINTO, 2010).

A utilização de plantas medicinais está em contínua expansão em nível mundial. A crescente busca por agentes terapêuticos derivados de espécies vegetais justifica-se pelo surgimento de doenças ainda sem tratamento apropriado, e pelo crescimento do conhecimento científico a respeito dos fitoterápicos, como importantes alternativas terapêuticas (GUARRERA, 2005).

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

Dentro desse contexto, as plantas medicinais e em especial o uso dos medicamentos fitoterápicos adquirem importância como agentes terapêuticos e, por isso, devem ser prioritariamente analisados segundo os métodos modernos de ensaios pré-clínicos e clínicos disponíveis (LAPA et al., 1999; CALIXTO, 2001).

Investigações fitoquímicas e, em menor extensão, farmacológicas, sobre membros da família Annonaceae vêm se intensificando nos últimos anos (SIEBRA, 2007). Muitas espécies do gênero *Annona* apresentam efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC), como *Annona senegalensis*, *Annona diversifolia* e *Annona muricata*, usadas na medicina popular devido às ações anticonvulsivante, sedativa e ansiolítica. Em decorrência do pressuposto etnofarmacológico que evidencia uso da *Annona muricata* na medicina popular para o tratamento das desordens citadas anteriormente, aliado a trabalhos realizados em nosso laboratório (SOUZA, 2013), fez-se necessário um estudo químico e farmacológico mais aprofundado, que ofereça mais subsídios para a compreensão do efeito antidepressivo-símile de *Annona muricata* L.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Caracterizar o efeito antidepressivo-símile do extrato hidroalcoólico das folhas de *Annona muricata* L. (graviola).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a composição fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Annona muricata* L. (EHFAM);
- Quantificar, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), os compostos fenólicos presentes no EHFAM;
- Investigar o perfil farmacológico da administração aguda do EHFAM em camundongos submetidos aos testes do campo aberto (TCA), nado forçado (TNF), acinesia induzida por reserpina, convulsões induzidas por pentilenotetrazol e tremores induzidos por oxotremorina;
- Sugerir o possível mecanismo de ação antidepressiva do EHFAM, com base em estudos de potencialização com antidepressivos clássicos (imipramina, fluoxetina e bupropiona).

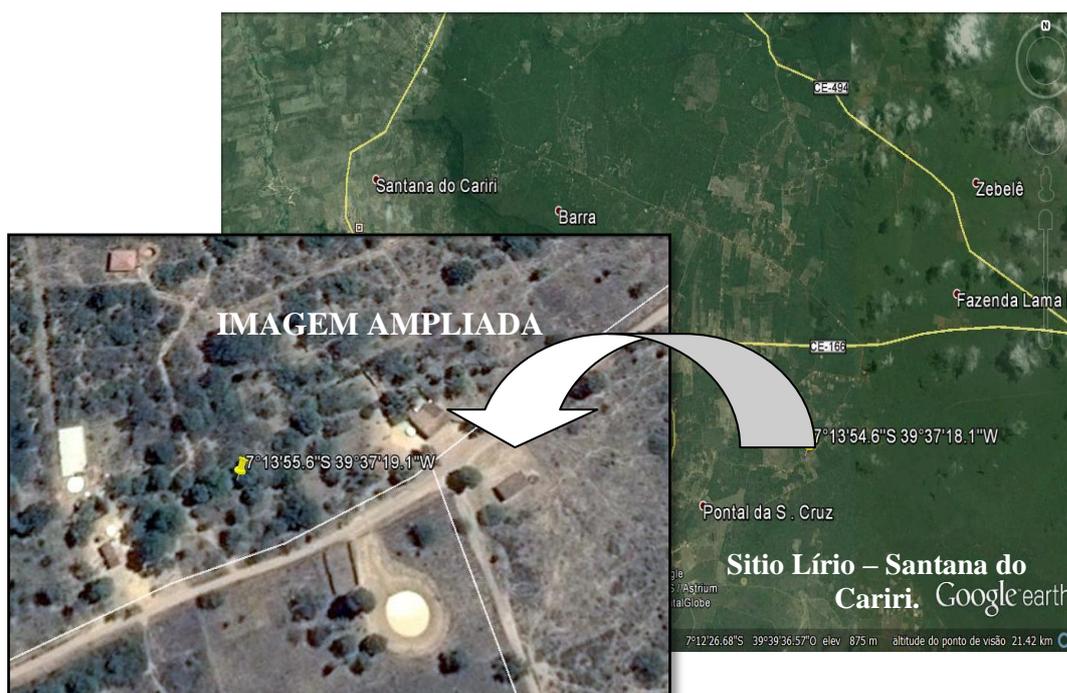
MATERIAL E MÉTODO

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Material vegetal:

A coleta do material vegetal foi feita segundo a licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), para a realização de atividades com finalidade científica com base na Instrução Normativa nº154/2007; licença nº 40883-1, Ministério do Meio Ambiente – MMA/ Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio (Anexo 2).

Um exemplar de *Annona muricata* L., foi coletado em uma propriedade privada (Sítio Lírio, distrito de Santana do Cariri – CE) na Chapada do Araripe, sob as coordenadas 7°13'55.6"S 39°37'19.1"W, no mês de março de 2013 (Figura 8). As informações foram obtidas através de aparelho GPS. Um exemplar do material coletado para confecção da exsicata foi enviado para identificação junto ao Herbário Caririense Dárdano de Andrade e Lima, da Universidade Regional do Cariri – URCA, o qual encontra-se devidamente registrado sob o número de tombo 10100 (Figura 9).



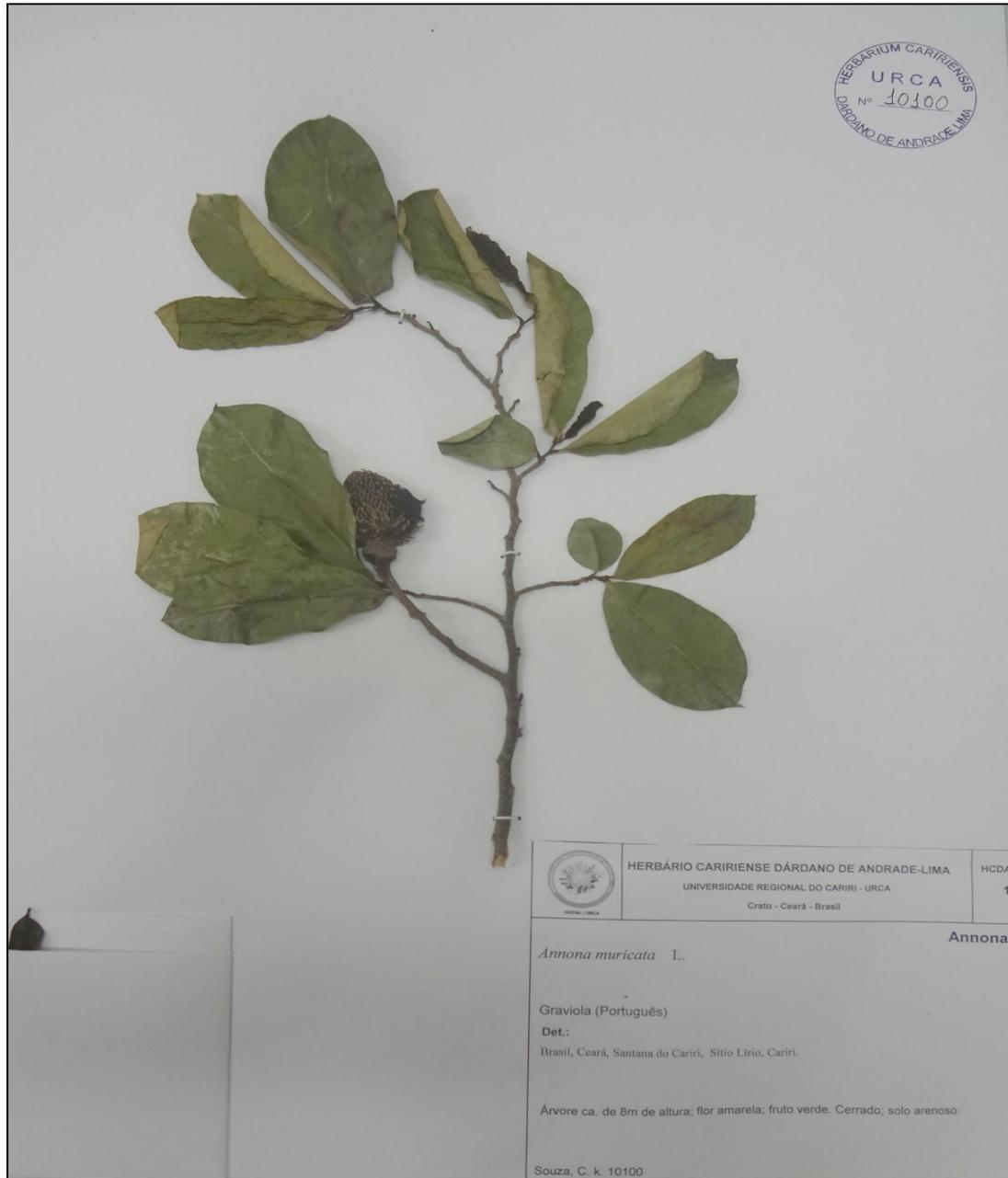


Figura 11: Exsicata da espécie *Annona muricata* L.

Fonte: Herbário Caririense Dárdano de Andrade e Lima, da Universidade Regional do Cariri – URCA, o qual encontra-se devidamente registrado sob o número de tomo 10100

3.2. DROGAS E REAGENTES

As drogas e reagentes utilizados na pesquisa estão listados abaixo (Tabela 2).

Tabela 2: Drogas e reagentes utilizados nos modelos comportamentais

DROGAS E REAGENTES	PROCEDÊNCIA
Água deionizada	Deionizador, LFQM
Álcool etílico P.A.	Sigma-Aldrich, EUA
Imipramina	Cristália Farma, Brasil
Bupropiona	Cristália Farma, Brasil
Fluoxetina	Cristália Farma, Brasil
Diazepan	Germed, Brasil
Reserpina	Sigma-Aldrich, EUA
Solução fisiológica de NaCl 0,9%	Farmace, Brasil
Tween 80	Sigma-Aldrich, EUA
Pentilenotetrazol - PTZ	Sigma-Aldrich, EUA

3.3. ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), linhagem Swiss, fêmeas, pesando em média 25 – 30g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte (Estácio/FMJ). Os animais foram mantidos em caixas plásticas, a temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclos claro/escuro de 12/12h, recebendo ração (Labina, Purina®) e água *ad libitum* no Biotério de manutenção de animais da URCA. Para realização dos testes farmacológicos, os animais foram separados aleatoriamente em grupos de nove animais, identificados, pesados e colocados no laboratório de Farmacologia e Química Molecular – LFQM, com um período de 24 horas anteriores aos testes, para o processo de adaptação.

O manejo dos animais foi realizado seguindo os princípios éticos para a experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Após os

experimentos, os animais foram eutanasiados em câmara de gás (Dióxido de carbono – CO₂), sendo posteriormente acondicionados em sacos plásticos sob refrigeração a – 20°C; o recolhimento foi realizado por empresa especializada no descarte de material biológico.

3.4 Exigências legais - aspectos éticos da pesquisa

Os protocolos experimentais com animais foram desenvolvidos mediante aprovação do Comitê de Ética. Para tanto, a proposta da pesquisa está em conformidade e foi conduzida em estrita obediência com as normas e diretrizes bioéticas vigentes para ensaios envolvendo seres vivos humanos (Resolução Nº 196/1996 e 301/2000 do Conselho Nacional de Saúde – CNS), animais não-humanos (*Guide for the care and use of laboratory animals, do NIH - National Institute of Health-EUA*, 1996; Lei Federal Nº 11.794/2008; Princípios Éticos da Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA); e integridade da fauna e flora (Lei Federal Nº 9605/1998) (BAZZANO, 2006; MACHADO *et al*, 2006; BRASIL, 2008; BRASIL, 1998). Todos os procedimentos adotados foram estabelecidos de acordo com o decreto nº. 24.645 de 10 de julho de 1934 que asseguram os direitos dos animais, estabelecendo medidas de proteção aos mesmos, e conforme a lei n.º. 6.638 de 8 de maio de 1979, que normatiza as práticas didático científicas da vivisseção de animais (BRASIL, 1934; BRASIL, 1979). A Lei 6.638 de 8 de maio de 1979 dispõe sobre a composição do CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua secretaria executiva cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais – CIUCA, mediante a regulamentação da Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais.

O projeto foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEUA) da Universidade Regional do Cariri – URCA, credenciado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e pelos termos da Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Mediante submissão, foi concedida a aprovação do projeto para realização do estudo, sob parecer Nº 00212/2013.1 (Anexo 3).

3.5. Obtenção do extrato hidroetanólico das folhas de *Annona muricata* L. (EHFAM):

O material botânico (298g de folhas de *Annona muricata* L.) foi coletado e transportado ao Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal – LFQM – URCA, onde foi selecionado de acordo com o grau de qualidade visual (ausência de danos mecânicos e manchas fúngicas) e, posteriormente, seco por exposição ao sol por um período de oito dias. Em seguida as folhas foram recortadas (a fim de aumentar a superfície de contato com o solvente) e acondicionadas em frascos de vidro transparente, sendo estas embebidas por solvente etanol 99,9% e água destilada, na proporção de 1:1, a temperatura ambiente por 72h. Após esse período, o material foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida até a concentração de $\pm 30\%$. Posteriormente o produto foi acondicionado em recipientes apropriados e mantidos sob baixa temperatura, sendo congelado e, em seguida, liofilizado seguindo a metodologia de Matos (2009) para retirada da parte aquosa. Ao fim do processo, obteve-se 33,39g de extrato seco das folhas de *Annona muricata* L. O rendimento obtido foi de 11,20% (Figura 12).

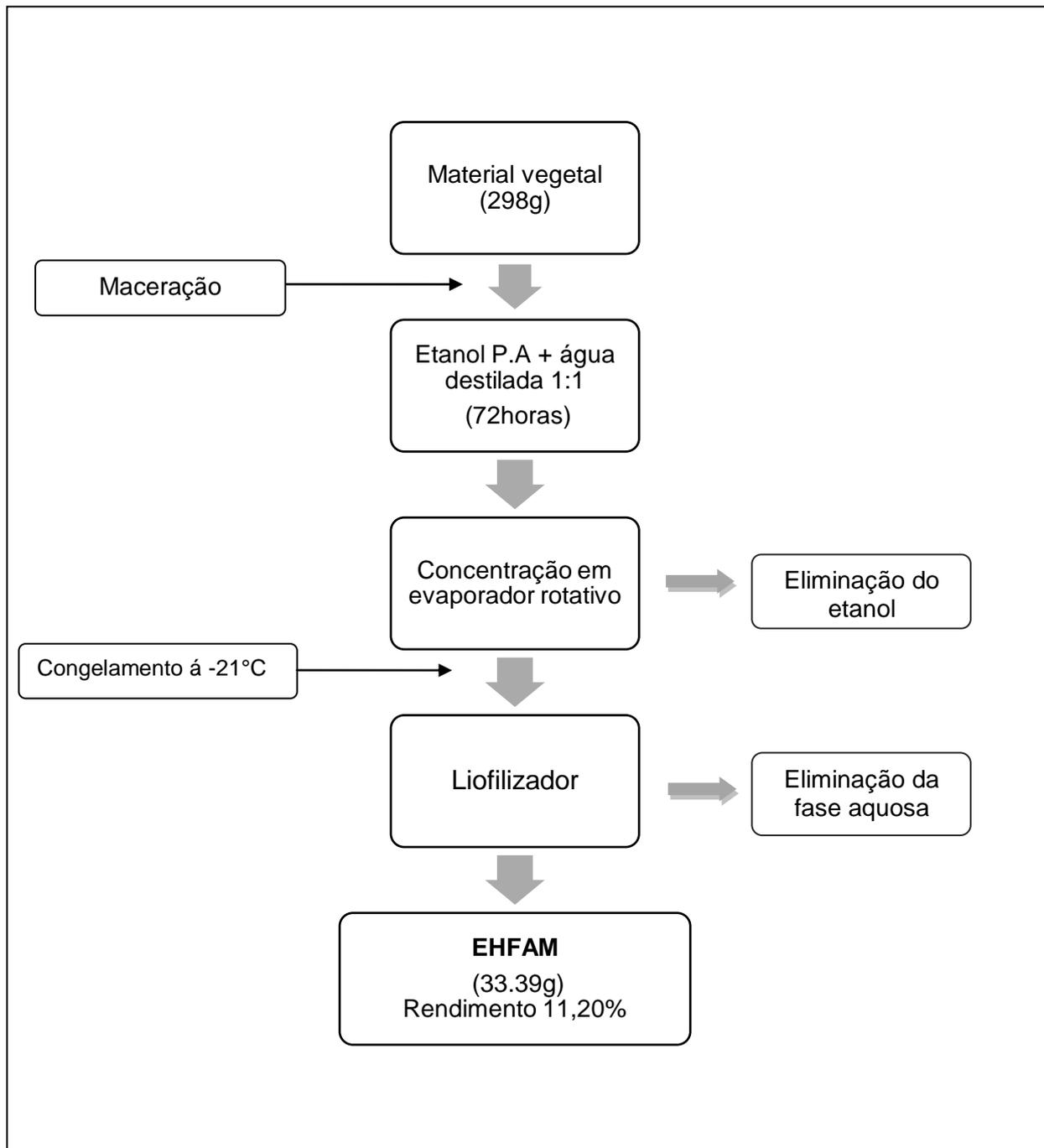


Figura 12. Fluxograma do processo de obtenção do EHFAM.

Fonte: Arquivo próprio.

3.6. Prospecção fitoquímica do EHFAM:

A realização da prospecção fitoquímica do EHFAM seguiu a metodologia de Matos (1997), onde classes de metabólitos secundários foram identificadas por mudanças colorimétricas e precipitados formados após a adição de reagentes específicos. Nos próximos parágrafos segue a descrição do procedimento anteriormente citado.

3.6.1. Preparação de extratos:

Trezentos miligramas do EHFAM foram solubilizados em 30 mL de uma mistura de etanol e água (30%). A solução obtida foi distribuída em sete porções de 3 mL em cada e enumeradas em frascos de vidro para as análises.

3.6.2. Teste para fenóis e taninos:

Os polifenóis são substâncias redutoras, caracterizados pela fácil oxidação, resultando em substâncias coradas. Os taninos são caracterizados por reações de coloração ou precipitação (SIMÕES et al., 2007).

No frasco 1 foram adicionadas 3 gotas de solução alcoólica de FeCl_3 . Após agitação, o resultado obtido foi comparado com um teste “branco” (mistura de água e FeCl_3). O surgimento de coloração variável entre azul e vermelho evidencia a presença de fenóis, quando o teste “branco” for negativo. Havendo precipitado escuro de tonalidade azul indica presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolizáveis) e tonalidade verde indica presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos). Para evidenciar taninos, ainda fez-se uso do teste de precipitação de gelatina, devido à habilidade desses compostos para interagir e precipitar proteínas, como o colágeno da gelatina (STRUMEYER e MALIN, 1975).

3.6.3. Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides:

Os flavonóides representam um dos grupos mais amplamente distribuídos e diversificados no reino vegetal. Solventes de polaridade crescente facilitam a extração dos flavonóides (SIMÕES et al, 2007). Nos frascos 2, 3 e 4, foram adicionados HCl 1% (7 gotas, até atingir um valor de pH 3.0), NaOH 40% (2 gotas, até atingir um valor de pH 8.5) e NaOH 40% (4 gotas, até atingir um valor de pH compreendido entre 11 – 14), respectivamente. O surgimento de colorações diferentes indica presença de constituintes diversos, de acordo com tabela 3.

Tabela 3: Identificação dos metabólitos secundários (Antocianinas, Antocianidinas, Flavonas, Flavonóis, Xantonas, Auronas, Chalconas, Flavononóis).

CONSTITUINTES	PH DO MEIO E COR DO PRODUTO FINAL DA REAÇÃO		
	pH 3.0	pH 8.5	pH 11
Antocianinas	Vermelho	Lilás	Azul - púrpura
Antocianidinas	-	-	-
Flavonas	-	-	Amarelo
Flavonóis	-	-	-
Xantonas	-	-	-
Auronas	Vermelho	-	Vermelho - púrpura
Chalconas	-	-	Vermelho - laranja
Flavononóis	-	-	-

Legenda: (-): ausência de qualquer cor.

3.6.4. Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas:

Ao frasco 5 foi adicionado HCl até atingir um valor de pH compreendido entre 1 – 3 e no frasco 6 foi adicionado NaOH até atingir um valor de pH 11. Os frascos foram posteriormente aquecidos durante 2 – 3 minutos. Seguindo o mesmo mecanismo de observação adotado no item anterior, o aparecimento ou intensificação de cores indica a presença de constituintes especificados na tabela 4 (Figura 13).

Tabela 4: Identificação dos metabólitos secundários.(Leucoantocianidinas, Catecnas,Flavononas).

CONSTITUINTES	PH DO MEIO E COR DO PRODUTO FINAL DA REAÇÃO	
	Ácido	Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelho	-
Catequinas	Pardo - amarelo	-
Flavononas	-	Vermelho - laranja

Legenda: (-): ausência de qualquer cor



Figura 13: Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas.

Fonte: Arquivo próprio.

3.6.5. Teste para alcaloides:

Podem-se encontrar alcaloides em todas as partes dos vegetais, porém há acúmulo preferencial em alguns órgãos e tecidos, tais como: tecidos de crescimento ativo; células epidérmicas e hipodérmicas; bainhas vasculares e vasos lactíferos (SIMÕES et al, 2007).

Preparou-se uma nova solução contendo 300 mg do EHFAM, acrescido de 30 mL de ácido acético 5%. Esta mistura foi aquecida até fervura por alguns minutos e transferida para um funil de separação. Ao filtrado foram adicionadas aproximadamente 10 mL de uma solução de NaOH 10%. A variação do pH por meio foi avaliada por meio de papel indicador. Em seguida adicionou-se clorofórmio (aproximadamente 15 mL) e o material foi submetido à agitação e posteriormente o mesmo foi deixado em repouso por alguns instantes. Havendo presença de alcaloides, estes passam para a fase clorofórmica (fração alcaloídica). Passados alguns instantes, o material foi aquecido para evaporação do solvente. Ao resíduo restante foram adicionadas 2 gotas de HCl 1%. Sobre uma lâmina de vidro foi depositada uma gota da solução e, ao lado desta, 1 gota de reagente de Dragendorff. Após a mistura, o indicativo de alcaloides é dado a partir da formação de precipitado na lâmina (Figura 14).

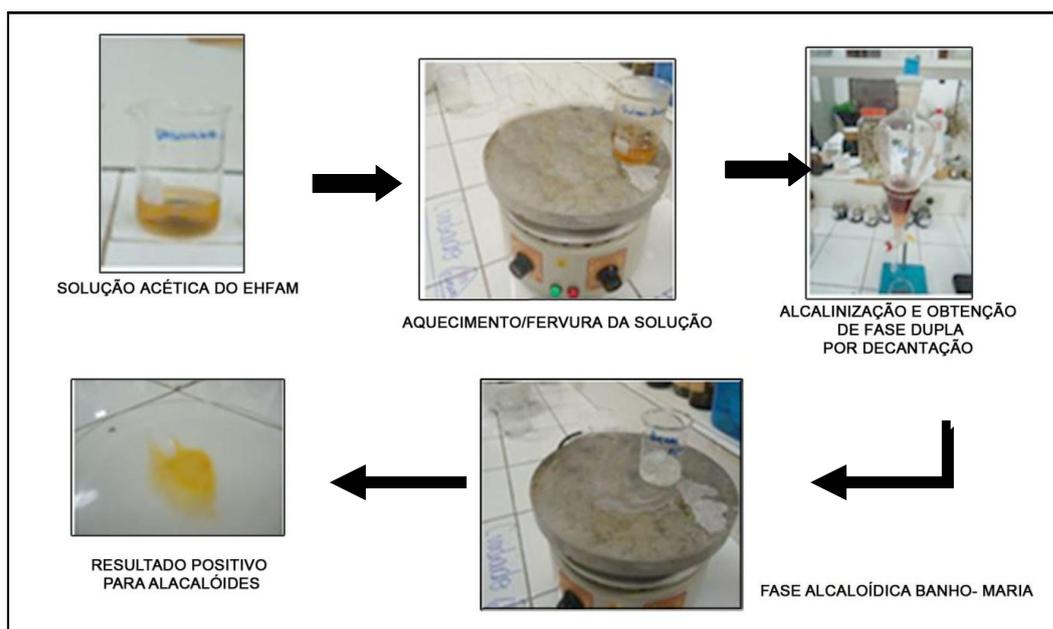


Figura 14: Teste para alcaloides.

Fonte: Arquivo próprio.

3.7. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DO EHFAM:

Todos os produtos químicos utilizados foram de grau analítico. O metanol, ácido acético e os padrões para ácido gálico, ácido caféico, ácido clorogênico e ácido elágico foram adquiridos da Merck (*Darmstadt*, Alemanha). Os padrões para quercetina, quercitrina, rutina, campferol, catequina e epicatequina foram adquiridos da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO, EUA). A CLAE foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu Prominence Sampler Auto (SIL-20A), sistema de CLAE (*Shimadzu*, Kyoto, Japão), equipado com bombas alternativas *Shimadzu* LC-20AT conectados a um desgaseificador DGU 20A5 com integrador SPD-M20A diodo, detector de arranjo de solução de software SP1 LC 1,22 (Boligon et al., 2013).

A quantificação dos compostos análises foi realizada empregando cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (DAD) e varredura entre 200 a 400 nm. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada para a quantificação dos ácidos fenólicos: ácidos gálico, clorogênico, elágico e caféico, e os flavonóides: quercetina, quercitrina, rutina, campferol, catequina e epicatequina, obtidos diante da comparação entre o seu tempo de retenção e do espectro de absorção de UV. As análises cromatográficas foram realizadas sob condições analíticas de gradiente com coluna C18 (4,6 mm x 250 mm) com partículas de diâmetro Embalado com 5 UM. A fase móvel foi de recipiente de água contendo 1% de ácido fórmico (A) e acetonitrilo (B), e o gradiente de composição foi: 13% de B até 10 minutos e mudou para obter 20%, 30%, 50%, 60%, 70% , 20% e 10% de B a 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 min, respectivamente (Boligon et al., 2012) com ligeiras modificações.

O EHFAM foi dissolvido em etanol a uma concentração de 20 mg/mL, para posterior análise. Na presença de antioxidantes, onze compostos foram investigados: ácido gálico, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido cafeico, catequina, epicatequina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina, rutina e kaempferol. A identificação destes compostos foi realizada por comparação dos tempos de retenção e espectro de absorção UV com os dos padrões comerciais. A taxa de fluxo foi de 0,7 ml / min, volume de injeção de 40 µl e o comprimento de onda foi de 254 nm para o ácido gálico e catequina, 280 nm para epicatequina, 325 nm para ácidos cafeico, elágico e clorogênico, 365 nm para a quercetina, isoquercitrina, quercitrina, rutina e kaempferol. Todas as amostras de fase móvel foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore), em seguida, desgaseificou-se com um banho de ultra-som antes da utilização. As soluções de referência de normalização foram preparadas

em fase móvel de CLAE em valores de concentração de 0030-0250 mg/mL para campferol, quercetina, quercitrina, isoquercitrina, catequina, epicatequina e rutina e 0030-0250 mg/mL para ácidos gálico, caféico, elágico e clorogênico. Os picos da cromatografia foram confirmados pela comparação do tempo de retenção com os de padrões de referência e pelos espectros do detector de arranjo de diodos - DAD (200 a 400 nm). A curva de calibração para o ácido gálico: $Y = 14286x + 1395,8$ ($r = 0,9996$); catequina: $Y = 15097x + 1189,3$ ($r = 0,9997$); epicatequina: $Y = 13601x + 1194,5$ ($r = 0,9992$); ácido cafeico: $Y = 12758x + 1259,7$ ($r = 0,9996$); ácido clorogênico: $Y = 13461x + 1275,3$ ($r = 0,9992$); ácido elágico: $Y = 13576x + 1346,4$ ($r = 0,9999$); Rutina: $Y = 12,845 + 1305,7$ ($r = 0,9999$); quercetina: $Y = 13560x + 1192,6$ ($r = 0,9991$), isoquercitrina: $Y = 12873x + 1325,6$ ($r = 0,9998$); quercitrina: $Y = 11870x + 1329,8$ ($r = 0,9993$) e kaempferol: $Y = 14253x + 1238,9$ ($r = 0,9997$). Todas as operações cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata. O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram calculados com base no desvio padrão das respostas e da inclinação por meio de três curvas analíticas independentes. LOD e LOQ foram calculados como 3,3 e 10 σ/s , respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e s é o declive da curva de calibração (Boligon et al., 2013).

3.8. PROTOCOLOS COMPORTAMENTAIS:

Todos os experimentos foram realizados em horário padronizado (12h00min as 16h00min), no Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM) da URCA, em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), desprovido de barulho externo, e iluminação de baixa intensidade (lâmpada vermelha de 15 W), mimetizando o ambiente natural do animal, evitando alterações comportamentais. Os animais foram divididos em grupos (24 horas antes da realização dos experimentos) compostos por nove animais cada, e levado para o LFQM para serem ambientados. No presente trabalho foram executados protocolos específicos para verificar e caracterizar o efeito tipo antidepressivo do EHFAM, tais como os testes do campo aberto, nado forçado, acinesia induzida por reserpina, convulsões induzidas por pentilenotetrazol e tremores induzidos por oxotremorina. Os animais receberam tratamento com veículo (salina – 0,1 mL/10g, i.p.), EHFAM (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) e antidepressivos clássicos (bupropiona 20 mg/Kg, i.p., fluoxetina 10 mg/Kg, i.p. e imipramina 30 mg/Kg, i.p.) para o controle positivo. Com trinta minutos após a injeção das

substâncias, os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais descritos citados anteriormente e descritos abaixo.

3.8.1. Teste do nado forçado (TNF):

O TNF é considerado o modelo farmacológico *in vivo* mais utilizado para avaliação da atividade antidepressiva, por apresentar alto valor preditivo devido às respostas aos medicamentos antidepressivos padrões existentes (PORSOLT et al., 1977). Neste teste um animal é submetido a uma situação estresse elevado representado pela natação em um ambiente confinado. Os animais inicialmente nadam e tentam encontrar uma saída, e não obtendo êxito assumem uma postura imóvel que ocorre cada vez mais precocemente com a repetição do procedimento.

Foram utilizados cilindros de vidro transparente (Figura 15) medindo 20 cm de altura e 15 cm de diâmetro, com volume total de 2L, contendo 1,5L de água a 27°C. Os animais (nove por grupo) foram divididos em sete grupos que recebem, respectivamente: CONT (salina, i.p., 0,1 mL/10g), IMI (imipramina 30 mg/Kg, i.p), FLUO (fluoxetina 10mg/kgv.i.p.), BUP (bupropiona 20mg/kg i.p) e EHFAM (5, 10 e 20mg/Kg, i.p.). Após trinta minutos da administração, cada animal foi colocado para nadar no cilindro por um tempo de 5 minutos. O parâmetro comportamental observado neste teste foi o tempo durante o qual o animal permaneceu imóvel (tempo de imobilidade – TI), sendo considerado imóvel quando o camundongo flutuava ou realizava apenas movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água (ALMEIDA, 2006).

Tabela 5: Grupos experimentais e drogas administradas no teste de nado forçado (TNF)

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TRATAMENTOS
CONT	Salina, 0,1 mL/10g, i.p.
IMI 30	Imipramina 30mg/kg, i.p.
FLUO 10	Fluoxetina 10mg/kg, i.p.
BUP 20	Bupropiona 20mg/kg, i.p.
EHFAM 5	EHFAM 5mg/kg, i.p.
EHFAM 10	EHFAM 10mg/kg, i.p.
EHFAM 20	EHFAM 20mg/kg, i.p.

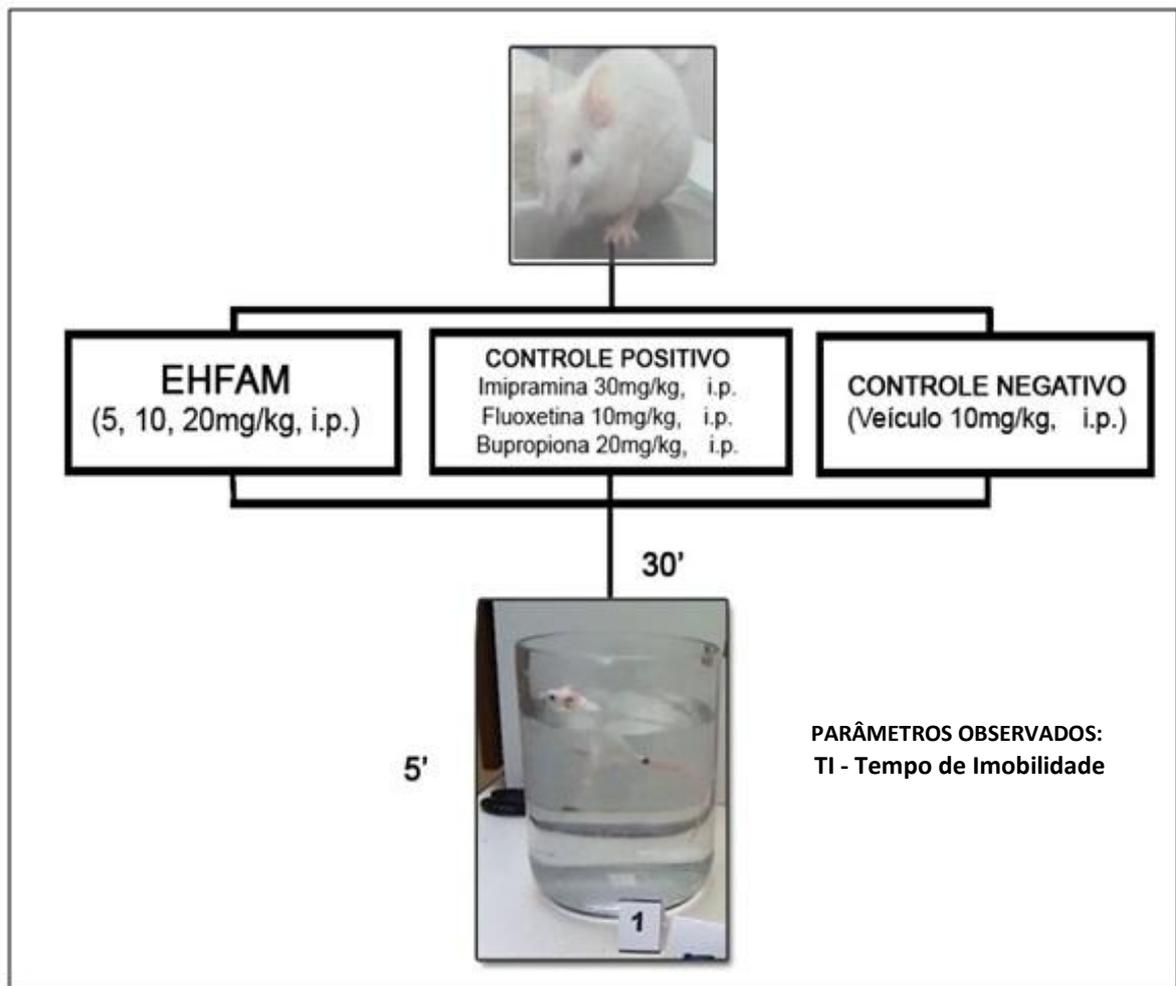


Figura 15: Esquema representativo da avaliação do efeito antidepressivo do EHFAM no teste de nado forçado (TNF).

3.8.2. Teste da acinesia induzida por reserpina:

Para este procedimento foi utilizada a metodologia segundo Askew (1963), na qual camundongos foram tratados previamente com reserpina (RES 10 mg/kg, i.p.). Decorridas 20 horas da administração da droga, os animais (nove por grupo) foram divididos em grupos que recerebram, respectivamente: CONT (salina, i.p., 0,1 mL/10g), IMI (imipramina 30 mg/Kg,i.p), FLUO (fluoxetina 10mg/kgv.i.p.), BUP (bupropiona 20mg/kg i.p) e EHFAM (5, 10 e 20mg/Kg, i.p.) (Tabela 16). Após 30 minutos, cada animal foi colocado no centro do aparelho do campo aberto para a avaliação da atividade locomotora (durante 5 minutos). O número de cruzamentos (NC) foi o parâmetro comportamental observado. Para o registro do NC, foram contados todos os quadrantes cruzados pelo animal, quando este se encontrava com as quatro patas dentro do mesmo quadrante.

Tabela 6: Grupos experimentais e drogas administradas no teste de acinesia induzida por reserpina.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TRATAMENTOS
RES	Reserpina 10mg/kg, i.p.
CONT	Salina 0,1 mL/10g, i.p.
IMI 30	Imipramina 30mg/kg, i.p.
FLUO 10	Fluoxetina 10mg/kg , i.p
BUP 20	Bupropiona 20mg/kg , i.p
EHFAM 5	EHFAM 5mg/kg, i.p.
EHFAM 10	EHFAM 10mg/kg, i.p.
EHFAM 20	EHFAM 20mg/kg, i.p.

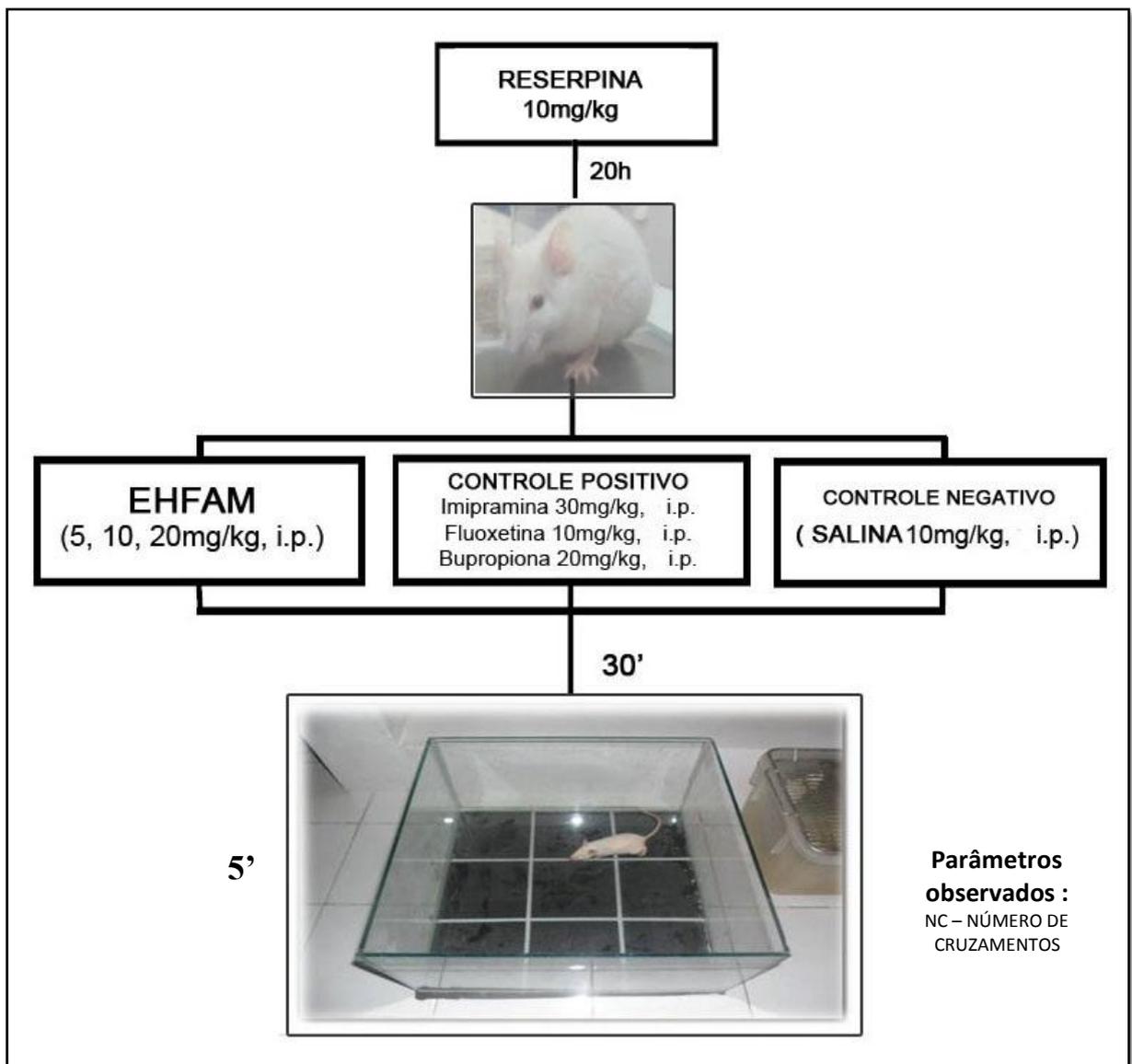


Figura16: Esquema de realização do teste de acinesia com reserpina.

3.8.3. Teste do campo aberto (TCA):

A fim de excluir a possibilidade de um eventual efeito estimulante que pudesse causar um efeito tipo antidepressivo falso-positivo, os camundongos foram submetidos ao teste do campo aberto, como descrito por (ARCHER, 1973). O campo aberto para camundongos foi confeccionado em vidro (30 x 30 x 15 cm) para melhor visualização dos animais (Figura 17). O interior do aparato foi subdividido em nove quadrantes iguais. Neste teste os animais foram divididos em grupos que recerebram, respectivamente: CONT (salina, i.p., 0,1 mL/10g), IMI (imipramina 30 mg/Kg,i.p), FLUO (fluoxetina 10mg/kgv.i.p.), BUP (bupropiona 20mg/kg i.p), EHFAM (5, 10 e 20mg/Kg, i.p.) E DZP (diazepam 2 mg/Kg, i.p.) (Tabela 6). Os animais foram colocados individualmente no campo aberto e durante 5 minutos foram observados os seguintes parâmetros: número de cruzamentos (NC – número de quadrantes cruzados pelo animal, quando este se encontrava com as quatro patas dentro do mesmo quadrante), número de *rearing* (NR – número de vezes que o animal colocava-se de pé, apoiado pelas patas traseiras) e o número de *grooming* (NG – movimentos de autolimpeza) (RODRIGUES et al., 2002; QUINTANS-JÚNIOR; ALMEIDA; ANTONIOLLI, 2005; OLIVEIRA et al., 2006).

Tabela 7: Grupos experimentais e respectivas drogas administradas no TCA.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TRATAMENTOS
CONT	Salina 0,1 mL/10g, i.p.
IMI 30	Imipramina 30mg/kg i.p.
FLUO 10	Fluoxetina 10mg/kg, i.p
BUP 20	Bupropiona 20mg/kg, i.p
DZP 2	Diazepam 2mg/kg, i.p.
EHFAM 5	EHFAM 5mg/kg, i.p.
EHFAM 10	EHFAM 10mg/kg, i.p.
EHFAM 20	EHFAM 20mg/kg, i.p.

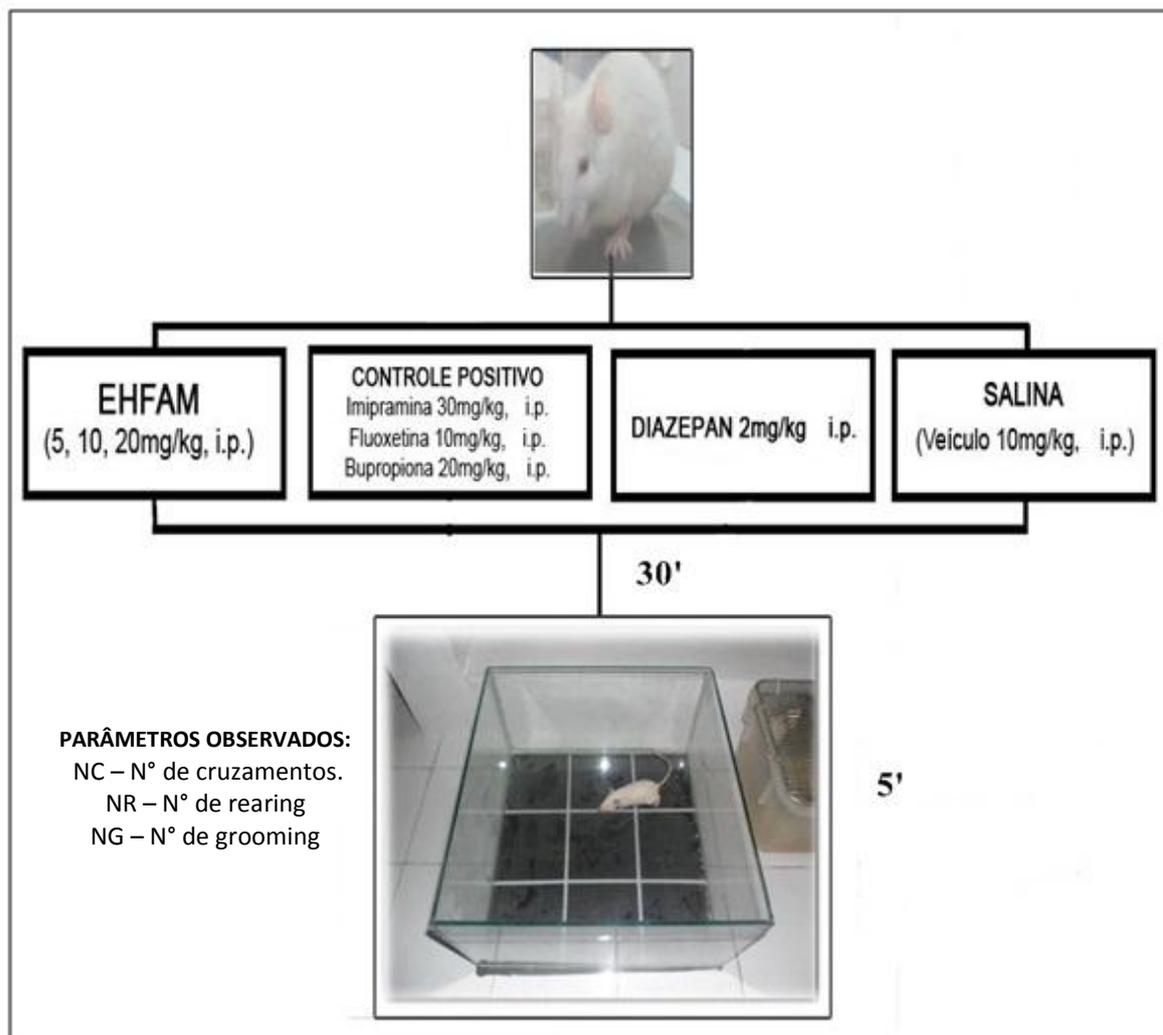


Figura 17: Esquema representativo da avaliação da atividade locomotora no teste do campo aberto (TCA).

3.8.4. Teste da potencialização do efeito tipo antidepressivo do EHFAM:

O TNF foi realizado mais uma vez, com o intuito de investigar a ocorrência de um possível efeito sinérgico decorrente da associação do EHFAM e de alguns antidepressivos padrões (Figura 18). Como descrito em parágrafos anteriores, foram utilizados cilindros de vidro transparente medindo 20 cm de altura e 15 cm de diâmetro, com volume total de 2L, contendo 1,5L de água a 27°C. Os animais (nove por grupo) foram divididos em grupos que recebem, respectivamente: CONT (salina, i.p., 0,1 mL/10g), IMI (imipramina 1 e 30 mg/Kg,i.p), FLUO (fluoxetina 1 e 10mg/kgv.i.p.), BUP (bupropiona 1 e 20mg/kg i.p), EHFAM (0,5 e 5 mg/Kg, i.p.), além das associações IMI 1 + EHFAM 0,5 (imipramina 1 mg/kg, i.p. + EHFAM 0,5 mg/kg, i.p.), FLU 1 + EHFAM 0,5 (fluoxetina 1 mg/kg, i.p. + EHFAM 0,5 mg/kg, i.p.) e BUP 1 + EHFAM 0,5 (bupropiona 1 mg/Kg, i.p. + EHFAM 0,5 mg/Kg, i.p.) (Tabela 7). Após trinta minutos da administração, cada animal foi colocado para nadar no cilindro por um tempo de 5 minutos. O parâmetro comportamental observado neste teste foi o tempo durante o qual o animal permaneceu imóvel (tempo de imobilidade – TI), sendo considerado imóvel quando o camundongo flutuava ou realizava apenas movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água (ALMEIDA, 2006).

Tabela 8: Grupos experimentais e respectivas drogas administradas no teste de potencialização do efeito tipo antidepressivo do EHFAM.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TRATAMENTOS
CONT	Salina 0,1 mL/10g, i.p.
IMI 1 e 30	Imipramina 1 e 30mg/kg i.p.
FLUO 1 e 10	Fluoxetina 1 e 10mg/kg, i.p
BUP 1 e 20	Bupropiona 1 e 20mg/kg, i.p
EHFAM 0,5 e 5	EHFAM 0,5 e 5mg/kg, i.p.
IMI 1 + EHFAM 0,5	Imipramina 1 mg/kg, i.p. + EHFAM 0,5 mg/kg, i.p.
FLU 1 + EHFAM 0,5	Fluoxetina 1 mg/kg, i.p. + EHFAM 0,5 mg/kg, i.p.
BUP 1 + EHFAM 0,5	Bupropiona 1 mg/kg, i.p. + EHFAM 0,5 mg/kg, i.p.

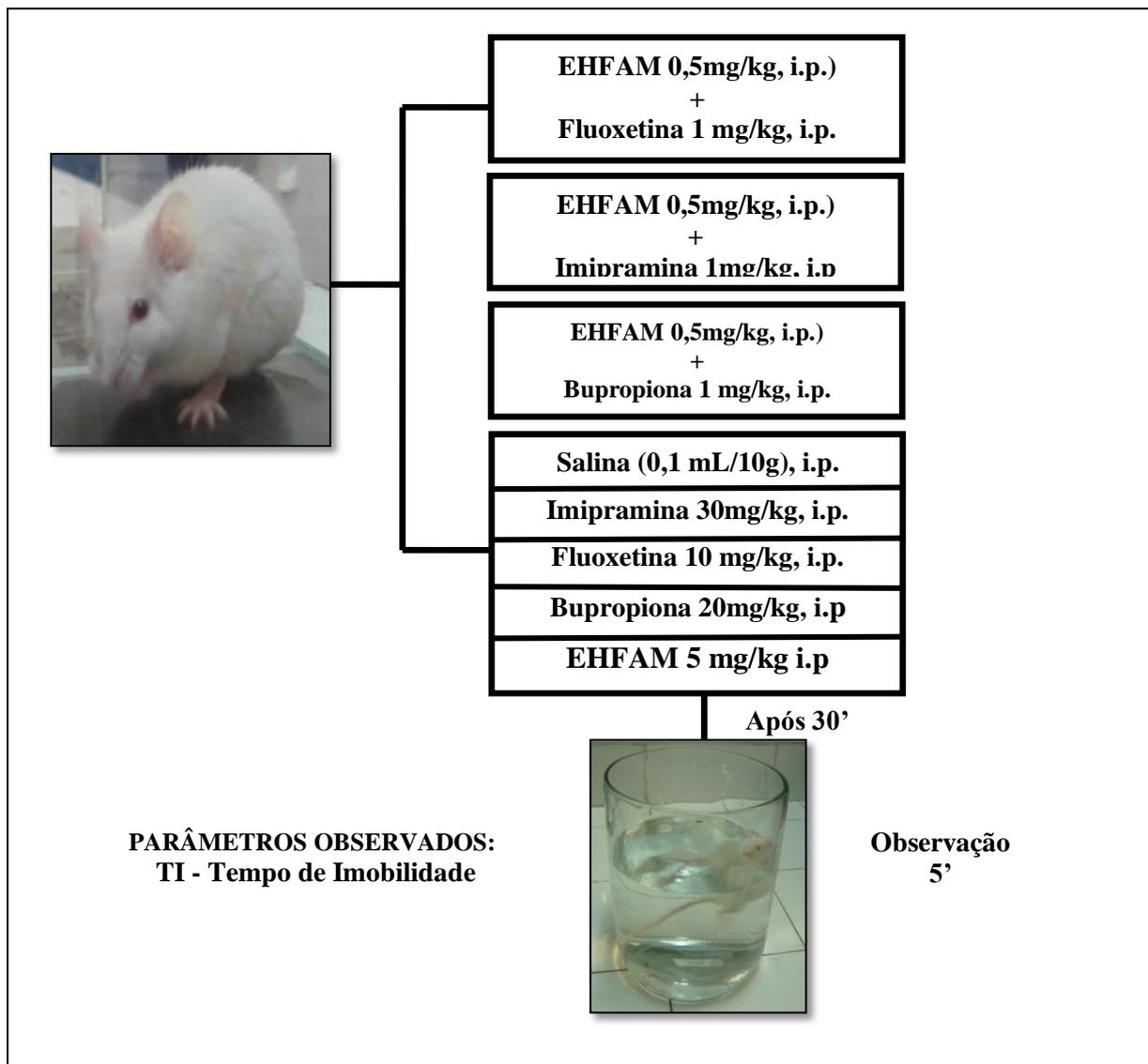


Figura 18: Esquema de avaliação do envolvimento dos sistemas monoaminérgicos, noradrenergicos e dopaminérgicos no efeito tipo-antidepressivo do EHFAM.

3.8.5. Avaliação do efeito do EHFAM sobre o limiar de convulsão em animais tratados com PTZ.

O efeito do EHFAM sobre o limiar de convulsão foi avaliado através do modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ). Os animais (nove por grupo) foram divididos e pré-tratados com: CONT (salina, i.p., 0,1 mL/10g), PTZ (pentilenotetrazol 40 e 80 mg/Kg, i.p.), IMI (imipramina 30 mg/Kg,i.p), FLUO (fluoxetina 10mg/kg i.p.), BUP (bupropiona 1 e 20mg/kg i.p) e EHFAM (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) (Tabela 9). Decorridos 30 minutos, os animais tratados com os antidepressivos padrões e com EHFAM receberam uma dose de PTZ 40 mg/Kg, i.p. A análise comportamental consistiu na observação dos animais individualmente por um período de 30 minutos, quanto ao aparecimaneto da primeira convulsão clônica ou tônico-clônica (latência de 1ª convulsão – LC, em segundos) e o tempo decorrido da administração do PTZ até a morte do animal (latência de morte – LM, em segundos) (Figura 19).

Tabela 9: Grupos experimentais e drogas administradas no teste de avaliação do efeito do EHFAM sobre o limiar de convulsão em animais tratados com PTZ.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TRATAMENTOS
SALINA	Salina, 0,1mL/10g, i.p.
PTZ 40	PTZ 80mg/kg, i.p.
PTZ 80	PTZ 40mg/kg, i.p.
IMI 30	Imipramina 30mg/kg i.p.
FLUO 10	Fluoxetina 10mg/kg, i.p
BUP 20	Bupropiona 20mg/kg, i.p
EHFAM 5	EHFAM 5mg/kg, i.p.
EHFAM 10	EHFAM 10mg/kg, i.p.
EHFAM 20	EHFAM 20mg/kg, i.p.

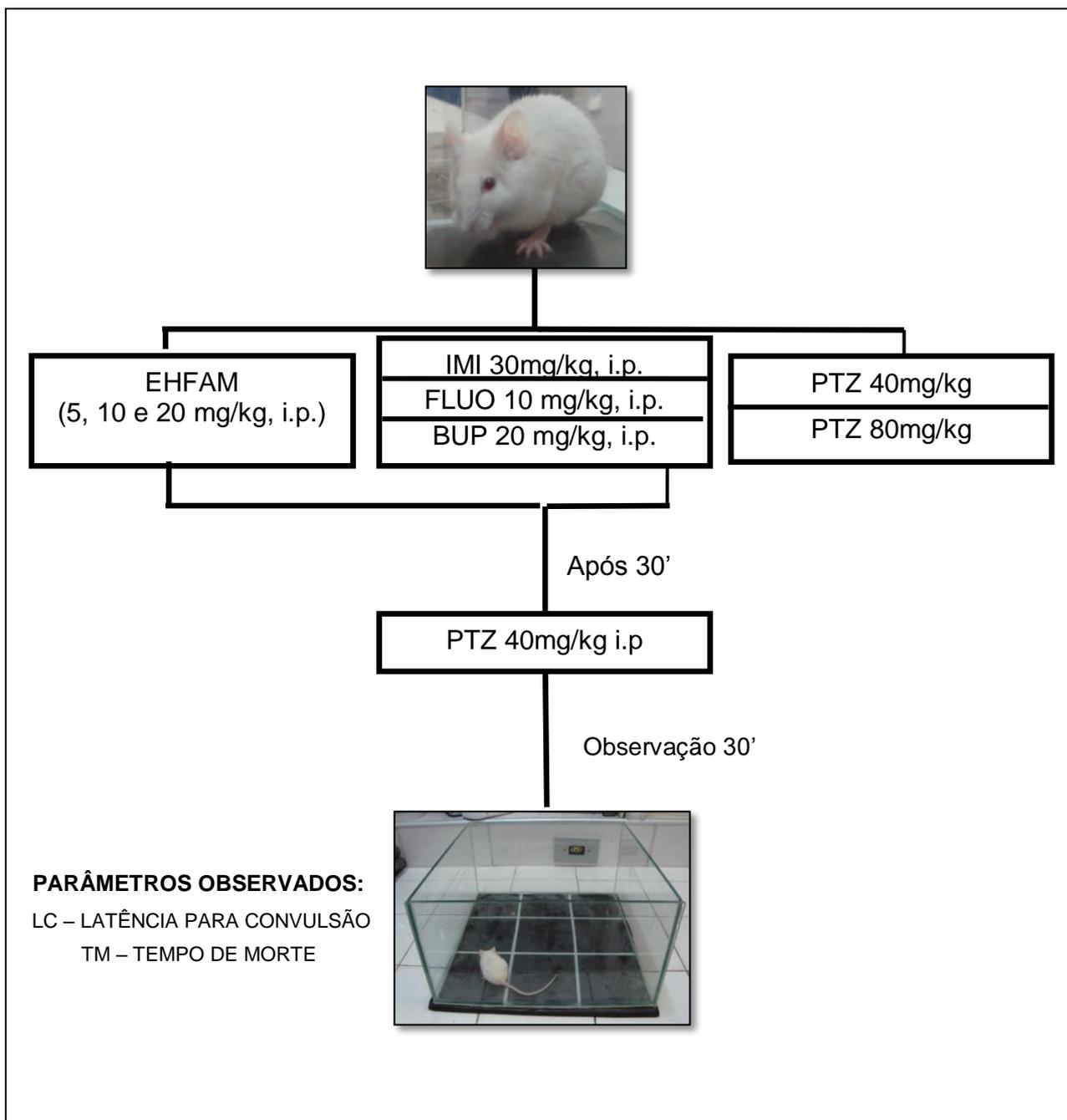


Figura 19: Esquema representativo da investigação do efeito do EHFAM sobre o limiar de convulsão em animais tratados com PTZ.

3.8.6. Teste dos tremores induzidos por oxotremorina:

O experimento foi realizado segundo a técnica descrita por Fukuzaki et al. (2000). Os animais (nove por grupo) foram divididos e pré-tratados com: CONT (salina, 0,1 mL/10g, i.p.), ATRO (atropina 10 mg/Kg, i.p.) e EHFAM (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) (Tabela 9). Decorridos 30 minutos, cada animal recebeu uma injeção de oxotremorina (0,5 mg/Kg, i.p.) e teve seu comportamento avaliado 10, 20 e 30 min após a administração deste último composto. A intensidade dos tremores apresentados pelos animais foi avaliada de acordo com a escala descrita por Coward et al. (1977):

- 0 - Ausência de tremores;
- 1 - Tremores fracos e isolados;
- 2 - Tremores moderados e pouco persistentes;
- 3 - Tremores intensos e persistentes.

Tabela 10:: Grupos experimentais e drogas administradas no teste tremores induzidos por oxotremorina.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TRATAMENTOS
OXO 0,5	Oxotremorina 0,5mg/kg, i.p.
SALINA	Salina, 0,1mL/10g, i.p.
IMI 30	Imipramina 30mg/kg, i.p.
FLUO 10	Fluoxetina 10mg/kg , i.p
BUP 20	Bupropiona 20mg/kg , i.p
EHFAM 5	EHFAM 5mg/kg , i.p.
EHFAM 10	EHFAM 10mg/kg , i.p.
EHFAM 20	EHFAM 20mg/kg , i.p.

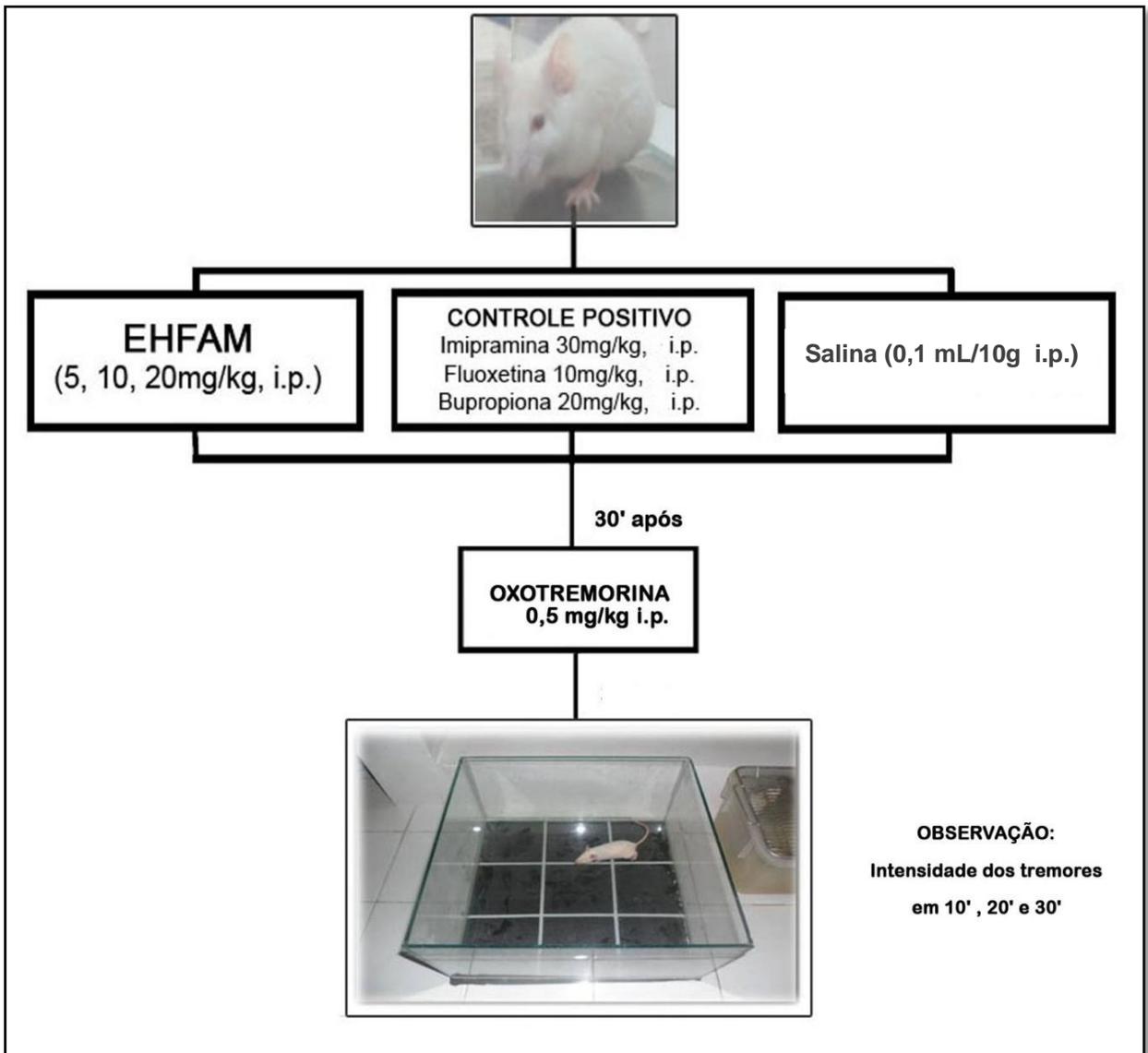


Figura 20: Esquema representativo do teste de tremores induzidos por oxotremorina.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados que obedeceram a uma distribuição paramétrica foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls (*post hoc*), e teste “t” para os resultados não-paramétricos. Em todas as análises estatísticas, os valores foram representados pela Média \pm Erro Padrão da Média (EPM), sendo considerado o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EHFAM:

A análise fitoquímica do EHFAM revelou a presença de diversos compostos, os quais são apresentados na tabela abaixo.

Tabela 11: Análise fitoquímica do EHFAM.

METABÓLITO SECUNDÁRIOS	RESULTADO
Fenóis	-
Taninos condensados	-
Antocianinas	-
Antocianidinas	-
Flavonas	+
Flavonóis	+
Xantonas	+
Chalconas	-
Auronas	+
Flavononóis	+
Catequinas	-
Flavononas	+
Leucoantocianidinas	-
Alcalóides	+

4.2. ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A CLAE do EHFAM revelou a presença dos seguintes compostos: ácido gálico (tR = 10,09 min, pico 1), catequina (tR = 16,32 min, pico 2); ácido clorogênico (tR = 20,57 min, 3 de pico), ácido caféico (tR = 24,93 min, pico 4), ácido elágico (tR = 29,86 min, pico 5) epicatequina (tR = 34,19 min, pico de 6), a rutina (tR = 39,05 min, pico 7), isoquercitrina (tR = 44,89 min, pico de 8), quercitrina (tR = 47,61 min, pico de 9), quercetina (tR = 51,07 min; pico 10) e kaempferol (tR = 61,20 min; pico 11) (figura 21 e tabela 12).

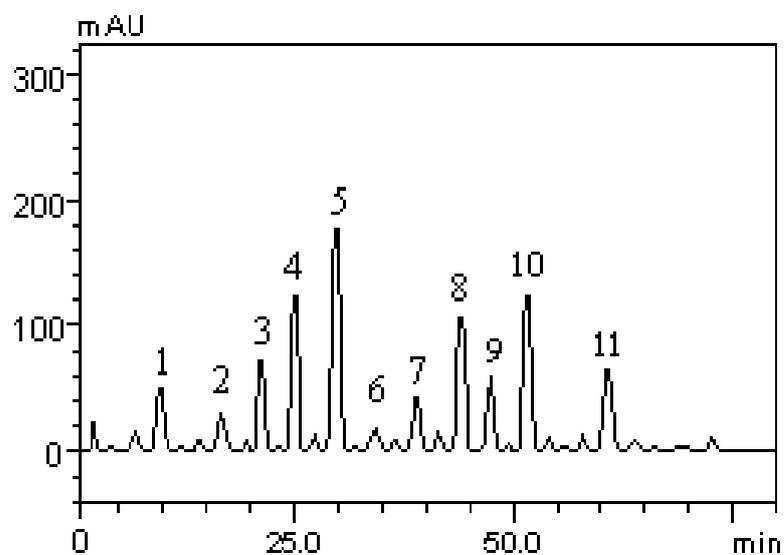


Figura 21: Cromatograma do EHFAM (detecção UV a 325nm).

Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 12: Análise da composição química do EHFAM por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

COMPOSTOS	EHFAM mg/g	LOD µg/mL	LOQ µg/mL
Ácido gálico	5.31 ± 0.02 a	0.015	0.049
Catequina	2.79 ± 0.01 b	0.032	0.105
Ácido clorogênico	6.25 ± 0.01 c	0.009	0.029
Ácido cafeico	10.14 ± 0.03 d	0.024	0.078
Ácido elágico	13.07 ± 0.02 e	0.013	0.042
Epicatequina	1.83 ± 0.01 f		
Rutina	5.20 ± 0.01 a	0.027	0.090
Isoquercitrina	9.64 ± 0.03 g	0.008	0.026
Quercitrina	6.19 ± 0.01 c	0.035	0.114
Quercetina	10.21 ± 0.02 d	0.019	0.063
Kampferol	6.27 ± 0.03 c	0.026	0.085

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão (SD) de três determinações. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey para valores de $p < 0,001$.

A investigação farmacológica de produtos naturais que apresentam atividade sobre o SNC tem auxiliado a compreensão das bases neuroquímicas de muitas doenças (PASSOS et al., 2009). Os metabólitos secundários são divididos em três grupos principais: os compostos fenólicos, os terpenos e os compostos nitrogenados. Dentre os metabólitos secundários mais estudados na pesquisa científica estão os terpenóides (substâncias isoprênicas) e os flavonóides (compostos fenólicos), que constituem grupos de pigmentos com ampla distribuição na natureza (CAMPOS, 2008). Compostos fenólicos, comumente encontrados em vegetais, frutas e muitos alimentos, estão presentes na dieta, tais como tocoferol, ácido ascórbico, carotenóides e fenólicos, estão entre as mais potentes substâncias bioativas e terapeuticamente úteis, proporcionando benefícios de saúde associados com a redução risco de diversas doenças crônicas e degenerativas (SILVA & JORGE, 2011).

A análise fitoquímica do EHFAM revelou a presença de metabólitos secundários como: Flavonas, Flavonóis, Xantonas, Chalconas, Auronas, Flavononóis, Catequinas, Flavononas e alcaloides. Estes resultados corroboram com Oliveira(2013), que identificou um perfil fitoquímico semelhante aquele apresentado em nossa pesquisa. Outros estudos

químicos com a *A. muricata* L. conduziram ao isolamento de compostos de diversas classes, tais como: alcaloides, terpenoides, carboidratos, polifenóis, lipídeos e ácidos aminados. (REIS, 2011; LUNA, 2006). Compostos polifenólicos naturais e seus análogos constituem um grupo heterogêneo de metabólitos secundários vegetais conhecidos por apresentar várias atividades biológicas. Estes compostos são classificados quimicamente em ácido fenólicos e análogos, estilbenos, flavonóides e um quarto grupo que inclui as cumarinas, lignanos etaninos (FRESCO et al., 2006).

Provenci (2007) afirma que alcaloides e flavonoides são considerados os principais constituintes químicos que apresentam um efeito modulador do sistema nervoso central. Pesquisas recentes concentram-se na possibilidade do uso de produtos naturais, especialmente flavonóides, para o desenvolvimento de medicamentos com ação antidepressiva, ou como uma alternativa complementar para o tratamento da depressão (Borges Filho et al., 2013; Liu et al., 2014; Mao et al., 2014).

Compostos fenólicos derivados de plantas são divididos em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (Naczki e Shahidi, 2004). Nesse contexto, flavonoides isolados de plantas, como luteolina, hesperidina, apigenina, crisina, rutina, e quercetina têm demonstrado efeitos protetores em doenças cardíacas, renais, hepáticas, neurológicas/psiquiátricas e neoplásicas (Pietta, 2000; Sequeto et al., 2012). Um ensaio clínico revelou que a administração crônica e subcrônica de compostos fenólicos levou a uma menor prevalência de sintomas depressivos em indivíduos idosos japoneses (Niu et al., 2009).

Zhu et al. (2012) observaram a menor incidência dos sintomas da depressão sob parâmetros comportamentais e bioquímicos em camundongos que foram tratados com polifenóis presentes no chá verde. O ácido cafeico, um dos constituintes presentes na semente do café, apresentou efeito sugestivo de ação antidepressiva no teste do nado forçado e em um modelo de estresse. Porém, ensaios bioquímicos destes mesmos estudos sugerem que o efeito não deva ocorrer pela inibição da MAO ou inibição da recaptação de monoaminas, e sim por outras vias (Takeda *et al.*, 2002a; 2002b). Em estudos realizados por Takeda *et al.*, (2003) e Alves (2009), demonstraram que o ácido cafeico possui efeito ansiolítico e antidepressivo quando administrado em animais sujeitos a stress, aparentemente através de uma modulação indirecta dos receptores adrenérgicos $\alpha 1A$.

Estudos realizado por Girish (2012), mostraram que o ácido elágico quando administrada de forma aguda ou crônica em camundongos (25, 50 e 100 mg / kg, po),

produziu uma redução significativa na duração de imobilidade, com um perfil comparável a fluoxetina (20 mg / kg,v.o.), no entanto, o tratamento com ácido elágico não teve nenhum efeito sobre a actividade locomotora quando testado no campo aberto.

Ainda, corroborando com os resultados da nossa pesquisa, estudos realizados por Dhingra(2012) também observaram atividade antidepressiva na administração aguda do ácido elágico.

A quercetina é um polifenol pertencente à classe dos flavonóides que tem demonstrado inúmeras atividades farmacológicas (FRESCO et al., 2006).Este polifenol também teve seu efeito tipo-antidepressivo demonstrado, através da redução do tempo de imobilidade no teste do nado forçado (Kaur et al., 2007; Bhutada et al., 2010.), e também mostrou ser capaz de inibir a atividade da enzima MAO-A (Chimenti et al., 2006; Saaby et al., 2009). Dimpfel (2009) demonstrou recentemente, em experimentos de eletrofarmacografia da atividade elétrica do cérebro de rato, que após a administração oral de quercetina, os padrões apontam para um efeito inibitório sobre a enzima monoaminoxidase, sugerindo efeito do tipo antidepressivo e corroborando com experimentos realizados anteriormente tanto in vitro (LEE et al., 2001),como in vivo (ANJANEYULU et al., 2003).

Um fator que deve ser levado em consideração é que a concentração e a diversidade dos alcaloides podem sofrer influencia do habitat, da distribuição geográfica, e do período da coleta, resultando em variação ecogeográfica de quiomiotipos (LEVIN, 1976; EGYDIO, 2009). Ainda as propriedades observadas no EHFAM , odem está relacionada não somente um composto presente em sua constiuição, mas pela ação sinérgica das junção dos mesmos.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho devem ser observados levando em consideração os fatores supracitados que podem influenciar na composição química e, conseqüentemente, nos efeitos farmacológicos do EHFAM.

4.3. Efeito do EHFAM (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) sobre o tempo de imobilidade (TI) em camundongos submetidos ao teste do nado forçado (TNF):

O efeito tipo-antidepressivo do EHFAM foi avaliado no teste de nado forçado, através da análise do tempo de imobilidade (em segundos) do animal no cilindro com água (figura 22). As drogas antidepressivas padrão imipramina 30 mg/kg ($64,00 \pm 3,16$), fluoxetina 10mg/kg ($91,11 \pm 5,81$), bupropiona 20mg/kg ($67,64 \pm 9,58$) e o EHFAM (5, 10 e 20 mg/kg: $102,7 \pm 6,85$; $135,2 \pm 11,59$; $132,0 \pm 9,67$, respectivamente) diminuíram significativamente o tempo de imobilidade dos animais em relação ao grupo controle ($184,1 \pm 14,92$). Um efeito dose-resposta foi observado apenas com a menor dose do extrato, quando comparada com as outras duas doses do material vegetal. Ressalta-se que os grupos tratados com EHFAM 5,10 e 20 mg/kg reduziram em 44,2% , 27,8% e 25,1% respectivamente, o tempo de imobilidade dos animais em relação ao grupo controle (salina).

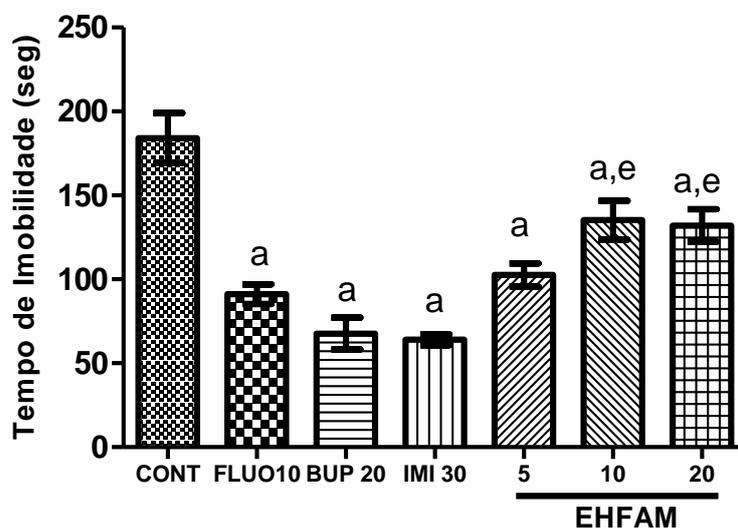


Figura 22: Efeito do EHFAM (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) sobre o tempo de imobilidade (TI) em camundongos submetidos ao teste do nado forçado (TNF). As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keusl (*post hoc*). Valores significativos: "a" e "e" vs CONT e EHFAM 5, respectivamente, quando $p < 0,05$. CONT = Controle, FLUO = fluoxetina 10mg/kg; BUP = bupropiona 20mg/kg; IMIP = Imipramina 30mg/Kg; 5 = EHFAM 5 mg/kg; 10 = EHFAM 10 mg/Kg; 20 = EHFAM 20 mg/Kg.

4.4. Efeito do EHFAM sobre camundongos submetidos ao teste da acinesia induzida por reserpina:

O efeito tipo antidepressivo do EHFAM foi avaliado sobre a acinesia induzida por reserpina. O número de cruzamentos no campo aberto foi o parâmetro avaliado. Na figura 23 observa-se que a reserpina 10mg/kg i.p ($19,11 \pm 1,38$) reduziu significativamente o número de cruzamentos (NC) dos animais em relação ao grupo controle ($56,3 \pm 3,36$). Este efeito foi parcialmente revertido com a administração dos antidepressivos padrão Imipramina 30 mg/kg, Fluoxetina 10 mg/kg e Bupropiona 20 mg/kg ($37,4 \pm 4,70$; $45,3 \pm 5,61$ e $37,78 \pm 4,7$, respectivamente). O EHFAM na dose de 5mg/kg aumentou de forma significativa o NC quando comparados com o grupo reserpina. Porém, as doses de 10 e 20 mg/kg do extrato ($16,44 \pm 2,81$; $19,33 \pm 1,65$, respectivamente), não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo tratado apenas com reserpina.

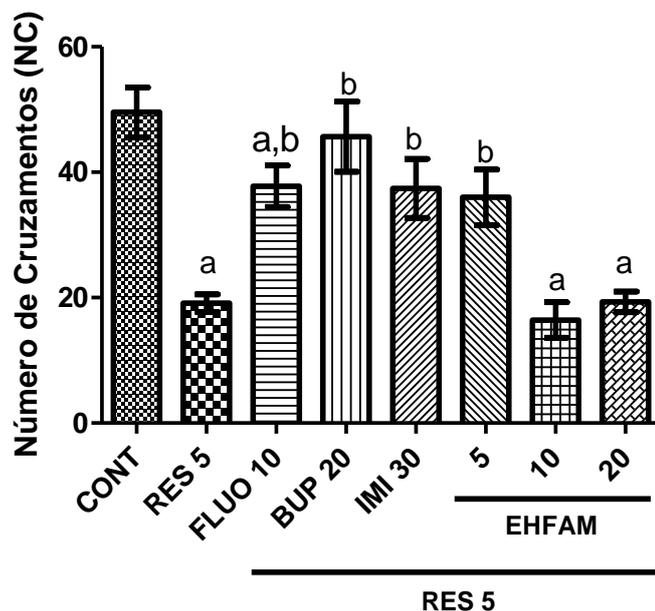


Figura 23: GEfeito do EHFAM sobre camundongos submetidos ao teste da acinesia induzida por reserpina. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keusl (*post hoc*). Valores significativos: "a" e "b" vs CONT e RES 5, respectivamente, quando $p < 0,05$. CONT = Controle; RES = reserpina; FLUO = fluoxetina 10mg/kg; BUP = bupropiona 20mg/kg; IMIP = Imipramina 30mg/Kg; 5 = EHFAM 5 mg/kg; 10 = EHFAM 10 mg/Kg; 20 = EHFAM 20 mg/Kg.

O transtorno depressivo é uma condição clínica amplamente debilitante e prevalente na população mundial, associada com morbidade e mortalidade (NESTLER e CARLEZON, 2006; NEMEROFF et al., 2007). A interação entre os sistemas monoaminérgicos tem sido base para entender a fisiopatologia dessa doença e o desenvolvimento de novos fármacos (PRYOR *et al.*, 1991). Os agentes antidepressivos atualmente oferecem melhores resultados terapêuticos e menores taxas de efeitos colaterais para a maioria dos pacientes (BERTON; NESTLER, 2006). Atualmente existe uma grande necessidade de buscar novos alvos terapêuticos, a fim de tratar pacientes resistentes a tratamentos clássicos e diminuir os efeitos colaterais que ocorrem com o uso de antidepressivos.

Em animais, não há estado que corresponda exatamente à condição inata da depressão em seres humanos. Entretanto, vários procedimentos experimentais produzem em animais estados comportamentais (perda da interação social, perda de apetite, redução da atividade motora, estresse, entre outros), típicos da depressão humana (PORSOLT et al., 1987). O modelo animal mais amplamente utilizado para triagem de novas drogas antidepressivas é o teste do nado forçado (PORSOLT *et al.*, 1977). Quando camundongos são forçados a nadar no TNF, onde não há possibilidade de escapar, eventualmente cessam a luta e rendem-se à situação estressante. Este estado de imobilidade é, portanto, considerado como um desespero comportamental, o qual pode ser traduzido como comportamento depressivo (PORSOLT *et al.*, 1977, 1978). Desta forma, diversos estudos sugerem que drogas que diminuem o tempo de imobilidade no TNF podem sugerir possível ação antidepressiva (MELO, 2006 *et al.*; SILVA, 2007; KULKARNI; DIRH, 2007).

Embora este modelo não reproduza adequadamente a sintomatologia da depressão em humanos, ele apresenta um alto valor preditivo na investigação de substâncias antidepressivas (WILLNER, 1984; 1997), uma vez que antidepressivos clássicos reduzem o tempo de imobilidade neste teste (PORSOLT *et al.*, 1977; CRYAN *et al.*, 2002).

Os resultados dos testes demonstraram que a administração aguda EHFAM, reduziu significativamente o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, nas doses avaliadas, tendo sua melhor atuação na menor dose, apresentando assim uma possível atividade do tipo antidepressiva. Estes dados corroboram com estudos realizados anteriormente por Oliveira(2013)*in press*, em nosso grupo de pesquisa, onde doses maiores do EHFAM(25,0,100 mg/kg) apresentaram efeito tipo antidepressivo ao diminuírem o tempo de imobilidade de camundongos no teste de natação forçada. Segundo Hasrat *et al* (1997) estudos

com o fruto da *A. muricata* apresentou efeito tipo antidepressivo, atribuído aos alcalóides isoquinolínicos, no qual foi sugerido uma ação agonista destes compostos sobre receptores 5-HT_{1A} (HASRAT, 1997). Outro composto presente em *A. muricata* é a quercetina, que também teve seu efeito tipo antidepressivo demonstrado através da redução do tempo de imobilidade no TNF (Kaur et al., 2007; Bhutada et al., 2010.), e também ao inibir a atividade da enzima MAO-A (Chimenti et al., 2006; Saaby et al., 2009). Ainda, alguns autores atribuem esse efeito tipo antidepressivo aos compostos fenólicos tais como ácido elágico e ácido cafeito, presentes em no EHFAM (Niu et al., 2009; Girish,201; Dhigra,2012).

Em estudos anteriores, Caparros-Lefebvre e Elbaz (1999) também relacionaram o efeito antidepressivo da graviola aos alcalóides do tipo reticulina, que tem mostrado tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo*, atividade antagonista dopaminérgica e agonista serotoninérgica, a qual se associa à atividade antidepressiva. Segundo Vázquez (2013), Várias espécies de *Annona* (Annonaceae) são utilizadas na medicina tradicional mexicana por apresentarem efeitos anticonvulsivantes e propriedades antidepressivas.

Estudos realizados por Díaz-Véliz (2012) com as folhas de *A. muricata*, também evidenciaram atividade antidepressiva nas doses de 12,5 e 25 mg/Kg, i.p. Neste trabalho os autores sugerem o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos na ação do extrato. Todavia, no estudo de Oviedo (2009), não foi observada atividade tipo antidepressiva do extrato, mesmo em doses altas (500 mg/Kg, v.o.). Esta diferença pode estar relacionada não somente à dose, mas também à via de administração que difere dos demais trabalhos realizados e à composição do extrato.

Para confirmação de um possível efeito tipo antidepressivo do EHFAM, foi realizado teste de acinesia induzida por reserpina, uma vez que os antidepressivos padrão são capazes de reverter as manifestações decorrentes da administração da reserpina .

A reserpina é um alcalóide extraído das raízes da planta *Rauwolfia serpentina*. A sua ação farmacológica foi descrita em detalhes pela primeira vez por Bein em 1953 (Gillis, 1974). Tem ação depressora do sistema nervoso central e efeito hipotensor, tendo sido utilizada clinicamente como um agente antipsicótico (Bear et al., 2008) e anti-hipertensivo. A reserpina interfere no armazenamento vesicular de monoaminas (dopamina, noradrenalina, adrenalina e serotonina), causando depleção destes neurotransmissores nos terminais nervosos, com conseqüente hipolocomoção e rigidez muscular transitórias, sendo estas respostas dependentes da dose utilizada (Colpaert, 1987; Gerlach e Riederer, 1996; Dawson, 2000). Recentemente, o uso de reserpina em doses consideradas baixas (0,1 – 1,0 mg/kg) tem

sido proposto como um modelo válido para o estudo dos prejuízos cognitivos (Alves et al., 2000; Prediger et al., 2005; Carvalho et al., 2006) e sintomas depressivos (Skalisz et al., 2002).

O teste de acinesia com reserpina foi utilizado como modelo de avaliação da função monoaminérgica anormal, através do qual os compostos antidepressivos foram diferenciados de outras drogas psicoativas (Askel, 1963; Metys et al., 1967). O pré-tratamento com reserpina provocou a redução do número de cruzamentos, no campo aberto, demonstrando o efeito acinéutico da droga, como descrito no parágrafo anterior. O efeito observado anteriormente resultou possivelmente da depleção dos estoques neuronais de noradrenalina, dopamina e serotonina (Goodwin et al, 1971).

Neste teste foi possível observar que o EHFAM reverteu o efeito da reserpina, de forma significativa, na dose 5mg/kg, o mesmo foi observado nos animais tratados com os antidepressivos imipramina, fluoxetina e bupropiona. No entanto esse comportamento não foi observado nas doses de 10 e 20 mg/Kg do extrato. Tomados em conjunto, os resultados observados até o presente momento indicam que o efeito tipo antidepressivo do EHFAM parece envolver a neurotransmissão monoaminérgica, uma vez que o EHFAM apresentou comportamento semelhante aos antidepressivos padrões que atuam pela via das monoaminas.

Entretanto, os modelos como o teste de natação forçada e acinesia induzida por reserpina, são testes baseados na resposta motora do animal e, portanto, drogas que aumentam a atividade motora (psicoestimulantes) podem fornecer resultados falso-positivos (BORSINI; MELI, 1998). De fato, é mostrado na literatura que drogas estimulantes como a cafeína ou anfetaminas, reduzem a duração da imobilidade nos referidos testes (VIEIRA *et al.*, 2008). Para descartar essa possibilidade, investigou-se o efeito do EHFAM no teste do campo aberto (TCA), um teste clássico utilizado para avaliar efeitos das drogas sobre a atividade motora dos animais (NOVAS *et al.*, 1988).

4.5. Teste do campo aberto (TCA)

Os parâmetros analisados no campo aberto foram o número de cruzamentos (NC – foram contados todos os quadrantes cruzados pelo animal, quando este se encontrava com as quatro patas dentro do mesmo quadrante), o número de *rearing* (NR - exploração vertical) e o número de *grooming* (movimento de auto-limpeza), conforme mostrados nas figuras 21, 22, 23. Na figura 24, observa-se que a dose de 5mg/kg i.p., ($79,8 \pm 5,84$) do EHFAM não apresentou diferença significativa no NC em relação ao grupo controle ($83,33 \pm 1,65$). No entanto, houve uma redução do número de cruzamentos nas doses de 10 e 20 mg/kg, i.p. ($61,22 \pm 3,4$; $62,00 \pm 3,39$ respectivamente), demonstrando um possível efeito sedativo do extrato. Em termos percentuais, o EHFAM nas doses de 10 e 20 mg/kg reduziu o NC em 26,5% e 25,5% respectivamente, em relação ao grupo controle. Os animais tratados com o DZP 2 mg/kg, i.p. ($44,67 \pm 7,71$) e imipramina 30mg/kg,i.p. ($53,56 \pm 6,16$) também apresentaram redução deste parâmetro com percentual de redução de 46,3% e 35,7% respectivamente em relação ao controle (figura 24).

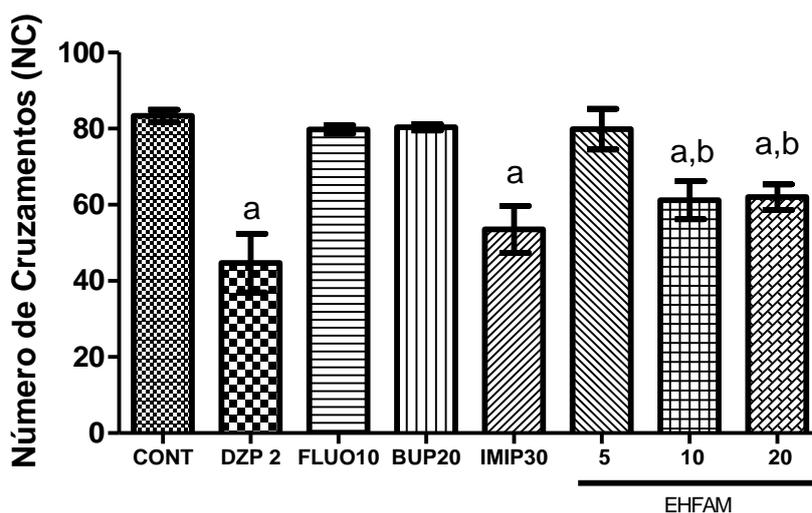


Figura 24: Efeito do EHFAM (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) sobre o número de cruzamentos. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keusl (*post hoc*). Valores significativos: "a" e "b" vs CONT e DZP 2, respectivamente, quando $p < 0,05$. CONT = Controle, DZP 2 = diazepam 2 mg/Kg, FLUO = fluoxetina 10mg/kg; BUP = bupropiona 20mg/kg; IMIP = Imipramina 30mg/Kg, 5 = EHFAM 5 mg/kg; 10 = EHFAM 10 mg/Kg, 20 = EHFAM 20 mg/Kg.

De forma semelhante, o EHFAM também reduziu o número de *grooming*, na dose de 20 mg/kg ($1,33 \pm 0,16$) em relação ao grupo controle ($2,44 \pm 0,17$) em 45,45%. As demais doses do extrato não apresentaram tal efeito. O tratamento com DZP 2mg/kg, i.p. ($0,88 \pm 0,30$) e a imipramina 30mg/kg,i.p($0,77 \pm 0,14$), também apresentaram redução deste parâmetro com percentual de redução de 63,9% e 68,4%, respectivamente, em relação ao grupo controle (figura 25). É importante ressaltar que, quando comparadas entre si, as doses de 5 e 20mg/kg do EHFAM apresentam diferença significativa, indicando um efeito dose-resposta.

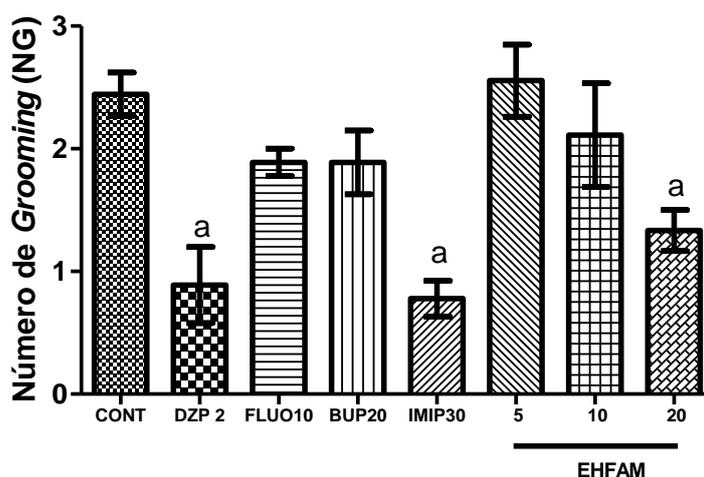


Figura 25: Efeito do EHFAM (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) sobre o número de *grooming*.. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keusl (*post hoc*). Valores significativos: "a" vs CONT, quando $p < 0,05$. CONT = Controle, DZP 2 = diazepam 2 mg/Kg, FLUO = fluoxetina 10mg/kg; BUP = bupropiona 20mg/kg; IMIP = Imipramina 30mg/Kg, 5 = EHFAM 5 mg/kg; 10 = EHFAM 10 mg/Kg, 20 = EHFAM 20 mg/Kg.

No tocante ao número de *rearing* (figura 26), observa-se que a dose de 5mg/kg ($36,89 \pm 1,47$) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle ($36,7 \pm 3,27$). A doses de 10 e 20 mg/kg i.p. ($28,44 \pm 1,77$ e $21,67 \pm 0,91$) apresentaram redução deste parâmetro quando comparados em relação ao grupo controle ($36,7 \pm 3,27$) de 22,6% e 41,1% respectivamente. O Diazepam 2mg/kg ($2,11 \pm 3,86$) a imipramina 30mg/kg também apresentaram redução deste parâmetro quando comparados em relação ao grupo controle correspondendo a 94,2% e 66,2%, respectivamente.

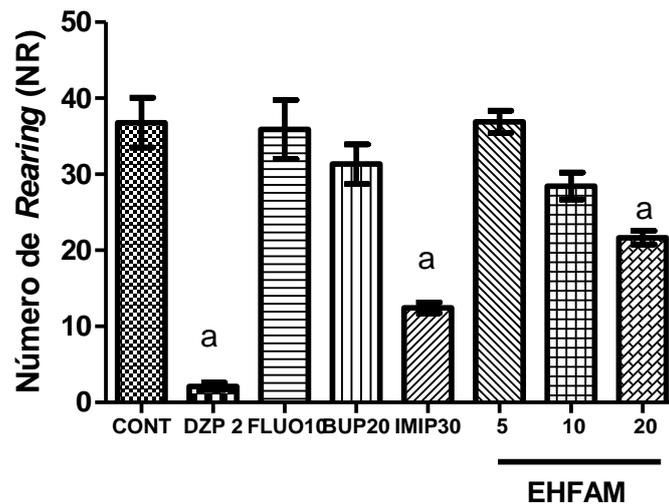


Figura 26: Efeito do EHFAM (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) sobre o número de *rearing*. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keuls (*post hoc*). Valores significativos: "a" vs CONT, quando $p < 0.05$. CONT = Controle, DZP 2 = diazepam 2 mg/Kg, FLUO = fluoxetina 10mg/kg; BUP = bupropiona 20mg/kg; IMIP = Imipramina 30mg/Kg, 5 = EHFAM 5 mg/kg; 10 = EHFAM 10 mg/Kg, 20 = EHFAM 20 mg/Kg.

O TCA foi utilizado neste estudo para verificar se a administração aguda do EHFAM poderia causar alguma alteração na atividade locomotor-exploratória no teste de nado forçado. Os efeitos de drogas psicoestimulantes podem ser diferenciados de antidepressivos por aumentarem a atividade motora (Borsini e Meli, 1988). Dessa forma, para excluir a possibilidade de que a redução no tempo de imobilidade produzida por determinado composto no TNF, seja devido a um aumento da atividade locomotora dos animais, é utilizado o TCA. Este teste permite avaliar o efeito de drogas sobre a atividade geral de animais (NOVAS et al, 1988). No teste do campo aberto o número de cruzamentos é considerado um índice de atividade locomotora enquanto que o número *rearing* é considerado índice de atividade exploratória (LOTUFO et al., 2004). Desta forma o modelo pode discriminar (dependendo do protocolo e do parâmetro observado) se a substância-teste exibe efeito ansiolítico ou efeito depressor (SILVA et al., 2006).

Para avaliar a atividade motora do animal no TCA, o parâmetro analisado foi o número de cruzamentos (número de quadrantes invadidos) do animal na arena (MARQUES et al., 2013). Um aumento na locomoção central ou no tempo gasto na parte central do aparelho pode ser interpretado como efeito ansiolítico, enquanto a redução da atividade vertical (*rearing*) e da locomoção está relacionada com a sedação ou com a prostração (CARLINI; MENDES, 2011). A atividade sedativa pode ser definida pela redução da atividade locomotora e redução da vigilância, o que minimiza a excitação excessiva (GUIMARÃES, 1999).

O EHFAM 5 mg/kg não promoveu alterações motoras, uma vez que não apresentou diferença significativa no NC, NG e NR em reação ao grupo controle no TCA. No entanto, as doses maiores, apresentaram redução em todos os parâmetros em relação ao grupo controle, sugerindo que o extrato pode causar efeito sedativo dose-dependente sobre o sistema nervoso central. Este fato pode ocorrer devido tanto a um efeito inibitório do extrato de *A. muricata* no SNC (atividade locomotora é uma medida através do nível de excitabilidade do sistema nervoso central) ou por ação periférica sobre a atividade muscular (HABIBI et al., 2012).

Neste teste o diazepam foi utilizado como droga padrão para efeito sedativo. Este efeito foi evidenciado através da redução significativa dos parâmetros analisados (número de cruzamentos – NC, número de *grooming* – NG e número de *rearing* – NR), o qual é decorrente da interação da droga com o receptor GABA_A (SOUSA et al., 2007). A imipramina também apresentou efeito semelhante. Entretanto, segundo, Ago et al. (2006), o efeito sedativo da imipramina ocorre devido ao bloqueio que essa droga causa sobre os receptores de histamina H1.

O comportamento de locomoção vertical, conhecido como *rearing*, é característico de excitabilidade do sistema nervoso central (SANTOS; JUNIOR; PRATA, 2012). A redução do número de *rearing*, por sua vez, sugere uma possível ação sedativa (OKOLI et al., 2010). Este comportamento é controlado pela estimulação e bloqueio de sub-tipos de receptores dopaminérgicos (DRAGO et al., 1999; CROMWELL et al., 1996) que estão sob controle e regulação de neurônios GABAérgicos (LUCETTI, 2010).

Estes resultados corroboram com Oliveira (2013) que, ao avaliar a atividade sedativa/ansiolítica do EHFAM nas doses de 25, 50 e 100mg/kg i.p., observou que as concentrações maiores do extrato causavam a diminuição de todos os parâmetros no teste de campo aberto e que, tal efeito foi decorrente da redução de dopamina no corpo estriado dos animais tratados

com o extrato, além da interação do mesmo com o sistema gabaérgico. Estes dados evidenciam que o EHFAM apresentou, em baixas doses, efeito tipo antidepressivo onde foi demonstrado que este efeito não foi decorrente de uma possível ação estimulante central do material vegetal.

4.6. Potencialização da atividade tipo antidepressiva do EHFAM no teste do nado forçado (TNF)

Os dados apresentados na figura 27 mostram o efeito da administração do EHFAM 0,5 e 5mg/kg isoladamente ou associado à fluoxetina 1 e 10 mg/Kg, i.p., no teste de nado forçado. Isoladamente, o EHFAM 5mg/kg ($55,11 \pm 7,882$) e FLU 10 mg/kg ($42,44 \pm 5,17$) reduziram o TI significativamente em relação ao grupo controle ($109,4 \pm 3,34$). Tal efeito não foi observado com os grupos tratados com as doses menores do extrato de do antidepressivo. Entretanto, a associação do EHFAM 0,5 e FLU 1 apresentou redução do TI ($45,22 \pm 7,06$), quando comparado com o grupo controle, de forma semelhante a EHFAM 5 mg/Kg e FLU 10 mg/Kg, indicando uma potencialização no efeito das drogas.

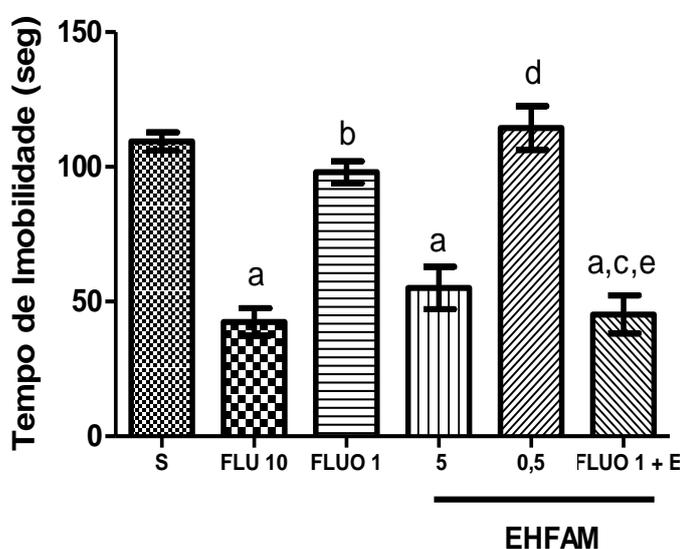


Figura 27: Potencialização da atividade antidepressiva do EHFAM com fluoxetina. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keusl (*post hoc*). Valores significativos: "a", "b", "d" e "e" vs CONT, FLUO 10, EHFAM 5 e EHFAM 0,5, respectivamente, quando $p < 0.05$. CONT = Controle, FLU = fluoxetina 1 e 10mg/kg, 0,5 e 5 = EHFAM 0,5 e 5 mg/kg e EHFAM 0,5 + FLU 1 = EHFAM 0,5 mg/kg, + fluoxetina 1mg/kg.

Os dados apresentados na figura 28 mostram o efeito da administração do EHFAM 0,5 e 5mg/kg isoladamente ou associado à bupropiona 1 e 20 mg/Kg, i.p., no teste de nado forçado. Isoladamente, o EHFAM 5mg/kg ($55,11 \pm 7,882$) e a bupropiona 20mg/kg ($38,44 \pm 5,635$) reduziram o TI significativamente em relação ao grupo controle ($109,4 \pm 3,34$). Tal efeito não foi observado com os grupos tratados com as doses menores do extrato de do antidepressivo. Entretanto, a associação do EHFAM 0,5 e BUP 1 apresentou redução do TI ($47,33 \pm 8,53$), quando comparado com o grupo controle, de forma semelhante a EHFAM 5 mg/Kg e BUP 20 mg/Kg, indicando uma potencialização no efeito das drogas.

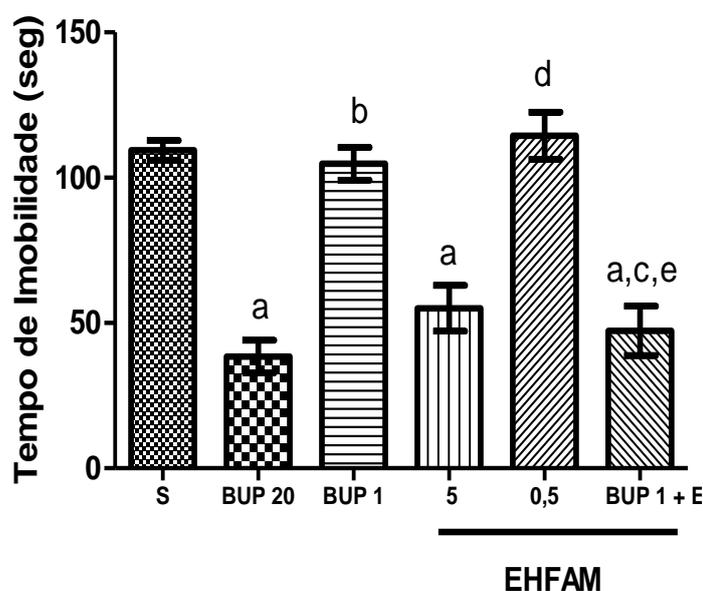


Figura 28 : Potencialização da atividade antidepressiva do EHFAM com Bupropiona. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keusl (*post hoc*). Valores significativos: "a", "b", "d" e "e" vs CONT, BUP 20, EHFAM 5 e EHFAM 0,5, respectivamente, quando $p < 0.05$. CONT = Controle, BUP = bupropiona 1 e 20mg/kg, 0,5 e 5 = EHFAM 0,5 e 5 mg/kg e EHFAM 0,5 + BUP 1 = EHFAM 0,5 mg/kg, + bupropiona 1mg/kg.

Os dados apresentados na figura 29 mostram o efeito da administração do EHFAM 0,5 e 5mg/kg isoladamente ou associado à imipramina 1 e 30 mg/Kg, i.p., no teste de nado forçado. Isoladamente, o EHFAM 5mg/kg ($55,11 \pm 7,882$) e a imipramina 30mg/kg ($49,56 \pm 3,24$) reduziram o TI significativamente em relação ao grupo controle ($109,4 \pm 3,34$). Tal efeito não foi observado com os grupos tratados com as doses menores do extrato de do antidepressivo. Entretanto, a associação do EHFAM 0,5 e IMI 1 apresentou redução do TI ($33,89 \pm 4,11$), quando comparado com o grupo controle, de forma semelhante a EHFAM 5 mg/Kg e IMI 30 mg/Kg, indicando uma potencialização no efeito das drogas.

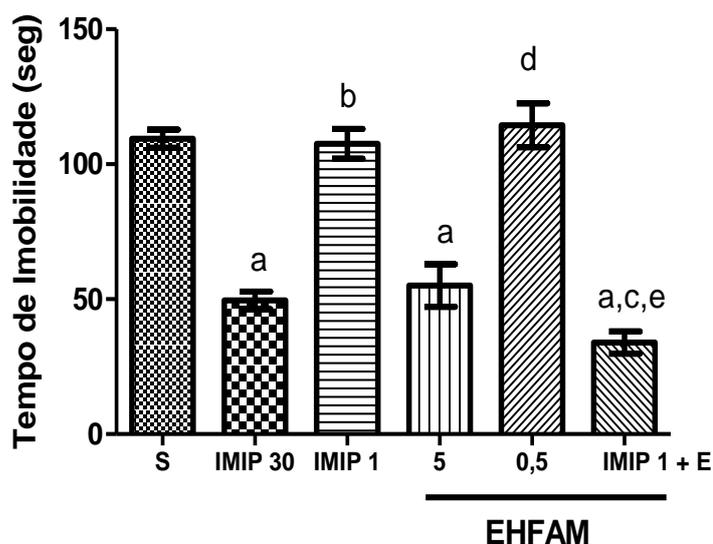


Figura 29: Potencialização da atividade antidepressiva do EHFAM com Imipramina. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keuls (*post hoc*). Valores significativos: "a", "b", "d" e "e" vs CONT, IMI 30, EHFAM 5 e EHFAM 0,5, respectivamente, quando $p < 0.05$. CONT = Controle, IMI = imipramina 1 e 30mg/kg, 0,5 e 5 = EHFAM 0,5 e 5 mg/kg e EHFAM 0,5 + IMI 1 = EHFAM 0,5 mg/kg, + imipramina 1mg/kg.

A observação de um efeito tipo antidepressivo do EHFAM nos testes de NF e acinesia induzida por reserpina direcionou a necessidade da investigação do envolvimento do sistema monoaminérgico (dopaminérgico, noradrenergico e serotoninérgico) com vista à traçar um possível mecanismo de ação antidepressiva do extrato. Logo, foram realizados testes de sinergismo, onde foram administradas doses subativas do extrato EHFAM (1mg/kg i.p.) em associação a antidepressivos clássicos, inibidores dos sistemas de captação de monoaminas, tais como a imipramina (inibidor mista da recaptção de 5-HT/NE), fluoxetina (inibidor seletivo da recaptção de 5-HT) e bupropiona (inibidor seletivo de recaptura de DA).

Alterações no sistema noradrenérgico tem sido apontadas como a principal causa na fisiopatologia da depressão e no mecanismo de ação de antidepressivos (Frazer, 2000; Nutt, 2006). Compostos ou drogas que afetam a neurotransmissão noradrenérgica, como ISRN ou os inibidores da enzima monoamina oxidase (iMAO, que inibem o metabolismo das monoaminas, incluindo a noradrenalina), são amplamente utilizados para tratar depressão (Páez-Pereda, 2005). Tendo em vista a importante relação do sistema noradrenérgico na fisiopatologia e tratamento da depressão, este estudo também investigou o envolvimento deste sistema de neurotransmissão no efeito tipo antidepressivo do EHFAM. Tal fato foi observado uma vez que os resultados mostraram que a associação EHFAM 0,5 + IMI 1 potencializou o efeito da imipramina e do extrato, quando administrados isoladamente e em doses menores.

De forma semelhante, o sistema serotoninérgico e dopaminérgico também tem sido implicados fortemente na etiologia da depressão e no mecanismo de ação de fármacos antidepressivos. As principais evidências relacionadas com o alívio da depressão envolvem os fármacos inibidores da recaptção de serotonina. Corroborando com essas evidências, estudos mostram que a depleção de triptofano, aminoácido precursor da serotonina, confirma a relação entre a diminuição da monoamina e os distúrbios depressivos. Existem diversas evidências que indicam que antidepressivos com efeitos no sistema dopaminérgico são eficazes para o tratamento da depressão (TAYLOR et al., 2005,) D'Aquila *et al.*, 2000; Willner *et al.*, 2005). Os resultados do presente estudo mostram que o sistema dopaminérgico pode também estar envolvido na ação tipo antidepressiva do EHFAM, uma vez que a associação do EHFAM 0,5 com BUP 1 potencializou o efeito da bupropiona e do extrato, quando administrados isoladamente e em doses menores.

A hipótese serotoninérgica da depressão (Głowinski e Axelrod, 1964; Schildkraut, 1965) associou os sintomas depressivos com a redução da concentração de serotonina nas sinapses do SNC. Consistente com esta hipótese, a maioria dos fármacos

utilizados atualmente para o tratamento da depressão aumentam os níveis sinápticos de serotonina (Risch e Nemeroff, 1992). Além disso, vale ressaltar que muitos extratos de plantas e compostos isolados desses extratos exibem efeito tipo-antidepressivo mediado pela modulação do sistema serotoninérgico (McGarry et al., 2007; Machado et al., 2007, 2008; Freitas et al., 2010). Estudos pré-clínicos e clínicos mostram que o aumento na transmissão serotoninérgica causa efeitos na transmissão noradrenérgica e vice-versa, confirmando que serotonina e noradrenalina estão intimamente relacionadas no SNC (Gorman e Sullivan, 2000; Szabo e Blier, 2001a, 2001b). Pacientes com depressão apresentam distúrbios nesta interação, o que sugere que uma falha na comunicação entre estes sistemas pode estar envolvida na patogênese desta doença (Geraciotti et al., 1997). Além disso, camundongos que tiveram seus níveis endógenos de NA depletados, não responderam a diferentes antidepressivos, incluindo os ISRS no TSC (Cryan et al., 2004). Adicionalmente, estudos clínicos têm mostrado que o tratamento com antidepressivos que inibem a recaptação de serotonina e noradrenalina, como a venlafaxina, possui uma maior eficácia clínica que ISRS (Rudolph, 2002; Stahl et al., 2002; Papakostas et al., 2007).

Para avaliar a hipótese da participação da serotonina no efeito tipo antidepressivo EHFAM, foi realizado um teste de sinergismo com o extrato e a fluoxetina (ISRS) no TNF. A fluoxetina, antidepressivo que aumenta a disponibilidade de serotonina na fenda sináptica, quando co-administrada com o extrato de *A. muricata*, ambas em doses sub-ativas (1mg/kg i.p. e 0,5 mg/Kg, i.p., respectivamente), potencializou o efeito tipo antidepressivo do extrato. Assim, a ação tipo antidepressiva do extrato parece ser mediada, pelo menos em parte, por um possível aumento dos níveis de serotonina na fenda sináptica.

Os dados apresentados não permitem indicar precisamente o mecanismo pelo qual o extrato hidroalcoólico de *A. muricata* interage com os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico, mas uma hipótese é que ele não interaja diretamente com os receptores destes sistemas, mas atue inibindo a recaptação de monoaminas e aumentando a disponibilidade dos neurotransmissores pertencentes a estes sistemas na fenda sináptica, uma vez que o extrato apresentou efeito sinérgico com os antidepressivos fluoxetina, imipramina e bupropiona. No entanto, estudos futuros são necessários para confirmar esta hipótese, tais como dosagem de monoaminas e metabólitos em homogenatos de hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal.

4.7. Efeito do EHFAM sobre o limiar da convulsão induzida por pentilenotetrazol:

Para o estudo da potencialização da atividade anticonvulsivante, uma dose baixa de pentilenotetrazol (40 mg/Kg, i.p.) foi administrada de forma isolada ou associada ao antidepressivos padrão: imipramina (30 mg/Kg, i.p.) (291,0 ± ±68,34), bupropiona 20mg/Kg, i.p (1647 ± 152,9), fluoxetina 10mg/kg (177,4 30,58). O pentilenotetrazol (40 mg/Kg, i.p.) e ao EHFAM (5,10,20 mg/kg v.i.p). O pentilenotetrazol em sua menor dose capaz de produzir efeito PTZ 40 mg/Kg, i.p.(1657 ± 143,2) administrado isoladamente, aumentou, de forma significativa, a latência para a primeira convulsão em 94% em relação ao grupo de animais tratados com PTZ 80 mg/Kg, i.p.(101,1 ± 11,57). A administração do EHFAM nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg i.p, e de BUP 20 (1647 ± 152,9) em associação com PTZ40 mg/kg, não reduziu a latência de 1ª convulsão, como foi observado com os antidepressivos IMI 30 (291,0 ± 68,34) e FLUO 10 (177,4 30,58).

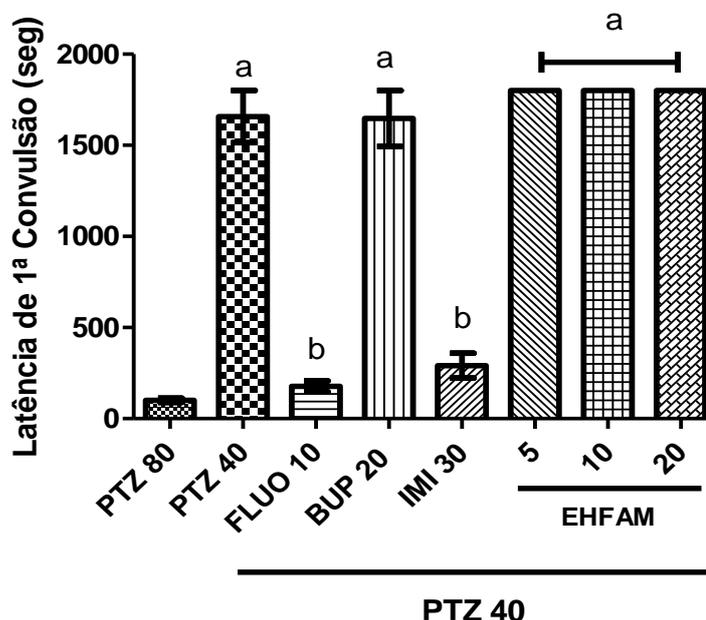


Figura 30: Efeito do EHFAM (5,10,20 mg/Kg, v.i.p.) em associação com antidepressivos padrões sobre a Latência de 1ª convulsão. As colunas representam média ± erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keuls (*post hoc*). Valores significativos: "a" e "b" vs PTZ 80 e PTZ 40, respectivamente, quando $p < 0.05$. PTZ 80 = pentilenotetrazol 80 mg/Kg, PTZ 40 = pentilenotetrazol 40 mg/Kg, FLUO = fluoxetina 10mg/kg, BUP = bupropiona 20mg/kg, IMIP = imipramina 30mg/Kg, 5 = EHFAM 5 mg/kg; 10 = EHFAM 10 mg/Kg, 20 = EHFAM 20 mg/Kg.

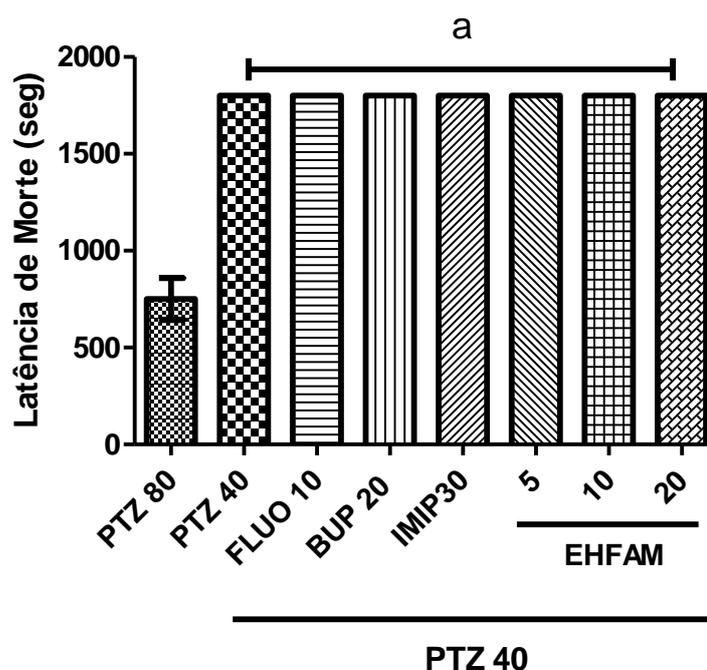


Figura 31: Efeito do EHFAM (5,10,20 mg/Kg, v.i.p.) em associação com antidepressivos padrões sobre o parâmetro tempo de morte. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keuls (*post hoc*). Valores significativos: "a" vs PTZ 80, quando $p < 0,05$. PTZ 80 = pentilenotetrazol 80 mg/Kg, PTZ 40 = pentilenotetrazol 40 mg/Kg, FLUO = fluoxetina 10mg/kg, BUP = bupropiona 20mg/kg, IMIP = imipramina 30mg/Kg, 5 = EHFAM 5 mg/kg; 10 = EHFAM 10 mg/Kg, 20 = EHFAM 20 mg/Kg.

Vários efeitos colaterais estão relacionados aos antidepressivos, porém, o efeito colateral considerado de maior gravidade é o efeito pró-convulsivante, o qual ocorre, em especial com os antidepressivos tricíclicos e ISRS, quando administrados em altas doses. Alguns estudos têm demonstrado que altas doses de imipramina tem atividade epileptogênica em animais e em seres humanos (Koella et al., 1979; Krijzer et al., 1984; Roseinstein et al., 1993). No entanto, o exato mecanismo das convulsões observadas com a imipramina ainda não é compreendido (Ago et al., 2006).

Este efeito bifásico parece ocorrer como o resultado do aumento de monoaminas que se observa com a administração desses compostos em doses elevadas. Estes achados são confirmados pelo trabalho de Shouse et al. (2001), ao mostrarem que o aumento de noradrenalina e serotonina, mas não de dopamina, estaria associado a alterações no

eletroencefalograma, às descargas neuronais intermitentes na amígdala e/ou locus coeruleus e, até mesmo, a sua generalização por todo o córtex cerebral. Estudos realizados por Ago et al. (2006), reforçam que a imipramina está envolvida na geração de convulsões devido as suas propriedades sobre a neurotransmissão monoaminérgica e, além disso, devido ao bloqueio que essa droga causa sobre os receptores H1.

Para avaliar se o limiar próconvulsivante do EHFAM, efeito observado em dose elevadas de alguns antidepressivos. O extrato foi testado no modelo que utiliza o pentilenotetrazol (PTZ) como agente indutor de convulsões. Inicialmente, os animais foram pré-tratados com o EHFAM (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) e subsequentemente tratados com PTZ (40 mg/Kg, i.p.). Como resultado dessas associações, foi observado que os grupos tratados não alteraram a latência da primeira convulsão em relação ao grupo tratado apenas com PTZ (40 mg/Kg, i.p.). Em estudos realizados por Oliveira (2013), observou-se que a dose de 100 mg/Kg i.p., apresentou atividade anticonvulsivante, mediada pelo sistema GABAérgico. Por outro lado, no trabalho de Oviedo (2009), a *A. muricata* não conferiu proteção contra convulsões induzidas por eletrochoque e pentilenotetrazol.

Possivelmente a diferença do efeito anticonvulsivante entre os autores, pode estar relacionada à diferença de absorção decorrente da via de administração no estudo de Oviedo (2009) o extrato foi administrado por via oral), da dose ou até mesmo da composição do extrato.

Os resultados sugerem então, que o EHFAM não compartilha o potencial pró-convulsivante presente nos antidepressivos tricíclicos, em especial a imipramina, indicando o EHFAM como potencial antidepressivo com características neuroprotetoras(Olivera, 2013), sendo desprovido de atividade pró-convulsivante observados em algumas classes de antidepressivos.

4.8. Efeito do EHFAM sobre os Tremores induzidos por oxotremorina

A figura 30 mostra o efeito do EHFAM reduziu sobre os tremores induzidos pela oxotremorina nos primeiros dez minutos do teste. A atropina 10 mg/Kg, i.p. (0 ± 0) e o EHFAM 5, 10 mg/Kg, i.p. ($1,2 \pm 0,32$ e $1,89 \pm 0,38$, respectivamente), reduziram a intensidade dos tremores em relação ao controle (3 ± 0). Por outro lado, o EHFAM 20 mg/Kg, i.p. ($2,5 \pm 0,17$) não apresentou o mesmo efeito.

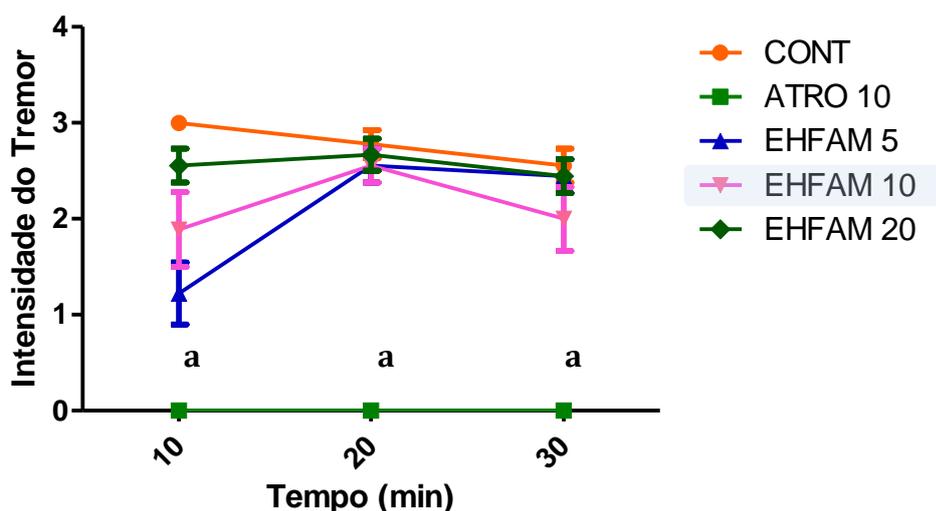


Figura 32: Efeito do EHFAM (5,10,20 mg/Kg, v.i.p.) sobre os tremores induzidos por oxotremorina. As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através de *two-way* ANOVA seguido por Student Newman Keusl (*post hoc*). Valores significativos: "a" vs CONT, quando $p < 0,05$. CONT = controle, EHFAM 5 = extrato hidroalcoólico das folhas de *Annona muricata* L. 5 mg/kg, i.p., EHFAM 10 = extrato hidroalcoólico das folhas de *Annona muricata* L. 10 mg/Kg e EHFAM 20 = extrato hidroalcoólico das folhas de *Annona muricata* L. 20 mg/kg, i.p.

No segundo intervalo de tempo (20 minutos), apenas a atropina (0 ± 0) apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (3 ± 0). O EHFAM 5, 10 e 20 mg/Kg, i.p. ($2,5 \pm 0,17$, $2,5 \pm 0,17$ e $2,6 \pm 0,16$, respectivamente), não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle. Um efeito semelhante foi observado no terceiro e último intervalo de tempo (30 minutos). Nele, a atropina reduziu a intensidade dos tremores (0 ± 0) em relação ao controle ($2,5 \pm 0,17$). Os demais grupos tratados com EHFAM 5, 10 e 20

mg/Kg, i.p. ($2,4 \pm 0,17$, $2,0 \pm 0,33$ e $2,4 \pm 0,17$, respectivamente) não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo tratado apenas com salina.

Sabe-se que a oxotremorina (um agonista colinérgico) é um ligante extremamente seletivo para os receptores colinérgicos muscarínicos no sistema nervoso central e periférico, e é muito utilizada na investigação de funções muscarínicas. Ele é capaz de induzir tremores, que são bloqueados pela atropina (COWARD *et al.*, 1977) e mediados, possivelmente, através da estimulação central do sistema colinérgico (BEBBINGTON *et al.*, 1996). A ativação colinérgica é essencial para o início do processo convulsivo em modelos de epilepsia, visto que estas convulsões podem ser bloqueadas pelo pré-tratamento com o antagonista muscarínico atropina (MARINHO *et al.*, 1998; DE BRUIN *et al.*, 2000). Por outro lado algumas drogas podem desenvolver ações sobre o sistema colinérgico e que, em alguns casos, estas ações ocorrem como efeito colateral, como é o caso dos antidepressivos tricíclicos.

Para avaliar a hipótese de o EHFAM atuar na via colinérgica, como o fazem os antidepressivos tricíclicos, foi realizado o teste dos tremores induzidos por oxotremorina, onde foi observado que apenas a dose de 5 mg/Kg, i.p., do EHFAM exerceu um discreto efeito antimuscarínico, capaz de reverter parcialmente os tremores induzidos pela oxotremorina, apenas no primeiro intervalo de tempo do teste. Tem sido proposto que os agonistas muscarínicos sejam efetivos como agentes farmacológicos em numerosas doenças e distúrbios incluindo psicoses, distúrbios motor e prejuízos cognitivos, mas seu uso é limitado devido aos seus efeitos colaterais parassimpaticomiméticos como salivação, sudorese, bradicardia e diarreia (BYMASTER *et al.*, 2003; FELDER *et al.*, 2000). No sistema nervoso periférico, os mAChRs medeiam a contração da musculatura lisa, a secreção glandular, e a função cardíaca (LI *et al.*, 2003; EGLIN, 2001) enquanto que no SNC os mAChRs modulam a percepção da dor, controle motor, regulação térmica e processos de aprendizagem e memória (LI *et al.*, 2003; GOMEZA *et al.*, 1999a; BYMASTER *et al.*, 1993). Sabe-se que o controle motor extrapiramidal é regulado pelo balanço entre os neurotransmissores colinérgicos e dopaminérgicos (GOMEZA *et al.*, 1999b; DI CHIARA *et al.*, 1994). Fujishiro *et al.* (2002) observaram que o tremor induzido pela OXO foi inibido pelos antidepressivos inibidores da recaptção de serotonina, como a clomipramina e paroxetina (as quais mostram alta afinidade à receptores colinérgicos muscarínicos).

Confirmando a hipótese do possível mecanismo de ação do EHFAM atuar na via colinérgica, foi visto no teste de oxotremorina, que as doses de 5 e 10 mg/Kg, ip. do EHFAM

exerceram um efeito antagonista sobre o sistema colinérgico, ao antagonizar parcialmente os tremores induzidos por oxotremorina (um agonista colinérgico) em camundongos, demonstrando que o extrato é dotado de discreta ação antimuscarínica.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- A análise fitoquímica do extrato hidroalcolico folhas de *Annona muricata* L. identificou a presença de alcaloides, compostos fenólicos não-flavonóides e compostos fenólicos flavonoides (flavonas, flavononas, flavonóis, flavononóis). A técnica de CLAE, por sua vez, revelou a presença dos ácidos caféico e elágico como os compostos fenólicos majoritários do EHFAM;
- O EHFAM apresentou efeito do tipo antidepressivo no TNF, o qual foi confirmado ao reduzir a acinesia induzida por reserpina em animais;
- Quando associado aos antidepressivos clássicos bupropiona, fluoxetina e imipramina, o EHFAM apresentou efeito sinérgico em animais submetidos ao TNF;
- O EHFAM não apresentou efeito pró-convulsivante em animais tratados com PTZ, mas mostrou-se dotado de ação antimuscarínica ao antagonizar parcialmente os tremores induzidos por oxotremorina (um agonista colinérgico) em camundongos.

***CONSIDERAÇÕES FINAIS E
PERSPECTIVAS***

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o EHFAM apresenta em sua composição fitoquímica alcaloides e compostos fenólicos (em especial os ácidos caféico e elágico), metabólitos que apresentam diversas ações sobre o sistema nervoso central. Quando testado em animais, o EHFAM apresentou, em baixas doses, efeito tipo antidepressivo no teste do nado forçado. Este efeito não foi decorrente de uma possível ação estimulante central do material vegetal, uma vez que o mesmo não apresentou tal característica quando avaliado no campo aberto. O efeito tipo antidepressivo do extrato parece decorrer da interação de um ou mais componentes do EHFAM com o sistema monoaminérgico, visto que o mesmo reverteu parcialmente a acinesia induzida por reserpina (um composto que depleta as reservas de catecolaminas nos terminais neuronais) e potencializou o efeito de antidepressivos clássicos (bupropiona, fluoxetina e imipramina), compostos que aumentam a concentração de monoaminas nas fendas sinápticas, no teste do nado forçado. Além disso, o extrato mostrou-se seguro, uma vez que o mesmo não diminuiu o limiar de convulsão dos animais tratados com PTZ, como o fazem alguns antidepressivos, a saber, os tricíclicos (imipramina) e os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (fluoxetina).

Diante do exposto, acredita-se que ainda são necessários alguns testes para melhor caracterizar o efeito tipo antidepressivos do EHFAM, bem como identificar o composto que possa ser o responsável pelas ações descritas anteriormente. Dessa forma, segue abaixo uma relação de outros testes que visam complementar os resultados obtidos no presente estudo:

- Investigação do efeito do EHFAM (5 mg/Kg, i.p.) e dos ácidos caféico e elágico (compostos fenólicos majoritários, presentes no extrato) sobre o sistema de transmissão monoaminérgico, utilizando antagonistas seletivos para os receptores noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico, isoladamente ou associados ao EHFAM em animais submetidos ao teste do nado forçado;
- Dosagem de monoaminas e metabólitos em homogenatos de hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos tratados com EHFAM (5 mg/Kg, i.p.) e os ácidos caféico e elágico;

- Avaliação do perfil antioxidante (TBARS, nitrito, catalase, GSH e glutathione peroxidase) em homogenatos de hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos tratados com EHFAM (5 mg/Kg, i.p.) e os ácidos caféico e elágico.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DO MESTRADO

Artigos publicados:

- Francisco E. B. Júnior, Dayanne R. de Oliveira, Elizângela B. Bento, Laura H. I. Leite, Daniele O. Souza, Ana Luiza A. Siebra, Renata S. Sampaio, Anita O. P. B. Martins, Andreza G. B. Ramos, Saulo R. Tintino, Luiz J. Lacerda-Neto, Patricia R. L. Figueiredo, Larissa R. Oliveira, Cristina K. S. Rodrigues, Valterlúcio S. Sales, Francisco R. S. D. N. Figueiredo, Emmily P. Nascimento, Alefe B. Monteiro, Érika N. Amaro, José G. M. Costa, Henrique Douglas Melo Coutinho, Irwin R. A. de Menezes, and Marta R. Kerntopf. Antiulcerogenic Activity of the Hydroalcoholic Extract of Leaves of *Croton campestris* A. St.-Hill in Rodents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**.
- Delmondes , G. A.; Francisco Figueiredo, R. S. D. N.; Tintino ,S. R.; Oliveira, L. R.; Monteiro. Á. B.; Sales ,V. S.; Rodrigues, C. K. S.; Nascimento , E. P.; Gomez , M. C. V.; Coronel , C.; Costa , J.G. M.; Coutinho, H. D. M.; Felipe, C. F. B.; Menezes , I. R. A.; Kerntopf , M. R. **Avaliação da citotoxicidade e atividade leishmanicida e tripanocida de extratos de *passiflora cincinnata mast l***. Caderno de Cultura e Ciência, Ano IX, v.13, n.1, Jul, 2014

Artigos submetidos

- Daniele O Souza, Msc; Valterlúcio S Sales, MSc; Cristina K de Souza Rodrigues, MSc; Larissa R de Oliveira, MSc; Izabel C Santiago Lemos, MSc; Gyllyandeson A Delmondes, MSc; Álefe B Monteiro, MSc; Emmily P do Nascimento, MSc; Francisco R Sobreira Dantas Nóbrega de Figueiredo, MSc; José G Martins da Costa, Ph.D.; Giovany M Pinto da Cruz, Dr.; Glauce S de Barros Viana, Ph.D.; Irwin R Alencar de Menezes, Ph.D.; Cícero F Bezerra Felipe, Ph.D.; Marta Kerntopf. Title: Sedative, anxiolytic and anticonvulsant effects of hydroalcoholic leaf extract of *Annona muricata* L. **Food Chemistry**.

- Elizângela B Bento, MSc; Francisco E de Brito Júnior, MSc; Dayanne R de Oliveira, MSc; Cícera N Fernandes, MSc; Gyllyandeson A Delmondes, MSc; Francisco R Alves Santana Cesário, MSc; Cristina K de Sousa Rodrigues, MSc; Valterlúcio S Sales, MSc; Francisco R Sobreira Dantas Nóbrega de Figueiredo, MSc; Izabel C Santiago Lemos, MSc; Irwin R Alencar de Menezes, Ph.D.; José G Martins da Costa, Ph.D.; Marta Kerntopf . Title: Antiulcerogenic Activity of the Hydroalcoholic Extract of Leaves of *Annona muricata* L. in Mice. **Food Chemistry**.

Apresentações de trabalhos em congressos:

- NASCIMENTO, E. P, SALES, V. S. ;**RODRIGUES,C.K.S.**; MENEZES, I. R. A. ; FELIPE, C. F. B.; KERNTOPF, M. R. **Avaliação da atividade anticonvulsivante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast. em camundongos.** Brazilian Congress on Pharmacology and Experimental Therapeutics held in Fortaleza. 2014.
- KERNTOPF, M. R. ; FELIPE, C. F. B. ; MENEZES, I. R. A. ; **RODRIGUES,C.K.S.**; SALES, V. S. **Avaliação da atividade antiparasitária e citotóxica in vitro de extrato hidroalcoólico de *Duguetia Furfuraceae*, contra trypanossoma cruzi, *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania infantum*.** IX Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. 2014.
- KERNTOPF, M. R. ; FELIPE, C. F. B. ; MENEZES, I. R. A. **RODRIGUES,C.K.S.**; SALES, V. S. **Avaliação da atividade antiparasitária e citotóxica in vitro de extrato hidroalcoólico de *Annona muricata* L., contra trypanossoma cruzi, *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania infantum*.** Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. 2014.
- KERNTOPF, M. R. ; FELIPE, C. F. B. ; MENEZES, I. R. A. ; **RODRIGUES,C.K.S.**; SALES, V. S. **Avaliação da atividade antiparasitária e citotóxica in vitro de extrato hidroalcoólico de *Passiflora cincinnata* Mast. L., contra trypanossoma cruzi, *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania infantum*.** Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. 2014.

- KERNTOPF, M. R. ; FELIPE, C. F. B. ; MENEZES, I. R. A. ; **RODRIGUES,C.K.S.;** SALES, V. S. . **Evaluation of sedative, anxiolytic, and anticonvulsant activity of the essential oil of Piper tuberculatum in mice.** Brazilian Congress on Pharmacology and Experimental Therapeutics held in Fortaleza. 2014.
- Rodrigues LB, Ramos AGB, Lacerda Neto LJ, Cesário FRAS, Oliveira CDM, Tintino SR, Sales VS, Pereira AOB, Menezes IRA, Rodrigues CKS. **Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oil hyptis martiusii benth (cidreira brava) by peritonitis carrageenan-induced model.** Brazilian Congress on Pharmacology and Experimental Therapeutics held in Fortaleza. 2014.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ABBO, E.S.; OLURIN, T. O. ; ODEYEMI, G. Studies on the storage stability of soursop (*Annona muricata* L.) juice. *African Journal Of Biotechnology*, 5: 1808-1812. 2006.

ABDEL GHANI, S. B., L. J. BROWN, et al. "Total synthesis of cis-reticulatacin-10-ones A and B: absolute stereochemical assignment." *Org Biomol Chem* 8(20): 4543-4545. 2010.

ACCATTINI, M; PAPINE, J.M. **Distúrbios do SNC Depressão, Ansiedade e Epilepsia. Programa de desenvolvimento profissional ao farmacêutico**; Medley; 2007.

ADEYEMI, D. O., O. A. KOMOLAFE, et al. "Histomorphological and morphometric studies of the pancreatic islet cells of diabetic rats treated with extracts of *Annona muricata*." *Folia Morphol* (Warsz) 69(2): 92-100. 2010.

AGRA, M.F. **Plantas da medicina popular dos cariris velhos**. 1a ed. APNE. Paraíba, Brasil. 1996.

AGUIAR, C. C.; CASTRO, T. R.; CARVALHO, A. F.; VALE, O. C.; SOUSA, F. C.; VASCONCELOS, S. M. Drogas antidepressivas. *Acta Med. Port.*, v. 24, n. 1, p. 091-098, 2011.

AGRA, Maria de Fátima et al. Levantamento de plantas medicinais utilizadas na região Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* , 18 v., n. 3, p. 472-508, 2008.

ALALI, F. Q. et al. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J. Nat. Prod.* 62 (3):504-540, 1999.

ALENCASTRO, L. S. **Relações entre narrativa, prosódia e movimento na depressão e seus subtipos melancólica e não melancólica**. Tese (Doutorado em Psicologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 87p, 2012.

ALMEIDA, R.N, FALCÃO ACGM, DINIZ RST, QUINTANS-JÚNIOR LJ, POLARI RM, BARBOSA-FILHO JM, AGRA MF, DUARTE JC, FERREIRA CD, ANTONIOLLI AR, ARAÚJO CC. **Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais**. Rev Bras Farmacogn. v.80 p.72-6, 1999.

ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia: fundamentos práticos, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c.14, p. 154-160, 2006.

ALMEIDA, L. F. P. **Propagação por enxertia de araticum *Annona crassiflora* Mart. e atemoia (*Annona squamosa* L. X *Annona cherimola* Mill.) em diferentes porta-enxerto de Annonaceae**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Dissertação de Mestrado, 2009, 109 p.

ALMEIDA, R.N, R.S.T. DINIZ, L.J. QUINTANS-JÚNIOR, S.A. DINIZ, A-C.G.M. FALCÃO & M.F.V. SOUZA. **Abstracts of XVI Latinamerican Congress of Pharmacology**. R 10.185, pp 232. 2000.

ALVES RC, CASAL S, OLIVEIRA B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? **Rev Quím Nova**.32:2169-80.2009.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. ed. 5ª edição. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994. Washington, DC, 2013.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 4, p. 233-42, 2001.

ANGELIS, R.C. **Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas**. São Paulo: Ed. Atheneu, 295p, 2001.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenolicos em alimentos – Uma breve revisao. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANGHINONI, J.C. Atividade Protetora de *Annona muricata* (Graviola) frente AOS Danos causados cabelo peróxido de hidrogênio. **Salão de Iniciação Científica (22 .: 2010 fora 18-22.: Porto Alegre, RS). Livro de Resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2010**. 2010.

ANSANTE,T.F. **Metabólitos secundários de Annonaceae: triagem, fracionamento biomonitorado e bioatividade frente a *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae)**. 2014. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz.

ANSSEAU, M., DEMYTTENAEREm K., HEYRMAN, J., MIGEOTTE, A., LEYMAN, S., MIGNON, A. Objective: remission of depression in primary care. **The Oreon Study. European Neuropsychopharmacology**, v. 19 (3), pp. 169-176, 2009.

ANTUNES, R.M.P. ET AL. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(4): 517-524. 2006.

ARAÚJO FILHO, G.C. de; ANDRADE, O.M.S.; CASTRO, F.de A.; SÁ, F.T. **Instruções Técnicas para o cultivo da Graviola**. Instruções Técnicas – Embrapa Agroindústria Tropical, nº02, p.1-10, dez. 2004.

ARAÚJO, J.F.; ALVES A.A.C.**Instruções técnicas para o cultivo da pinha (*Annona squamosa* L.)** Salvador. EBDA, 44f. 1999.

ARCHER J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Anim Behav** , v. 21, p. 205–235, 1973.

AVANZI, CLAUDIA J; ALEIXO, A. M.; BAPTISTELLA, L. H. B. (2006) **Identificação e Caracterização dos compostos ativos dos extratos vegetais das folhas da graviola (*Annona muricata*) e dos Extratos Vegetais da Casca do Pau D'arco (*Tabebuia avellanedae*)**. In: *58ª Reunião Anual da SBPC*, Forianópolis. 58ª Reunião Anual da SBPC. 2006.

AZIZ, P. A.; YUSOF, S. Physico-chemical characteristics of soursop fruit (*Annona muricata*) during growth and development. *ASEAN Food Journal, New York*, 9 (4): 147-150. 1994.

BALLONE, G.J. **Fisiopatologia da depressão**, 2007, Disponível em: <<http://www.psiqweb.med.br/>> Acesso em: 20 de dezembro de 2014.

BAUMEISTER, A.A.; HAWKINS, M.F.; UZELAC, S.M. The myth of reserpine-induced depression: role in the historical development of the monoamine hypothesis. *J. Hist. Neurosci.*, v.12, p.207-220, 2003.

BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, T.S. **In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species**. *Indian J. Exp. Biol.* v.45, n.5, p.480-5, 2007.

BAZZANO, F.C.O. Aspectos éticos da pesquisa científica, p. 149-180. In: SILVA, J.V. et al. **Bioética: meio ambiente, saúde e pesquisa**. 1ª Ed. São Paulo: Iátria, 2006.

BETANCUR-GALVIS, L.; SAEZ, J.; GRANADOS, H.; SALAZAR, A.; OSSA, J.E.BEZCHLIB,N.Y; BUTLER, K.Z., JEFFRIES, J.J. **Clinical handbook of psychotropic drugs**. 9th ed. Toronto (Canada): Hogrefe & Huber Publishers; 1999.

BOLIGON, A.A., BRUM, T.F., FROLHICH, J.K., FROEDER, A.L.F., ATHAYDE, M.L. HPLC/DAD profile and determination of total phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek stem bark. **Research Journal of Phytochemistry**. 6 (3): 84-91, 2012

BOLIGON, A.A.; KUBIÇA, T.F.; MARIO, D.N.; BRUM, T.F.; PIANA, M.; WEIBLEN, R.; LOVATO, L.; ALVES, S.H.; SANTOS, R.C.V.; ALVES, C.F.S.; ATHAYDE, M.L. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiol Plant**. 35: 2229-2239, 2013.

BOOK,D. Flux corrected transport ii: Generalizations of the method. **J. Comp. Phys.**, 18:248-283. 1975.

BORGES FILHO, C.; DEL FABBRO, L.; DE GOMES, M. G.; GOES, A. T. R.; SOUZA, L. C.; BOEIRA, S. P. et al. Kappa-opioid receptors mediate the antidepressant-like activity of hesperidin in the mouse forced swimming test. **Eur J Pharmacol**, 698:286-91, 2013.

BOSCOLO, O. H., VALLE, L. S. **Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil**. IHERINGIA, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 63, n. 2, p. 263-277, jul./dez. 2008. Disponível em<<http://www.fzb.rs.gov.br/publicacoes/iheringia-botanica/Ih63-2-p263-278.pdf>> Acesso em 12 de novembro de 2013.

BOSCOLO, O. H., VALLE, L.S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 63, n. 2, p. 263-277, 2008

BRANDÃO, J. A. C. B. Simbiose micorrízica arbuscular de gravioleiras (*Annona muricata*) em solo infestado por *pratylenchus coffeae*. Pernambuco. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, p.74, 2003. BRASIL, **Decreto nº 24.645 de 10 julho de 1934**.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em março de 2012.

BRASIL, **Lei Federal Nº 11.794 de 2008** sobre Princípios Éticos da Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

BRASIL, **Lei Federal Nº 9605 do ano 1998**.

BRASIL, **Lei n.º. 6638 de 8 de maio de 1979**.

BHUTADA, P.; MUNDHADA, Y.; BANSOD, K.; UBGADÉ, A.; QUAZI, M.; UMATHE, S.; MUNDHADA, D. Reversal by quercetin of corticotrophin releasing factor induced anxiety- and depression-like effect in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, p. 955-960, 2010.

BORA, P. S.; HOLSCHUH, H. J.; SILVA VASCONCELOS, M. A. Characterization of polyphenol oxidase of soursop (*Annona muricata* L.) fruit and a comparative study of its inhibition in enzyme extract and in pulp. **Journal Ciencia Y Tecnología Alimentaria**, 4: (4): 267-273.2004.

BOROWICZ, K.K.; FURMANEK-KARWOWSKA, K.; MORAWSKA, M.; LUSZCZKI, J.J.; CZUCZWAR, S.J. Effect of acute and chronic treatment with milnacipran potentiates the anticonvulsant activity of conventional antiepileptic drugs in maximal electroconvulsive-induced seizures in mice. **Psychopharmacology**. 207: 661-669. 2010.

BUENO, J.R. A Era dos Antidepressivos. **Revista Debates em Psiquiatria Clínica**, jan./fev., (1), p. 6-15, 2011.

CALABRESE, F.; GUIDOTTI, G.; MOLTENI, R.; RACAGNI, G.; MANCINI, M.; RIVA, M. A. Stress-induced changes of hippocampal NMDA receptors: modulation by duloxetine treatment. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37916, 2012.

CAMPOS D.A.; SANTOS F.A. LIMA A.F.; RIBEIRO E.R.; SILVEIRA E.R.; PESSOA O.D.; RAO, V.S.; **Gastroprotective Effect of a Flavone From Lonchocarpus Araripensis Benth (Leguminosae) and the Possible Mechanism**. *Journal of Pharmacy of Pharmacology*. v. 60(3): p.391-397. 2008.

CAPARROS-LEFEBVRE, D., LANNUZEL, A., MICHEL, P.P., ABAUL, J., HOCQUEMILLER, R., & RUBERG, M. Toxicidade de Annonaceae para neurónios dopaminérgicos: o papel potencial no parkinsonismo atípico em Guadalupe. *Distúrbios do Movimento*, 17 (1), 84-90. 2002.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005

CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolos em psicofarmacologia experimental. Um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais.** São Paulo: FAP-UNIFESP, 2011.

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

CARVALHO, A C. B., DINIZ, M. F. F. M., MUKHERJEE, R. Estudos da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, n. 1, p. 11-16. 2005.

CHARNEY, D. S.; MIHIC, S. JOHN.; HARRIS, R. ANDRON apud BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 11^a Ed. Editora: MCGRAW-HILL. 2010.

CASTANEDA, A.E.; TUULIO-HENRIKSSON, A.; MARTTUNEN, M.; SUVISAARI, J.; LONNQVIST, J. A review on cognitive impairments in depressive and anxiety disorders with a focus on young adults. **J. Affect. Disord.**, v. 106, p. 1–27, 2008.

CECHINEL, F.V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, 21(1): p. 99-105, 1998.

CHANG, F. R.; WU, Y. C. Novel Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, 22 (64): 925-931. 2001

CHANG, F.R., YANG .P.Y., LIN. J.Y., . LEE. K.H.,. **Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra***. *J Nat Prod*. 61:437-9. 1998

CHANG, F.R.; LIAW, C.C.; LIN, C.Y.; CHOU, C.J.; CHIU, H.F.; WU, Y.C. New Adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Planta Med.** v.69, n.3, p.241-6, 2003.

CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, p. 5-40, 2012.

CHEN Z, SKOLNICK P. Triple uptake inhibitors: therapeutic potential in depression and beyond. **Expert Opin Investig Drugs** 16:1365–1377, 2007.

CHEN, C.H., T.J. HSIEH, T.Z. Liu, C.L. CHERN, P.Y. HSIEH.. Annoglabayin, a novel dimeric kaurane diterpenoid, and apoptosis in Hep G2 cells of annomontacin from the fruits of *Annona glabra*. **Journal Nat Prod**.p.67. 2011

CHEN, G. Y., ZHOU, Q., FU, Y. H., LI, X. B., WU, S. Y., SONG, X. P., HAN, C. R. Bioactive benzylisoquinoline alkaloids from *Artabotrys hexapetalus*. *Phytochemistry Letters*, 11, 296-300. 2015.

CHENG J, DAÍ F, ZHOU B, YANG L, LIU Z. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure–activity relationship *Food Chem* 104: 132–139, 2007.

CHIMENTI, F.; COTTIGLIA, F.; BONSIGNORE, L.; CASU, L.; CASU, M.; FLORIS, C.; SECCI, D.; BOLASCO, A.; CHIMENTI, P.; GRANESE, A.; BEFANI, O.; TURINI, P.; ALCARO, S.; ORTUSO, F.; TROMBETTA, G.; LOIZZO, A.; GUARINO, I. Quercetin as the active principle of *Hypericum hircinum* exerts a selective inhibitory activity against MAO-A: extraction, biological analysis, and computational study. *J Natl Prod*, v. 69, p. 945-949, 2006.

COHEN LJ. Rational drug use in the treatment of depression. *Pharmacotherapy*. Jan-Feb;17(1):45-61. 1997.

CORREA, M. P. **Dicionário de plantas medicinais do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de desenvolvimento Florestal, v. 6, n. 3, p. 646. Graviola do Norte, 1984.

CORREA. M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: IBDF. v.5, 687p. 1978.

COSTA, E. L. M. B. **Depressão: Consumo de antidepressivos em Portugal e na Europa**. 2010. 50f. Monografia (Licenciatura em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2010.

CREMONEZ, Caroline Marroni. **Estudo da ação antiofídica do extrato das folhas e do suco de graviola (*Annona muricata*) no envenenamento por *Lachesis muta rhombeata***. Tese de Doutorado. 2011. Universidade de São Paulo.

CRYAN, J.F.; PAGE, M.E.; LUCKI, I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effect of reboxetine in a modified forced swim test. *European Journal of Pharmacology*, v. 436, p. 197-205, 2002b.

COPPEN, A. Indoleamines and affective disorders. *J Psychiatr Res*. 9(3):163-171. 1972.

DAILLY, E.; CHENU, F.; RENARD, C.E.; BOURIN, M. Dopamine, depression and antidepressants. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, v. 18, p.601-607, 2004.

DAVIDSON MB, ECHEVERRY D. **Collaborative care for depression and chronic illnesses**. *N Engl J Med.*; 364(13):1278. 2011.

DAGTEKIN, O., MARCUS, H., MÜLLER, C., BÖTTINGER, B.W., SPÖHR, F. Liquid therapy for serotonin syndrome after intoxication with venlafaxine, lamotrigine and diazepam. *Minerva Anestesiologica*, v. 76. 2010.

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

DHINGRA, D., CHHILLAR, R. Antidepressant-like activity of ellagic acid in unstressed and acute immobilization-induced stressed mice. **Pharmacological Reports**. 64, 796-807. 2012.

DIAZ, S. L. & MAROTEAUX, L. Implication of 5-HT_{2B} receptors in the serotonin syndrome. **Neuropharmacology**. Jan 26. 2011.

DSM-5. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. 5ª ed., Porto Alegre, Artmed, 948 p. 2014

DUMAN, R. S. Antidepressants and neuroplasticity. **Bipolar Disord**, v. 4, n. 3, p. 183-194, 2004.

DUMAN, R.S., MONTEGGIA L.M. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders, **Biol Psychiatry**;59:1116–1127. 2006.

DUNLOP, B. W.; NEMEROFF, C. B. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. **Arch. Gen. Psychiatry.**, 64:327-37, 2007.

DUNLOP, B.W., & DAVIS, P.G. Combination Treatment With Benzodiazepines and SSRIs for Comorbid Anxiety and Depression: A Review. **Prim Care Companion J Clin Psychiatry**;10:222–228. 2008.

DUVVURI, V., BAILER, U. F., & KAYE, W. H. Altered Serotonin Function in Anorexia and Bulimia Nervosa. In C. P. Müller & B. L. Jacobs (Eds.), **Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin** (pp. 715-729). London, UK: Elsevier. 2010.

EISENBERG, D.M., DAVIS, R.B., ETTNER, S.L., APPEL, S., WILKEY, S., ROMPAY, M.V., KESSLER, R. **Trends in alternative medicine use in United States, 2004 - 2007: results of a follow-up national survey**. *JAMA* 280: 1569- 1575. 2008.

EULÁLIO, M.C., ANDRADE, T. F., MELO, R. L.P., NERI, A.L. **A estrutura latente da depressão em idosos: uma análise taxométrica**. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 31(3):555-564, mar, 2015.

FANG, Y. N. ; LIU, G. T. Effect of isorhapontigenin on respiratory burst of rat neutrophils. *Phytomedicine*, 9: 734-738. 2002.

FAUSTINO, T. T.; ALMEIDA, R. B.; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. 4, p. 429-436, 2010

FARAHANI, MARZIEH, SARBANDI ET AL. Medicamentos derivados de plantas naturais para o tratamento da depressão: Uma visão geral dos mecanismos de ação Avaliações em neurociências, **Fitoterapia research**. 26 v, n. 3, p. 305-321, 2015.

FIGUEIREDO, Carlos Rogério et al. Atividade antitumoral de Constituintes Kielmeyera coriacea Folha em Experimental melanoma, testada in vitro e in vivo em ratos sinergicos. **boletim farmacêutica avançada**, 4 v., n. Supl 1, p. 429, de 2014.

FERRARI, A.J., CHARLSON, F.J., NORMAN, R.E., PATTEN, S.B., FREEDMAN G, MURRAY CJ, et al. **Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study**. PLoS Med. 2013.

FERRARI ,A.J.; CHARLSON, F.J.;NORMAN, R.E; PATTEN, S.B.;FREEDMAN, G. **Burden of Depressive Disorders by Country, Sex, Age, and Year: Findings from the Global Burden of Disease Study**. 2010.

FERELLI, C.; DEDALO, M. F. N. Avaliação da Capacidade Antioxidante dos Extratos de Graviola (Annona Muricata) e Suas Frações. **In: MOSTRA ACADÊMICA DA UNIMEP, 4ª, 2006, Piracicaba. Anais da 4ª Mostra Acadêmica**. Piracicaba: Universidade Metodista de Piracicaba. 2006.

FERELLI, C.; NEPOMUCENO, M. F. Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de graviola (Annona muricata) e suas frações. **In: 3º Congresso de Pesquisa, Piracicaba. 3ª Mostra Acadêmica da UNIMEP**. 2005.

FERREIRA, V.F.; PINTO, A. C. **A Fitoterapia no mundo atual**. Química Nova, v.33, n.9, p. 1829, 2010.

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

FILHO, N. A; MARI, J.J.; COUTINHO, E.; FRANÇA, I.F.; ANDREOLI, S.B.; BUSNELLO, E.D. Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity - Methodological features and prevalence estimates. **The British Journal of Psychiatry**, v. 171, p. 524-529, 1997.

FLECK, M.P, LAFER, B., SOUGEY, E.B.Del Porto JA, Brasil MA, Juruena MF; Associação Medica Brasileira. Guidelines of the Brazilian Medical Association for the treatment of depression (complete version)]. **Rev Bras Psiquiatr** 2003; 25(2):114-22. Fundamental & Clinical Pharmacology; 2004.

FOONG, CHAN, P; HAMID, R, ABDUL. Avaliação das actividades anti-inflamatórias do extrato etanólico de Annona muricata folhas. **Revista Brasileira de Farmacognosia** , v. 22, n. 6, p. 1301-1307, 2012.

FORMIGA, Ayana Cartaxo. Avaliação da atividade antifúngica dos extratos hidroalcoolicos de Annona muricata L. e Musa sapientum L. sobre cinco espécies de cândida. 2014.

FOUNTOULAKIS, K. N. The emerging modern face of mood disorders: a didactic editorial with a detailed presentation of data and definitions. **Annals of General Psychiatry**, n.9, p.14, 2010.

FREITAS, R. D. R., BRIENZA, S. M. B. Estudo da ação de extratos de graviola (Annona muricata) sobre o estresse oxidativo em células sadias e linhagens tumorais. **In: 15º Congresso de Iniciação Científica, 5ª Mostra Acadêmica UNIMEP**. 2007.

FREITAS, A.E., BUDNI, J., LOBATO, K.R., BINFARÉ, R.W., MACHADO, D.G., JACINTO, J., VERONEZI, P.O., PIZZOLATTI, MG, RODRIGUES, A.L. Antidepressant-like action of the ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34: 335-343, 2010.

FRIES, R.E. Annonaceae. In: ENGLER, A.; PRANTL, K. (Ed.). **Die natürlichen Pflanzenfamilien**. 2nd ed. Berlin: Duncker und Humblot,. p. 1-171. 1959.

GALECKI, P.; SZEMRAJ, J.; BIENKIEWICZ, M.; FLORKOWSKI, A.; GALECKA, E. Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. *Pharmacological Reports*, v. 61, n. 3, p. 436-447, 2009.

GERON, Vera Matias. TRATAMENTO INOVADOR (DESVENLAFAXINA) PARA DEPRESSÃO MAIOR. *Revista Científica FAEMA*, v. 5, n. 1, p. 46-59, 2014.

GILMAN, A.G., T.W. RALL, A.S. NIES & P. TAYLOR) “**As bases farmacológicas da terapêutica**”. 9aEdição, McGraw-Hill, México. 1996.

GLEYE, C; LAURENS, A; HOCQUEMILLER, R.; LAPREVOTE, O.; SERANI, L.; CAVÉ, A. (1997) Cohibins A and B, acetogenins from roots of *Annona muricata*. *Phytochemistry*, 44 (8): 1541-1545. 1997.

GÓMEZ LOZADA, Andrés Felipe; MOLINA RAGA, Sarah Lucía. Evaluacion preliminar de la actividad insecticida contra puto barberi (cochinilla harinosa) del extracto etanolico de las semillas desengrasadas de annona muricata. 2012.

GOMES DE MELO, Joabe et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules*, v. 15, n. 12, p. 8534-8542, 2010.

GONÇALVES, A.L. **Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais**. 209p.2007. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas – Universidade Paulista.

GOODMAN e GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ªed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2001.

GOTTLIEB, J.D.; MUESER, K.T.; ROSENBERG S.D.; XIE H.; WOLFE R.S. **Psychotic Depression, Posttraumatic Stress Disorder, and Engagement in Cognitive-Behavioral Therapy within an Outpatient Sample of Adults with Serious Mental Illness**. *Comprehensive Psychiatry*, 52(1):41–49. 2011.

GRZYBOWSKI, ET AL. Efeito larvicida sinérgica e alterações morfológicas induzidas pela extratos etanólicos de *Annona muricata* e *Piper nigrum* contra o vector da dengue *Aedes aegypti*. *Ciência Manejo de pragas* , v. 69, n. 5, p. 589-601, 2013.

GUARRERA, M. P. **Traditional phytotherapy in central Italia.** *Fitoterapia*, v. 76, p.1-25, 2005.

GUIMARÃES, F. S. **Medicamentos antidepressivos e estabilizadores de humor.** In: GRAEFF, F.; GUIMARÃES, F. *Fundamentos da psicofarmacologia.* São Paulo: Atheneu, 2001. p. 93-122.

HAMON, M.; BOURGOIN, S. Pharmacological profile of antidepressants: a likely basis for their efficacy and side effects. *European Neuropsychopharmacology*, v. 16, p. 5625-5632, 2006.

HASLER, G. Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians? *World Psychiatry*; v.9, pp. 155-161, 2010.

HASRAT, JA ET AL. Triagem de plantas medicinais a partir de Suriname para ligantes 1a 5-HT: alcalóides bioativos isoquinolínicos partir do fruto da *Annona muricata*. *Phytomedicine*, v 4, n. 2, p. 133-140, 1997.
depressed

HIRSCH, M., BIRNBAUM, R.J. Tricyclic and tetracyclic drugs for treating depressed adults. In: Basow. **Waltham**, MA, 2012.

HIMMELHOCH JM. **Monoamine oxidase inhibitors.** *Comprehensive textbook of psychiatry*. 6th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; p. 2038-56. 1995.

JARAMILLO, M. C.; ARANGO, G. J. ; GONZALEZ, M. C. ; ROBLEDO, S. M. & VÉLEZ, I. D. **(Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp.** *Fitoterapia*, 71(2): 183-186. 2000.

JIMERSON, D.C. Role of dopamine mechanisms in the affective disorders. In: MELTZER, H.Y., (ed.). *Psychopharmacology, the third generation of progress.* **New York: Raven Press**, p. 505-511, 1987.

JUNQUEIRA, N.T.V.; OLIVEIRA, M.A.S.; ICUMA, I.M.; RAMOS, V.H.V. Cultura da Graviola. In: Incentivo à fruticultura no Distrito Federal: Manual de fruticultura. **2ª ed. rev. atual.** – Brasília: OCDF, COOLABORA, 1999.

JUNQUEIRA, K P; VALE, M R; PIO, R; RAMOS, J D. **Cultura da graviola (*Annona muricata*).** Lavras: Ufla. (Boletim de Extensão). 2002.

KAUR, R.; CHOPRA, K.; SINGH, D. Role of alpha2 receptors in quercetin-induced behavioral despair in mice. *J Med Food*, v. 10, p. 10-165, 2007.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica.** 12ª edição. Ed. McGraw Hill, 2014

KESSEL, J.B.; SIMPSON, G.M. **Tricyclic and Tetracyclic Drugs.** In: Kaplan HI, Sadock BJ, editors. *Comprehensive Textbook of Psychiatry.* 6th ed. Baltimore: Williams e Wilkins; p. 2096-112. 1995.

KIM, G. S.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L. L.; WU, F. E.; MCLAUGHLIN, J. L. SASTRODIHARDJO, S. Two New Mono-TetrahydrofuranRing Acetogenins, Annomuricin E and Muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, 61: 432-436. 1997.

KNEGTERING, H. et al. - What are the effects of antipsychotics on sexual dysfunctions and endocrine functioning? *Psychoneuroendocrinology*. 28 (2): 109-123, 2003.

KUGAYA, A.; SANACORA, G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. *CNS Spectr*, v. 10, n. 10, p. 808-819, 2005.

LAFER, B. et al. Depressão no ciclo da vida. Porto Alegre. **Artes médicas**. 2000.

LAPA A.J., LIMA T.C.M. Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento. **Rede Iberoamericana de Validação de Plantas Mediciniais**. 1997.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M.T.R.L.; CASTRO, M.S.A.; LIMA, T.C.M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. SBPC, Campinas-SP, 2008.

LAPA, F.R. **Avaliação da atividade antinociceptiva, antiinflamatória e protetora gástrica do extrato hidroetanólico bruto de *Polygala paniculata* L.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná e Universidade Federal de Santa Catarina. Curitiba, 2006.

LEE, Y.C.; CHEN, P.P. A review of Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and serotonin noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) in neuropathic pain. **Expert Opin Pharmacother**. v.11, n.17, p.2813-2825, 2010.

LEBOUEF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B. & MUKHERJEE, R. **The phytochemistry of Annonaceae**. *Phytochemistry*. v. 21, p.2783-2813, 1982.

LEOPARDI, M. T. **Metodologia da pesquisa na saúde**. 2. ed. Florianópolis: UFSC/Pós-Graduação em Enfermagem, 2002.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.

LEVINE, J.; PANCHALINGAM, K.; RAPOPORT, A.; GERSHON, S.; MCCLURE, R. J.; PETTEGREW, J. W. Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. **Biol Psychiatry**, v. 47, n. 7, p. 586-593, 2000.

LEVINSON, D. F. The genetics of depression: A review. **Biological Psychiatry**, 60:84-92, 2006.

LIAW, C.C.; CHANG, F. R.; LIN, C.Y. ; CHOW, C. J.; CHIU, H. F.; WU, M. J. (2002) New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, 65 (4): 470-75. 2002.

LI, XM, CHLAN-FOURNEY, J.; JUORIO, A. V.; BENNET, V. L.; SHRIKHANDE, S.; BOWEN, R. C. Antidepressants upregulate messenger RNA levels of the neuroprotective enzyme superoxide dismutase (SOD1). *J Psychiatry Neurosci*, 25:43-7, 2000.

LIEBERMAN, D.Z; MONTGOMERY, S.A; TOURIAN, K.A; BRISARD, C; ROSAS, G; PADMANABHAN, K. et al. A pooled analysis of two placebo-controlled trials of desvenlafaxine in major depressive disorder. *Int Clin Psychopharmacol*, v. 23(4), p. 188-197, 2008.

LIMA, V.T.M. Avaliação dos efeitos centrais da Iangambina isolada de *Ocotea duckei* Vattimo: Estudo comportamental e neuroquímico em Córtex motor e corpo estriado de camundongo. Dissertação de mestrado. Universidade federal do Ceará Faculdade de medicina Departamento de fisiologia e farmacologia Curso de pós-graduação em farmacologia. 2005.

LIU, D.; XIE, K.; YANG, X.; GU, J.; GE, L.; WANDG, X. et al. Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. *Behav Brain Res*, 264: 9-16, 2014.

LIMA, K. S. B.; LIMA, Y. C.; SOUSA, T. S.; BERTINI, L. M.; MORAIS, S. M. **Atividade Antioxidante de Plantas e Sua Relação com o Teor de Taninos**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, XLVI, 2006, Salvador. Anais do XLVI Congresso Brasileiro de Química. Salvador: Universidade Estadual do Ceará. 2002.

LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. **Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity**. *Food Chemistry, Reading*, v. 122, n. 4, p. 1129-1138, 2010.

LIMA, M. D. **Perfil cromatográfico dos extratos brutos das sementes de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. através da cromatografia líquida de alta eficiência**. Dissertação de Mestrado – Maceió – AL, Universidade Federal de Alagoas, 102 páginas. 2007

LIMA, L.P. In: MONTEIRO, R, editor. **Programa de Educação Continuada em Psiquiatria – Desvende**. São Paulo: AC Farmaceutica; 2012.

LOBÃO, A.Q., MELLO SILVA, R., FORZZA, R.C. *Guatteria* (Annonaceae) da Floresta Atlântica brasileira. *Rodriguésia*. Rio de Janeiro, v. 63, p. 1039-1064, 2012.

LOPES, J. C.; SILVA, R. M. Diversidade e caracterização das annonaceae do Brasil. disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v36nspe1/v36nspe1a15.pdf>. acessado em: 10 de dezembro de 2013.

LOPEZ, A.D. **Global and regional burden of disease and risk factors**, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* .367: 1747-57. 2006.

LOPEZ, M.R.A., RIBEIRO, J.P., ORES, L.C., JANSEN, K., SOUZA, L.D.M., PINHEIRO, R.. et al . **Depressão e qualidade de vida em jovens de 18 a 24 anos no sul do Brasil**. *Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul*.2011.Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101 .acesso em :15 setembro, 2014.

LOPEZ-RUBALCAVA, C. ET AI. Ações ansiolítico do extrato hexano das folhas de *Annona cherimola* em dois paradigmas de ansiedade: possível envolvimento do GABA / benzodiazepina complexo receptor. **As ciências da vida** , v 78, n.. 7, p. 730-737, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 36. 2002.

LÚCIO, A. S. S. C. **Alcaloides azafenantrenos isolados de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague e Sandwith (Annonaceae)**. 2011. 121f. Dissertação (Mestrado em produtos naturais e sintéticos bioativos). Universidade Federal da Paraíba. João pessoa, PB, 2011.

LÚCIO, Ana Silvia Suassuna Carneiro et al. Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**, 2014.

LUNA, J. S. **Estudo de Plantas Bioativas**. Tese de Doutorado – Recife – PE, Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, 254 páginas. 2006

LUNA, J. S.; CARVALHO, J. M.; LIMA, M. R. F.; BIEBER, L. W.; BENTO, E. S.; FRANCK, X.; SANT'ANA, A. E. G. Acetogenins in *Annona muricata* L. (annonaceae) leaves are potent molluscicides. **Natural Product Research**, 20 (3): 253-257. 2006

MAAS, P.J.M. Neotropical Annonaceae. In: MILLIKEN, W.; KLITGARD, B.; BACARAT, A. **Neotropikey**: interactive key and information resources for flowering plants of the neotropics. 2009. Disponível em: <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Annonaceae.htm>>. Acesso em : 11 mar. 2013.

MABBERLEY, D.J. **The Plant-Book**.Cambridge University Press, New York. 858 p. 1997.

MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y. S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. **Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, special issue, 2010.

MAO, Q. Q.; IP, S. P.; KO, K. M.; TSAI, S. H.; CHE, C. T. Peony glycosides produce antidepressant-like action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress: effects on

hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain-derived neurotrophic factor. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 33:1211-6, 2009.

MAO, Q. Q.; HUANG, Z.; ZHONG, X.; XIAN, X.; IP, S. Brain-derived neurotrophic factor signalling mediates the antidepressant-like effect of piperine in chronically stressed mice. **Behav Brain Res**, 26:140-5, 2014.

MARAZZITI, D.; CONSOLI, G.; PICCETTI, M.; CARLINI, M.; FARAVELLI, L. Cognitive impairment in major depression. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 626, p. 83–86, 2010.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Editora UFC, 1997.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza. **Editora da Universidade Federal do Ceará**, 2009.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e aproveitamento de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: IOCE, 2002.

MATSUMOTO, R. S.; RIBEIRO, J. P. N.; TAKAO, L. K.; LIMA, M. I. S. **Allelopathic potential of leaf extract of *Annona glabra* L. (Annonaceae)**. *Acta Botanica Brasilica*, Feira de Santana, v. 24, n. 3, p. 631-635, 2010.

MAURI, M.C., FERRARA, A., BOSCATI, L., BRAVIN, S., ZAMBERLAN, F., ALECCI, M., INVERNIZZI, G. Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. **Neuropsychobiol** 37: 124–129, 1998.

MELLO-SILVA, R.; LOPES, J.C.; PIRANI, J.R. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Annonaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 37-56, 2012.

MEREDITH, L.S. Depression: 20 years of progress. **Medical Care** .42 (6): 499-501. 2004.

MILLAN, M.J. The role of monoamines in the actions of established and “novel” antidepressant agents: a critical review. **Eur J Pharmacol.**, v.500, p.371-84, 2004.

MIRALHA, J. E. C. **Plantas Mediciniais de Uso na Amazônia**. 2a Edição Cultural CEJUP, 1995.

MITANI, H.; SHIRAYAMA, Y.; YAMADA, T.; KAWAHARA, R. Plasma levels of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and cortisol, and serotonin turnover in depressed patients. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, v.30, p.531-534, 2006.

MIYASAKA, L.; ATALLAH, A. **Risco de interação de drogas: combinações de uso de antidepressivos e outras drogas**. *Revista Saúde Pública*, v. 37, n. 2, p. 212-215, abr. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/cgi-bin/wxix.exe/iah/>>. Acesso em: 09 maio 2003

MORISHITA, S. AOKI, S. Effects of tricyclic antidepressants on protein kinase C activity in rabbit and human platelets in vivo. **Journal of Affective Disorders**, 70 329–332. 2002.

MORENO, R.A.; HUPFELD D.; SOARES, M.B.M. A escolha do antidepressivo nos transtornos de humor: papel da nortriptilina. **J Bras Psiquiatria**, n.1, p.33S-35S, 1999.

MOREIRA, M. R. C., et al. **Prospecção tecnológica do mirtenol: um monoterpeno com atividade farmacológica sobre o sistema nervoso central**. Anais do Simpósio Internacional de Inovação Tecnológica-SIMTEC, v. 1, n. 1, 2013.

MOSCA, J. L., CAVALCANTE, C. E. B., DANTAS, T. M. **Características botânicas das principais anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006.

MUSSELMAN, *et al.* Comparison of the synaptosomal uptake inhibition of NASH, J.; NUTT, D. **Antidepressant**. **Psychiatry**, v. 6, n. 7, p. 289-294, 2007. NEMEROFF, C.B.; OWENS, M.J. **Treatment of mood disorders**. **Nature Neurosc.** 5, 1068-1070. 2002

MURRAY CJL, LOPEZ AD. **Global mortality, disability and the contribution of risk factors: global burden of disease study**. **Lancet**;349:1436-42. 1997.

NADAL-VICENS, M.; CHYUNG, J.H.; TURNER, T.J. Farmacologia da neurotransmissão serotoninérgica e adrenérgica central. **In GOLAN et al. Princípios de farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

NASH, J.; NUTT, D. Antidepressants. **Psychiatry** 6:7, p.289-94, 2007.

NEIRA LR. Aspectos generales y clínicos de La depresión. In: Grupo de psiquiatras latinoamericanos para la docencia em depresión. **Diagnóstico y tratamiento de La enfermedad depresiva**. México: AWWE, p. 1926. 2013.

NEMEROFF, C. B. The burden of severe depression: A review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **J Psychiatr Res**, 41:189-206, 2007.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. **Neurobiology of depression**. **Neuron**, 34:13-25, 2002.

N'GOUEMO P, KOUDOGBO B, TCHIVOUNDA HP, AKONO-NGUEMA C, ETOUA MM. Efeitos do extrato etanólico de *Annona muricata* sobre crises convulsivas induzidas por pentilenotetrazol em ratinhos. **Phytother Res** 11 : 243-245. 1997.

NOVAS, M.L. *et al.* Proconvulsant and anxiogenic effects of n-butyl-h-carboline-3-carboxylate, on endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 30, p. 331-336, 1988.

OMS. **Classificação dos Transtornos Mentais e do Comportamento da CID-10**. Descrições Clínicas e Diretrizes Diagnósticas. Porto Alegre: Artes Médicas; 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde - CID-10. ed. EDUSP: São Paulo. Disponível em: < <http://www.datasus.gov.br/cid10/V2008/cid10.htm>>. Acesso em: 29 out. 2014

OLIVEIRA, S. L. de; GUERRA, N. B.; MACIEL, M. I. S.; LIVERA, A. V. S. Polyphenoloxidase activity, polyphenols concentration and browning intensity during soursop (*Annona muricata*, L.) maturation. *Journal of Food Science, Chicago*, 59 (4): 1050-1052.1994.

ONIMAWO, I.A Proximate composition and selected physicochemical properties of the seed, pulp and oil of sour sop (*Annona muricata*) *Plant Foods For Human Nutrition*, 57 (2): 165-171. 2002.

OVIEDO, V; GARCÍA, M; DÍAZ, C; MARDER, M; COSTA, M; RINCÓN, J; SÁNCHEZ, C; GUERRERO, M. Extracto y fracción alcaloidal de *Annona muricata* con actividad de tipo ansiolítica em ratones. **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.** v. 38, p. 105-120, 2009.

PAIZANIS, E., HAMON, M., LANFUMEY, L. 2007. Hippocampal Neurogenesis, Depressive Disorders, and Antidepressant Therapy. **Neural Plasticity**, Article ID 73754, v. 7. 2007.

PADMA, P.; PRAMOD, N.P.; THYAGARAJAN, S.P.; KHOSA, R.L. **Effect of the extract of *Annona muricata* and *petunia nyctaginiflora* on herpes simplex virus.** J. Ethnopharmacol. v.61, n.1, p.81-83, 1998.

PASSOS, Carolina S. et al. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Rev Bras Farmacogn**, v. 19, p. 140-149, 2009.

PAULKE, A.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; WURGLICS, M. Determination of St. John's wort flavonoid - metabolites in rat brain through high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 832, n.1, p.109-13, 2006.

PATEL, N. C. CHEN, Y.; GUO, J. J. Hemorrhagic stroke associated with antidepressant use in patients with depression: does degree of serotonin reuptake inhibition matter. **Pharmacoeconomol Drug Saf**, v. 18, n. 3, p. 196-202, doi:10.1002/pds.1699, 2009.

PATHAK, P. ET AL. Atividade antimicrobiana in vitro e análise fitoquímica das folhas de *Annona muricata*. **International Journal of Pharma Investigaçã o e Desenvolvimento** , v. 2, n. 5, p. 1-6, 2010.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 14, n. 01, p. 40-44, 2004.

PEDROSO, I.A.; LUNARDELLO, M.A.(s.d). **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de folhas e frutos de *Annona muricata* L.** Universidade São Judas Tadeu, 2008

POSSER, T. *et al.* Antidepressant-like effect of the organoselenium compound ebselen in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic systems. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 602, p. 85-91, 2009.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, 266:730-2, 1977.

PROVENSI, G. Investigação da Atividade Ansiolítica de *Passiflora Alata* Curtis (Passifloraceae). **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.

QUEVEDO, J. **Pesquisa Translacional em Medicina**. 2009. Disponível em: < <http://periodicos.unesc.net/index.php/saude/article/view/143/148> >. acesso em: 18 de novembro 2014.

QUISPE M. A.; ZAVALA C, D.; ROJAS C. J. Efecto citotóxico selectivo in vitro de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. **Revista Peruana De Medicina Experimental y Salud Publica**, v.23, n. 4, p. 265- 269, 2006.

RANG & DALE.H. P. Rang.et al. **Farmacologia** - Rio de Janeiro : Elsevier,. 768p. 2010.

RAPOSO, J. I. C. C. **Fatores associados à variação de peso em doentes com depressão**. 2010. Dissertação (Mestrado em Dietética e Nutrição) – Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

REIS, C. N. ***Annona muricata*: análise química e biológica dos frutos de gravioleira**. Rio de Janeiro, 2011. 150p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2011.

RIBEIRO, R. I. M.; KURIBAYASHI, J. S.; BORGES JUNIOR, P. C.; BELETTI, M. E.; ESPINDOLA, F. S.; CASSALI, G. D.; LOYOLA, A. M. Inibicao de metaloproteinases por extratos aquosos de Aloe vera, *Annona muricata* e cha preto. **Biosci. J., Uberlancia**, v. 26, p. 121-127, jan./fev. 2010.

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

RODRIGUEZ-LANDA, J.F.; CONTRERAS, C.M. Uma revisão de observações clínicas e experimentais sobre as ações do antidepressivo e os efeitos secundários produzidos por *Hypericum perforatum* extratos. **Phytomedicine** , v. 10, n. 8, p. 688-699, 2003.

RODRIGUES, A. D. **Atividade antioxidante e anticonvulsivante de suco de uva bordô e seu efeito no comportamento de ratos wistar**.2014.Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

ROGÓZ, Z., SKUZA, G., LEGUTKO, B. Repeated treatment with mirtazapine induces brain derived neurotrophic factor gene expression in rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v.56, n.4, p.661-671. 2005.

SACRAMENTO, C. K., FARIA, J.C., CRUZ, F. L., et al. **Caracterização física e química de frutos de três tipos de gravioleira (*Annona muricata* L.)**. *Rev. Bras. Frutic.*, vol.25, no.2, p.329-331. ISSN 0100-2945. ago. 2003.

SAABY, L.; RASMUSSEN, H. B.; JÄGER, A. K. MAO-A inhibitory activity of quercetin from *Calluna vulgaris* (L.) Hull. **J Ethnopharmacol**, v. 121, p. 178-181, 2009.

SAIZ,R.J., MONTES,R.J.M. Pharmacological treatment of depression. **Rev Clin Esp.** May;205(5):233-40. 2005.

SAKURATA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S. & KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**, 31: 1279-1285, 1992.

SALGADO, H.; KOHR, G.; TREVINO, M. Noradrenergic “Tone” determines dichotomous control of cortical spike timing-dependent plasticity. **Scientific reports**, v.417 (2), P.1-7, 2012.

SÁNCHEZ-MATEO, CC et al. A actividade antidepressiva de alguns *Hypericum reflexum* L. fil. extractos no teste de natação forçada em camundongos. *Jornal de Etnofarmacologia* , 112 v., n. 1, p. 115-121, 2007.

SÁNCHEZ, C. & HYTTEL, J. Comparison of the Effects of Antidepressants and Their Metabolites on Reuptake of Biogenic Amines and on Receptor Binding, **Cellular and Molecular Neurobiology**, Vol. 19, No. 4. 1999.

SANTARELLI, L., SAXE, M., GROSS, C., BATTAGLIA, F., DULAWA, S., WEISSTAUB, N., LEE, J., DUMAN, R., ARANCIO, O., BELZUNG, C., HEN, R.. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effect of antidepressants. **Science** vol 301, 8 August. 2003.

SARIN L. Clasificación y evolución de La enfermedad depresiva. In: Grupo de psiquiatras latinoamericanos para la docência em depresión. **Diagnóstico y tratamiento de La enfermedad depresiva**. México: AWWE, p. 3542. 2013. Obs ainda citar

SARIN L, DUAİLÍBI K. **Diagnóstico e tratamento da depressão: a multidimensionalidade do transtorno depressivo maior: alcançando a remissão dos sintomas físicos, emocionais e a funcionalidade plena do paciente**. Planmark, 1. ed. São Paulo.30 p. 2013.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2001.

SCHILDKRAUT JJ: The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**;122(5):509-522.1965.

SCHULTZ, A.R.H. **Introdução à botânica sistemática**. 4a ed. ver. Porto Alegre, Ed. Da Universidade UFRS. 1984.

SENE-COSTA E. **Sobre os transtornos do humor:Universo da Depressão**. São Paulo: editora .Agora; p.39-83. 2006.

SEPLANTEC – Subsecretaria de Ciências e Tecnologia. **Inventário de Plantas Medicinais do Estado da Bahia**. p. 925-927, 1979.

serotonin by St John`s wort products. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.56, p. 813-818, 2004.

SHAHIDI, F.; Ho, CT **Phenolic compounds in foods and natural health products.** Washington, DC.: American Chemical Society, 320 p. 2005.

SHER, L.; MANN, J.J.; TRASKMAN-BENDZ, L.; WINCHEL, R.; HUANG, Y.Y.; FERTUCK, E.; STANLEY, B.H.. Lower cerebrospinal fluid homovanilic acid levels in depressed suicide attempters. **J. Affect. Disord.**, v. 90, p.83-89, 2006.

SAYAR, K.; AKSU, G.; AK, I.; TOSUN, M. Venlafaxine treatment of fibromyalgia. **Annals of Pharmacotherapy**, v.37, 1561-1565, 2003.

SIEBRA, C. A. **Atividades biológicas de Annona glabra Linn., ANNONACEAE.** p. 83. Curitiba: Dissertação de mestrado, UFPR, 2007.

SILVA, L.F., P. PEREIRA & E. ELISABETSKY. **Genetic and Pharmacology 32:** 47-50. 1998.

SILVA, M.R. **Fundamentos de Farmacologia.** Volume II. Edart. 1973.

SILVA, P. **Farmacologia.** 6^a edição. Editora Guanabara Koogan. 2002.

SILVA, M.C.C. **Estudo comportamental e neuroquímico do ácido alfa-lipóico associado à paroxetina e desvenlafaxina em modelos de depressão em camundongos.** Fortaleza,2012. Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO com sede na Universidade Estadual do Ceará.

SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; DAMASCENO, E. I.; FÉLIX, J. S.; MAIA, J. G. (2009) **Atividade antioxidante dos óleos essenciais de dois tipos químicos de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume).** In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32^a, 2009, Fortaleza. *Anais da 32^a Reunião da Sociedade Brasileira de Química.* Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará.

SIMÕES, C. M. O., *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5.ed., Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1102 p. ISBN 8570256825. 2003.

SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.

SOUZA, E. B. R. **Análise exploratória do efeito do solvente na análise de metabólitos secundários das folhas de Annonamuricata L. por métodos quimiométricos.** Paraná. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, p.104, 2009.

SWERTS, OLIVEIRA M. S. **Manual para elaboração de trabalhos científicos.** Alfenas: UNIFENAS, 2010. Disponível em: <http://www.unifenas.br/pesquisa/manualmetodologia/normasdepublicacoes.pdf> Acesso em: 25 dez. 2013.

SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. **Eur J Pharmacol**, v. 375, n. 1-3, p. 31-40, 1999.

STAHL, S.M. **Psicofarmacologia: Bases neurofisiológicas e aplicações práticas**. Edit. Guanabara Koogan, 3ª ed. p.337.2010.

STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 230p. 1996

STAN, T. L. **Modulação da transmissão de glutamato 5-HT mediada pelo receptor no hipocampo e no córtex pré-frontal e a sua relação com a cognição e a depressão**. 2014.

STARR, L.R.; HAMMEN, C.; BRENNAN, P.A.; NAJMAN, J.M. Serotonin transporter gene as a predictor of stress generation in depression. **J. Abnorm Psychol**, 2012. (in press)

STONE, E.A.; LIN, Y. & QUARTERMAIN, D. A Final Common Pathway for Depression? Progress Toward a General Conceptual Framework. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, p. 508 – 524, 2008.

STOPPE A. Abordagem clínica da depressão e da ansiedade. **J. Bras. Med.** 91(3):13-26. 2006.

TAKEDA H, TSUJI M, MIYAMOTO J, MATSUMIYA T. Rosmarinic acid and caffeic acid reduce the defensive freezing behavior of mice exposed to conditioned fear stress. **Psychopharmacology**; 164: 233-235.2002b.

TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **Jpn. J. Pharmacol.**, 19b: 418, 1970.

TANAE, M. M. et al. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 309-313, 2007.

TENG, C.T, CEZAR, L.T.S. Depressão. Revista Brasileira de Medicina, São Paulo. 2010. Disponível: http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id_materia=4526&fase=imprime Acesso em 18 de setembro de 2014.

TOLEDO, A.C.O., et al. **Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica**. Lecta. Bragança Paulista, 21(1/2): p. 7-13, jan/dez, 2003

TÔNISSAR, M.; MÄLLO, T.; ELLER, M.; HÄIDKIND, R.; KÕIV, K; HARRO, J. Rat behavior after chronic variable stress and partial lesioning of 5-HT-ergic neurotransmission: effects of citalopram. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 32:164-77, 2008.

TOSCAN, C. M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**. 2010. 69p. Dissertação (Mestrado em biotecnologia). Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2010.

TRIVEDI, M. H.; RUSH, A. J.; WISNIEWSKI, S. R.; NIERENBERG, A. A.; WARDEN, D.; RITZ, L. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement based care in STAR*D: implications for clinical practice. **Am J Psychiatry**, 163:28-40, 2006.

VALLADA, H. P. V.; LIMA, I. V. M.; SOUGEY, E. B. **Farmacogenética do tratamento da depressão**: busca de marcadores moleculares de boa resposta aos antidepressivos. 2004, Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-60832004000100007>. Acesso em: 22 de dezembro de 2014.

VÁZQUEZ, M. M. REYES, R. E. **Metabolismo secundário em annonacea: Fonte potencial de drogas**. In: .V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene à exportação. Botucatu-SP. 2013

VENÂNCIO, E. T.; RIOS, E. R.V.; SOUSA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Neurobiologia das emoções e principais alvos farmacológicos: foco sobre medo e ansiedade. Revista Eletrônica **Pesquisa Médica** – v. 2, n.4, 2008.

VERSIANI, M. **Depressão uma doença crônica**. Ciência hoje 2004; 34 (201): 34-37

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, C. *et al.* Frequency of climbing behavior as a predictor of altered motor activity in rat forced swimming test. **Neurosci. Lett.**, v. 445, p. 170–173, 2008.

VIEIRA, G. H. F.; MOURAO, J. A.; ANGELO, A. M.; COSTA, R. A.; VIEIRA, R. H. S. F. Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against gram positive and gram negative bacteria. **Rev. Inst. Med. Trop.**, Sao Paulo, v. 52, n. 3, p. 129-132, maio/jun., 2010.

VISMARI, L.; ALVES, G. J.; PALERMO NETO, J. **Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema**. São Paulo. **Rev. Psiquiatr. Clín.**, v. 35, n. 5, p.196-204, 2008.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 143: 711-714, 1973.

VIZZOTTO, M., KROLOW, A.C., WEBER, G. E. B. **Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e Sua Importância**. EMBRAPA: Clima Temperado. Pelotas, RS, 2010.

WANCATA, J.; FRIEDRICH, F. **Depression: A diagnosis aptly used?** Psychiatry Danubina, Zagreb, v.23, n.4, p.406-411, 2011.

WAGNER; WISENAUER. **Fitoterapia: fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas**. São Paulo – SP: Ed. Pharmabooks, 2006.

WANNMACHER L. **Uso Racional de Antidepressivos**. In: Uso Racional de Medicamentos: temas selecionados. No 9. Ano 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health topics: Depression**. 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/depression/en>>. Acesso em: 29 out. 2014.

WILBUR, B.G. & KELLY, K.A. Effect of proximal gastric, complete gastric and truncal vagotomy on canine gastric activity, motility and emptying. **Ann. Surg.**, 178: 295-303, 1973.

WILLIAMSON, Elizabeth M. **Pharmacological Methods in Phytotherapy Research**. Volume 1. Editora Wiley. 1996.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. **Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs**. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111: 544-547, 1962.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology** 52:90–110. 2005.

With USDA's. National Agricultural Library, USA, 1990. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Classificação de transtornos mentais e de comportamento – CID10; Porto Alegre, Artes.2007.

WING, V. C. & SHOAI, M. Examining the clinical efficacy of bupropion and nortriptyline as smoking cessation agents in a rodent model of nicotine withdrawal. **Psychopharmacology** 195:303–313.2007.

WOOLFE, G. & MACDONALD, A.D. **The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride**. J. Pharmacol. Exp. Ther. 80: 300-307, 1944.

YAN, H. C.; CAO, X.; DAS, M.; ZHU, X. H.; GAO, T. M. Behavioral animal models of depression. **Neurosci Bull**, 26:327-37, 2010.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.

ZARATE, C., JR.; MACHADO-VIEIRA, R.; HENTER, I.; IBRAHIM, L.; DIAZGRANADOS, N.; SALVADORE, G. Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders? **Harv Rev Psychiatry**, v. 18, n. 5, p. 293-303, 2010.

ANEXOS



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 40883-1	Data da Emissão: 29/08/2013 10:15	Data para Revalidação*: 28/09/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: CRISTINA KELLY DE SOUZA RODRIGUES	CPF: 017.335.793-89
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E MECANISMOS CENTRAIS DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA NA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE ANNONA MURICATA L. EM CAMUNDONGOS.	
Nome da Instituição : Universidade Regional do Cariri	CNPJ: 06.740.864/0001-26

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	COLETA DE MATERIAL BOTÂNICO E FABRICAÇÃO DE EXTRATO	09/2013	10/2013

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Comunicar a APA Araripe do início da pesquisa. Obter permissão dos proprietários das áreas de realização da pesquisa. Enviar relatório final para a APA Araripe.
---	--

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		CE	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL CHAPADA DO ARARIPE	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Annona muricata

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n°154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 78276524



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 40883-1	Data da Emissão: 29/08/2013 10:15	Data para Revalidação*: 28/09/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: CRISTINA KELLY DE SOUZA RODRIGUES	CPF: 017.335.793-89
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E MECANISMOS CENTRAIS DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA NA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE ANNONA MURICATA L. EM CAMUNDONGOS.	
Nome da Instituição : Universidade Regional do Cariri	CNPJ: 06.740.864/0001-26

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Plantas)	Folhas
2	Método de captura/coleta (Plantas)	Coleta manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Regional do Cariri	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 78276524



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 40883-1	Data da Emissão: 29/08/2013 10:15	Data para Revalidação*: 28/09/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: CRISTINA KELLY DE SOUZA RODRIGUES	CPF: 017.335.793-89
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E MECANISMOS CENTRAIS DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA NA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE ANNONA MURICATA L. EM CAMUNDONGOS.	
Nome da Instituição : Universidade Regional do Cariri	CNPJ: 06.740.864/0001-26

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 78276524



Página 4/4



Herbário Caririense Dárdano de Andrade – Lima
Universidade Regional do Cariri - URCA

NÚMERO DE HERBÁRIO

Remetente: N° 20.2013

HERBÁRIO CARIRIENSE DÁRDANO DE ANDRADE-LIMA (HCDAL/URCA)
Contato: Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva (herbario@urca.br)
Universidade Regional do Cariri - URCA
Departamento de Ciências Biológicas
Rua: Cel. Antonio Luiz, 1161
Campus do Pimenta - Crato - CE
CEP: 63.105-100

Destinatário: Data: 25.07.2013

LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA E QUÍMICA MOLECULAR
Contato: Cristina Kelly de Souza

N° Amostras: 01

Tipo de Operação: Número de Herbário

	N° HCDAL	NOME POPULAR	FAMÍLIA	NOME CIENTÍFICO	RESPONSÁVEL
01	10.100	Graviola	Annonaceae	<i>Annona muricata</i> L.	Ana Moraes-Mendonça

Cordialmente,


Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva
Curadora do HCDAL



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS

Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta
Fones: (088) 3102.1291 / Fax: (088) 3102.1291
CEP 63105-000 – Crato - CE - Brasil
propg@urca.br - www.urca.br/ceua



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado “ **AValiação DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E MECANISMOS CENTRAIS DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA NA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE ANNONA MURICATA L.E CONSTITUINTE MAJORITÁRIO EM CAMUNDONGOS.**”
Processo Nº 00212/2013.1 foi **APROVADO** pela Comissão de experimentação e
Uso de Animais – CEUA/URCA. Protocolo.

Irwin Rose Alencar de Menezes
Presidente do CEUA/URCA

CRATO-CE
2013

APÊNDICES

APÊNDICES 1.

Dados da análise estatística do teste de avaliação da atividade antidepressiva do EHFAM (5, 10, 20 mg/Kg, v. i.p.) sobre a latência de imobilidade em camundongos submetidos ao teste de nado focado (TNF).

EHFAM - ANÁLISE ESTATÍSTICA - TESTE NADO FORÇADO (TNF) Pzf: 1 way ANOVA of data 1 - 02.09.2013

Col. stats		A	B	C	D	E	F	G
		CONT	FLU 10	BUP 20	IMI 30	EHFAM 5	EHFAM 10	EHFAM 20
1	Number of values	9	9	9	9	9	9	9
2								
3	Minimum	149.0	71.00	30.00	53.00	56.00	72.00	76.00
4	25% Percentile	157.0	73.50	41.50	55.00	95.00	105.5	113.5
5	Median	166.0	89.00	65.00	61.00	108.0	146.0	130.0
6	75% Percentile	203.5	106.5	94.00	73.50	115.0	163.5	159.5
7	Maximum	289.0	119.0	110.0	77.00	127.0	175.0	163.0
8								
9	Mean	184.1	91.11	67.67	64.00	102.7	135.2	132.0
10	Std. Deviation	44.77	17.43	28.60	9.500	20.57	34.77	29.00
11	Std. Error	14.92	5.811	9.532	3.167	6.856	11.59	9.667
12								
13	Lower 95% CI of mean	149.7	77.71	45.69	56.70	86.86	108.5	109.7
14	Upper 95% CI of mean	218.5	104.5	89.65	71.30	118.5	162.0	154.3
15								
16	Sum	1657	820.0	609.0	576.0	924.0	1217	1188

1way ANOVA					
1	Table Analyzed	Data 1			
2					
3	One-way analysis of variance				
4	P value	< 0.0001			
5	P value summary	***			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
7	Number of groups	7			
8	F	20.16			
9	R squared	0.6836			
10					
11	Bartlett's test for equal variances				
12	Bartlett's statistic (corrected)	19.05			
13	P value	0.0041			
14	P value summary	**			
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
16					
17	ANOVA Table	SS	df	MS	
18	Treatment (between columns)	98320	6	16390	
19	Residual (within columns)	45520	56	812.8	
20	Total	143800	62		
21					
22	Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
23	IMI 30 vs CONT	-120.1	12.64	Yes	***
24	IMI 30 vs EHFAM 10	-71.22	7.494	Yes	***
25	IMI 30 vs EHFAM 20	-68.00	7.155	Yes	***
26	IMI 30 vs EHFAM 5	-38.67	4.069	Yes	*
27	IMI 30 vs FLU 10	-27.11	2.853	No	ns
28	IMI 30 vs BUP 20	-3.667	---	No	ns
29	BUP 20 vs CONT	-116.4	12.25	Yes	***
30	BUP 20 vs EHFAM 10	-67.56	7.109	Yes	***
31	BUP 20 vs EHFAM 20	-64.33	6.770	Yes	***
32	BUP 20 vs EHFAM 5	-35.00	3.683	Yes	*
33	BUP 20 vs FLU 10	-23.44	---	No	ns
34	FLU 10 vs CONT	-93.00	9.786	Yes	***
35	FLU 10 vs EHFAM 10	-44.11	4.642	Yes	**
36	FLU 10 vs EHFAM 20	-40.89	4.303	Yes	**
37	FLU 10 vs EHFAM 5	-11.56	1.216	No	ns
38	EHFAM 5 vs CONT	-81.44	8.570	Yes	***
39	EHFAM 5 vs EHFAM 10	-32.56	3.426	Yes	*
40	EHFAM 5 vs EHFAM 20	-29.33	3.087	Yes	*
41	EHFAM 20 vs CONT	-52.11	5.483	Yes	***
42	EHFAM 20 vs EHFAM 10	-3.222	0.3391	No	ns
43	EHFAM 10 vs CONT	-48.89	5.144	Yes	***

APÊNDICES 2.

Dados da análise estatística do teste de avaliação da acinesia induzida por reserpina sobre o EHFAM (5, 10, 20 mg/Kg, v. i.p.) .

1way ANOVA Tabular results					
1	Table Analyzed	Data 1			
2					
3	Repeated Measures ANOVA				
4	P value	< 0.0001			
5	P value summary	***			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
7	Number of groups	8			
8	F	38.30			
9	R squared	0.8272			
10					
11	Was the pairing significantly effective?				
12	R squared	0.3250			
13	F	19.50			
14	P value	< 0.0001			
15	P value summary	***			
16	Is there significant matching? (P < 0.05)	Yes			
17					
18	ANOVA Table	SS	df	MS	
19	Treatment (between columns)	10250	7	1464	
20	Individual (between rows)	5966	8	745.8	
21	Residual (random)	2141	56	38.23	
22	Total	18360	71		
23					
24	Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary
25	10 vs S	-33.11	16.06	Yes	***
26	10 vs BUP 20	-29.22	14.18	Yes	***
27	10 vs FLUO 10	-21.33	10.35	Yes	***
28	10 vs IMI 30	-21.00	10.19	Yes	***
29	10 vs 5	-19.56	9.488	Yes	***
30	10 vs 20	-2.889	1.402	No	ns
31	10 vs RES 5	-2.667	---	No	ns
32	RES 5 vs S	-30.44	14.77	Yes	***
33	RES 5 vs BUP 20	-26.56	12.88	Yes	***
34	RES 5 vs FLUO 10	-18.67	9.057	Yes	***
35	RES 5 vs IMI 30	-18.33	8.895	Yes	***
36	RES 5 vs 5	-16.89	8.194	Yes	***
37	RES 5 vs 20	-0.2222	---	No	ns
38	20 vs S	-30.22	14.66	Yes	***
39	20 vs BUP 20	-26.33	12.78	Yes	***
40	20 vs FLUO 10	-18.44	8.949	Yes	***
41	20 vs IMI 30	-18.11	8.787	Yes	***
42	20 vs 5	-16.67	8.086	Yes	***
43	5 vs S	-13.56	6.577	Yes	***
44	5 vs BUP 20	-9.667	4.690	Yes	**
45	5 vs FLUO 10	-1.778	0.8625	No	ns
46	5 vs IMI 30	-1.444	---	No	ns
47	IMI 30 vs S	-12.11	5.876	Yes	***
48	IMI 30 vs BUP 20	-8.222	3.989	Yes	*
49	IMI 30 vs FLUO 10	-0.3333	---	No	ns
50	FLUO 10 vs S	-11.78	5.714	Yes	***
51	FLUO 10 vs BUP 20	-7.889	3.827	Yes	**
52	BUP 20 vs S	-3.889	1.887	No	ns

APÊNDICES 3.

Dados da análise estatística da avaliação da atividade antidepressiva do EHFAM (5, 10, 20 mg/Kg,v. i.p.) sobre de cruzamentos (NC) de camundongos submetidos ao teste de Campo Aberto (TCA).

EHFAM - ANÁLISE ESTATÍSTICA - TESTE CAMPO ABERTO - CA NC Pzf: 1 way ANOVA of data 1 - 02.09.2013

Col. stats		A	B	C	D	E	F	G
		CONT	DZP 2	FLU 10	BUP 20	IMI 30	EHFAM 5	EHFAM 10
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of values	9	9	9	9	9	9	9
2								
3	Minimum	76.00	9.000	76.00	76.00	27.00	47.00	43.00
4	25% Percentile	79.50	22.00	76.50	78.00	34.00	71.00	46.50
5	Median	81.00	58.00	81.00	81.00	61.00	84.00	62.00
6	75% Percentile	88.50	62.00	83.00	82.50	71.00	91.50	73.50
7	Maximum	89.00	73.00	84.00	83.00	73.00	100.0	87.00
8								
9	Mean	83.33	44.67	79.78	80.33	53.56	79.89	61.22
10	Std. Deviation	4.975	23.15	3.270	2.500	18.48	16.02	15.03
11	Std. Error	1.658	7.715	1.090	0.8333	6.160	5.340	5.010
12								
13	Lower 95% CI of mean	79.51	26.87	77.26	78.41	39.35	67.58	49.67
14	Upper 95% CI of mean	87.16	62.46	82.29	82.26	67.76	92.20	72.78
15								
16	Sum	750.0	402.0	718.0	723.0	482.0	719.0	551.0

1way ANOVA					
1	Table Analyzed	Data 1			
2					
3	One-way analysis of variance				
4	P value	< 0.0001			
5	P value summary	***			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
7	Number of groups	8			
8	F	10.26			
9	R squared	0.5289			
10					
11	Bartlett's test for equal variances				
12	Bartlett's statistic (corrected)	51.66			
13	P value	< 0.0001			
14	P value summary	***			
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
16					
17	ANOVA Table	SS	df	MS	
18	Treatment (between columns)	13520	7	1931	
19	Residual (within columns)	12040	64	188.2	
20	Total	25560	71		
21					
22	Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
23	DZP 2 vs CONT	-38.67	8.457	Yes	***
24	DZP 2 vs BUP 20	-35.67	7.800	Yes	***
25	DZP 2 vs EHFAM 5	-35.22	7.703	Yes	***
26	DZP 2 vs FLU 10	-35.11	7.679	Yes	***
27	DZP 2 vs EHFAM 20	-17.33	3.791	Yes	*
28	DZP 2 vs EHFAM 10	-16.56	3.621	Yes	*
29	DZP 2 vs IMI 30	-8.889	1.944	No	ns
30	IMI 30 vs CONT	-29.78	6.513	Yes	***
31	IMI 30 vs BUP 20	-26.78	5.856	Yes	**
32	IMI 30 vs EHFAM 5	-26.33	5.759	Yes	**
33	IMI 30 vs FLU 10	-26.22	5.735	Yes	***
34	IMI 30 vs EHFAM 20	-8.444	1.847	No	ns
35	IMI 30 vs EHFAM 10	-7.667	---	No	ns
36	EHFAM 10 vs CONT	-22.11	4.836	Yes	*
37	EHFAM 10 vs BUP 20	-19.11	4.180	Yes	*
38	EHFAM 10 vs EHFAM 5	-18.67	4.082	Yes	*
39	EHFAM 10 vs FLU 10	-18.56	4.058	Yes	*
40	EHFAM 10 vs EHFAM 20	-0.7778	---	No	ns
41	EHFAM 20 vs CONT	-21.33	4.666	Yes	*
42	EHFAM 20 vs BUP 20	-18.33	4.010	Yes	*
43	EHFAM 20 vs EHFAM 5	-17.89	3.912	Yes	*
44	EHFAM 20 vs FLU 10	-17.78	3.888	Yes	**
45	FLU 10 vs CONT	-3.556	0.7776	No	ns
46	FLU 10 vs BUP 20	-0.5556	---	No	ns
47	FLU 10 vs EHFAM 5	-0.1111	---	No	ns
48	EHFAM 5 vs CONT	-3.444	---	No	ns
49	EHFAM 5 vs BUP 20	-0.4445	---	No	ns
50	BUP 20 vs CONT	-3.000	---	No	ns

APÊNDICE 5..

Dados da análise estatística da atividade antidepressiva do EHFAM (5, 10, 20 mg/Kg,v. i.p.) sobre de cruzamentos (NG) de camundongos submetidos ao teste de Campo Aberto (TCA).

EHFAM - ANÁLISE ESTATÍSTICA - TESTE CAMPO ABERTO - CA NG Pzf: 1 way ANOVA of data 1 - 02.09.2013								
Col. stats		A	B	C	D	E	F	G
		CONT	DZP 2	FLU 10	BUP 20	IMI 30	EHFAM 5	EHFAM 10
1	Number of values	9	9	9	9	9	9	9
2								
3	Minimum	2.000	0.0	1.000	1.000	0.0	1.000	0.0
4	25% Percentile	2.000	0.0	2.000	1.000	0.5000	2.000	1.500
5	Median	2.000	1.000	2.000	2.000	1.000	3.000	2.000
6	75% Percentile	3.000	2.000	2.000	2.500	1.000	3.000	3.000
7	Maximum	3.000	2.000	2.000	3.000	1.000	4.000	4.000
8								
9	Mean	2.444	0.8889	1.889	1.889	0.7778	2.556	2.111
10	Std. Deviation	0.5270	0.9280	0.3333	0.7817	0.4410	0.8819	1.269
11	Std. Error	0.1757	0.3093	0.1111	0.2606	0.1470	0.2940	0.4231
12								
13	Lower 95% CI of mean	2.039	0.1756	1.633	1.288	0.4388	1.878	1.135
14	Upper 95% CI of mean	2.850	1.602	2.145	2.490	1.117	3.233	3.087
15								
16	Sum	22.00	8.000	17.00	17.00	7.000	23.00	19.00
1way ANOVA								
1	Table Analyzed	Data 2						
2								
3	One-way analysis of variance							
4	P value	< 0.0001						
5	P value summary	***						
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes						
7	Number of groups	8						
8	F	6.921						
9	R squared	0.4309						
10								
11	Bartlett's test for equal variances							
12	Bartlett's statistic (corrected)	20.28						
13	P value	0.0050						
14	P value summary	**						
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes						
16								
17	ANOVA Table	SS	df	MS				
18	Treatment (between columns)	28.43	7	4.062				
19	Residual (within columns)	37.56	64	0.5868				
20	Total	65.99	71					
21								
22	Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?			Summary	
23	IMI 30 vs EHFAM 5	-1.778	6.962	Yes			***	
24	IMI 30 vs CONT	-1.667	6.527	Yes			***	
25	IMI 30 vs EHFAM 10	-1.333	5.222	Yes			**	
26	IMI 30 vs BUP 20	-1.111	4.351	Yes			*	
27	IMI 30 vs FLU 10	-1.111	4.351	Yes			*	
28	IMI 30 vs EHFAM 20	-0.5556	2.176	No			ns	
29	IMI 30 vs DZP 2	-0.1111	---	No			ns	
30	DZP 2 vs EHFAM 5	-1.667	6.527	Yes			***	
31	DZP 2 vs CONT	-1.556	6.092	Yes			***	
32	DZP 2 vs EHFAM 10	-1.222	4.787	Yes			*	
33	DZP 2 vs BUP 20	-1.000	3.916	Yes			*	
34	DZP 2 vs FLU 10	-1.000	3.916	Yes			*	
35	DZP 2 vs EHFAM 20	-0.4444	---	No			ns	
36	EHFAM 20 vs EHFAM 5	-1.222	4.787	Yes			*	
37	EHFAM 20 vs CONT	-1.111	4.351	Yes			*	
38	EHFAM 20 vs EHFAM 10	-0.7778	3.046	No			ns	
39	EHFAM 20 vs BUP 20	-0.5556	---	No			ns	
40	EHFAM 20 vs FLU 10	-0.5556	---	No			ns	
41	FLU 10 vs EHFAM 5	-0.6667	2.611	No			ns	
42	FLU 10 vs CONT	-0.5556	---	No			ns	
43	FLU 10 vs EHFAM 10	-0.2222	---	No			ns	
44	FLU 10 vs BUP 20	0.0000	---	No			ns	
45	BUP 20 vs EHFAM 5	-0.6667	---	No			ns	
46	BUP 20 vs CONT	-0.5556	---	No			ns	
47	BUP 20 vs EHFAM 10	-0.2222	---	No			ns	
48	EHFAM 10 vs EHFAM 5	-0.4444	---	No			ns	
49	EHFAM 10 vs CONT	-0.3333	---	No			ns	
50	CONT vs EHFAM 5	-0.1111	---	No			ns	

APÊNDICES 6.

Dados da análise estatística da avaliação da antidepressiva do EHFAM (5, 10, 20 mg/Kg,v. i.p.) sobre de cruzamentos (NR) de camundongos submetidos ao teste de Campo Aberto (TCA).

EHFAM - ANÁLISE ESTATÍSTICA - TESTE CAMPO ABERTO - CA NR Pzf: 1 way ANOVA of data 1 - 02.09.2013								
Col. stats		A	B	C	D	E	F	G
		CONT	DZP 2	FLU 10	BUP 20	IMI 30	EHFAM 5	EHFAM 10
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of values	9	9	9	9	9	9	9
2								
3	Minimum	23.00	0.0	13.00	25.00	10.00	27.00	18.00
4	25% Percentile	27.00	0.5000	26.00	27.00	10.00	35.50	24.50
5	Median	37.00	3.000	40.00	28.00	12.00	38.00	29.00
6	75% Percentile	45.00	3.000	44.50	37.50	14.50	39.00	33.00
7	Maximum	51.00	4.000	47.00	45.00	15.00	43.00	34.00
8								
9	Mean	36.78	2.111	35.89	31.33	12.44	36.89	28.44
10	Std. Deviation	9.833	1.453	11.59	7.858	2.128	4.372	5.318
11	Std. Error	3.278	0.4843	3.864	2.619	0.7093	1.457	1.773
12								
13	Lower 95% CI of mean	29.22	0.9943	26.98	25.29	10.81	33.53	24.36
14	Upper 95% CI of mean	44.34	3.228	44.80	37.37	14.08	40.25	32.53
15								
16	Sum	331.0	19.00	323.0	282.0	112.0	332.0	256.0
1way ANOVA								
1	Table Analyzed	Data 3						
2								
3	One-way analysis of variance							
4	P value	< 0.0001						
5	P value summary	***						
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes						
7	Number of groups	8						
8	F	33.07						
9	R squared	0.7834						
10								
11	Bartlett's test for equal variances							
12	Bartlett's statistic (corrected)	47.12						
13	P value	< 0.0001						
14	P value summary	***						
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes						
16								
17	ANOVA Table	SS		df		MS		
18	Treatment (between columns)	10250		7		1465		
19	Residual (within columns)	2835		64		44.29		
20	Total	13090		71				
22	Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Mean Diff.		q		Significant? P < 0.05?		Summary
23	DZP 2 vs EHFAM 5	-34.78		15.68		Yes		***
24	DZP 2 vs CONT	-34.67		15.63		Yes		***
25	DZP 2 vs FLU 10	-33.78		15.23		Yes		***
26	DZP 2 vs BUP 20	-29.22		13.17		Yes		***
27	DZP 2 vs EHFAM 10	-26.33		11.87		Yes		***
28	DZP 2 vs EHFAM 20	-19.56		8.815		Yes		***
29	DZP 2 vs IMI 30	-10.33		4.658		Yes		**
30	IMI 30 vs EHFAM 5	-24.44		11.02		Yes		***
31	IMI 30 vs CONT	-24.33		10.97		Yes		***
32	IMI 30 vs FLU 10	-23.44		10.57		Yes		***
33	IMI 30 vs BUP 20	-18.89		8.515		Yes		***
34	IMI 30 vs EHFAM 10	-16.00		7.212		Yes		***
35	IMI 30 vs EHFAM 20	-9.222		4.157		Yes		**
36	EHFAM 20 vs EHFAM 5	-15.22		6.862		Yes		***
37	EHFAM 20 vs CONT	-15.11		6.812		Yes		***
38	EHFAM 20 vs FLU 10	-14.22		6.411		Yes		***
39	EHFAM 20 vs BUP 20	-9.667		4.357		Yes		**
40	EHFAM 20 vs EHFAM 10	-6.778		3.055		Yes		*
41	EHFAM 10 vs EHFAM 5	-8.444		3.807		No		ns
42	EHFAM 10 vs CONT	-8.333		---		No		ns
43	EHFAM 10 vs FLU 10	-7.444		---		No		ns
44	EHFAM 10 vs BUP 20	-2.889		---		No		ns
45	BUP 20 vs EHFAM 5	-5.556		---		No		ns
46	BUP 20 vs CONT	-5.444		---		No		ns
47	BUP 20 vs FLU 10	-4.556		---		No		ns
48	FLU 10 vs EHFAM 5	-1.000		---		No		ns
49	FLU 10 vs CONT	-0.8889		---		No		ns
50	CONT vs EHFAM 5	-0.1111		---		No		ns

APÊNDICES 7

Dados da análise estatística do teste de potencialização da atividade antidepressiva do EHFAM 0,5mg/kg e Fluoxetina 1mg/kg

EHFAM - ANÁLISE ESTATÍSTICA -- TESTE POTENCIALIZAÇÃO NF FLUOX Pzf: 1 way ANOVA of data 1 - 02.09.2013

1way ANOVA Column statistics		A	B	C	D	E	F
		CONT	FLU 10	FLU 1	EHFAM 5	EHFAM 0,5	FLU 1
		Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of values	9	9	9	9	9	9
2							
3	Minimum	97.00	22.00	83.00	32.00	83.00	12.00
4	25% Percentile	98.50	26.50	86.00	34.00	92.00	27.50
5	Median	107.0	43.00	101.0	51.00	108.0	49.00
6	75% Percentile	120.0	56.00	106.0	81.00	139.5	64.50
7	Maximum	121.0	65.00	119.0	91.00	149.0	72.00
8							
9	Mean	109.4	42.44	98.00	55.11	114.4	45.22
10	Std. Deviation	10.04	15.53	12.18	23.65	24.50	21.22
11	Std. Error	3.346	5.175	4.059	7.882	8.165	7.075
12							
13	Lower 95% CI	101.7	30.51	88.64	36.94	95.62	28.91
14	Upper 95% CI	117.2	54.38	107.4	73.29	133.3	61.54
1way ANOVA Tabular results							
1	Table Analyzed	POT.EHFAM +FLUO					
2							
3	Repeated Measures ANOVA						
4	P value	< 0.0001					
5	P value summary	***					
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes					
7	Number of groups	6					
8	F	195.2					
9	R squared	0.9606					
10							
11	Was the pairing significantly effective?						
12	R squared	0.2200					
13	F	35.83					
14	P value	< 0.0001					
15	P value summary	***					
16	Is there significant matching? (P < 0.05)	Yes					
17							
18	ANOVA Table	SS		df		MS	
19	Treatment (between columns)	50200		5		10040	
20	Individual (between rows)	14740		8		1843	
21	Residual (random)	2057		40		51.42	
22	Total	67000		53			
23							
24	Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Mean Diff.		q		Significant? P < 0.05?	Summary
25	FLU 10 vs EHFAM 0,5	-72.00		30.12		Yes	***
26	FLU 10 vs CONT	-67.00		28.03		Yes	***
27	FLU 10 vs FLU 1	-55.56		23.24		Yes	***
28	FLU 10 vs EHFAM 5	-12.67		5.299		Yes	**
29	FLU 10 vs FLU 1	-2.778		1.162		No	ns
30	FLU 1 vs EHFAM 0,5	-69.22		28.96		Yes	***
31	FLU 1 vs CONT	-64.22		26.87		Yes	***
32	FLU 1 vs FLU 1	-52.78		22.08		Yes	***
33	FLU 1 vs EHFAM 5	-9.889		4.137		Yes	**
34	EHFAM 5 vs EHFAM 0,5	-59.33		24.82		Yes	***
35	EHFAM 5 vs CONT	-54.33		22.73		Yes	***
36	EHFAM 5 vs FLU 1	-42.89		17.94		Yes	***
37	FLU 1 vs EHFAM 0,5	-16.44		6.880		Yes	***
38	FLU 1 vs CONT	-11.44		4.788		Yes	**
39	CONT vs EHFAM 0,5	-5.000		2.092		No	ns

APÊNDICES 8.

Dados da análise estatística do teste de potencialização da atividade antidepressiva do EHFAM 0,5mg/kg e Bupropiona 1mg/kg

1way ANOVA Tabular results					
1	Table Analyzed	Data 1			
2					
3	One-way analysis of variance				
4	P value	< 0.0001			
5	P value summary	***			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
7	Number of groups	6			
8	F	26.32			
9	R squared	0.7327			
10					
11	Bartlett's test for equal variances				
12	Bartlett's statistic (corrected)	7.847			
13	P value	0.1649			
14	P value summary	ns			
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
16					
17	ANOVA Table	SS	df	MS	
18	Treatment (between columns)	54560	5	10910	
19	Residual (within columns)	19900	48	414.6	
20	Total	74460	53		
21					
22	Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
23	BUP 20 vs 0,5	-76.00	11.20	Yes	***
24	BUP 20 vs S	-71.00	10.46	Yes	***
25	BUP 20 vs BUP 1	-66.33	9.773	Yes	***
26	BUP 20 vs 5	-16.67	2.456	No	ns
27	BUP 20 vs BUP 1 + E	-8.889	---	No	ns
28	BUP 1 + E vs 0,5	-67.11	9.888	Yes	***
29	BUP 1 + E vs S	-62.11	9.151	Yes	***
30	BUP 1 + E vs BUP 1	-57.44	8.464	Yes	***
31	BUP 1 + E vs 5	-7.778	---	No	ns
32	5 vs 0,5	-59.33	8.742	Yes	***
33	5 vs S	-54.33	8.005	Yes	***
34	5 vs BUP 1	-49.67	7.318	Yes	***
35	BUP 1 vs 0,5	-9.667	1.424	No	ns
36	BUP 1 vs S	-4.667	---	No	ns
37	S vs 0,5	-5.000	---	No	ns

APÊNDICES 9.

Dados da análise estatística do teste de potencialização da atividade antidepressiva do EHFAM 0,5mg/kg e Imipramina 1mg/kg

1way ANOVA Tabular results					
1	Table Analyzed	Data 1			
2					
3	Repeated Measures ANOVA				
4	P value	< 0.0001			
5	P value summary	***			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
7	Number of groups	6			
8	F	208.3			
9	R squared	0.9630			
10					
11	Was the pairing significantly effective?				
12	R squared	0.1659			
13	F	26.89			
14	P value	< 0.0001			
15	P value summary	***			
16	Is there significant matching? (P < 0.05)	Yes			
17					
18	ANOVA Table	SS	df	MS	
19	Treatment (between columns)	58220	5	11640	
20	Individual (between rows)	12030	8	1504	
21	Residual (random)	2236	40	55.91	
22	Total	72480	53		
23					
24	Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
25	IMIP 1 + E vs 0,5	-80.56	32.32	Yes	***
26	IMIP 1 + E vs S	-75.56	30.31	Yes	***
27	IMIP 1 + E vs IMIP 1	-73.67	29.56	Yes	***
28	IMIP 1 + E vs 5	-21.22	8.515	Yes	***
29	IMIP 1 + E vs IMIP 30	-15.67	6.286	Yes	***
30	IMIP 30 vs 0,5	-64.89	26.03	Yes	***
31	IMIP 30 vs S	-59.89	24.03	Yes	***
32	IMIP 30 vs IMIP 1	-58.00	23.27	Yes	***
33	IMIP 30 vs 5	-5.556	2.229	No	ns
34	5 vs 0,5	-59.33	23.81	Yes	***
35	5 vs S	-54.33	21.80	Yes	***
36	5 vs IMIP 1	-52.44	21.04	Yes	***
37	IMIP 1 vs 0,5	-6.889	2.764	No	ns
38	IMIP 1 vs S	-1.889	---	No	ns
39	S vs 0,5	-5.000	---	No	ns

APÊNDICES 10.1

Dados da análise estatística do teste avaliação de limiar pro-convulsivante. –Latencia de 1º convulsão.

1way ANOVA Tabular results					
1	Table Analyzed	Data 1			
2					
3	One-way analysis of variance				
4	P value	< 0.0001			
5	P value summary	***			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
7	Number of groups	8			
8	F	104.9			
9	R squared	0.9198			
10					
11	Bartlett's test for equal variances				
12	Bartlett's statistic (corrected)				
13	P value				
14	P value summary	ns			
15	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
16					
17	ANOVA Table	SS	df	MS	
18	Treatment (between columns)	40990000	7	5856000	
19	Residual (within columns)	3573000	64	55830	
20	Total	44570000	71		
21					
22	Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
23	PTZ 80 vs 20	-1699	21.57	Yes	***
24	PTZ 80 vs 10	-1699	21.57	Yes	***
25	PTZ 80 vs 5	-1699	21.57	Yes	***
26	PTZ 80 vs PTZ 40	-1556	19.75	Yes	***
27	PTZ 80 vs BUP 20	-1546	19.63	Yes	***
28	PTZ 80 vs IMI 30	-189.9	2.411	No	ns
29	PTZ 80 vs FLUO 10	-76.33	---	No	ns
30	FLUO 10 vs 20	-1623	20.60	Yes	***
31	FLUO 10 vs 10	-1623	20.60	Yes	***
32	FLUO 10 vs 5	-1623	20.60	Yes	***
33	FLUO 10 vs PTZ 40	-1479	18.78	Yes	***
34	FLUO 10 vs BUP 20	-1470	18.66	Yes	***
35	FLUO 10 vs IMI 30	-113.6	---	No	ns
36	IMI 30 vs 20	-1509	19.16	Yes	***
37	IMI 30 vs 10	-1509	19.16	Yes	***
38	IMI 30 vs 5	-1509	19.16	Yes	***
39	IMI 30 vs PTZ 40	-1366	17.34	Yes	***
40	IMI 30 vs BUP 20	-1356	17.22	Yes	***
41	BUP 20 vs 20	-152.9	1.941	No	ns
42	BUP 20 vs 10	-152.9	---	No	ns
43	BUP 20 vs 5	-152.9	---	No	ns
44	BUP 20 vs PTZ 40	-9.667	---	No	ns
45	PTZ 40 vs 20	-143.2	---	No	ns
46	PTZ 40 vs 10	-143.2	---	No	ns
47	PTZ 40 vs 5	-143.2	---	No	ns
48	5 vs 20	0.0000	---	No	ns
49	5 vs 10	0.0000	---	No	ns
50	10 vs 20	0.0000	---	No	ns

APÊNDICES 10.2

Dados da avaliação estatística do teste de avaliação do limiar pro-convulsivante. –Tempo de morte.

1way ANOVA Tabular results					
1	Table Analyzed	Data 2			
2					
3	Repeated Measures ANOVA				
4	P value	< 0.0001			
5	P value summary	***			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
7	Number of groups	8			
8	F	94.19			
9	R squared	0.9217			
10					
11	Was the pairing significantly effective?				
12	R squared	0.01106			
13	F	1.000			
14	P value	0.4464			
15	P value summary	ns			
16	Is there significant matching? (P < 0.05)	No			
17					
18	ANOVA Table	SS	df	MS	
19	Treatment (between columns)	8675000	7	1239000	
20	Individual (between rows)	105300	8	13160	
21	Residual (random)	736800	56	13160	
22	Total	9517000	71		
23					
24	Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
25	PTZ 80 vs 20	-1050	27.45	Yes	***
26	PTZ 80 vs 10	-1050	27.45	Yes	***
27	PTZ 80 vs 5	-1050	27.45	Yes	***
28	PTZ 80 vs IMIP30	-1050	27.45	Yes	***
29	PTZ 80 vs BUP 20	-1050	27.45	Yes	***
30	PTZ 80 vs FLUO 10	-1050	27.45	Yes	***
31	PTZ 80 vs PTZ 40	-1050	27.45	Yes	***
32	PTZ 40 vs 20	0.0000	0.0000	No	ns
33	PTZ 40 vs 10	0.0000	---	No	ns
34	PTZ 40 vs 5	0.0000	---	No	ns
35	PTZ 40 vs IMIP30	0.0000	---	No	ns
36	PTZ 40 vs BUP 20	0.0000	---	No	ns
37	PTZ 40 vs FLUO 10	0.0000	---	No	ns
38	FLUO 10 vs 20	0.0000	---	No	ns
39	FLUO 10 vs 10	0.0000	---	No	ns
40	FLUO 10 vs 5	0.0000	---	No	ns
41	FLUO 10 vs IMIP30	0.0000	---	No	ns
42	FLUO 10 vs BUP 20	0.0000	---	No	ns
43	BUP 20 vs 20	0.0000	---	No	ns
44	BUP 20 vs 10	0.0000	---	No	ns
45	BUP 20 vs 5	0.0000	---	No	ns
46	BUP 20 vs IMIP30	0.0000	---	No	ns
47	IMIP30 vs 20	0.0000	---	No	ns
48	IMIP30 vs 10	0.0000	---	No	ns
49	IMIP30 vs 5	0.0000	---	No	ns
50	5 vs 20	0.0000	---	No	ns

APÊNDICES 11.1

Dados da avaliação estatística do teste de tremores induzidos por oxotremorina.

2way ANOVA Tabular results					
1	Table Analyzed	Data 1			
2					
3	Two-way ANOVA				
4					
5	Source of Variation	% of total variation	P value		
6	Interaction	5.30	0.0012		
7	Column Factor	70.05	P<0.0001		
8	Row Factor	1.72	0.0131		
9					
10	Source of Variation	P value summary	Significant?		
11	Interaction	**	Yes		
12	Column Factor	***	Yes		
13	Row Factor	*	Yes		
14					
15	Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
16	Interaction	8	10.01	1.252	3.467
17	Column Factor	4	132.3	33.09	91.62
18	Row Factor	2	3.244	1.622	4.492
19	Residual	120	43.33	0.3611	
20					
21	Number of missing values	45			
22					
23	Bonferroni posttests				
24					
25	CONT vs ATRO 10				
26	Row Factor	CONT	ATRO 10	Difference	95% CI of diff.
27	10	3.000	0.0000	-3.000	-3.911 to -2.089
28	20	2.778	0.0000	-2.778	-3.689 to -1.867
29	30	2.556	0.0000	-2.556	-3.467 to -1.644
30					
31	Row Factor	Difference	t	P value	Summary
32	10	-3.000	10.59	P<0.001	***
33	20	-2.778	9.806	P<0.001	***
34	30	-2.556	9.021	P<0.001	***
35					
36	CONT vs EHFAM 5				
37	Row Factor	CONT	EHFAM 5	Difference	95% CI of diff.
38	10	3.000	1.222	-1.778	-2.689 to -0.8665
39	20	2.778	2.556	-0.2222	-1.133 to 0.6890
40	30	2.556	2.444	-0.1111	-1.022 to 0.8001
41					
42	Row Factor	Difference	t	P value	Summary
43	10	-1.778	6.276	P<0.001	***
44	20	-0.2222	0.7845	P > 0.05	ns
45	30	-0.1111	0.3922	P > 0.05	ns
46					
47	CONT vs EHFAM 10				
48	Row Factor	CONT	EHFAM 10	Difference	95% CI of diff.
49	10	3.000	1.889	-1.111	-2.022 to -0.1999
50	20	2.778	2.556	-0.2222	-1.133 to 0.6890

APÊNDICES 11.2

Dados da avaliação estatística do teste de tremores induzidos por oxotremorina.cont.

2way ANOVA Tabular results					
51	30	2.556	2.000	-0.5556	-1.467 to 0.3557
52					
53	Row Factor	Difference	t	P value	Summary
54	10	-1.111	3.922	P<0.001	***
55	20	-0.2222	0.7845	P > 0.05	ns
56	30	-0.5556	1.961	P > 0.05	ns
57					
58	CONT vs EHFAM 20				
59	Row Factor	CONT	EHFAM 20	Difference	95% CI of diff.
60	10	3.000	2.556	-0.4444	-1.356 to 0.4668
61	20	2.778	2.667	-0.1111	-1.022 to 0.8001
62	30	2.556	2.444	-0.1111	-1.022 to 0.9001
63					
64	Row Factor	Difference	t	P value	Summary
65	10	-0.4444	1.569	P > 0.05	ns
66	20	-0.1111	0.3922	P > 0.05	ns
67	30	-0.1111	0.3922	P > 0.05	ns
68					
69	ATRO 10 vs EHFAM 5				
70	Row Factor	ATRO 10	EHFAM 5	Difference	95% CI of diff.
71	10	0.0000	1.222	1.222	0.3110 to 2.133
72	20	0.0000	2.556	2.556	1.644 to 3.467
73	30	0.0000	2.444	2.444	1.533 to 3.356
74					
75	Row Factor	Difference	t	P value	Summary
76	10	1.222	4.315	P<0.001	***
77	20	2.556	9.021	P<0.001	***
78	30	2.444	8.629	P<0.001	***
79					
80	ATRO 10 vs EHFAM 10				
81	Row Factor	ATRO 10	EHFAM 10	Difference	95% CI of diff.
82	10	0.0000	1.889	1.889	0.9776 to 2.800
83	20	0.0000	2.556	2.556	1.644 to 3.467
84	30	0.0000	2.000	2.000	1.089 to 2.911
85					
86	Row Factor	Difference	t	P value	Summary
87	10	1.889	6.668	P<0.001	***
88	20	2.556	9.021	P<0.001	***
89	30	2.000	7.060	P<0.001	***
90					
91	ATRO 10 vs EHFAM 20				
92	Row Factor	ATRO 10	EHFAM 20	Difference	95% CI of diff.
93	10	0.0000	2.556	2.556	1.644 to 3.467
94	20	0.0000	2.667	2.667	1.755 to 3.578
95	30	0.0000	2.444	2.444	1.533 to 3.356
96					
97	Row Factor	Difference	t	P value	Summary
98	10	2.556	9.021	P<0.001	***
99	20	2.667	9.414	P<0.001	***
100	30	2.444	8.629	P<0.001	***

APÊNDICES 11.3

Dados da avaliação estatística do teste de tremores induzidos por oxotremorina.cont.

2way/ANOVA Tabular results					
ID#					
102	EHFAM 5 vs EHFAM 10				
103	Row Factor	EHFAM 5	EHFAM 10	Difference	95% CI of diff.
104	10	1.222	1.889	0.6667	-0.2446 to 1.578
105	20	2.556	2.556	0.0000	-0.9112 to 0.9112
106	30	2.444	2.000	-0.4444	-1.356 to 0.4668
107					
108	Row Factor	Difference	t	P value	Summary
109	10	0.6667	2.353	P > 0.05	ns
110	20	0.0000	0.0000	P > 0.05	ns
111	30	-0.4444	1.569	P > 0.05	ns
112					
113	EHFAM 5 vs EHFAM 20				
114	Row Factor	EHFAM 5	EHFAM 20	Difference	95% CI of diff.
115	10	1.222	2.556	1.333	0.4221 to 2.245
116	20	2.556	2.667	0.1111	-0.8001 to 1.022
117	30	2.444	2.444	0.0000	-0.9112 to 0.9112
118					
119	Row Factor	Difference	t	P value	Summary
120	10	1.333	4.707	P<0.001	***
121	20	0.1111	0.3922	P > 0.05	ns
122	30	0.0000	0.0000	P > 0.05	ns
123					
124	EHFAM 10 vs EHFAM 20				
125	Row Factor	EHFAM 10	EHFAM 20	Difference	95% CI of diff.
126	10	1.889	2.556	0.6667	-0.2446 to 1.578
127	20	2.556	2.667	0.1111	-0.8001 to 1.022
128	30	2.000	2.444	0.4444	-0.4668 to 1.356
129					
130	Row Factor	Difference	t	P value	Summary
131	10	0.6667	2.353	P > 0.05	ns
132	20	0.1111	0.3922	P > 0.05	ns
133	30	0.4444	1.569	P > 0.05	ns