



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI-URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PRPGP
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO
MOLECULAR

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CENTRAIS DA ADMINISTRAÇÃO
AGUDA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Annona muricata L. EM CAMUNDONGOS.

DANIELE OLIVEIRA SOUZA

CRATO – CE
2013

DANIELE OLIVEIRA SOUZA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CENTRAIS DA ADMINISTRAÇÃO
AGUDA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Annona muricata L. EM CAMUNDONGOS.**

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: Bioprospecção de Produtos Naturais; Linha de Pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.

Orientadora:

Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf Mendonça

Co-orientador:

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe

**CRATO – CE
2013**

DANIELE OLIVEIRA SOUZA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CENTRAIS DA ADMINISTRAÇÃO
AGUDA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Annona muricata L. EM CAMUNDONGOS.**

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: Bioprospecção de Produtos Naturais; Linha de Pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf Mendonça - Orientadora
Universidade Regional do Cariri- URCA

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

Prof. Dr. Jose Henrique Leal-Cardoso - Avaliador Externo
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes - Avaliador Interno
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dra. Roseli Barbosa - Suplente
Universidade Regional do Cariri - URCA

Dedico,

A **DEUS**, que a cada dia me renova com fé e amor.

Aos meus pais, **M^a Celimária Oliveira Silva Souza** e **José Luiz de Souza**, minha fortaleza de viver.

AGRADECIMENTOS

"Quando se diz obrigado, se dizem muitas coisas mais, que vêm de muito longe com a origem do indivíduo, e de tão perto como o pulsar do coração".
(Pablo Neruda)

A **Deus**, por conceder a Graça da vida em sua plenitude, direcionando os meus passos e renovando minha fé a cada dia, iluminando-me na realização deste trabalho, ao qual é o autor;

Aos meus pais, **Maria Celimária Oliveira Silva Souza** e **José Luiz de Souza**, que são a fonte da motivação dos meus anseios. Pela compreensão da ausência em momentos familiares, por sonharem comigo na realização dos meus objetivos. Por serem os pilares de minha vida e meus exemplos de amor, honestidade, sabedoria, coragem, respeito e trabalho;

A minha **família**, minha referência, por todo carinho e amor, pela paciência, compreensão, sempre estarem à disposição quando preciso: **Vó Chiquinha**, meus **irmãos**, e **sobrinhos**, pelos os momentos de brincadeiras fundamentais e energizantes...Tia Dely ama muito;

À Orientadora: Profa. Dra. **Marta Regina Kerntopf Mendonça**, por acolher-me desde a iniciação científica, pela inestimável orientação deste trabalho, pela aquisição de material e drogas e presença nos experimentos, pela confiança, estímulo, paciência, ensinamentos, preocupação, compreensão, carinho e amizade;

Ao Co-orientador: Prof. Dr. **Cícero Francisco Bezerra Felipe**, pela orientação, competência, paciência, dedicação, disponibilidade e valiosa contribuição e aprendizado fundamentais para realização e êxito deste trabalho;

Ao Prof. Dr. **Irwin Alencar de Menezes**, pelos preciosos ensinamentos, competência, confiança, apoio, disponibilidade, amizade e claro pela oportunidade de iniciar os primeiros passos na pesquisa, quando me acolheu no LFQM;

À Profa. Dra. **Roseli Barbosa**, pelo o exemplo de profissionalismo e competência, que se somam a sua doçura e 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 Professores: **Dr. Giovany Michely Pinto da Cruz**, **Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho** e **Dr. Iri Sandro Pampolha Lima** por terem a gentileza de prontamente aceitarem o convite de participação da minha banca de qualificação;

Ao Prof. Dr. **Jose Henrique Leal-Cardoso**, pela gentileza e atenção de participar da banca avaliadora deste trabalho.

Aos **animais** de experimentação e **plantas** utilizados neste trabalho, pelo sacrifício de suas vidas em prol da ciência;

De forma especial a:

Dois anjos: **Valter Santos** e **Cristina Kelly**, que no início éramos companheiros de jornada, que se tornaram amigos em quem confio. Este trabalho tem todos os “dedos” de vocês. Paciência, disponibilidade, empenho, eficácia, companherismo... são muitas as palavras de bons adjetivos que cabem a vocês. Pela amizade e companherismo, muito obrigada;

A uma amiga, “encomendada”: **Larissa Rolim** “Lara”, que veio para completar o time. Obrigada por poder contar sempre contigo e pela alegria;

Aos que contribuíram na realização deste trabalho, na fase inicial de experimentos, **Tharley Andrade**, **Rúbia Alana**, em especial à **Paula Denise**, que comigo foi parceira nos primeiros passos deste, e pela amizade sincera. E também na fase final, **Álefe Brito**, **Maria Cristina** e **Mileide**, pela ajuda sempre pronta e eficaz e palavras de incentivo;

Laura Hévila, amiga-irmã, pelo o privilégio da verdadeira amizade, por entender-me (meus TOCs), ouvir-me e sabiamente confortar. Agradeço a DEUS por ter uma amiga como você, a “menina prodígio” que admiro demais;

Damiana Gonçalves, por ser esta pessoa de “Luz”, que irradia as pessoas ao seu redor, pela amizade, sorriso e exemplo de coragem;

Aos amigos que fiz ao trilhar nesta caminhada, e que permanecerão para sempre: **Eidla Mikaelle** e **Stefânio Barreto**, pelos os momentos inesquecíveis de estudo, viagens, discussões, também de culinária e acima de tudo: obrigada pela amizade sincera;

Aos amigos: **Anita Oliveira**, **Barbosa Neto**, **João Neto**, **Gerlânia Leite**, **Renata Sampaio**, **Rodolfo Nóbrega** e **Thales Coutinho**, pela estimada amizade e momentos de alegria.

Aos amigos do **Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal - LFQM**: **Andreza Guedes**, **Andressa**, **Cinara Vidal**, **Datiane Moraes**, **Severino Denício**, **Demontier**, **Emilly Balbino**, **Érica**, **Heloísa Helena**, **Israel**, **Luzia**, **Luiz Jardelino**, **Luiz Pereira**, **Maria Cristina**, **Mariana Késsia**, **Norma Fernandes**, **Poliana Moreira**, **Priscila Pereira**, **Rayane Oliveira**, **Sharlene Brito**. Pela amizade, apoio, incentivo, pelo ambiente agradável de convívio. A convivência ao longo desses anos contribuiu para a minha formação acadêmica e pessoal e fez de mim uma pessoa melhor.

Aos amigos do **Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM**, por serem sempre solícitos quando precisei. Em especial: **Flaviana Moraes**, **Saulo Tintino**, **Fernando Fiqueredo**, **Elba Sobral**, **Nadguia Leite** e **João Vitor**.

A minha turma de Pós-Graduação em especial: **Ana Luiza, Ivna Salmito, Héverton Mendes e Sara Alencar**. Obrigada pelo incentivo e amizade construída.

À coordenadora do Programa de Pós-graduação em Bios prospecção Molecular, **Dra. Marta Almeida**, às secretárias **Maria Andecieli Rolim de Brito e Maria Lenira Pereira**, pela solicitude!

A todos os **Professores** do Programa de Pós-Graduação Bioprospecção Molecular, pelos ensinamentos e disponibilidade.

À **Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte – FMJ**, pelos animais cedidos e apoio na parceria para realização deste trabalho. Em especial: **Dra. Glauce Socorro de Barros Viana, Dr. Giovany Cruz, Janice e Seu Francisco**.

Ao **Herbário Caririense Dárdano de Andrade -Lima** na pessoa da Professora **Dra. Arlene Pessoa**, pela identificação da espécie vegetal estudada.

Aos funcionários da URCA: **Rafael Freitas (auxílio no Biotério), Fernando, Marcos, Seu Luís, Ivaneide e Fred** pela atenção dispensada.

Aos amigos de vida: **Amanda Nascimento, Claudener Souza, Janaina Oliveira, Kátia Daniella e Nágela Luila**, pela amizade de sempre.

À **Universidade Regional do Cariri – URCA** e a **todos** que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

A **CAPES, FUNCAP e CNPq**, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

(...) Resta esse constante esforço para
caminhar dentro do labirinto
Esse eterno levantar-se depois de cada
queda
Essa busca de equilíbrio no fio da
navalha
Essa terrível coragem diante do grande
medo,
E esse medo Infantil de ter pequenas
coragens.

Vinicius de Moraes

RESUMO

O gênero *Annona*, pertencente à família Annonaceae, constitui um gênero importante como fonte de espécies medicinais. Dentre as 135 espécies deste gênero encontra-se a *Annona muricata* L., conhecida popularmente como graviola, utilizada na medicina popular como sedativo, anticonvulsivante, emético, hipoglicemiante, hipotensivo e antidepressivo. Este trabalho objetivou investigar os efeitos centrais da administração aguda do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *A. muricata* L. - EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, via intraperitoneal) em camundongos, através da observação das alterações comportamentais em diferentes modelos experimentais de ansiedade, depressão, convulsão, sedação e coordenação motora. A prospecção fitoquímica do extrato revelou a presença de uma série de metabólitos secundários, dentre os quais destacam-se os alcalóides e os flavonóides. Os resultados mostraram que a DL_{50} do extrato é de aproximadamente 1000 mg/Kg, i.p. e o teste hipocrático demonstrou que o material vegetal apresentou efeito depressor central. Para confirmar esse efeito, foram realizados testes específicos. O extrato apresentou efeito sedativo no teste do campo aberto e efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado, sem apresentar, no entanto, efeito miorrelaxante no teste do *rota rod*. Os efeitos sedativo e ansiolítico do extrato foram parcialmente revertidos pelo flumazenil, um antagonista benzodiazepínico. O extrato também apresentou efeito anticonvulsivante nos modelos de convulsão induzidas por pilocarpina e pentilenotetrazol. Neste último teste, o efeito anticonvulsivante do EHFAM foi revertido pelo flumazenil. O EHFAM potencializou o tempo de sono induzido por pentobarbital, possivelmente por interferir no metabolismo hepático do barbitúrico. Por fim, o extrato apresentou efeito do tipo antidepressivo ao reduzir o tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao nado forçado, sugerindo a interação de um ou mais componentes da droga com receptores de monoaminas noradrenérgicas, dopaminérgicas ou serotoninérgicas, uma vez que o tratamento com o material vegetal promoveu diminuição na concentração de monoaminas no corpo estriado dos animais tratados agudamente. Estes resultados mostram que o EHFAM, possui importantes efeitos sobre o Sistema Nervoso Central, que têm como base, possivelmente, a interação com sistemas GABAérgico e monoaminérgico e possíveis implicações, o que justifica o uso popular desta planta no tratamento da ansiedade, depressão e distúrbios do sono.

Palavras-chaves: *Annona muricata*, alcalóides, flavonóides, ansiedade, depressão e Sistema GABAérgico.

ABSTRACT

The genus *Annona*, belonging to the family Annonaceae, constitutes an important genus as a source of medicinal species. Among the 135 species of this genus, *Annona muricata* L., popularly known as graviola, is used in folk medicine as a sedative, anticonvulsant, emetic, hypoglycemic, hypotensive, antidepressant and antistress. The present study aimed to investigate the toxicity and behavioral effects of the acute administration of Hydroalcoholic extract of leaves of *A. muricata* L. - EHFAM (25, 50 and 100 mg/Kg, via intraperitoneal) in mice, by observing behavioral changes in different experimental models of anxiety, depression, seizures, sedation, and motor coordination. The phytochemical screening of the extract revealed the presence of secondary metabolites, such as the alkaloids and flavonoids. The results showed that the LD₅₀ of the extract is approximately 1000 mg / Kg, ip. The hippocampal test showed that the vegetable material presented central depressant effect. To confirm this effect, specific tests were performed. The EHFAM showed sedative effect in open field test and anxiolytic effect in the elevated plus maze test, however, no relaxant effect was observed in the rota rod test. The sedative and anxiolytic effects of the extract were partially reversed by the flumazenil, a benzodiazepine antagonist. The extract also showed anticonvulsant effect in models of seizures induced by pilocarpine pentylentetrazole. In the latter test, the anticonvulsant effect of EHFAM was partially reversed by flumazenil. The EHFAM potentiated the sleeping time induced by pentobarbital, possibly by interfering with the hepatic metabolism of the barbiturate. Finally, the extract showed antidepressant-like effect by reducing the immobility time of mice submitted to the forced swimming, suggesting a possible interaction of one or more components of the drug with noradrenergic, dopaminergic or serotonergic systems, since the treatment with the extract caused a decrease in the concentration of monoamines in the striatum of acutely treated animals. These results show that the EHFAM has important effects on the Central Nervous System that are possibly based on the interaction with GABAergic and monoaminergic systems, hence the popular use of this plant in the treatment of anxiety, depression and sleep disorders.

Keywords: *Annona muricata*, alkaloids, flavonoids, anxiety, depression and GABAergic system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição geográfica da família Annonaceae	24
Figura 2	Árvore de <i>Annona muricata</i>	26
Figura 3	Rota biossintética para formação da estrutura benzilisoquinolínica a partir do L-tirosina	28
Figura 4	Estruturas principais do Sistema Límbico	33
Figura 5	Receptor GABAA	36
Figura 6	Fluxograma de obtenção do EHFAM	45
Figura 7	Desenho experimental do estudo psicofarmacológico do EHFAM.	51
Figura 8	Esquema representativo da investigação do efeito do EHFAM sobre a deambulação dos animais através do teste de campo aberto	52
Figura 9	Esquema representativo da investigação do efeito do EHFAM sobre a ansiedade através do LCE.	53
Figura 10	Esquema representativo da determinação do mecanismo de ação ansiolítica do EHFAM no campo aberto e labirinto em cruz elevado.	54
Figura 11	Esquema representativo a investigação do efeito do EHFAM sobre a depressão através do teste do Nado Forçado.	56
Figura 12	Esquema representativo da investigação do EHFAM sobre a convulsão induzida por PTZ e pilocarpina.	57
Figura 13	Esquema representativo da investigação do EHFAM sobre a duração de sono induzido por pentobarbital.	58
Figura 14	Esquema representativo da investigação do EHFAM sobre o efeito sobre a coordenação motora de camundongos submetidos ao teste do rota rod.	59
Figura 15	Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o número de cruzamentos (NC) de camundongos submetidos ao campo aberto.	64

Figura 16	Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o número de Grooming (NG) de camundongos submetidos ao campo aberto.	65
Figura 17	Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o número de Rearing (NR) de camundongos submetidos ao campo aberto.	66
Figura 18	Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.	67
Figura 19	Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado.	68
Figura 20	Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o tempo de permanência dos camundongos nos braços fechados do labirinto em cruz elevado.	69
Figura 21	Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.	70
Figura 22	Efeito do EHFAM (100 mg/Kg, i.p.), e EHFAM (100 mg/Kg, i.p.) associado ao flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.) sobre o número de cruzamentos (NC) de camundongos submetidos ao campo aberto.	72
Figura 23	Efeito do EHFAM (100 mg/Kg, i.p.), e EHFAM (100 mg/Kg, i.p.) associado ao flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.) sobre o número de Grooming (NG) de camundongos submetidos ao campo aberto.	73
Figura 24	Efeito do EHFAM (100 mg/Kg, i.p.), e EHFAM (100 mg/Kg, i.p.) associado ao flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.) sobre o número de Rearing (NR) de camundongos submetidos ao campo aberto.	74
Figura 25	Efeito do EHFAM (100 mg/Kg, i.p.), e EHFAM (100 mg/Kg, i.p.) associado ao flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.) sobre o número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.	75
Figura 26	Efeito do EHFAM (100 mg/Kg, i.p.), e EHFAM (100 mg/Kg, i.p.) associado ao flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.) sobre o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.	76

Figura 27	Efeito do EHFAM (100 mg/Kg, i.p.), e EHFAM (100 mg/Kg, i.p.) associado ao flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.) sobre o número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado.	77
Figura 28	Efeito do EHFAM (100 mg/Kg, i.p.), e EHFAM (100 mg/Kg, i.p.) associado ao flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.) sobre o tempo de permanência nos braços fechados do labirinto em cruz elevado.	78
Figura 29	Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a Latência de Imobilidade.	79
Figura 30	Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência da primeira convulsão de camundongos tratados com pentilenotetrazol (80 mg/Kg, i.p.).	80
Figura 31	Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência de morte de camundongos tratados com pentilenotetrazol (80 mg/Kg, i.p.).	81
Figura 32	Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência da primeira convulsão de camundongos tratados com pilocarpina (350 mg/Kg, i.p.).	82
Figura 33	Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência de morte de camundongos tratados com pilocarpina (350 mg/Kg, i.p.).	83
Figura 34	Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência da perda do reflexo postural de camundongos tratados com pentobarbital (50 mg/Kg).	84
Figura 35	Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a duração da perda do reflexo postural de camundongos tratados com pentobarbital (50 mg/Kg).	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Constituintes específicos para coloração em determinado meio.	47
Quadro 2	Constituintes específicos para coloração referente ao meio	48
Quadro 3	Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração do EHFAM via intraperitoneal.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Drogas e reagentes utilizados nos ensaios comportamentais e neuroquímicos.	44
Tabela 2	Prospecção fitoquímica do EHFAM	63
Tabela 3	Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a coordenação motora de camundongos submetidos ao teste do <i>rota rod</i> .	83
Tabela 4	Efeito do pré-tratamento do EHFAM (100 mg/Kg, i.p.) sobre a concentração de monoaminas e metabólitos em corpo estriado de camundongos.	83

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α - Alfa

γ - Gama

°C - Grau Celsius

® - Marca registrada

μL - Microlitro

μM - Micromolar

ANOVA - Análise de Variância

ATC's - Antidepressivos tricíclicos

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

DOPAC - Ácido diidroxifenilacético

DZP – Diazepam

EHFAM- Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Annona muricata*

EPM. - Erro Padrão da Média

FLU - Flumazenil

g - Gramas

GABA - Ácido gama aminobutírico

GABA_A - Receptor do ácido gama-aminobutírico do tipo A

GABA_B - Receptor do ácido gama-aminobutírico do tipo B

GCs - Glicocorticoides

GSH - Glutathiona reduzida

h - Horas

5-HIAA - Ácido 5-hidroxi-indolacético

HVA - Ácido homovanílico

IMIP - Imipramina

i.p. - Intraperitoneal

MAO - Monoamina oxidase

mg - Miligrama

Kg - Quilograma

mL - Mililitros

ng - Nanograma

NC - Número de Cruzamentos

NG - Número de *Grooming*

NR- Número de *Reaning*

NEBA - Número de Entradas nos Braços abertos

NEBF - Número de Entradas nos Braços Fechados

OMS - Organização Mundial de Saúde

PTB - Pentobarbital sódico

PTZ - Pentilenotetrazol

r.p.m - Rotações por minuto

TI - Tempo de Imobilidade

TPBA - Tempo de Permanência nos Braços abertos

TPBF - Tempo de Permanência nos Braços Fechados

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.2 Relevância e Justificativa	23
1.3 Revisão de Literatura	24
1.3.1 Família Annonaceae e Gênero <i>Annona</i>	24
1.3.2 <i>Annona muricata</i> L.....	25
1.3.6 Ansiedade	31
1.3.7 Depressão	37
2. OBJETIVOS	41
2.1 Geral	41
2.2 Específicos	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Material	42
3.1.1 Material vegetal	42
3.1.2 Drogas e reagentes:	43
3.1.3. Animais.....	43
3.2 Métodos	44
3.2.1 Exigências legais - aspectos éticos da pesquisa	44
3.2.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico liofilizado.....	44
3.2.3 Prospecção fitoquímica do EHFAM.....	46
3.2.1.1. Preparação de extratos.....	46
3.2.1.2. Teste para fenóis e taninos	46
3.2.1.3. Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.....	47
3.2.1.4. Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas	47
3.2.1.5. Teste para alcalóides	48
3.2.4 Teste Hipocrático e Determinação da Dose Letal Mediana (DL ₅₀)	49
3.2.5 Protocolo experimental para testes comportamentais	50
3.2.4.1.Campo aberto (CA)	52
3.2.4.2. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	53
3.2.4.3. Nado Forçado (NF)	55

3.2.4.4. Teste de convulsões induzidas por Pentilenotetrazol e Pilocarpina.....	57
3.2.4.5. Teste de potencialização do Sono induzido por Pentobarbital sódico	58
3.2.4.6. Teste do rota rod.....	59
3.2.4.7. Dosagem de monoaminas e metabólitos	60
3.2.6 Análise estatística dos dados	61
4. RESULTADOS.....	62
4.1. Prospecção fitoquímica do EHFAM.....	62
4.2. Teste Hipocrático e Dose Letal Mediana (DL₅₀).....	62
4.3. Testes comportamentais	64
4.3.1 Campo aberto (CA)	64
4.3.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	67
4.3.3 Nado Forçado (NF)	75
4.3.4 Teste da convulsão induzida por Pentilenotetrazol – PTZ.....	76
4.3.5 Teste de convulsões induzidas por Pilocarpina.....	78
4.3.6 Tempo de Sono	80
4.3.7 Teste do Rota rod	82
4.3.8 Dosagem de monoaminas e metabólitos	82
5. DISCUSSÃO	83
6. CONCLUSÃO	96
7. REFERÊNCIAS	98
8. APÊNDICE	116
9. ANEXO	117

1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização, a biodiversidade da natureza é alvo de observação do homem que ao longo de muitos anos, proporcionou o acúmulo de informações para promoção de uma melhor qualidade de vida. Em especial as plantas despertam, por sua ampla distribuição e riqueza de espécies a curiosidade em conhecê-las. O uso das plantas por grupos sociais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade, que constitui um conhecimento tradicional e fundamental para a descoberta dos princípios ativos- substâncias capazes de exercer uma ação de cura-responsáveis no combate de doenças (IBAMA, 2013; VEIGA JUNIOR, 2005).

Evidências mostram que, para algumas doenças complexas, os produtos naturais representam uma estimável fonte de produção de novos compostos químicos, uma vez que representam estruturas privilegiadas, selecionadas por mecanismos evolutivos em um período de tempo de milhões de anos (BOLDI, 2004; CLARDY e WALSH, 2004; KOEHN e CARTER, 2005; NEWMAN et al, 2003). O Brasil é um país conhecido por possuir a mais diversa flora do mundo e pesquisas tem sido realizada buscando melhor conhecê-la, preservá-la e dela extrair substâncias que possam ser úteis à humanidade (POZETTI, 2005).

Nesse sentido, pesquisadores, bem como a indústria farmacêutica, dedicam-se ao desenvolvimento de estudos com o objetivo de descobrir novos princípios ativos e também aprimorar as descobertas de novas atividades farmacológicas de substâncias já conhecidas e oriundas de plantas (FIRMO et al., 2011). Apesar do avanço das pesquisas científicas para validar as informações populares referentes ao uso de plantas medicinais, estas ainda não são o suficiente, visto a ampla variedade de plantas de uso popular não terem sido investigadas em testes científicos pré-clínicos ou clínicos (VEIGA JUNIOR, 2005).

A pesquisa e produção de novos fármacos a partir de plantas é um trabalho multidisciplinar, abrangendo diversos campos do conhecimento e vários métodos de análise, como, por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, para conduzir um

estudo promissor de eficaz enriquecimento dos conhecimentos sobre a flora mundial (BALUNAS e KINGHORN, 2005; MACIEL et al., 2002). A integração dessas áreas na pesquisa de plantas medicinais é fundamental para a elucidação de compostos ativos e seus respectivos alvos farmacológicos que são uns dos maiores desafios na pesquisa (MACIEL et al., 2010; PITCHAI, 2010).

O primeiro estudo sistemático de plantas medicinais foi realizado, cerca de 2.700 a. C., durante o Império Shennung. Entre as 365 drogas mencionadas no Inventário de Shennung, encontram-se espécies, tais como *Ephedra*, *Ricinus communis* além do ópio de *Papaver somniferum*, que fornecem respectivamente efedrina, óleo de rícino e morfina, princípios ativos conhecidos e utilizados até os dias atuais para os mesmos propósitos de afecções respiratórias (*Ephedra*), cura de feridas e contraceptivo (*Ricinus communis*), propriedades sedativas/hipnóticas e analgesia (*Papaver somniferum*) (BALICK, 1997; DAVID E DAVID, 2002; FOSTER, 1999; EKWERE, 2011; DUARTE, 2005).

As atividades biológicas das plantas são correlacionadas à presença de compostos químicos, particularmente os metabólitos secundários, cuja composição sofre influência direta dos fatores geográficos e ambientais (KIRAN et al., 2008). Tais metabólitos apresentam estrutura complexa e uma variedade de atividades biológicas, destacando-se como exemplo, as saponinas, cumarinas, flavonóides, alcalóides, taninos, óleos essenciais, entre outros (POSER e MENTZ, 2003). Eles têm função de defesa contra pragas e doenças, aqueles envolvidos na defesa contra herbivoria através de atividade neurotóxica podem ter efeitos benéficos no homem atuando como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos (BRISKIN, 2000).

Doenças relacionadas ao SNC têm-se mostrado cada vez mais comuns em meio à sociedade em que vivemos e dentre estas, a ansiedade e depressão estão atualmente entre as doenças mais comuns da humanidade, sendo as maiores causas de incapacidade no mundo (LUCETTI, 2010; LAKHAN e VIEIRA, 2008). Assim, a busca por novos compostos como alternativas terapêuticas para tais distúrbios têm progredido constantemente (IRIE et al., 2004).

A terapêutica com plantas medicinais para distúrbios do sistema nervoso tem crescido nos últimos anos, na intenção de minimizar os efeitos colaterais e melhorar a eficácia farmacológica na terapêutica dos distúrbios psiquiátricos. Algumas plantas são bastante conhecidas pelos efeitos centrais, tais como o efeito antidepressivo de *Hipericum perforatum*, efeito ansiolítico de *A. muricata*, da *Pfaffia glomerata* (Ginseng-brasileiro), *Passiflora incarnata*, os efeitos analgésicos e antitussígenos de *Papaver somniferum*, (PAGE, 2005), e efeitos antimuscarínicos da *Atropa belladonna* (DE PARIS et al., 2000; CAPASSO e SORRENTINO, 2005; SCHULZ et al., 2001). Frente a esses achados, drogas obtidas de fontes naturais estão surgindo como terapias adjuvantes no tratamento de distúrbios psiquiátricos, diante do grande índice epidemiológico desses distúrbios (KIENZLE-HORN 2002; CARLINI, 2003).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que as doenças mentais acometem de 4,3% a 26,4% da população mundial e tendem a aumentar a prevalência em todo o mundo, em países desenvolvidos e em desenvolvimento (DEMYTTENAERE et al., 2004). Em pesquisas epidemiológicas de transtorno mental durante a vida, realizadas em alguns países obteve um índice de 48,6% para os Estados Unidos e 36,3% para o Brasil. Sendo que os transtornos de ansiedade, humor, respondem cada, a um terço da prevalência total de transtornos mentais nos diferentes países (WHO, 2000).

As drogas ansiolíticas/antidepressivas disponíveis no mercado não suprem as necessidades terapêuticas seja pela ocorrência de efeitos colaterais, que prejudicam a utilização em longo prazo, ou pelo custo de aquisição, considerando o baixo poder aquisitivo da maioria da população. Este fato tem atraído o interesse na procura de novas ferramentas terapêuticas à base de plantas, mais precisamente as utilizadas na medicina tradicional (DÍAZ-VÉLIZ, 2012).

A literatura mostra que a *Annona muricata* L. apresenta metabólitos secundários como: taninos, flavonas, flavononóis, flavononas e alcaloides (BENTO, 2013). O interesse de estudo desta espécie está ligado à presença de flavonoides e alcalóides apormofínicos de ocorrência na família Annonaceae com estudos demonstrando que estes compostos atuam em nível de Sistema Nervoso Central. Somando-se ao conhecimento

etnofarmacológico da *A. muricata*, é reportado uso da espécie para uma variedade de afecções, dentre as quais se destaca o uso da infusão das folhas secas contra insônias graves e dores de cabeça (GONÇALVES, 2007; NOVA, 2008; LUNA et al., 2010) e dos frutos e folhas sendo utilizados como tranquilizantes (DÍAZ-VÉLIZ, 2012).

1.2 Relevância e Justificativa

Dentre todas as plantas medicinais usadas pelo o homem, as que são reconhecidas por causarem alteração na atividade do SNC têm recebido atenção especial, principalmente as utilizadas para desordens psiquiátricas crônicas (ansiedade, depressão e epilepsia) que, em alguns casos, não são controladas com tratamentos convencionais (CARLINI, 2003). No Brasil, várias plantas medicinais são utilizadas para aliviar a ansiedade, insônia e humor deprimido (GOMES et al., 2008). Neste contexto, é cada vez mais crescente o número de produtos à base de plantas como terapia complementar na prática psiquiátrica. Este fato tem despertado o interesse de investigar o potencial terapêutico de algumas espécies de plantas, através de modelos animais. Esses modelos têm contribuído para a triagem de novas ferramentas farmacológicas, que permitam a elucidação da eficácia da planta (BULLER e LEGRAND, 2001).

Investigações químicas e farmacológicas de espécies de *Annona* indicam a presença de importantes compostos bioativos, sendo largamente empregadas na etnofarmacologia devido às diferentes propriedades farmacológicas atribuídas principalmente às acetogeninas e alcalóides, dois dos principais constituintes bioativos encontrados em gêneros específicos das anonáceas (FAGUNDES et al, 2005).

Em decorrência do pressuposto etnofarmacológico que evidencia uso da *A. muricata* na medicina popular para o tratamento da ansiedade, depressão e distúrbios do sono, faz-se necessário um estudo químico e farmacológico que confirme experimentalmente o uso popular desta planta no tratamento das desordens psiquiátricas anteriormente citadas, além de identificar possíveis efeitos tóxicos decorrentes do uso da planta.

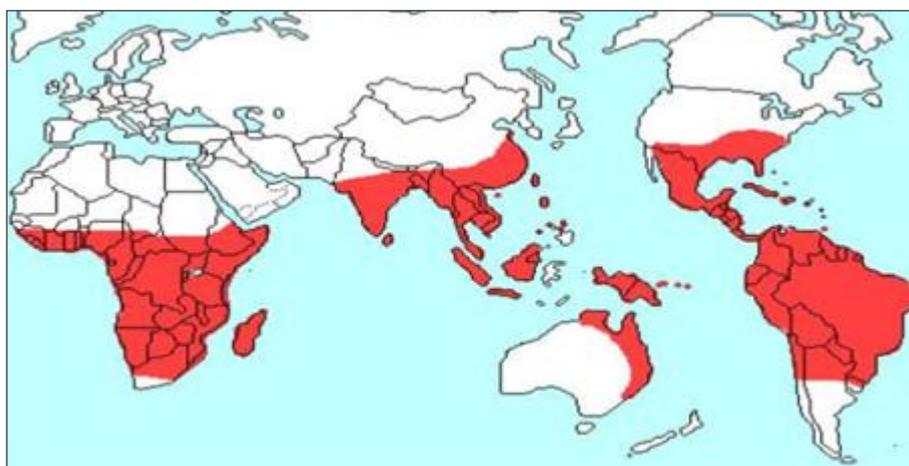
Nesse contexto, diante do diverso e inesgotável arsenal terapêutico das plantas medicinais, a identificação de compostos químicos presentes em espécies vegetais que apresentam efeitos sobre o sistema nervoso central é importante para a descoberta de novos fármacos que possam ser utilizados no tratamento de distúrbios psiquiátricos. Dessa forma, o presente trabalho vem contribuir com os estudos já realizados com *A. muricata*, no intuito de traçar os possíveis mecanismos envolvidos na ação ansiolítica e antidepressiva comumente relatadas pela população e por escassos trabalhos na literatura.

1.3 Revisão de Literatura

1.3.1 Família Annonaceae e Gênero *Annona*

A família Annonaceae compreende cerca de 135 gêneros e mais de 2.300 espécies, a maioria nativa de regiões tropicais ou subtropicais, sendo que dos gêneros conhecidos de Annonaceae, o gênero *Annona* é o de maior importância como fonte de frutos comestíveis (BARON, 2010), seguido de *Cananga* e *Rollinia* (LUNA, 2006). A família é originária provavelmente da África ou América do Sul, com base em dados fitogeográficos e palinológicos. Ásia e Austrália abrigam 51 gêneros, África e Madagascar 40 gêneros e o Continente Americano 38 gêneros (Figura 1). No continente Americano a predominância é na América do Sul, com 35 gêneros. A região amazônica, as Guianas e o sudeste brasileiro são considerados os grandes centros de localização de espécies da família Annonaceae (LEBOEUF et al., 1982; MIRALHA, 2007).

Figura 1. Distribuição geográfica da família Annonaceae.



No Brasil, a família Annonaceae compreende 26 gêneros e aproximadamente 260 espécies, desempenhando importante papel na composição da vegetação (MAAS et al., 2001). Dentre as espécies de estimada importância econômica, destaca-se *A. squamosa* (fruta-do-conde), *A. muricata* (graviola), *A. reticulata* (condessa) e *A. cherimola* (cherimóia), devido às propriedades nutricionais dos frutos que são consumidos *in natura* ou na forma de sucos e sorvetes (LORENZI e MATOS, 2002).

As áreas sob produção têm crescido mais rapidamente do que a contribuição da ciência e tecnologia (PINTO et al, 2005), devido apresentar importância econômica em diversas regiões, como, Chile, México, Venezuela, Austrália e Brasil. Seu cultivo em solo brasileiro teve início a partir da região semiárida, e com um tempo sofreu dispersão, estando hoje presente em vários estados brasileiros. Na região Nordeste, a Bahia é a principal produtora, seguida por Pernambuco e Alagoas (SOBRINHO, 2010).

Uma variedade de constituintes químicos apresenta-se na família Annonaceae, como: substâncias aromáticas, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, substâncias benzênicas, catequinas, proantocianidina, óleos essenciais, terpenos, esteroides, acetogeninas, carboidratos, lipídios, proteínas, lactonas, vitaminas, carotenos, saponinas, (REIS, 2011; LIMA, 2007; LUNA, 2006) e alcaloides dos tipos quinolínicos, pirrolizidínicos, piperidínicos, indolizidínicos, piridínicos e isoquinolínicos entre outros (SIMÕES e SCHENKEL, 2004).

1.3.2 *Annona muricata* L.

Annona muricata L., é conhecida popularmente no Brasil 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 (NUNES, 2012). É uma espécie originária da América tropical, principalmente Antilhas e América Central, sendo amplamente cultivada em quase todos os países de clima tropical, inclusive no Brasil (LORENZI e MATOS, 2002). Sendo uma das importantes frutíferas cultivadas no Nordeste brasileiro, seus frutos são utilizados *in natura* e na fabricação de suco, sorvetes, compotas, geléias e doces (LUNA, 2010).

Do ponto de vista botânico, *Annona muricata* L. é uma árvore que pode alcançar 4 a 8 m de altura quando adulta, possuindo abundante sistema radicular e caule único com ramificação assimétrica (Figura 2). As flores são hermafroditas, verde-escuras a verde-claras (MAAS et al, 2001), com cálice de sépalas triangulares e pétalas externas grossas de cor amarelada (NUNES, 2012). O fruto - graviola - também conhecido como jaca-de-pobre, jaca-do-pará, coração-de-rainha, araticum manso, é uma baga composta (sincarpo) com peso oscilando entre 0,4 Kg a 10 Kg, comprimento médio em 30 cm e formato de coração; a casca tem espículas carnosas moles e é verde-clara na colheita. A polpa é branca sucosa, a semente com 1 a 2 cm de comprimento, peso 0,59g (170 sementes/100 g) é preta na sua retirada do fruto passando a marrom após dias, (MAAS et al, 2001), as folhas obovado-oblongas, brilhantes, medindo 8-15 cm de comprimento (NUNES, 2012).

Figura 2. Árvore de *Annona muricata*



Fonte: SOUZA, D.O.

Estudos químicos com a *A. muricata* L. conduziram ao isolamento de compostos de diversas classes, tais como: alcalóides, terpenóides, carboidratos, polifenóis, lipídeos e ácidos aminados. Nos últimos anos a maioria das pesquisas têm focado num novo repertório de compostos, as acetogeninas anonáceas. Estas, encontradas em todas as partes da planta, as pesquisas fitoquímicas se dirigiram ao isolamento de compostos desta classe, principalmente a partir das folhas (REIS, 2011; LUNA, 2006).

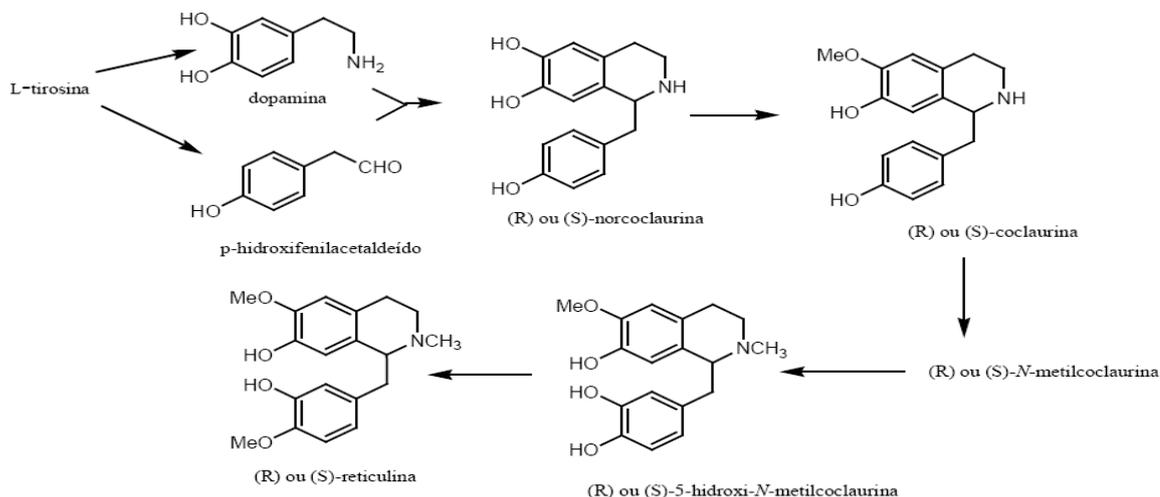
Os alcalóides são substâncias orgânicas nitrogenadas de origem natural, principalmente em plantas, mas também, em menor quantidade em microrganismos e animais. Constituem um vasto grupo de metabólitos secundários, com caráter levemente alcalino e ampla variedade estrutural. Classificados de acordo com o aminoácido precursor, que podem ser ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, histidina, ácido antranílico, triptofano e reações de aminação (DEWICK, 2002). No reino vegetal, os alcalóides encontram-se distribuídos nas Angiospermas em diversas famílias, destacando-se Apocinaceae, Solanaceae, Papaveraceae, Loganiaceae e Rubiaceae (BOTH, 2005). Sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se, em seguida, nos vacúolos e, dessa forma, não aparecem em células jovens.

Existe um grande interesse no estudo dos alcalóides devido a sua ampla atividade farmacológica. Uma das propriedades intrínsecas da maioria dos alcalóides, fundamental para a sua utilização no tratamento de doenças do SNC, é a de ultrapassar a barreira hematoencefálica (SILVA, 2005). Muitos alcalóides são conhecidos por suas atividades no sistema nervoso central (podendo apresentar atividade depressiva - morfina, escopolamina ou estimulante - estricnina, cafeína) e periférico (parassimpático - pilocarpina atropina, hiosciamina e simpático - efedrina). Os alcalóides também têm atividade anestésica (cocaína), antitumoral (vimblasina, vincristina), antimalárica (quinina), antibacteriana (berberina) entre outras (BRUNETON, 1999).

A família Annonaceae apresenta alcalóides isoquinolínicos do tipo benzilisoquinolínico, distribuído nas seguintes séries: berberinas, aporfínicos, oxoaporfínicos, fenantrenos, cularinas, morfandienonas, isoquinolonas e os bisbenzilisoquinolínicos (CAVÉ, 1985). A origem biossintética dos alcalóides isoquinolínicos (Figura 3) inicia-se pela formação dos aminoácidos aromáticos como a L-

fenilalanina e L-tirosina, pela rota do ácido chiquímico a partir de carboidratos (RINALDI, 2007).

Figura 3: Rota biossintética para formação da estrutura benzilisoquinólica a partir do aminoácido L-tirosina.



Fonte: DEWICK, 1997.

Todos os alcalóides isoquinolínicos são derivados dos benzilisoquinolínicos, a formação biossintética desse esqueleto tem início com a reação de condensação de duas unidades fenólicas, ambas derivadas do aminoácido L-tirosina, a dopamina e dos 3,4-dihidroxi-fenilacetaldeído (DEWICK, 1997).

Na família Annonaceae a presença dos alcalóides aporfínicos é constante em espécies do gênero *Annona* (DEBOURGES et al., 1987). Estes são encontrados somente em plantas das famílias Annonaceae, Berberidaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae, Ranunculaceae, Papaveraceae e Rhamnaceae (GUINAUDEAU et al, 1979). No gênero *Annona*, a anonaína é o alcaloide aporfínico de ocorrência mais comum. É encontrada nas espécies *A. cherimola*, *A. glabra*, *A. montana*, *A. paludosa*, *A. reticulata*, *A. salzmanni*, *A. senegalensis*, *A. squamosa* e *A. spinescens* (QUEIROZ et al., 1996, BHAUMIK et al., 1979). Estes compostos demonstraram propriedades antitumorais significantes e toxicidade seletiva contra vários tipos de células cancerosas em doses baixas.

A composição de alcalóides das folhas de *A. muricata* também foi bastante estudada, revelando a presença de alcalóides aporfínicos annonaina, isolaurelina, xilopina e o coclaurina, reticulina, além de outros compostos polifenólicos (ZIYAEV, 2011; CAPARROS-LEFEBVRE e ELBAZ, 1999; NUNES, 2012).

Do ponto de vista etnofarmacológico, todas as partes da planta são utilizadas no tratamento de algumas condições como artrite, artrose, cólicas, diarreia, feridas, úlceras, problemas renais, malária, ansiedade, tosse, problemas na próstata e na função pancreática, diabetes, depressão, alcoolismo, alterações digestivas e intestinais, HIV, epilepsia, e esclerose (REIS, 2011; JARAMILLO et al., 2000). Estudo realizado na Amazônia registrara o uso da planta na insônia, dores de cabeça, perda de peso, febre, aftas e diurese (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2003). Os frutos e folhas da graviola são utilizados como tranqüilizantes tradicionais. À fruta são atribuídos efeitos antidepressivos, possivelmente relacionados aos alcalóides isoquinolínicos ao atuarem como agonistas nos receptores 5HT1A (HASRAT, 1997), embora a eficácia e a segurança de suas preparações não tenham sido comprovadas cientificamente (BARON, 2010; LIMA, 2007; PEREIRA et al., 2004).

Estudos têm mostrado ação hipotensiva das folhas, antidepressiva do fruto e anti-herpes da casca do caule (LUNA, 2006), atividade antiespasmódica, vasodilatadora, relaxante do músculo liso e citotóxico contra células cancerígenas a partir dos extratos das folhas e troncos (ALALI et al., 1999), efeito contra *Herpes simplex* (PADMA et al, 1998), antibacteriano, antifúngico, cardiodepressor do extrato da casca e das folhas de *A. muricata* L. (LUNA, 2006). Estudos realizados pela Central de Medicamentos - CEME, em modelos pré-clínicos, não comprovaram a ação antidiabética, sedativa e anticonvulsivante do extrato de *A. muricata*, popularmente atribuída.

Atualmente os estudos sobre *A. muricata* L., concentram-se na sua capacidade de agir contra células cancerígenas. Torres (2012), mostrou redução da tumorigenicidade e na metástase dos tumores pancreáticos e Hamizah (2012), obteve redução da incidência de tumores da pele em 33,33%. A investigação da atividade antitumoral na grande maioria dos trabalhos é relacionada à atividade das acetogeninas (LIAW et al., 2002). Entretanto, há relatos indicando que o uso em longo prazo da *A. muricata*, pode levar a

uma possível atividade neurodegenerativa, possivelmente associada à presença das acetogeninas. Estudos indicam que a annonacina, substância presente na *A. muricata* L., talvez seja responsável pelo desenvolvimento da síndrome Parkinsoniana na população estudada em Guadeloupe (LANNUZEL et al., 2008). No entanto, alta concentração do alcalóide reticulina foi encontrada no fluido cerebrospinal de alguns pacientes e, portanto, há possibilidade dessa substância estar também associada a essa enfermidade, agindo como um agente neurotóxico, cuja ação parece ser mediada pelo glutamato ou por radicais livres.

A *A. muricata* L. é considerada fonte natural de antioxidantes. Uma comparação da atividade antioxidante foi feita entre espécies do gênero *Annona*. As folhas de *A. muricata*, *A. squamosa* e *A. reticulata* foram testadas e os resultados evidenciaram que os extratos etanólicos de *A. muricata* possuem atividade antioxidante mais potente *in vitro* quando comparado às folhas de *A. squamosa* e *A. reticulata*; este efeito parece ser atribuído à presença de acetogeninas nos extratos (BASKAR et al., 2007).

Poucos estudos (DÍAZ-VÉLIZ, MORA, 2012; OVIEDO et al., 2009) têm investigado a atividade ansiolítica da *A. muricata*. Todavia, há controvérsias destes estudos sobre o possível mecanismo da ação ansiolítica; Oviedo et al., (2009) relacionam sistema serotoninérgico ao efeito ansiolítico da planta, enquanto Díaz-Véliz, Mora (2012) sugere, sem maiores evidências, a participação do GABA no efeito ansiolítico.

A chapada do Araripe compreende um conjunto formado por todas as formas de vida de dada região. Uma área delimitada entre três Estados do Nordeste Brasileiro (Ceará, Piauí e Pernambuco), que apresenta uma riqueza inestimável em seu ecossistema com características geológicas, geomorfológicas, pedológicas, climáticas, hidrográficas/hidrológicas e de vegetação, bastante peculiares. A Região do Cariri, localizada ao Sul do Estado do Ceará tem seus aspectos geográficos intimamente marcados pela configuração da Chapada do Araripe (AUGUSTO, GÓES, 2007). Nesse universo da biodiversidade local é possível encontrar, como tem sido foco de estudo de pesquisadores da Região, o uso de plantas com a finalidade de tratamento de enfermidades humanas. Dentre as espécies vegetais empregadas com a finalidade curativa

pelas comunidades residentes na área de cerrado da Chapada do Araripe, evidencia-se uso da *A. muricata*, pelas comunidades locais da Chapada do Araripe.

1.3.6 Ansiedade

A ansiedade consiste em um estado de tensão ou apreensão cujas causas não são necessariamente produtoras de medo, mas sim da expectativa de algum evento próximo (LENT, 2004). A ansiedade é benéfica em níveis normais, no entanto se os sintomas da ansiedade são prolongados, ou tornam-se desproporcionais à situação objetiva (RUIZ et al., 2000), provocam sofrimento no indivíduo, passando a ser inconveniente e incapacitante, sendo considerada patológica (GRAEFF e BRANDÃO, 1999), causando sofrimento clinicamente significativo com prejuízo social e ocupacional para o indivíduo. Pacientes com ansiedade generalizada apresentam, pelo menos, três ou mais dos seguintes sintomas, na maioria dos dias em um período de 6 meses: inquietação ou sensação de estar com os nervos a flor da pele, fadigabilidade, dificuldade em concentrar-se ou sensações de “branco” na mente, irritabilidade, tensão muscular, perturbação do sono (dificuldades em conciliar ou manter o sono ou sono insatisfatório e inquieto). Estas emoções são resultantes de processos neurais complexos que culminam em manifestações fisiológicas autônomas como sudorese, taquicardia, tremores entre outras. Estas emoções nos permitem lidar com situações emergenciais e de estresse, são importantes tanto para o desempenho quanto para a sobrevivência do ser humano (PARENTE et al., 2005).

A ansiedade normal tem função adaptativa, melhora o rendimento, é mais leve, sendo uma reação que não afeta a liberdade do indivíduo (RUIZ et al., 2000). No entanto, se os sintomas de ansiedade são prolongados, ocorrendo de forma desproporcional ou na ausência de eventos ou estímulos estressantes, pode culminar nos transtornos de ansiedade (DSM-IV-TR, 2000). Os transtornos de ansiedade estão entre os mais frequentes na prática clínica (KESSLER et al, 2005a, 2005b; OLATUNJI et al, 2007; KESSLER; WANG, 2008).

Alguns estudos mostram que a ansiedade tem uma prevalência de um oitavo do total da população mundial (EISENBERG et al, 1998.; DOPHEIDE e PARK, 2002). No âmbito nacional foi constatado que a ansiedade e as fobias constituem os principais problemas de saúde mental da população brasileira (ALMEIDA FILHO et al., 1997),

variando de 3,7 a 12,7%, (MELLO, 2007), frequentemente coexistindo com outras desordens, principalmente, a depressão (MALSEN, 2008).

Os transtornos da ansiedade caracterizam-se por um desarranjo na manutenção dos mecanismos neurobiológicos para atender ao estresse, a maior ativação deste processo prejudica a vida sócio-profissional das pessoas que sofrem desse mal. Apesar dos avanços observados no tratamento dos transtornos de ansiedade nos últimos anos, estima-se que menos de 50% dos pacientes portadores de transtorno de ansiedade generalizada apresentem alívio total dos sintomas, indicando a necessidade de continuidade da pesquisa pré-clínica e clínica nesse campo (ANDREATINI et al., 2001).

O transtorno é definido pelo *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-IV) como estado de preocupação exacerbado que pode abranger diversas atividades ou eventos da vida do indivíduo. Pode ser considerado um transtorno crônico quando ocorre na maior parte dos dias em um período de pelo menos seis meses (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2002). Os transtornos de ansiedade são classificados em: Transtorno de pânico sem agorafobia, transtorno de pânico com agorafobia, fobia específica, fobia social, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno de estresse agudo, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade devido a uma condição médica geral, transtorno de ansiedade devido a uma substância e transtorno de ansiedade sem outra especificação. As perturbações de ansiedade mais prevalentes são a fobia específica (8,7%), a fobia social (6,8%), seguida da perturbação pós-stress traumático (3,5%), e perturbação de ansiedade generalizada (3,1%) (KESSLER et al., 2005).

As desordens da ansiedade são intermediadas por processos neurobiológicos distintos. Graeff, (2007) mostra em testes de ansiedade experimental humana as diferenças entre o estado emocional associado à ansiedade antecipatória, condição característica do transtorno de ansiedade generalizada (TAG), e aquele partilhado por outras condições patológicas, como o transtorno de pânico (TP) e o transtorno de ansiedade social (TAS). Estes estados neurobiológicos distintos implicam na diferença do tratamento farmacológico; o TAG e a ansiedade são aliviados rapidamente por doses relativamente baixas de ansiolíticos benzodiazepínicos (BZDs), enquanto o TP e o TAS

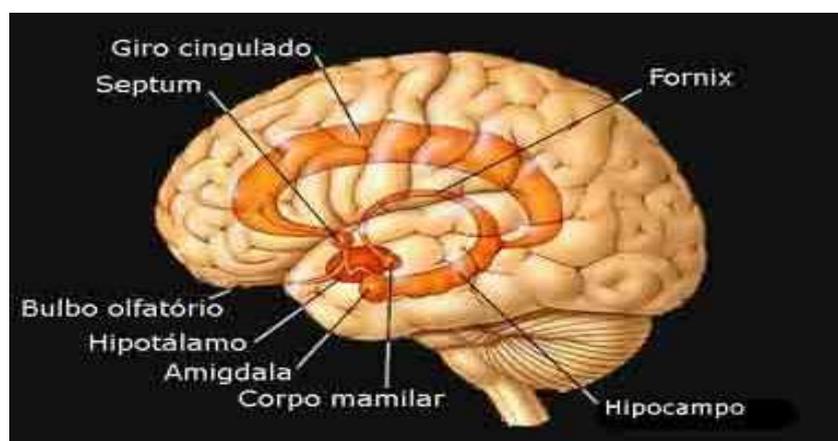
respondem ao tratamento prolongado com medicamentos antidepressivos (GRAEFF, 2007).

Bases neurais da ansiedade

O conhecimento da integração entre os processos emocionais, cognitivos e homeostáticos, é de grande valia na compreensão das respostas fisiológicas do organismo frente as mais variadas situações enfrentadas pelo o indivíduo (ESPERIDIÃO-ANTONIO, 2008). As áreas cerebrais envolvidas no controle motivacional, na cognição e na memória fazem conexões com diversos circuitos nervosos, os quais, através de seus neurotransmissores promovem respostas fisiológicas que relacionam o organismo ao meio (sistema nervoso somático) e também à inervação de estruturas viscerais, importantes para a manutenção da constância do meio interno (LANOTTE et al., 2005).

Na ansiedade, fica evidente a relação das bases neurofisiológicas e comportamento. A ansiedade é uma emoção, portanto as estruturas cerebrais relacionadas estão presentes no sistema límbico. O sistema límbico (Figura 4) é uma designação para regiões cerebrais (formação do hipocampo, complexo amigdalóide, septo, núcleos olfatórios, gânglios da base e núcleos selecionados do diencéfalo) agrupados ao redor das bordas subcorticiais do núcleo cerebral subjacente, ao qual é atribuída uma variedade de funções emocionais e motivacionais complexas (BLOOM, 2005). Embora, a ideia de um sistema das emoções, tenha sido bastante discutida, uma vez que diferentes circuitos e áreas do SNC são correlacionados as emoções (ESPERIDIÃO-ANTONIO, 2008), não existem componentes morfofuncionalmente mais pronunciados e os elementos exercem papéis regulatórios semelhantes entre si (BERRIDGE, 2004).

Figura 4: Estruturas principais do Sistema Límbico



Fonte: http://amulhereoperineo.files.wordpress.com/2012/01/sistema_lim_bico1.jpg

Acredita-se que os circuitos neurais que envolvem a amígdala e o hipocampo são a base da ansiedade (ROSEN e SCHULKIN, 1998). A amígdala é responsável pela detecção, geração e manutenção das emoções relacionadas ao medo e coordenação de respostas apropriadas à ameaça e ao perigo (PHAN, 2002; DE GELDER, 2004; HÖISTAD, 2008). Localizada no lobo temporal (LENT, 2004). Esta estrutura está envolvida na geração da ansiedade e medo (DELANEY e SAH, 1999; LEDOUX, 2004) e sua estimulação pode levar a um estado de vigilância ou atenção aumentada, ansiedade e medo (BEAR, 2002; LEE, 2006; GRAHAM, 2006).

As informações de todos os sistemas sensoriais projetam-se aos núcleos da amígdala, através de conexões excitatórias e inibitórias a partir de vias corticais e subcorticais (WILLIAMS, 2006).

Alvos terapêuticos no tratamento da ansiedade

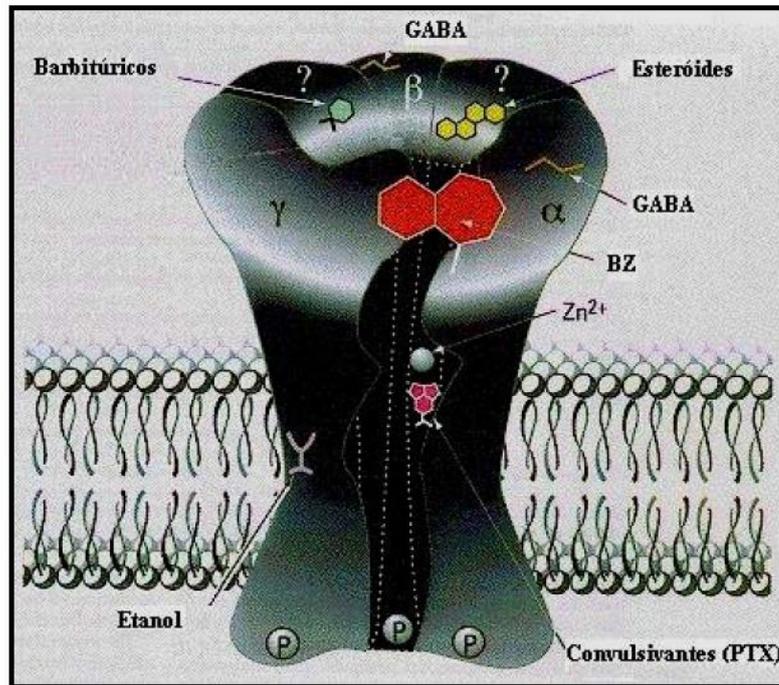
Os benzodiazepínicos (BZP) são os fármacos de primeira linha para os transtornos de ansiedade, representando uma das classes de medicamentos mais consumidas mundialmente. Contudo, o tratamento farmacológico dos vários distúrbios de ansiedade está longe do ideal (OLIVIER, 2003) e a eficácia na redução dos sintomas somáticos tem sido questionável, especialmente no tratamento crônico (SRAMEK et al., 2002). Embora na gênese da ansiedade estejam envolvidos diversos sistemas de neurotransmissores integrados, os medicamentos mais comumente empregados no tratamento das desordens ansiosas envolvem os sistemas GABAérgico e serotoninérgico (NUTT et al., 2002) pois os neurotransmissores ácido γ -aminobutírico (GABA) e serotonina, são os mais atuantes no controle da ansiedade; ambos controlam a resposta ao estresse e qualquer redução ou supressão temporária ou contínua de um deles pode resultar em ansiedade (JUANG et al., 2005). Recentemente novos estudos destacam os grupos de antagonistas glutamatérgicos e outros compostos que atuam em outras vias de neurotransmissão como possíveis drogas para o tratamento da ansiedade (LIMA, 2009).

Um agente ansiolítico deve reduzir a ansiedade e exercer um efeito calmante, com pouco ou nenhum efeito sobre as funções motoras ou mentais. Várias drogas ansiolíticas

usadas rotineiramente, principalmente os BZPs, estão entre as classes de drogas que modulam alostericamente os receptores GABAérgicos do tipo A (OLSON, 2002). Estes receptores possuem um papel central na regulação da excitabilidade cerebral, uma vez que medeia a ação do principal neurotransmissor inibitório no cérebro dos mamíferos o, GABA, este ativa três diferentes classes de receptores, tais como: GABA_A, GABA_B e GABA_C (BORMANN, 1988; SILVILOTTI e NISTRÌ, 1991).

Os receptores do GABA são proteínas transmembranas; o receptor GABA_A (Figura 5), é formado por um complexo pentamérico de subunidades sendo, basicamente, duas do tipo α , duas β e a outra pode ser qualquer uma das outras, dispostas a formar um canal de íons cloreto (Cl⁻) (BIANCHI et al., 2009; KUMAR et al., 2009). Considerando como o alvo mais importante para os estudos de ansiedade, este receptor ocorre principalmente a nível pré-sináptico, tendo um papel central na regulação da excitabilidade cerebral, através de seus efeitos inibitórios. Muitas drogas importantes tais como os BZPs, apresentam vários efeitos relacionados com este receptor, tais como a sedação e a indução do sono, a redução da ansiedade e da agressão, a redução do tônus muscular e da coordenação, efeito anticonvulsivante, além de amnésia anterógrada, que é a perda da capacidade de reter novas informações. Estes efeitos dos benzodiazepínicos ocorrem através da potencialização da resposta ao GABA, por facilitarem a abertura dos canais de cloreto ativados por este neurotransmissor, ao ligar-se de um modo específico em um sítio regulador do receptor, distinto do sítio ligante de GABA, aumentando a afinidade do GABA pelo receptor (RANG e DALE, 2007).

Figura 5: Receptor GABA_A



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

Esse receptor também possui local de ligação para outras substâncias, como os barbitúricos, álcool, neuroesteróides, picrotoxina e alguns anestésicos, no qual todos potencializam a resposta do GABA (MACDONALD; OLSEN, 1994; JOHNSTON, 1996). O antagonista competitivo dos benzodiazepínicos mais conhecido é o flumazenil, o qual possui certa atividade ansiogênica e proconvulsivante. Esta droga ser usada para reverter o efeito da superdosagem de benzodiazepínicos (RANG e DALE, 2007).

É importante ressaltar que na prática clínica, os BZPs devem ser utilizados para a gestão de ansiedade aguda, não devendo exceder 2 a 4 meses. Porém, o uso desses medicamentos ocorre muitas vezes de forma indiscriminada, e a continuidade do uso supera a indicação clínica, levando ao uso excessivo e por um longo período (CARVALHO e DIMENSTEIN, 2004), gerando diminuição dos efeitos benéficos dos BZPs, além de gerar tolerância, dependência física e psicológica e síndrome da abstinência (BENÍTEZ et al., 2008; AUTHIER et al., 2009). Diante da complexidade envolvida na mediação da ansiedade, é importante, uma melhor compreensão dos processos moleculares e neuroanatômicos envolvidos neste distúrbio, para facilitar o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

1.3.7 Depressão

A depressão é um grande problema de saúde pública mundial, sendo a quarta maior causa de incapacitação social (STOPPE JUNIOR, 2006). Na população geral varia de 4% a 10% (ZAVASCHI, 2002). No Brasil a prevalência de depressão é bastante variável. Dados da OMS apontam que a depressão será a doença mais comum do mundo em 2030.

A depressão é caracterizada por alteração no humor e falta de interesse em atividades prazerosas (anedonia), acarretando prejuízo das funções psicológicas, motoras e sociais, podendo variar de uma condição branda, beirando a normalidade, a uma depressão severa (psicótica) acompanhada por alucinações e delírios (RANG et al., 2003). Difere tanto qualitativa quanto quantitativamente de paciente para paciente (NESTLER et al., 2002). A depressão pode ocorrer na infância, adolescência e maioridade, com maior prevalência em mulheres (5 a 20%), que em homens (3 a 12%) (BEBBINGTON, 2004; PRYCE et al., 2005; BURCUSA e IACONO, 2007).

Os transtornos de humor dividem-se em transtornos unipolares, que incluem a depressão maior e a distímia (depressão menor intermitente) e os transtornos bipolares, que incluem o transtorno bipolar (desordem maníaco-depressiva) e a ciclotimia (forma branda da desordem bipolar caracterizada por episódios de hipomania e depressão alternados) (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 1994).

O diagnóstico é feito a partir de um critério estabelecido pela APA (*American Psychiatric Association*), que define cinco ou mais sintomas característicos devem estar presentes durante duas semanas e devem representar uma mudança significativa na qualidade de vida do paciente para ser caracterizado como depressão. Pelo menos um dos sintomas deve ser o humor deprimido ou perda de interesse e de prazer em atividades previamente prazerosas (TOIGO, 2011), além de outros sintomas, tais como: alteração do apetite e peso, distúrbio do sono, sentimento de culpa, falta de concentração, falta de energia e ideias suicidas (NEMEROFF e OWENS, 2002).

O humor deprimido caracteriza-se, quando o interesse ou prazer se reduz de forma acentuada, ou quando se instala perda ou ganho de peso, insônia ou sonolência excessiva,

agitação ou retardo motor, fadiga ou perda de energia, sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou inadequada (JUANG et al., 2005; CAMARGOS et al., 2008). Os indivíduos com depressão apresentam problemas relativos à capacidade de decidir, veem o futuro de forma pessimista e são incapazes de responder positivamente, mesmo a estímulos favoráveis e se consideram incapazes, incompetentes e perdedores. A ansiedade é comum na depressão, afetando 90% dos casos, porém a baixa autoestima não é reconhecida como um dos sintomas mais prevalentes da depressão (JUAN et al., 2005).

Os agentes causais da depressão podem ser biológicos, genéticos e psicossociais. Neste último item, vários fatores podem desencadear a psicopatologia da depressão, a saber: perda de genitores na infância, cuidado parental inadequado, abandono, divórcio, educação ‘sem afeto’ ou disfuncional por parte dos pais, abuso físico e sexual, e outros traumas ocorridos na infância. Mello (2003) afirma de forma consistente que a vivência de estressores no início da vida associa-se ao maior risco de transtornos de humor, ansiedade e de personalidade na idade adulta.

Neurobiologia da depressão

Como se sabe, a sinapse representa a comunicação entre os neurônios, constituindo a base do funcionamento do SNC. Normalmente, os neurônios liberam os neurotransmissores, que são capturados por outros neurônios por meio de seus receptores. Na depressão ocorre diminuição na quantidade de neurotransmissores liberados, principalmente da serotonina, bem como ocorrem alterações no mecanismo de recaptação dos neurotransmissores (MAARTENS, KNOTTNERUSB e POP, 2002, MAN, 2005).

Biologicamente, inicialmente foram implicadas a deficiência de catecolaminas, e indolaminas, especialmente a noradrenalina (KAPCZINSKI et al., 2004). Posteriormente, muito valor tem sido dado à diminuição de neurotransmissores, como a serotonina, noradrenalina e dopamina (MAN, 2005).

O desequilíbrio do cortisol e a regulação deficiente do feedback de glicocorticóide têm sido repetidamente identificados como correlatos biológicos de transtornos depressivos e de ansiedade em adultos (BURKE, 2005; YEHUDA 2005). Em um estudo

de Heim et al. (2000), mulheres com histórico de abuso sexual ou físico demonstraram ACTH aumentado, mas respostas normais de cortisol ao *Trier Social Stress Test* (TSST), comparadas com mulheres sem histórico de abuso.

Tratamento da depressão

O tratamento da depressão baseia-se principalmente na teoria monoaminérgica. Essa teoria postula que a depressão é causada por uma deficiência na transmissão de monoaminas (noradrenalina, dopamina e serotonina) no SNC.

Os primeiros estudos clínicos da relação entre monoaminas e a depressão foram publicados por Freis (1954). Este pesquisador verificou que cinco pacientes hipertensos desenvolveram depressão após o tratamento com altas doses de reserpina, um agente antihipertensivo que depleta as reservas de monoaminas. As evidências que apoiam essa teoria é o fato de que diversos fármacos utilizados no tratamento da depressão agem aumentando a concentração de monoaminas na fenda sináptica (ANDERSON et al., 2000), principalmente serotonina e noradrenalina, que atuam como neurotransmissores em sinapses nervosas. Estas são removidas das sinapses após sua liberação, por um processo de recaptção pelo neurônio pré-sináptico (STAHL, 1998). Após a recaptção são destruídas dentro do neurônio, pelas enzimas monoaminoxidase (MAO) e catecol-O-metiltransferase (COMT), ou são novamente armazenadas em vesículas, para serem liberadas na fenda sináptica (TOIGO, 2011). Esta relação das monoaminas com a depressão tem sido a base de estudos para entender a fisiopatologia dessa doença e para o desenvolvimento de medicamentos antidepressivos (PRYOR et al., 1991).

Entretanto, estudos recentes têm sugerido que o sistema monoaminérgico não representa a via final comum na regulação do humor, mas exerce uma influência modulatória. (STAHL, 1998). Outros sistemas que estariam regulando a plasticidade neuronal e sináptica teriam importância central na neurobiologia e tratamento deste transtorno (SANACORA et al.; 2008; ZARATE e MANJI, 2008). Este dado pode justificar o efeito antidepressivo de outros agentes (bupropiona, mirtazapina) que não têm efeito significativo nem sobre a MAO nem sobre a recaptção de monoaminas, além da

evidência de que cocaína e anfetaminas, apesar de serem potentes inibidores da recaptação de monoaminas, são drogas destituídas de efeito antidepressivo.

Pesquisas em ratos mostram que a administração de antidepressivos por duas semanas produz redução no número de receptores (*down-regulation*) adrenérgicos. Este achado gera uma nova teoria de que as alterações na sensibilidade de receptores monoaminérgicos, observadas após administração crônica de medicamentos, estão relacionadas ao mecanismo de ação antidepressiva (STAHL, 1998). Não há, entretanto nenhuma teoria plenamente convincente para explicar como a adaptação de receptores monoaminérgicos pode atuar na depressão. Outra hipótese mais recente propõe a causa principal como uma reduzida atividade elétrica dos neurônios, uma vez que essa atividade é o fator limitante para a liberação dos neurotransmissores, ou seja, é o fator limitante da concentração das monoaminas (KISS, 2008). Além, disso ressaltam-se também pesquisas que investigam modificações no padrão de expressão gênica a partir do tratamento com antidepressivos (STAHL, 1998). As pesquisas atuais procuram buscar um ponto em comum entre todas essas evidências. Os agentes antidepressivos atualmente oferecem melhores resultados terapêuticos e menores taxas de efeitos colaterais para a maioria dos pacientes, mas eles ainda são designados a aumentar agudamente a transmissão de monoaminas (BERTON; NESTLER, 2006). Estima-se que 30 a 50% dos pacientes deprimidos não se recuperam totalmente (QURAIISHI e FRANGOU, 2002), existe um consenso de que alguns déficits cognitivos da depressão persistiriam após a remissão clínica (TRICHARD et al., 1995).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos centrais da administração aguda do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Annona muricata* L. em camundongos.

2.2 Específicos

- Realizar a prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Annona muricata* L. (EHFAM), a fim de identificar os metabólitos secundários presentes no material vegetal;
- Realizar uma triagem farmacológica geral para avaliar o perfil de efeitos obtidos com a administração intraperitoneal de doses crescentes do EHFAM;
- Determinar a DL_{50} e identificar possíveis sinais de toxicidade aguda em animais tratados com EHFAM;
- Avaliar os efeitos centrais da administração aguda do EHFAM em camundongos submetidos aos seguintes testes comportamentais: campo aberto (CA), labirinto em cruz elevado (LCE), *rota rod* (RR), convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) e pilocarpina (PILO), potencialização do tempo de sono induzido por pentobarbital e nado forçado (NF);
- Determinar a concentração de monoaminas e metabólitos em corpo estriado de camundongos tratados com EHFAM, através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar a participação do sistema GABAérgico e monoaminérgico sobre os efeitos comportamentais do EHFAM e sugerir um possível mecanismo que explique as ações centrais do EHFAM.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Material vegetal

O material vegetal (folhas de *Annona muricata*) foi coletado nas imediações dos laboratórios da Universidade Regional do Cariri no município de Crato-CE, Brasil, à orientação sul 07° 0.143415; oeste 039° 24.9330, no mês de agosto de 2011. De acordo com a autorização com base na Instrução Normativa nº154/2007; licença nº 33028-2, Ministério do Meio Ambiente – MMA/ Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio.

A identificação botânica foi realizada pela Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva e a exsicata foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima – HCDAL da Universidade Regional do Cariri - URCA catalogada sob número de registro 9469.

3.1.2 Drogas e reagentes:

Tabela 1 – Drogas e reagentes utilizados nos ensaios comportamentais e neuroquímicos.

Drogas e Reagentes	Procedência
Acetonitrila	Carlo Erba Reagenti, Itália
Ácido cítrico	Grupo Química, Brasil
Ácido octanosulfônico sódico	Sigma-Aldrich, EUA
Água deionizada	Deionizador, LFQM
Álcool etílico P.A.	Sigma-Aldrich, EUA
Cloridrato de imipramina	Novartis, Suíça
Diazepam	Germed, Brasil
Flumazenil	Cristália Farma, Brasil
Hidróxido de sódio	Reagen, Brasil
Imipramina	Cristália Farma, Brasil
Pentobarbital sódico	Syntec, Brasil
Pentilenotetrazol	Sigma-Aldrich, EUA
Pilocarpina	Sigma-Aldrich, EUA
Tetrahidrofurano	Sigma-Aldrich, EUA

3.1.3. Animais

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), raça *Swiss*, adultos, fêmeas, pesando 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. Um dia anterior aos testes os animais foram separados por grupos, identificados e pesados.

A manipulação dos animais foi realizada seguindo os princípios éticos para a experimentação animal, relatados nos princípios éticos da experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

Após os experimentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e acondicionados em sacos plásticos sob refrigeração a – 20°C; o recolhimento foi realizado por empresa especializada no descarte de material biológico.

3.2 Métodos

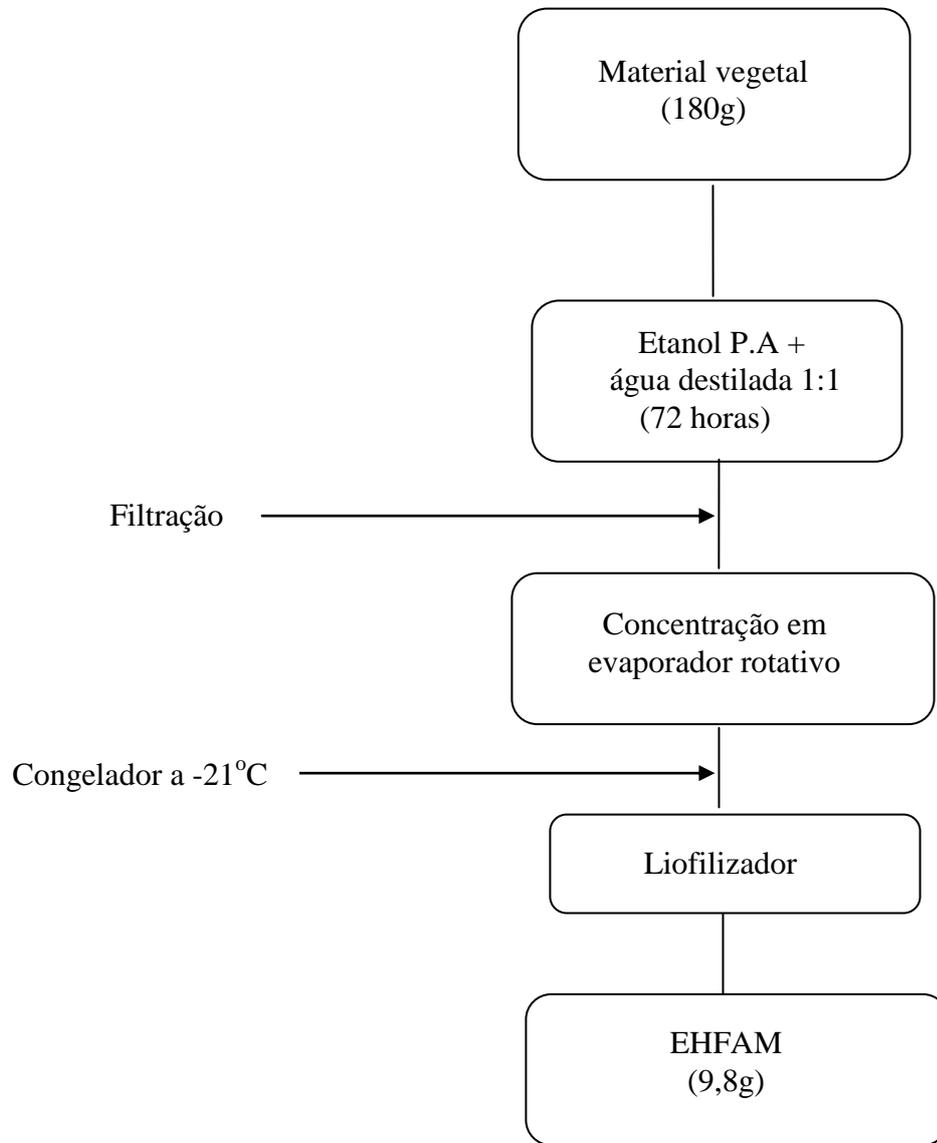
3.2.1 Exigências legais - aspectos éticos da pesquisa

Toda a proposta da pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Regional do Cariri- URCA, credenciado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), pelos termos da Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde; com **parecer nº 23/2012.2.**

3.2.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico liofilizado

O material botânico (180g) foi selecionado e seco em intervalos de sol forte por um período de 72 horas para posterior preparação do extrato. O extrato hidroalcoólico liofilizado das folhas de *Annona muricata* foi obtido a partir da trituração das folhas secas, a fim de aumentar a superfície de contato com o solvente. Em seguida as folhas secas foram 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, a solução obtida foi filtrada e submetida à evaporação do solvente no aparelho evaporador rotativo. O produto final foi congelado e, em seguida, liofilizado. O rendimento obtido foi de 66% (Figura 6).

Figura 6: Fluxograma de obtenção do EHFAM.



3.2.3 Prospecção fitoquímica do EHFAM

A pesquisa fitoquímica visa o conhecimento dos constituintes químicos presentes em espécies vegetais (SIMÕES et al, 2007). 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.

3.2.1.1. 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.

3.2.1.2. 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 desse composto para interagir e precipitar proteínas, como a gelatina (STRUMEYER e MALIN, 1975).

3.2.1.3. 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 o quadro 1.

Quadro 1: Constituintes específicos para coloração em determinado meio.

CONSTITUINTES	COR E pH DO MEIO		
	Ácido (pH 3.0)	Alcalino (pH 8.5)	Alcalino (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.

3.2.1.4. 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 seguinte:

Quadro 2: Constituintes específicos para coloração referente ao meio.

CONSTITUINTES	COR E pH DO MEIO	
	Ácido	Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelho	-
Catequinas	Pardo - amarelo	-
Flavononas	-	Vermelho - laranja

Legenda: (-): ausência de qualquer cor.

3.2.1.5. Teste para alcalóides

Podem-se encontrar alcalóides 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 alcalóides, 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 alcalóides é dado a partir da formação de precipitado na lâmina.

3.2.4 Teste Hipocrático e Determinação da Dose Letal Mediana (DL₅₀)

Os efeitos gerais da administração aguda do EHFAM foram avaliados segundo a lista de sinais listados por Almeida et al., (1999) e Almeida, (2006), que avalia possíveis mudanças comportamentais em decorrência de tratamentos, resultantes de ações estimulantes ou depressoras do SNC, além de efeitos tóxicos e morte.

Todos os sinais de toxicidade, o tempo de manifestação, a intensidade, a duração e a progressão dos mesmos foram registrados de acordo com a intensidade do evento, que seguiu um padrão de observação: ausente (0), efeito diminuído (-), efeito presente (+), efeito presente intenso (++)).

Os parâmetros observados após a administração das drogas, relacionados às ações estimulantes, foram: coçar o focinho, convulsão clônica e tônica, exoftalmia, aumento da frequência respiratória, lamber patas, morder cauda, aumento da motilidade, movimentos estereotipados, piloereção, tremores finos e grosseiros. Os parâmetros observados, relacionados às ações depressoras, foram: alienação ao meio, analgesia (por teste de compressão da cauda do animal), anestesia (puxando o pêlo e suspendendo o animal), ataxia, diminuição da apreensão da pata, catatonía, dispnéia, exoftalmia, diminuição da frequência respiratória, diminuição da motilidade, diminuição do reflexo corneano, tônus dorsal, ptose palpebral e sedação. Outros parâmetros observados foram: agressividade, contorção, coloração da urina, diâmetro da pupila, diarreia, ereção da cauda, fasciculações, grunhidos, aumento ou diminuição da micção, midríase, orelha (cianótica, hiperêmica ou pálida), passividade, reação de fuga, sialorréia, tremor da cauda, lacrimejamento, sudorese, coma e morte (YAMANAKA, x2008).

Os animais foram organizados em grupos contendo quatro animais, e tratados via intraperitoneal com EHFAM nas doses: 10, 50, 100, 500, 1.000, 1.250, 1.500, 1.750, 2.000 mg/Kg e veículo e observados por 10, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 720 minutos, pós-administração intraperitoneal. Após a avaliação, seguiram-se observações a cada 24 horas durante 14 dias consecutivos dos parâmetros descrito por Malone e Robichaud (1962).

A toxicidade aguda via oral, seguiu o método de classes (2000 mg/Kg), no qual foi administrado 2000 mg/Kg a três animais, os quais foram mantidos em jejum de 12 horas. A avaliação seguiu da mesma forma anteriormente descrita.

O tempo de corte de observação dos parâmetros de toxicidade foi de quatro horas. Os animais foram acompanhados por 14 dias, e verificado o número de mortes. Após este período os animais foram sacrificados.

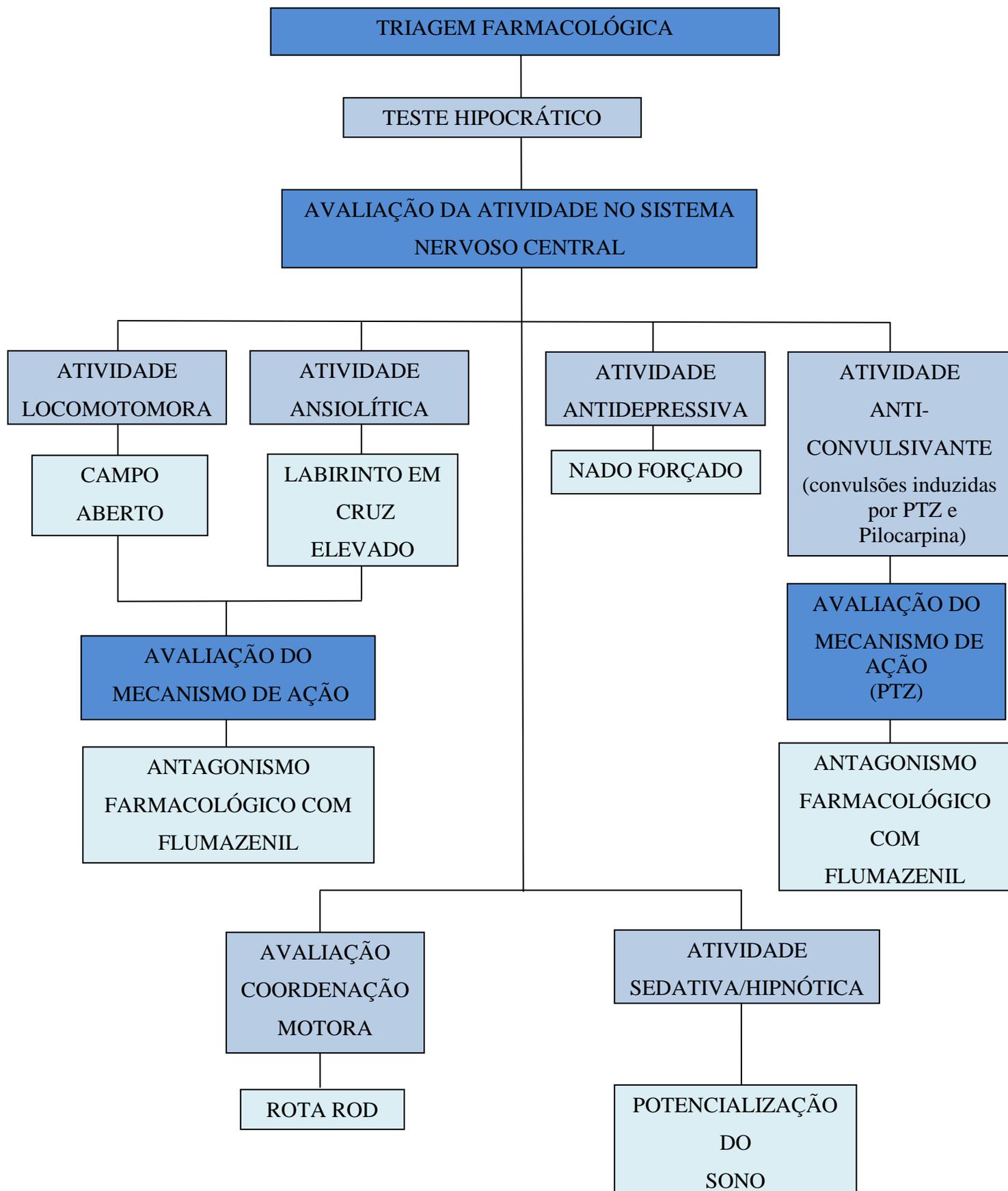
Os resultados do *screening* hipocrático (via intraperitoneal) foram submetidos ao tratamento estatístico e determinado o valor da Dose Letal Média (DL₅₀). A DL₅₀ foi calculada pela análise de probitos correspondentes ao número de mortes de animais de cada grupo que receberam o EHFAM em diferentes concentrações (mencionadas anteriormente, i.p.). A análise foi realizada por meio da interpolação semi-logarítmica, sendo postos no eixo das ordenadas os valores dos probitos correspondentes ao percentual de mortes e, no eixo das abcissas, as doses administradas do EHFAM. A escolha das doses utilizadas neste trabalho foi determinada com base no valor da DL₅₀ do EHFAM, sendo o valor máximo da dose correspondente a 10% do valor da DL₅₀.

3.2.5 Protocolo experimental para testes comportamentais

Todos os testes foram realizados no mesmo horário, de 12h30min as 16h00min, no Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM) da URCA, em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), som e iluminação.

Os animais foram divididos em grupos (24 horas antes da realização dos experimentos) compostos por nove animais em cada, a exceção do teste de rota rod e dosagem de monoaminas, que foram realizados com grupos de seis e quatro animais, respectivamente. A via de administração utilizada em todos os experimentos foi a intraperitoneal (i.p.), com volume utilizado de 0,1 mL/10g de peso corporal do camundongo. Inicialmente foi realizada uma triagem farmacológica (teste hipocrático) para identificação dos efeitos farmacológicos gerais e tóxicos do EHFAM. A escolha das doses utilizadas neste trabalho foi determinada com base no valor da DL₅₀ do extrato, sendo o valor máximo da dose correspondente a 10% do valor da DL₅₀.

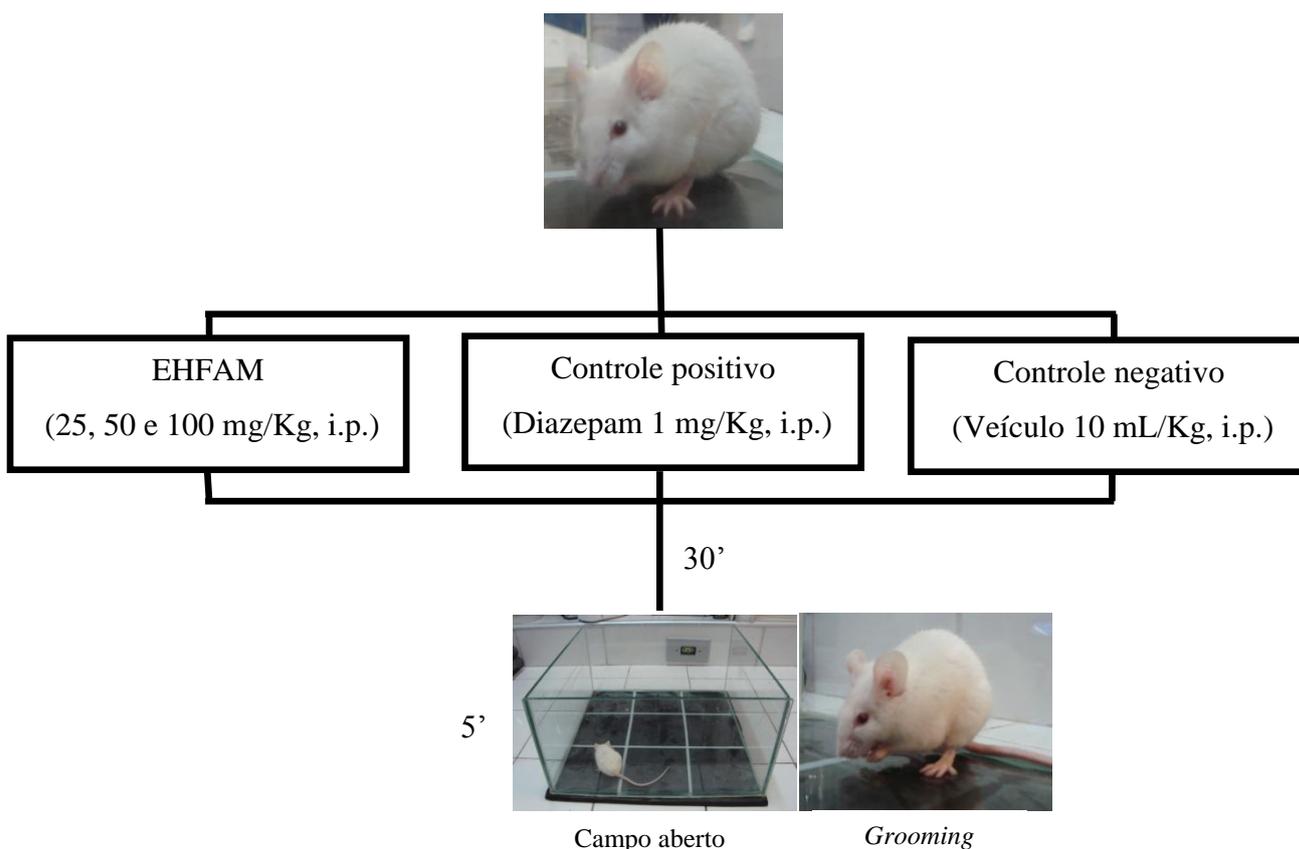
Figura 7: Desenho experimental do estudo psicofarmacológico do EHFAM.



3.2.4.1. Campo aberto (CA)

O campo aberto (BERTGES, 2008) consistiu em uma arena confeccionada de vidro transparente, e piso preto (30 x 30 x 15 cm), dividida em nove quadrantes iguais. Foram utilizados cinco grupos contendo nove animais cada. O primeiro grupo foi tratado com veículo (água destilada, i.p.), o segundo com diazepam (DZP 1 mg/Kg, i. p.) o terceiro, quarto e quinto, receberam EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.), respectivamente. Após trinta minutos do tratamento, cada animal foi colocado no centro do campo aberto e observado por 5 minutos, quanto aos parâmetros comportamentais: número de cruzamentos (NC), número de *Grooming* (NG – comportamento de auto-limpeza) e o número de *Rearing* (NR – exploração vertical) (Figura8).

Figura 8: Esquema representativo da investigação do efeito do EHFAM sobre a deambulação dos animais através do teste de campo aberto.

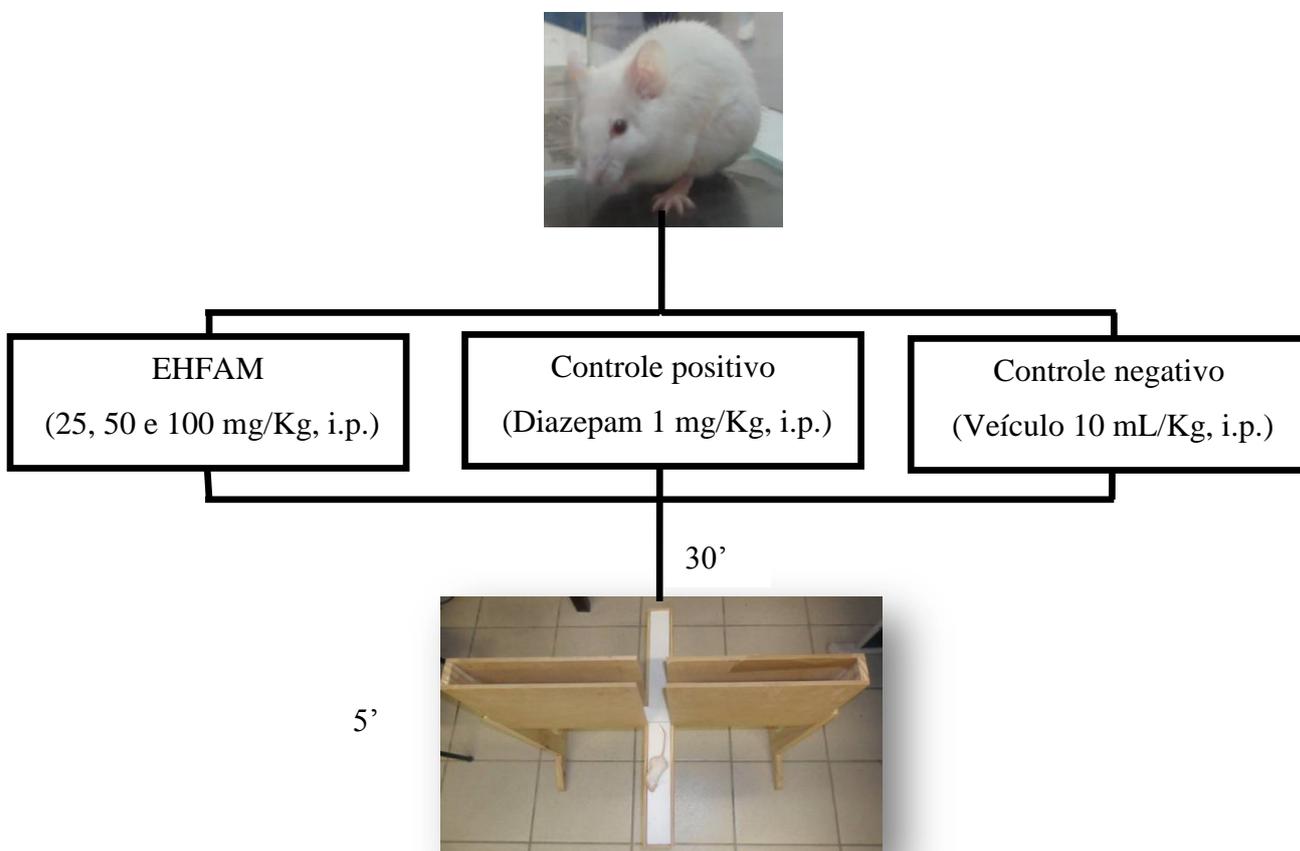


3.2.4.2. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE (Figura 9) é baseado no modelo proposto por Porsolt et al., (1985), para ratos e validado por Lister (1987) para camundongos. Consiste em um aparelho feito em madeira formado por dois braços abertos e opostos (34,5x 3,25 cm) e dois braços fechados (34,5 x 3,25 cm), unidos por uma plataforma central (10x10 cm), a 72 cm elevado do solo.

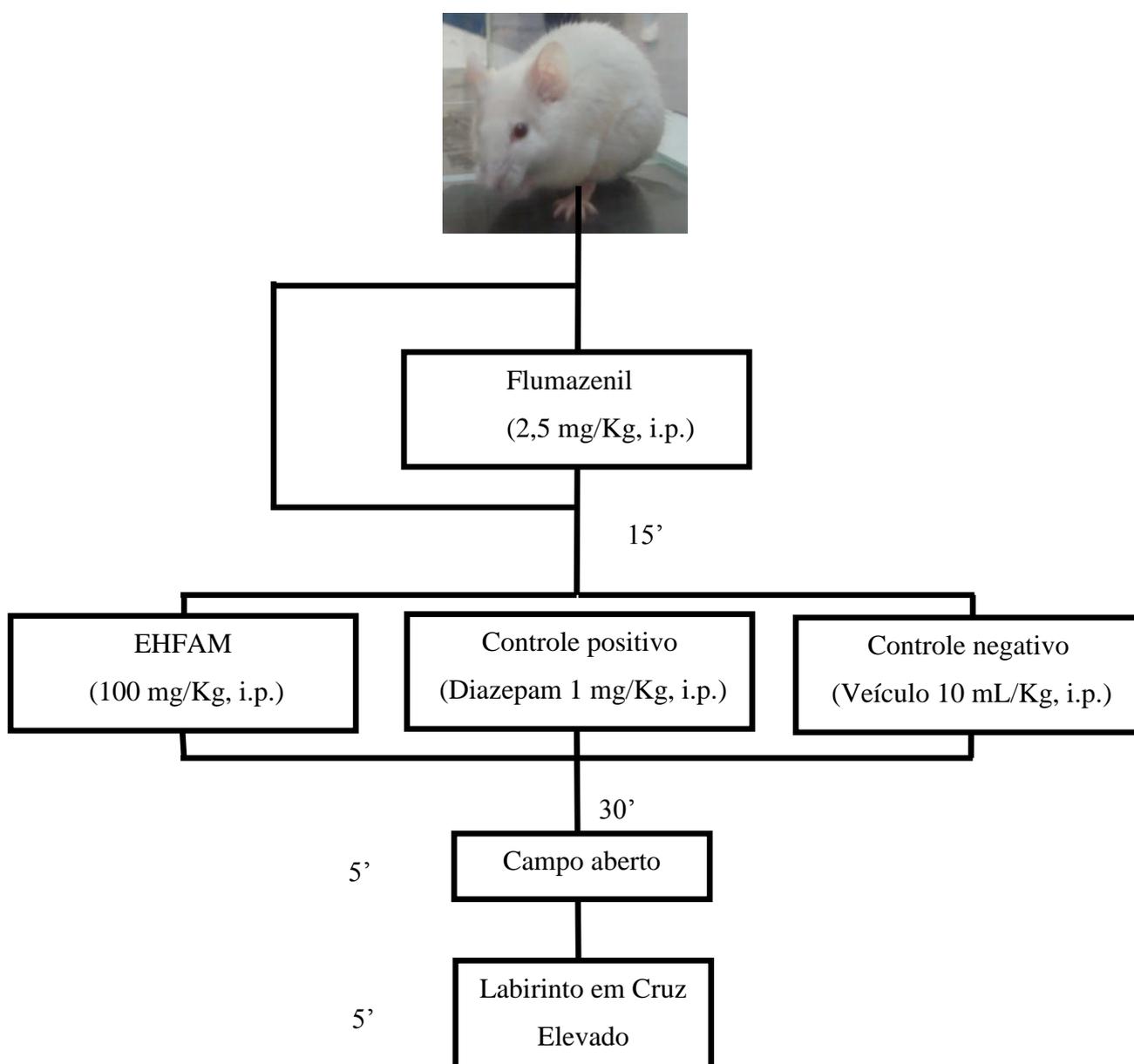
Após 30 minutos do tratamento, cada animal foi colocado no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi observado por 5 minutos, de acordo com os parâmetros: número de entradas (NEBA) e o tempo permanência nos braços abertos (TPBA) e número de entradas (NEBF) e o tempo permanência nos braços fechados (TPBF). Diazepam (1 mg / Kg, i.p.) foi usado como um controle positivo para o efeito ansiolítico. É importante ressaltar que este experimento foi realizado em sequência ao teste de campo aberto, utilizando os mesmos animais.

Figura 9: Esquema representativo da investigação do efeito do EHFAM sobre a ansiedade através do LCE.



Para avaliação do possível envolvimento do receptor GABA_A no mecanismo de ação ansiolítica do EHFAM, foram utilizados outros camundongos, pré-tratados com flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.), um antagonista benzodiazepínico. Após 15 minutos, os mesmos animais receberam o EHFAM na dose de 100 mg/Kg, i.p., diazepam 1 mg/Kg e analisados após 30 minutos no modelo do campo aberto (CA) e labirinto em cruz elevado (LCE) (Figura 10) (ARAGÃO et al., 2006).

Figura 10 - Esquema representativo da determinação do mecanismo de ação ansiolítica do EHFAM no campo aberto e labirinto em cruz elevado.



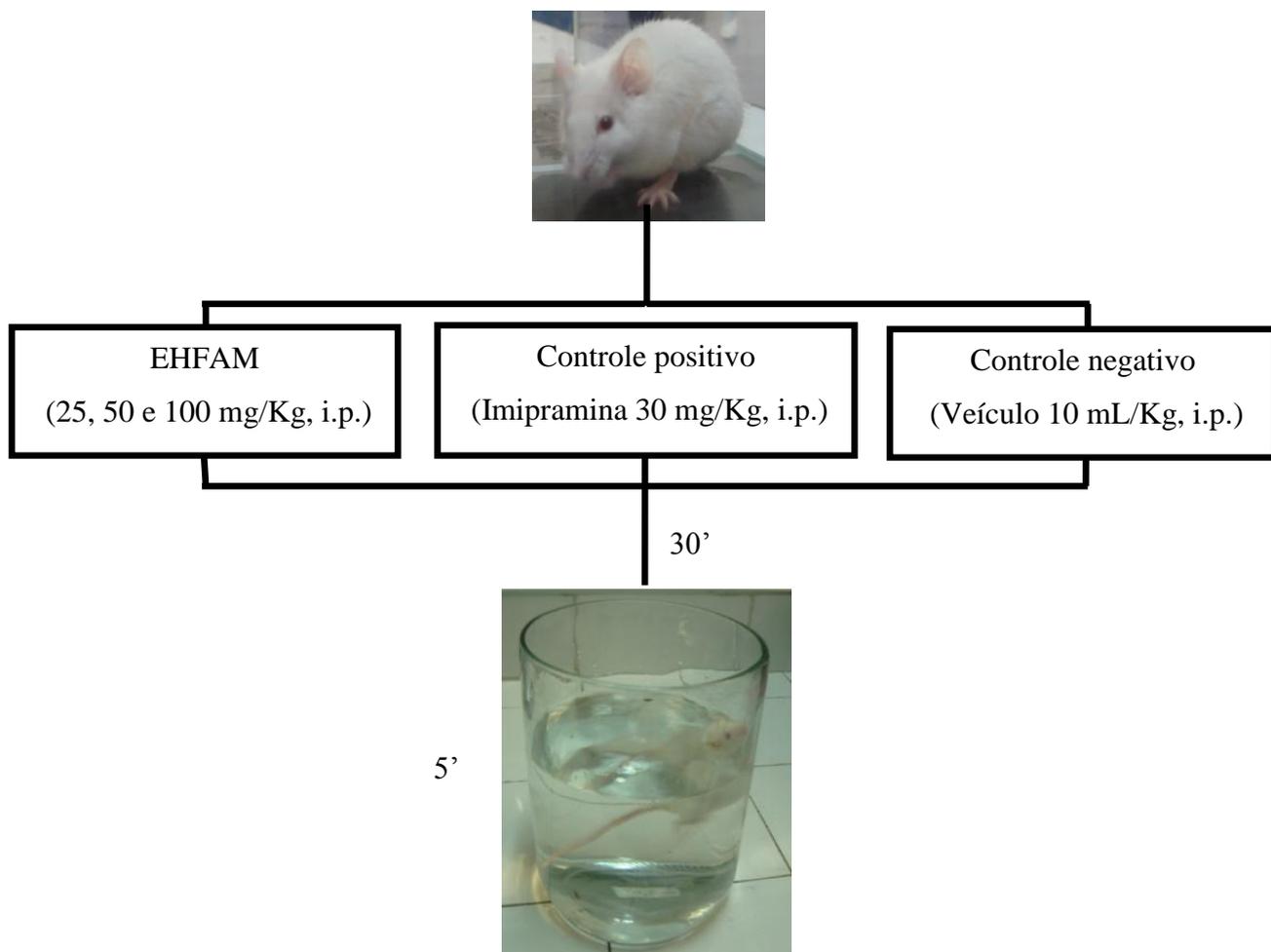
3.2.4.3. Nado Forçado (NF)

O teste do NF foi desenvolvido por Porsolt et al., (1978; 1987), para estudos de substâncias com possível ação antidepressiva, baseado no “desespero comportamental”. O objetivo foi criar um modelo que reproduzisse um comportamento semelhante à depressão e que fosse sensível aos fármacos utilizados clinicamente no tratamento desta patologia (FORTUNATO, 2009).

Neste teste os animais foram submetidos ao nado forçado, em um recipiente com água, onde é impossível escapar (Figura 11). Inicialmente há uma tentativa desesperada de tentar sair dessa situação, quando os animais apresentam um período de vigorosa atividade seguido por momentos em que os mesmos permanecem imóveis, limitando-se aos movimentos necessários para manter a cabeça fora da água. Esse período de imobilidade é acompanhado por hipotermia e se prolonga por meia hora após o teste. A imobilidade reflete um “estado de desespero”, na suposição de que os animais tenham desistido de tentar escapar da situação imposta. O parâmetro comportamental observado neste teste foi o tempo durante o qual o animal permaneceu imóvel (Tempo de Imobilidade – TI) (ALMEIDA, 2006).

Foram utilizados cilindros de vidro transparente, medindo 19 cm de altura e 15 cm de diâmetro, com volume total de 2L, contendo 1,5L de água a 27°C. Os animais foram divididos em cinco grupos, com treze animais cada. O primeiro grupo, controle, recebeu veículo, água destilada (i.p.), o segundo foi tratado com imipramina (30 mg/Kg, i.p. – antidepressivo tricíclico usado como droga padrão de efeito tipo antidepressivo). O terceiro, o quarto e o quinto grupos, foram tratados com EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) respectivamente. Após trinta minutos da administração, cada animal foi colocado para nadar no cilindro por um tempo de 5 minutos, observando o tempo de imobilidade em segundos. Foi considerado TI, quando o camundongo flutuava ou fazia movimentos necessários apenas para manter sua cabeça acima da água.

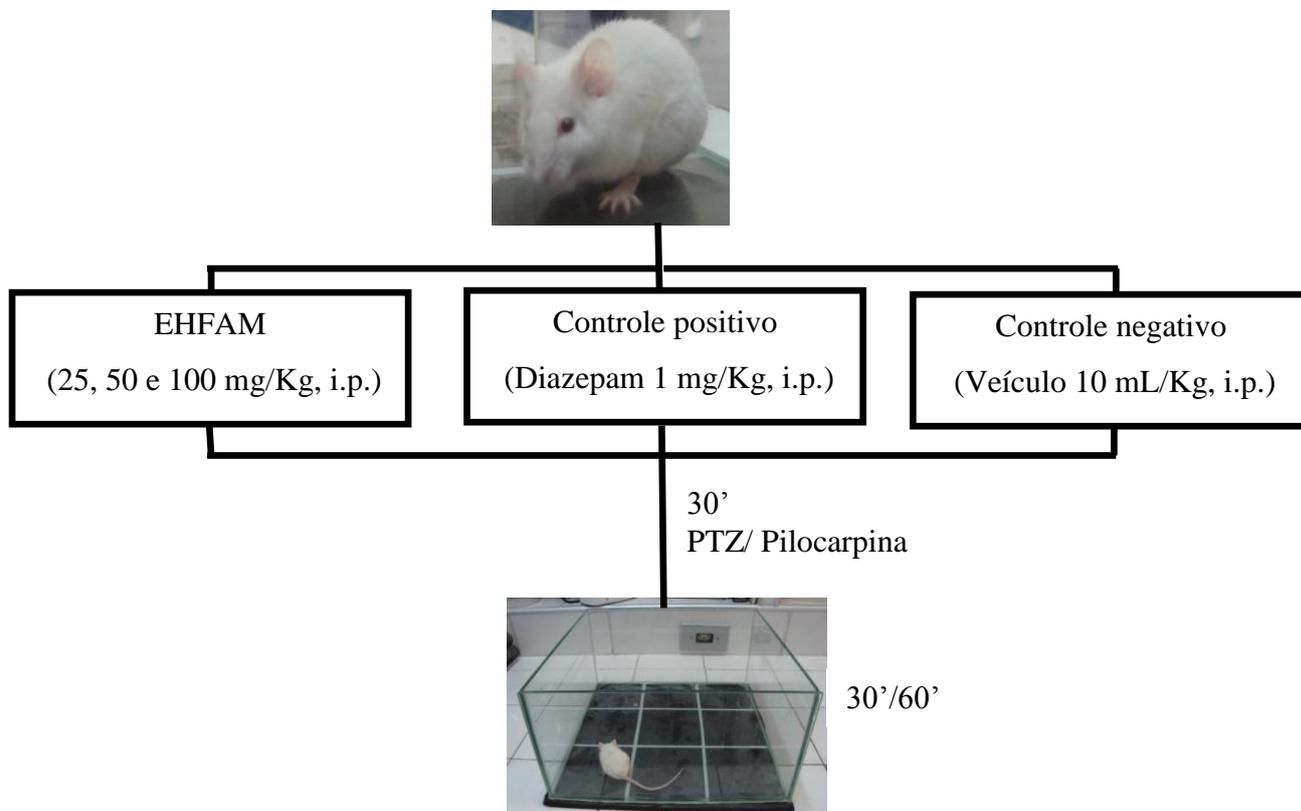
Figura 11: Esquema representativo a investigação do efeito do EHFAM sobre a depressão através do teste do Nado Forçado.



3.2.4.4. Teste de convulsões induzidas por Pentilenotetrazol e Pilocarpina

O efeito anticonvulsivante do EHFAM foi avaliado através do antagonismo das convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) e pilocarpina (PILO). Após 30 minutos do tratamento i.p. com diazepam 2 mg/Kg e EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) e veículo, cada animal recebeu PTZ (80 mg/Kg, i.p.), ou pilocarpina (350 mg/Kg, i.p.). A análise consistiu na observação dos animais individualmente por um período de 30 minutos, quando tratados com PTZ e por 60 minutos, quando tratados com PILO. Os parâmetros analisados foram: latência da primeira convulsão (tempo decorrido entre a administração de PTZ ou PILO até a primeira convulsão clônica ou tônico-clônica, em segundos) e a latência de morte dos animais (tempo decorrido da administração do PTZ ou PILO até a morte do animal) (Figura 12).

Figura 12: Esquema representativo da investigação do EHFAM sobre a convulsão induzida por PTZ e pilocarpina.

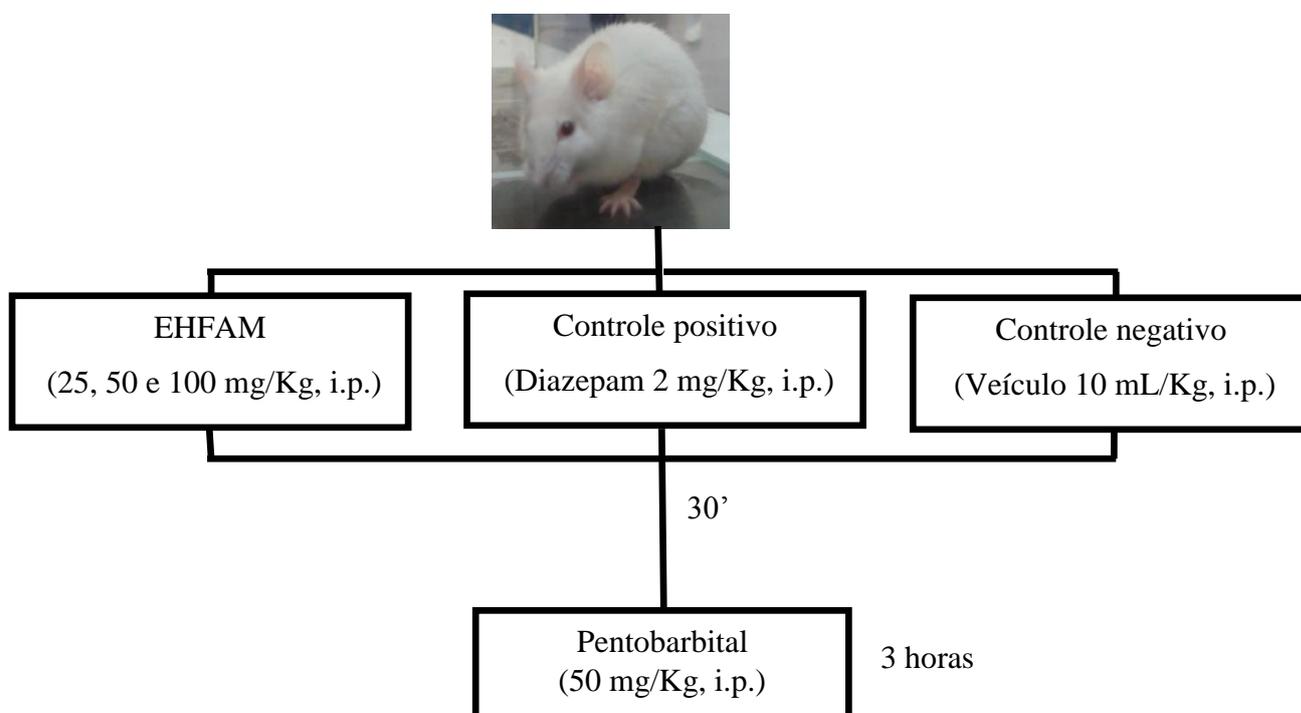


Foi investigado o efeito do flumazenil, um antagonista do receptor seletivo benzodiazepínico GABA_A (GABA-BZD), na atividade anticonvulsivante do EHFAM. Nos grupos experimentais, os camundongos foram pré-tratados com flumazenil (FLU) (5 mg/Kg, i.p.), 15 minutos antes do tratamento com EHFAM (100 mg/Kg, i.p. ou droga padrão DZP (1 mg/Kg, i.p.). Após 30 minutos destes tratamentos, os camundongos foram tratados com uma dose única de PTZ (80 mg/Kg, i.p.) e avaliados quanto a latência de primeira convulsão e latência de morte (FILE; PELLOW, 1986).

3.2.4.5. Teste de potencialização do Sono induzido por Pentobarbital sódico

Neste teste, os animais foram tratados com EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg) e DZP (2 mg/Kg), após 30 minutos foi administrado pentobarbital sódico (50 mg/Kg) em cada animal e observado os parâmetros da latência e duração da perda do reflexo postural dos animais, em até 3 horas de duração (DEVI et al., 2003; QUINTANS-JUNIOR et al., 2005).

Figura 13: Esquema representativo da investigação do EHFAM sobre a duração de sono induzido por pentobarbital.

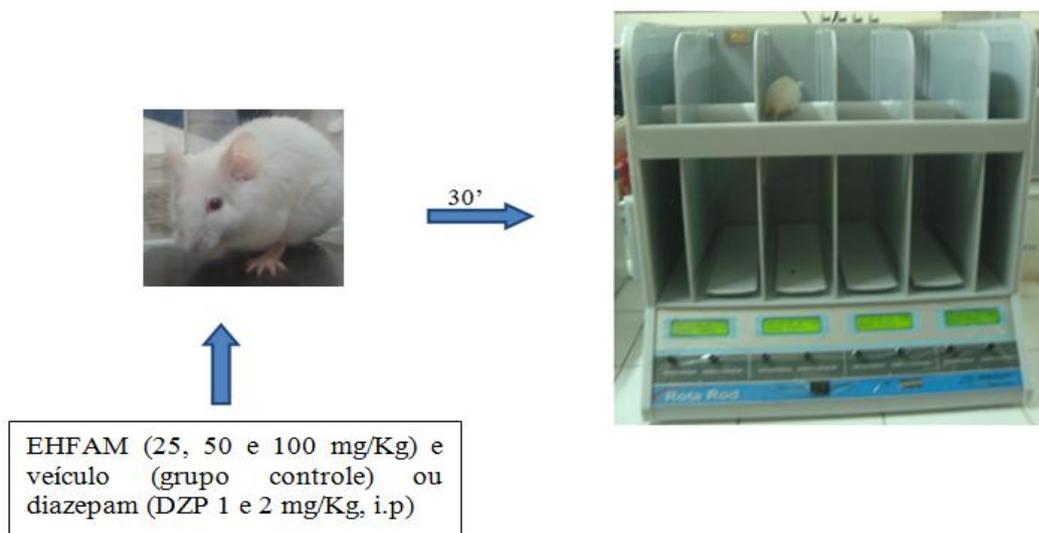


3.2.4.6. Teste do rota rod

O teste do *rota rod* investiga o efeito de relaxamento muscular ou incoordenação motora produzidos por drogas nos animais (CARLINI e BURGOS, 1979). Para este teste, os camundongos foram selecionados em uma sessão de treino, 24 horas antes do experimento. Os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso. Os camundongos capazes de permanecer na barra giratória (16 rpm) por mais de 180 s foram selecionados.

Seguidas 24 horas, os animais selecionados foram tratados com EHFAM 25, 50 e 100 mg/Kg, veículo (grupo controle) ou diazepam (DZP 1 e 2 mg/Kg, i.p), e 30 minutos após, cada animal foi testado no aparelho de *rota rod*, onde foi registrado o tempo em que cada um permaneceu na barra até um tempo final de 1 minuto e o número de quedas, com três reconduções, no máximo (DUNHAM e MIYA, 1957).

Figura 14: Esquema representativo da investigação do EHFAM sobre o efeito sobre a coordenação motora de camundongos submetidos ao teste do *rota rod*.



3.2.4.7. Dosagem de monoaminas e metabólitos

Para determinação dos níveis de monoaminas e seus metabólitos, foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE. Foram utilizados dois grupos de animais contendo quatro animais cada. O primeiro grupo recebeu EHFAM 100 mg/Kg e o segundo recebeu salina. Após 30 minutos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e decaptados com tesoura cirúrgica e imediatamente o encéfalo foi removido e colocado sobre o gelo para retirada do corpo estriado (CE) com auxílio de uma pinça reta de microdissecação, acompanhando a fissura sagital mediana, divulsionando tangencialmente aos ventrículos laterais, e córtex fronto-occipital, que foi rebatido expondo parte do corpo estriado, sendo isolado e removido.

As amostras obtidas foram envolvidas em papel alumínio, previamente identificado e pesado, mantidas a temperatura de -70°C , para posterior análise do conteúdo de monoaminas (noradrenalina, dopamina) e metabólito DOPAC.

Para a obtenção dos homogenatos de tecidos cerebral, as amostras de tecido (CE) foram homogeneizadas em ácido perclórico 10% (HClO_4) e centrifugados por 30 minutos em centrífuga refrigerada (4°C) a 15.000 rpm. Após foram filtradas e mantidas a 4°C até à análise pelo método de HPLC. Uma alíquota de $20\mu\text{L}$ do sobrenadante foi injetada no equipamento CLAE para análise química. Foi utilizado um equipamento de HPLC de marca Shimadzu, com detecção amperométrica. Para a separação das monoaminas, foi usada uma coluna (CLC-ODS(M), 25 cm, calibre: 4,6 mm; diâmetro de partícula: $3\mu\text{m}$; Shimadzu). A fase móvel foi preparada com solução tampão de ácido cítrico 0,163M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69 (SOS), como reagente formador do par iônico; acetonitrila 4% v/v e tetrahidrofurano 1,7% v/v. Para preparação da solução da fase móvel, pesou-se 17,75 g de ácido cítrico, o qual foi dissolvido com água mili-Q para um volume de 400 mL e o pH foi ajustado para 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M. A esta solução foram adicionados 75mg de SOS (ácido octanosulfônico sódico) e o volume acrescido para 471,5 mL com água mili-Q. A solução preparada foi filtrada e degaseificada e acrescido 20 mL de acetonitrila e 10 mL de tetrahidrofurano, completando um volume final de 500 mL.

Os padrões utilizados foram preparados em uma concentração final de 4 ng de DA, NA e DOPAC (Sigma Chemical, Co, USA). A partir da altura ou área dos picos

destes padrões, as amostras foram calculadas no programa Microsoft Excel em um computador PC, e os resultados expressos em ng/g de tecido.

3.2.6 Análise estatística dos dados

Os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Student Newman Keuls. Em algumas análises foi utilizado o teste T. Foram considerados estaticamente significativos os valores de $p < 0,05$. A DL50 foi calculada utilizando método estatístico de probitos (FINNEY, 1971) calculados pelo programa Statplus® versão 5.8.

4. RESULTADOS

4.1. Prospecção fitoquímica do EHFAM

A análise fitoquímica do EHFAM revelou a presença de diversos compostos, apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Prospecção fitoquímica do EHFAM.

Amostras	Metabólitos														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
EHFAM	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+

EHFAM = Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *A. muricata*. 1 – Fenóis; 2 – Taninos Pirogálicos; 3 – Taninos Condensados; 4 – Antocianinas; 5 – Antocianidinas; 6 – Flavonas; 7 – Flavonóis; 8 – Xantonas; 9 – Chalconas; 10 – Auronas; 11 – Flavononóis; 12 – Leucoantocianidinas; 13 – Catequinas; 14 – Flavononas; 15 – Alcalóides; (+) presença; (-) ausência.

4.2. Teste Hipocrático e Dose Letal Mediana (DL₅₀)

Os animais tratados com EHFAM, via i.p., nas doses de 500, 1000, 1250, 1500, 1750 e 2000 mg/Kg apresentaram efeitos depressores do SNC, como diminuição da motilidade, analgesia e sedação. Estas mudanças comportamentais foram mais evidentes a partir de 30 minutos após a administração do extrato. No entanto, a administração do EHFAM, nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg, não apresentou diferença em relação ao controle em todos os intervalos avaliados. Na dose de 1000 mg/Kg, 50% dos animais vieram a óbito. Com o aumento da dose do extrato (1250, 1500, 1750 mg/Kg) o percentual de mortalidade subiu para 75%. Finalmente, com a administração do EHFAM na dose de 2000 mg/Kg, 100% dos animais tratados vieram a óbito até 30 minutos após a administração do material. O quadro 3 mostra uma síntese das principais alterações comportamentais observadas nos animais após tratamento i.p. com o EHFAM em relação ao respectivo grupo controle.

A DL₅₀ apresentou um valor de 1.091,74 mg/Kg, sugerindo que doses superiores a 1000 mg/Kg apresenta um potencial tóxico.

Quadro 3: Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração do EHFAM via intraperitoneal.

EHFAM (mg/Kg, i.p.)	TEMPO (min)	EFEITOS FARMACOLÓGICOS
500	10	Sem alterações comportamentais (0)
	30	Piloereção (+), analgesia (+), diminuição da motilidade (+)
	60	Contorção abdominal (+)
	120	Sem alterações comportamentais (0)
	180	
	240	
	360	
	720	
1000	10	Sem alterações comportamentais (0)
	30	
	60	Contorção abdominal, diminuição da motilidade (+)
	120	morte
1250	10	Sem alterações comportamentais (0)
	30	
	60	morte
	120	morte
1500	10	Sem alterações comportamentais (0)
	30	
	60	
	120	
	180	morte
	240	morte
1750	10	Sem alterações comportamentais (0)
	30	
	60	
	120	
	180	morte
2000	10	morte

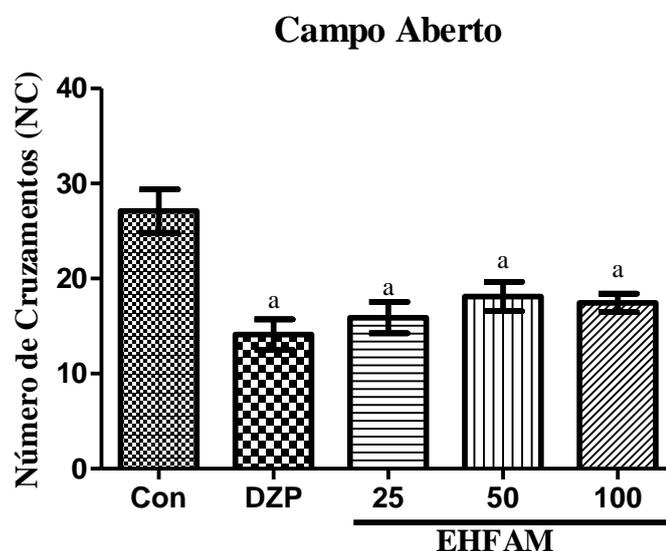
Legenda: (0) ausente, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito presente intenso.

4.3. Testes comportamentais

4.3.1 Campo aberto (CA)

O número de cruzamentos (exploração horizontal), o número de *rearing* (exploração vertical) e o número de *grooming* (movimento de autolimpeza) foram os parâmetros analisados, conforme mostrados nas figuras 15, 16 e 17. Após o tratamento (i.p.) do EHFAM nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, houve uma redução do número de cruzamentos ($15,89 \pm 1,65$; $18,11 \pm 1,54$; $17,44 \pm 0,95$, respectivamente) em relação ao grupo controle ($27,11 \pm 2,28$). Em termos percentuais, o EHFAM nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg reduziu o NC em 58,6%, 66,8% e 64,4%, respectivamente, em relação ao grupo controle. Os animais tratados com o DZP 1 mg/Kg (i.p.), também apresentaram redução deste parâmetro ($14,11 \pm 1,6$) em relação ao respectivo controle em 52,2% (Figura 15).

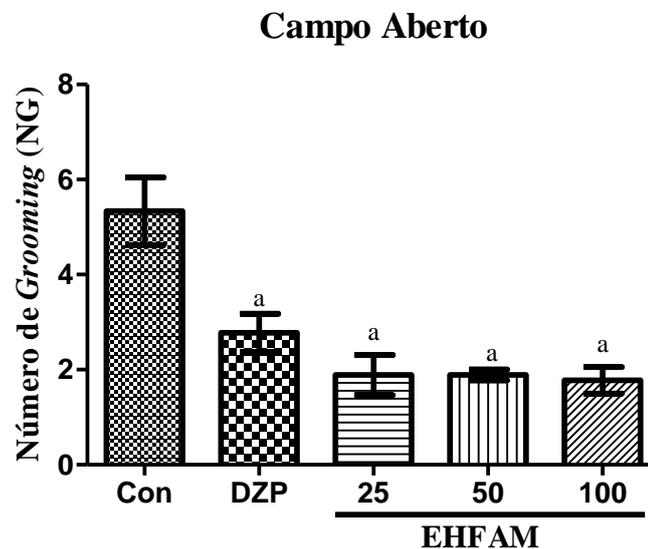
Figura 15 - Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o número de cruzamentos (NC) de camundongos submetidos ao campo aberto.



As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keusl (*post hoc*); “a” vs Controle, quando $p < 0.05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1 mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p.

De forma semelhante, o EHFAM também reduziu os outros parâmetros analisados em relação ao grupo controle. O número de *grooming*, por exemplo, foi reduzido nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg (1.88 ± 0.42 ; 1.88 ± 0.11 ; $1.77 \pm 0,27$) em relação ao grupo controle ($5,33 \pm 0,70$) em 35,2%; 35,2% e 33,2%, respectivamente. O tratamento com DZP também reduziu o NG em 52% ($2,77 \pm 0,40$) em relação ao grupo controle (Figura 16).

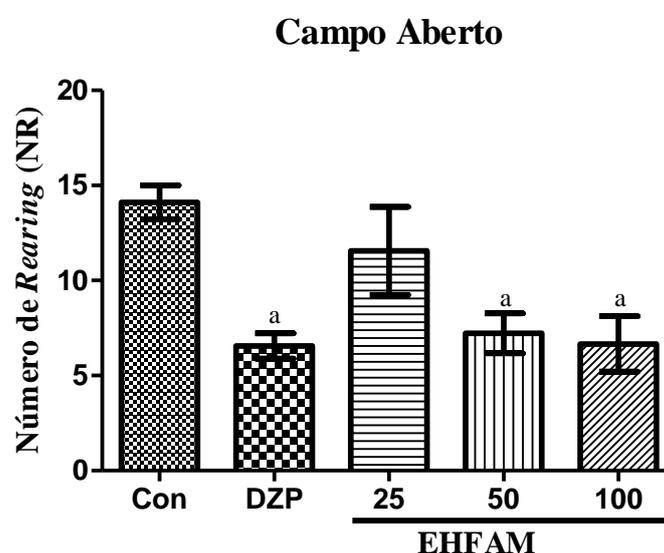
Figura 16: Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o número de *Grooming* (NG) de camundongos submetidos ao campo aberto.



As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keusl (*post hoc*); “a” vs Controle, quando $p < 0.05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p.

Na figura 17, observa-se uma redução no número de *rearing* nos grupos tratados com EHFAM 50 e 100 mg/Kg, ($7,22 \pm 1,05$; $6,66 \pm 1,45$) e DZP ($6,5 \pm 0,6$) em relação ao grupo controle ($14,11 \pm 0,8$), correspondendo a 51%, 47% e 46% respectivamente. A dose 25 mg/Kg ($11,56 \pm 2,31$) não apresentou diferença estatística do grupo veículo. As doses do EHFAM, não apresentaram diferença estatística entre si e com a droga de referência (DZP), o que não evidencia relação dose-efeito.

Figura 17: Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o número de *Rearing* (NR) de camundongos submetidos ao campo aberto.



As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keuls (*post hoc*); "a" vs Controle, quando $p < 0,05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p.

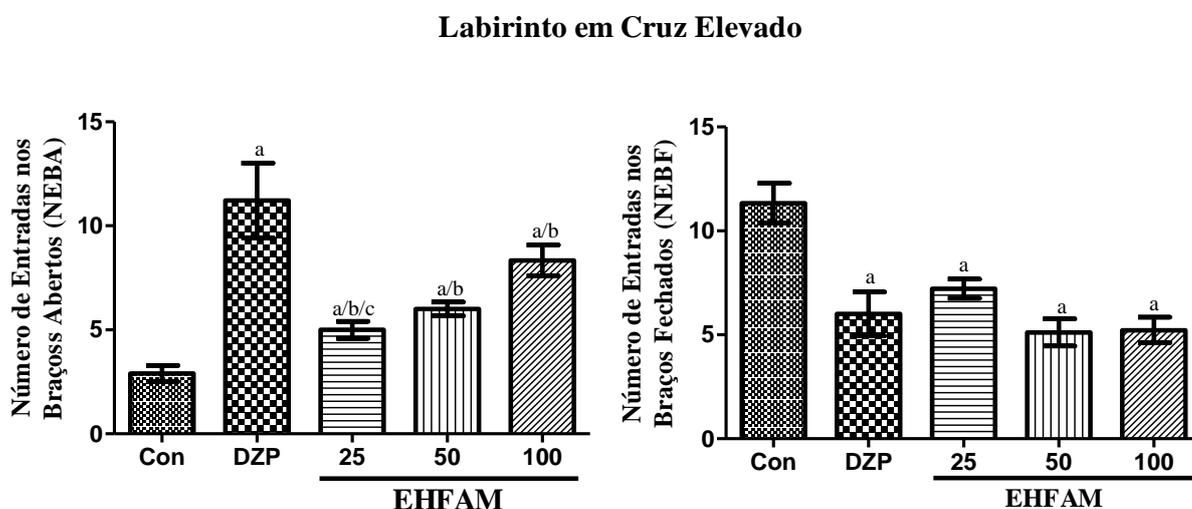
4.3.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

No LCE a administração do EHFAM promoveu diferença significativa em quase todos os parâmetros avaliados, em relação ao grupo controle, exceto no número de entradas nos braços abertos (NEBA) (Figura 18), no qual apenas a dose de 100 mg/Kg ($8,33 \pm 0,74$) foi significativamente diferente do controle ($2,88 \pm 0,38$) apresentando aumento de 2,9 vezes quando comparado ao controle. Os grupos 25 e 50 do EHFAM ($5,00 \pm 0,40$; $6,00 \pm 0,33$, respectivamente) não apresentaram diferença estatística entre si. Entretanto as doses de 25 e 100 mg/Kg do EHFAM, mostram diferença estatística de 60% entre si.

O DZP interferiu em todos os parâmetros: aumentou o número de entradas ($11,22 \pm 1,79$ vs $2,889 \pm 0,38$) e permanência ($135 \pm 12,37$ vs $31,67 \pm 6,19$) nos braços abertos em 3,9 e 4,3 vezes, em relação ao controle veículo. Reduziu o número de entradas ($6,00 \pm 1,05$ vs $11,33 \pm 0,95$) e tempo de permanência ($88,63 \pm 16,68$ vs $212,1 \pm 13,87$) nos braços fechados quando comparado com o grupo controle (veículo) em 53% e 42%, respectivamente (Figuras 18 e 19).

Os grupos tratados com EHFAM nas doses 25, 50 e 100 mg/Kg, diminuíram o número de entradas nos braços fechados (NEBF), ($7,22 \pm 0,46$; $5,11 \pm 0,65$; $5,22 \pm 0,61$) apresentando 63,7%, 45%, 46%, respectivamente, do NEBF do grupo controle ($11,33 \pm 0,95$) (Figura 18), não apresentando diferenças entre os grupos.

Figura 18: Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o número de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado.

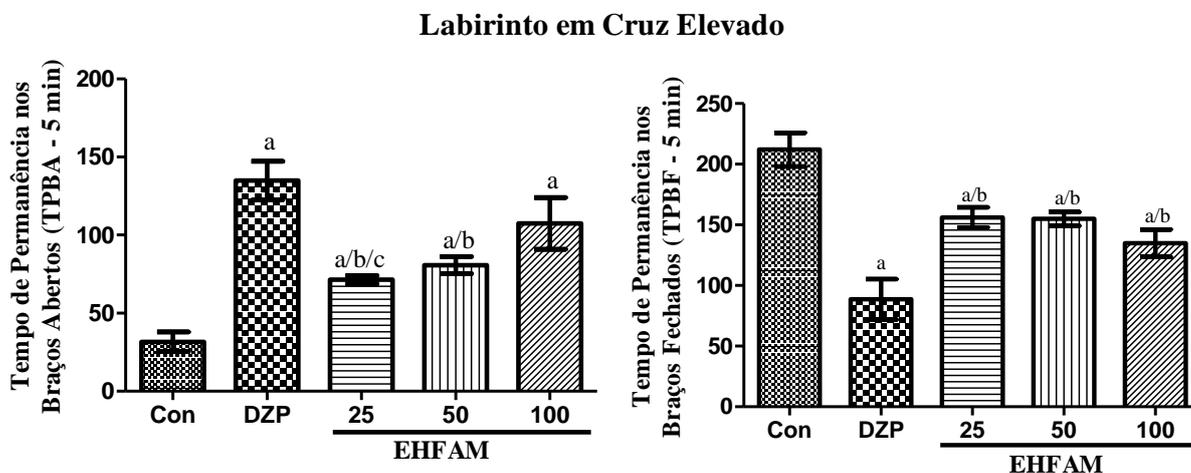


As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keusl (*post hoc*). Valores significativos: “a”, “b”, “c” vs Con, DZP e 100, respectivamente, quando $p < 0,05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p.

Também foi observada uma diminuição no tempo de permanência nos braços fechados (TPBF) em todas as doses 25, 50 e 100 mg/Kg do EHFAM ($156,2 \pm 8,31$; $155,0 \pm 5,80$; $134,9 \pm 1,30$), correspondendo respectivamente a: 73,6%, 73% e 63,6% em relação ao grupo controle ($212,1 \pm 13,87$) (Figura 19).

Além disso, houve aumento de 3,39 vezes o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) do grupo tratado com EHFAM na dose de 100 mg/Kg ($107,4 \pm 16,57$), quando comparado ao controle ($31,67 \pm 6,19$). Os grupos 25 e 50 do EHFAM ($71,44 \pm 2,66$; $80,78 \pm 5,52$, respectivamente) apresentam 2,25 e 2,55 vezes, respectivamente de aumento do TPBA em relação ao controle (veículo). Entre as doses do EHFAM, houve diferença apenas entre as doses 25 e 100 mg/Kg (Figura 19).

Figura 19: Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre o tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado.



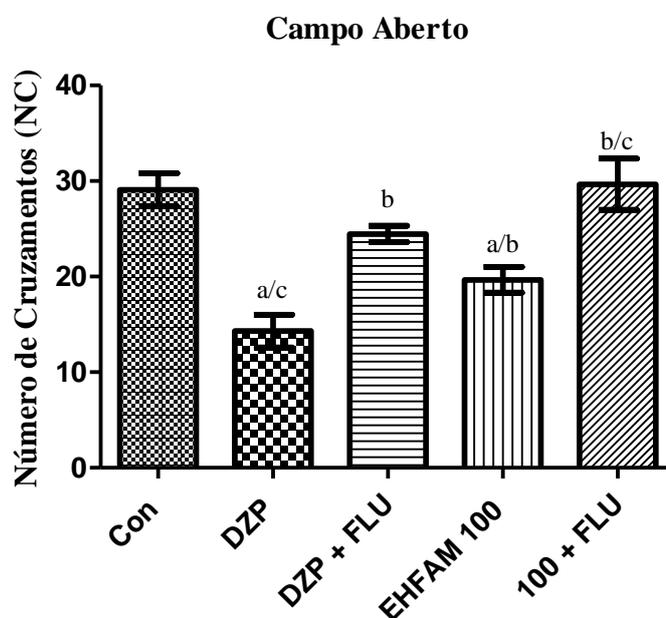
As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keuls (*post hoc*). Valores significativos: “a”, “b”, “c” vs Con, DZP e 100, respectivamente, quando $p < 0,05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p.

Uma vez que o EHFAM apresentou atividade sedativa no CA e ansiolítica no LCE, procurou-se investigar a participação dos receptores GABA_A nos efeitos observados com o extrato. Diante dos resultados obtidos anteriormente descritos do CA e LCE, somando-se aos dados de atividade anticonvulsivante, nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol, a dose de 100 mg/Kg do EHFAM apresentou melhor efeito dentre as demais doses do extrato (25 e 50 mg/Kg). Portanto a dose de 100 mg/Kg do EHFAM foi utilizada para avaliar o possível envolvimento do sistema GABAérgico nos efeitos sedativo e ansiolítico do extrato nos mesmos modelos de investigação de atividade sedativa e ansiolítica, respectivamente, no campo aberto e no labirinto em cruz elevado e no teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol.

A figura 20 mostra o efeito do diazepam e do EHFAM, isoladamente ou associados ao flumazenil (antagonista benzodiazepínico), sobre o número de cruzamentos de camundongos no teste de campo aberto (cont: $29,08 \pm 1,73$, DZP: $14,31 \pm 1,71$, EHFAM 100: $19,67 \pm 1,34$, DZP + FLU: $24,45 \pm 0,85$, EHFAM + FLU: $29,67 \pm 2,67$). Observa-se que o diazepam 1 mg/Kg (DZP) reduziu, de forma significativa o parâmetro

em questão em relação ao grupo controle em 49,2%. Este efeito, entretanto, foi revertido na presença de flumazenil 2,5 mg/Kg (FLU), que aumentou em 58,5%, o número de cruzamentos dos camundongos tratados com a associação DZP + FLU, em relação ao grupo que recebeu apenas DZP. Assim, como também o efeito do EHFAM, foi revertido na associação com FLU, o qual aumentou o NC em 66,3%, quando comparado ao grupo EHFAM 100 mg/Kg isolado. Este último diminui o NC em 67,6% em relação ao controle (veículo).

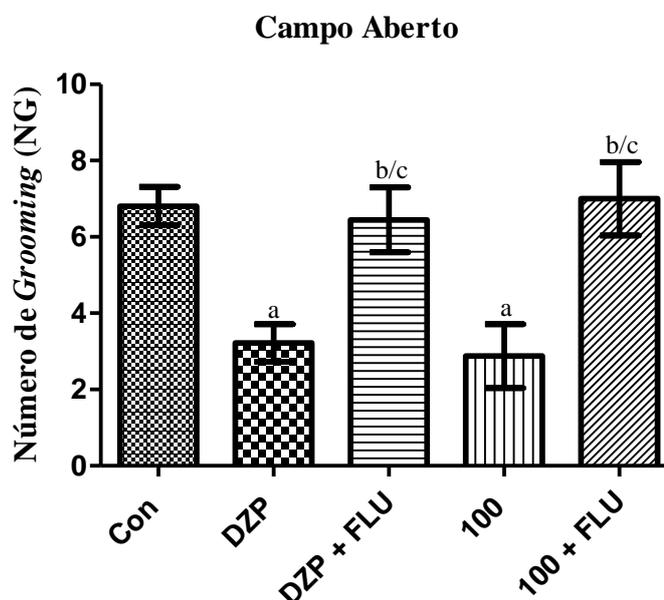
Figura 20: Efeito do EHFAM (100 mg/Kg, i.p.), e EHFAM (100 mg/Kg, i.p.) associado ao flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.) sobre o número de cruzamentos (NC) de camundongos submetidos ao campo aberto.



As colunas representam média ± erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keuls (*post hoc*). Valores significativos: “a”, “b”, “c” vs Con, DZP e 100, respectivamente, quando $p < 0,05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p.

O EHFAM 100 mg/Kg, também reduziu de forma significativa o número de *Grooming* ($2,87 \pm 0,84$) em 42,2%, assim como o DZP ($3,22 \pm 0,49$) em 47,35%, quando comparados ao grupo controle ($6,80 \pm 0,50$). O FLU administrado associado ao DZP ($6,44 \pm 0,85$), e ao EHFAM ($7,00 \pm 0,96$), reverteu o efeito de ambos em 50% e 41%, respectivamente quando comparados aos respectivos grupos isolados. Entretanto estes últimos grupos associados não apresentam diferenças entre si (Figura 21).

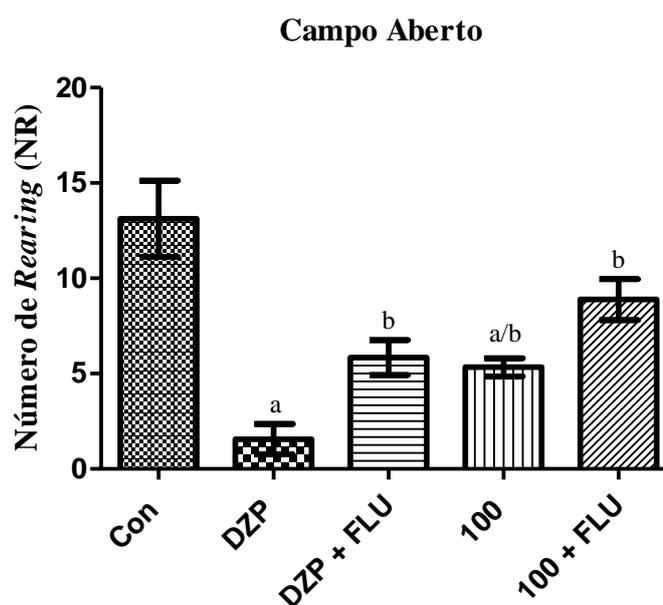
Figura 21: Efeito do EHFAM (100 mg/Kg, i.p.), e EHFAM (100 mg/Kg, i.p.) associado ao flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.) sobre o número de *Grooming* (NG) de camundongos submetidos ao campo aberto.



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”, “c” vs Con, DZP e 100, respectivamente, quando $p < 0,05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p

O Número de *Rearing* dos animais tratados com EHFAM 100 mg/Kg ($5,33 \pm 0,47$) também foi reduzido em relação ao controle ($13,13 \pm 1,99$) apresentando 40,59%, do Número de *Rearing*, assim como o grupo DZP ($1,55 \pm 0,80$ vs $13,13 \pm 1,99$) que corresponde a 11,8% deste parâmetro. Todavia, na associação com FLU, apenas o efeito do DZP foi revertido ($5,84 \pm 0,91$), em 26,5% quando comparado ao grupo tratado apenas com DZP. O efeito do EHFAM 100 mg/Kg, neste caso não, foi revertido quando associado ao FLU, em relação ao grupo tratado com EHFAM isoladamente (Figura 22).

Figura 22: Efeito do EHFAM (100 mg/Kg, i.p.), e EHFAM (100 mg/Kg, i.p.) associado ao flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.) sobre o número de *Rearing* (NR) de camundongos submetidos ao campo aberto.

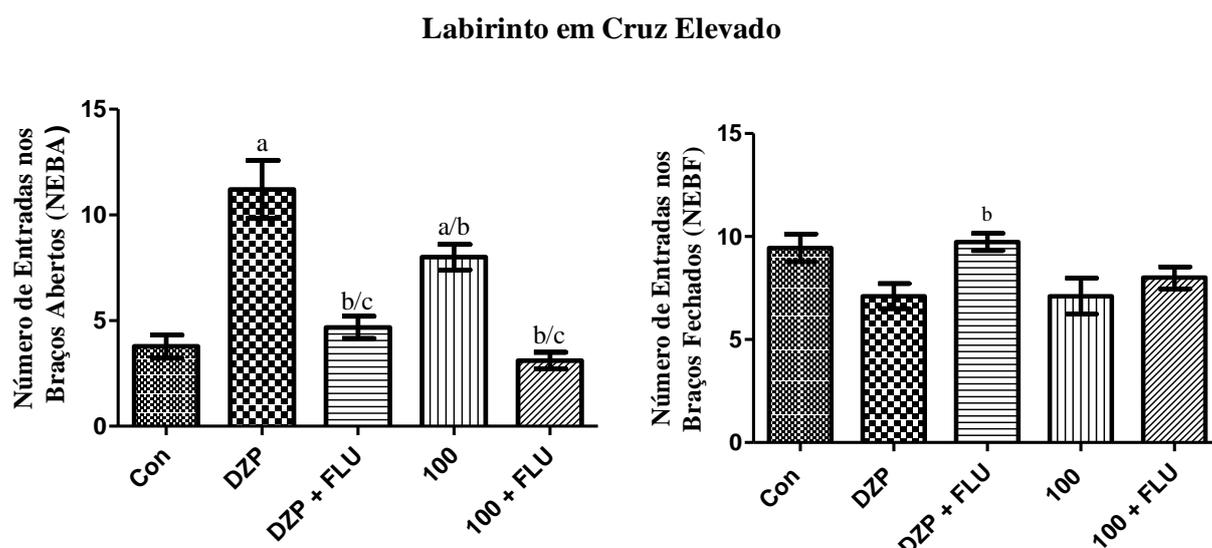


As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keusl (*post hoc*). Valores significativos: “a”, “b” vs Con e DZP, respectivamente, quando $p < 0,05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p

No LCE, a ação do DZP foi mais uma vez comprovada em todos os parâmetros estudados, aumentando o número de entradas 3,0 vezes ($11,20 \pm 1,37$ vs $3,77 \pm 0,54$) e o tempo de permanência em 2,7 vezes ($148,5 \pm 9,80$ vs $55,25 \pm 7,22$) dos animais nos braços abertos, em relação ao controle.

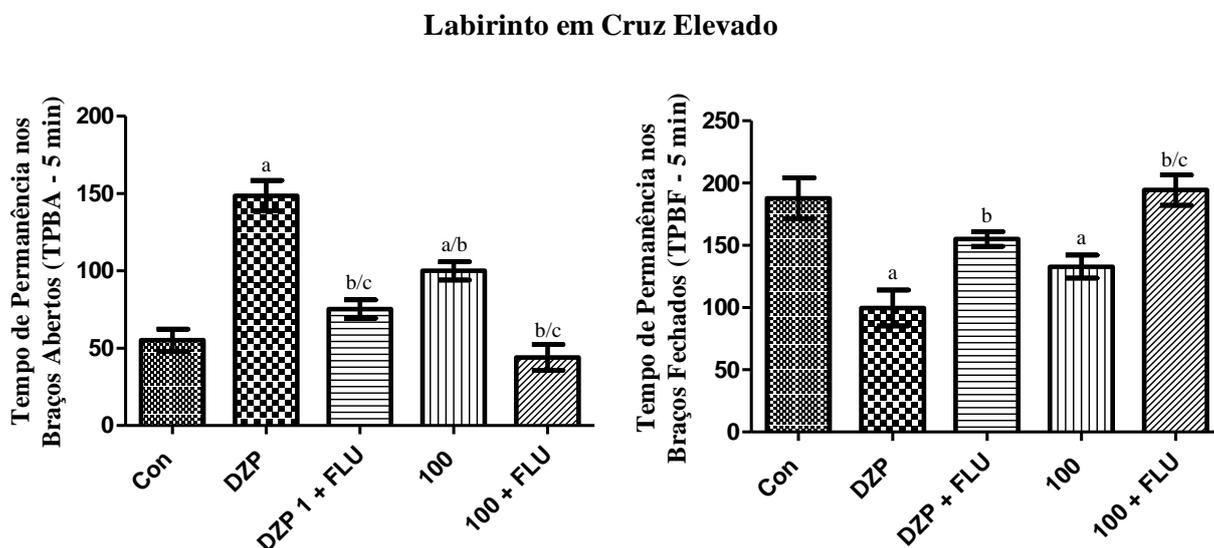
Quando associado ao FLU o efeito do DZP foi parcialmente revertido, diminuindo significativamente o número de entradas nos braços abertos em 2,4 vezes ($4,67 \pm 0,52$ vs $11,20 \pm 1,37$), bem como no tempo de permanência nos braços abertos em 2,0 vezes ($75,32 \pm 5,86$ vs $148,5 \pm 9,80$), quando comparado ao grupo tratado somente com DZP (Figura 23).

Figura 23: Efeito do EHFAM (100 mg/Kg, i.p.), e EHFAM (100 mg/Kg, i.p.) associado ao flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.) sobre o número de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado.



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” vs Con e DZP, respectivamente, quando $p < 0,05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p.

Figura 24: Efeito do EHFAM (100 mg/Kg, i.p.), e EHFAM (100 mg/Kg, i.p.) associado ao flumazenil (2,5 mg/Kg, i.p.) sobre o tempo de permanência nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado.



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” vs Con e DZP, respectivamente, quando $p < 0,05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p.

No número de entradas nos braços fechados, o tratamento com DZP não causou diferença em relação ao grupo controle (veículo) ($7,11 \pm 0,61$ vs $9,44 \pm 0,66$) (Figura 23), mas reduziu significativamente o tempo de permanência nos braços fechados quando comparado com o grupo controle em 53% ($99,67 \pm 14,32$ vs $187,9 \pm 16,29$) (Figuras 24). Na associação com FLU, houve aumento do número de entradas de 73% ($9,73 \pm 0,42$ vs $7,11 \pm 0,61$) e de 1,5 vezes no tempo de permanência nos braços fechados quando comparado com DZP isoladamente ($155,1 \pm 5,79$ vs $99,67 \pm 14,32$).

O EHFAM 100 mg/Kg apresentou atividade em todos os parâmetros observados quando comparado ao grupo controle (veículo), aumentando o número de entradas 2,12 vezes ($8,00 \pm 0,60$ vs $3,77 \pm 0,54$) e o tempo de permanência em 1,8 vezes ($100,0 \pm 5,85$ vs $55,25 \pm 7,22$) dos animais nos braços abertos, em relação ao controle.

A associação com FLU reverteu parcialmente o efeito ansiolítico do EHFAM nos parâmetros analisados: diminuiu 2,57 vezes o número de entradas ($3,11 \pm 0,38$ vs $8,00 \pm 0,60$) e 2,26 vezes o tempo de permanência nos braços abertos ($44,14 \pm 8,31$ vs $100,0 \pm 5,85$), quando comparado com os respectivos grupos de EHFAM 100 mg/Kg isolados (Figuras 23 e 24).

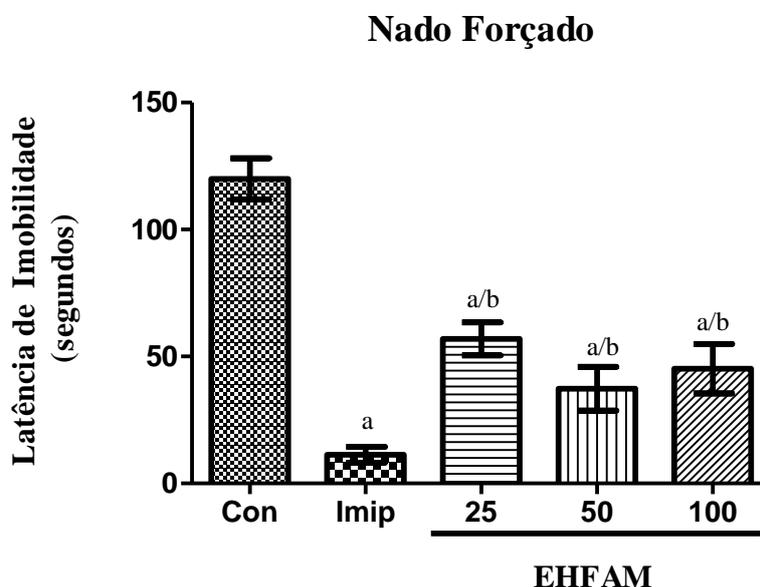
O EHFAM 100 mg/Kg não reduziu o número de entradas ($7,11 \pm 0,87$ vs $9,44 \pm 0,66$) nos braços fechados em relação ao controle. E também, não houve também diferença significativa em relação ao grupo tratado com a associação EHAM + FLU ($8,00 \pm 0,52$ vs $7,11 \pm 0,87$) em relação ao EHFAM isolado (Figura 23). Porém, o tempo de permanência nos braços fechados foi reduzido ($132,9 \pm 9,27$ vs $187,9 \pm 16,29$) quando comparado ao controle em 70,7%, e este efeito foi parcialmente revertido em 68,4%, quando o EHFAM associado ao FLU ($194,4 \pm 12,15$ vs $132,9 \pm 9,27$), comparado ao grupo que recebeu apenas EHFAM (Figura 24).

4.3.3 Nado Forçado (NF)

O efeito 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 25). A droga antidepressiva padrão imipramina 30 mg/Kg ($11,31 \pm 3,17$) e o EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg; $56,92 \pm 6,48$; $37,31 \pm 8,6$; $45,15 \pm 9,75$, respectivamente) reduziram de forma significativa o tempo de imobilidade dos animais tratados correspondendo em apenas 9,4% do tempo de imobilidade, quando comparado ao grupo controle ($120 \pm 8,15$) tratado com veículo (água destilada).

O EHFAM apresentou efeito em todas as doses testadas (25, 50 e 100 mg/Kg), apresentando 47,4%; 31% e 37,25%, respectivamente do tempo de imobilidade, em relação ao controle ($120 \pm 8,15$) tratado com veículo (água destilada). Não havendo diferença estatística entre as doses.

Figura 25: Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a Latência de Imobilidade.

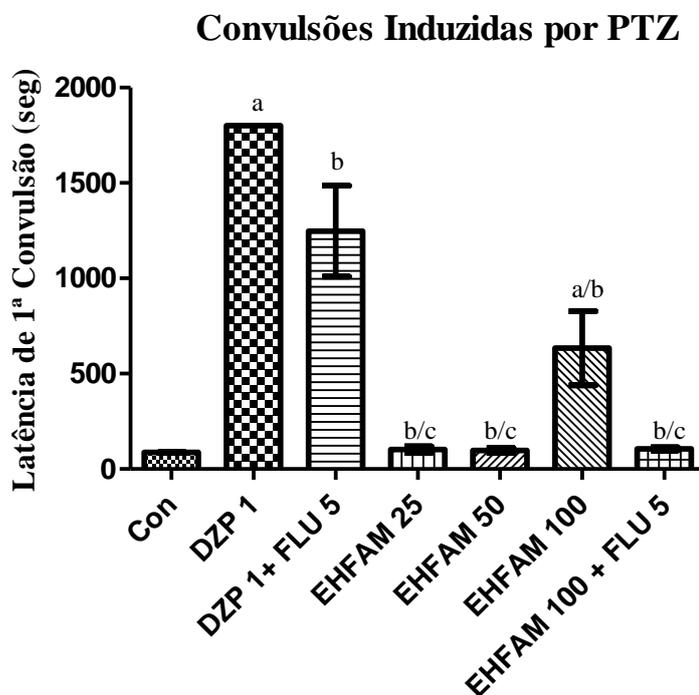


As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keusl (*post hoc*). Valores significativos: “a”, “b” vs Con e Imip, respectivamente, quando $p < 0,05$. Con = Controle (veículo), Imip = Imipramina 30 mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p.

4.3.4 Teste da convulsão induzida por Pentilenotetrazol – PTZ

No teste da convulsão induzida por PTZ foram avaliados a latência da convulsão (LC) e latência de morte (LM), em segundos. Os grupos de camundongos tratados com EHFAM nas doses 25 e 50 mg/Kg, não aumentaram significativamente a latência da convulsão ($102,3 \pm 17,59$; $97,44 \pm 14,03$, respectivamente), apenas a dose de 100 mg/Kg ($633,9 \pm 194,0$) aumentou a latência para primeira convulsão 7,28 vezes, em relação ao controle ($87,00 \pm 1,46$) (Figura 26). O DZP 1 mg/Kg ($1800 \pm 0,00$), aumentou de forma significativa a latência para primeira convulsão 20,68 vezes, em relação ao grupo controle. Quando associado ao flumazenil, o EHFAM 100 mg/Kg ($105,8 \pm 9,07$) teve seu efeito revertido ao diminui em 6 vezes a latência para primeira convulsão em relação ao grupo tratado somente com EHFAM 100 mg/Kg. Assim como na associação com o DZP 1 mg/Kg ($1248 \pm 238,3$), que obteve reversão de 1,4 vezes, quando comparado ao grupo DZP 1 mg/Kg.

Figura 26: Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência da primeira convulsão de camundongos tratados com pentilenotetrazol (80 mg/Kg, i.p.).

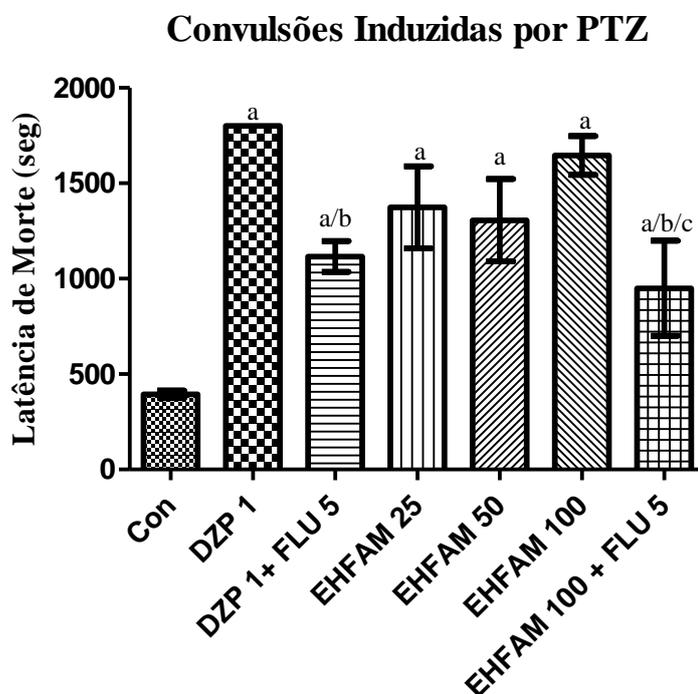


As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keusl (*post hoc*). Valores significativos: “a”, “b”, “c” vs Con, DZP e EHFAM 100, respectivamente, quando $p < 0,05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p.

No parâmetro latência de morte, todas as doses do EHFAM testadas (25, 50 e 100 mg/Kg) apresentaram efeito neuroprotetor em aumentar este parâmetro em 3,5; 3,32 e 4,2 vezes, respectivamente, ($1374 \pm 215,6$; $1307 \pm 216,5$; $1646 \pm 101,6$), quando comparado ao controle ($393,7 \pm 19,91$) (Figura 27). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos. O grupo tratado com DZP, não apresentou convulsão durante o período de observação ($1800 \pm 0,00$) diferindo do grupo controle em 456,9%.

Na associação ao flumazenil o EHFAM 100 mg/Kg ($949,8 \pm 248,6$) teve seu efeito revertido ao diminuir a latência de morte 1,7 vezes. Quando o flumazenil associado ao DZP 1 mg/Kg ($1117 \pm 80,91$), o efeito do DZP foi revertido 1,6 vezes.

Figura 27: Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência de morte de camundongos tratados com pentilenotetrazol (80 mg/Kg, i.p.).

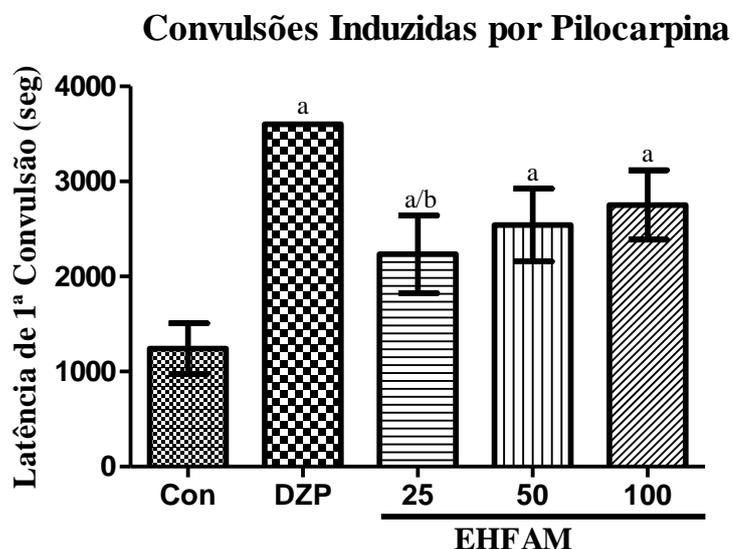


As colunas representam média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keuls (*post hoc*). Valores significativos: “a”, “b”, “c” vs Con, DZP e EHFAM 100, respectivamente, quando $p < 0,05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p.

4.3.5 Teste de convulsões induzidas por Pilocarpina

No modelo de convulsão induzida por pilocarpina, todos os animais apresentaram sinais colinérgicos periféricos (miose, piloereção, tremores, cromodacriorréia, diarreia) e, em alguns casos, convulsões motoras límbicas. O pré- tratamento com o EHFAM, 30 minutos antes da pilocarpina (350 mg/Kg, i.p.), causou uma proteção significativa, dose-dependente, contra convulsões induzidas por pilocarpina. Os grupos tratado com EHFAM nas doses 25, 50 e 100 mg/Kg (i.p.) aumentaram o tempo de latência para a primeira convulsão 1,8; 2,0; 2,2 vezes, respectivamente, em relação ao controle. Apresentando as seguintes médias: $2234 \pm 408,0$; $2542 \pm 383,6$; $2753 \pm 364,8$, respectivamente vs $1241 \pm 267,3$). Estatisticamente, não há diferença dos entre os grupos do EHFAM. O grupo DZP ($3600 \pm 0,00$ vs $1241 \pm 267,3$), aumentou a latência da primeira convulsão 3 vezes (Figura 28).

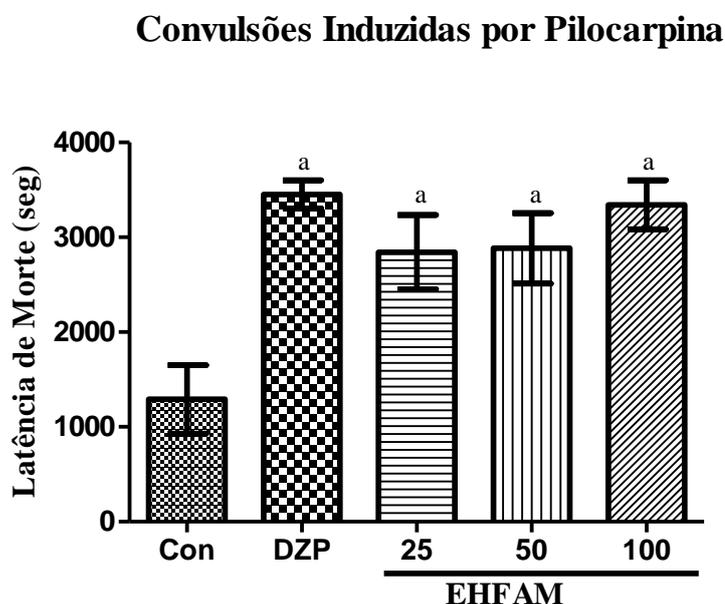
Figura 28: Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência da primeira convulsão de camundongos tratados com pilocarpina (350 mg/Kg, i.p.).



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” vs Con e DZP, respectivamente, quando $p < 0,05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p.

Da mesma forma, que o extrato apresentou aumento da latência para a primeira convulsão, também o tratamento com o extrato, em todas as doses utilizadas (25, 50 e 100 mg/Kg), aumentou o tempo de morte dos animais ($2843 \pm 391,8$; $2884 \pm 371,2$; $3343 \pm 257,3$, respectivamente), em 2,2; 2,2 e 2,6 vezes, quando comparado ao controle veículo ($1290 \pm 361,7$) (Figura 29). O grupo tratado com DZP apresentou significativa atividade anticonvulsivante ($3453 \pm 147,3$ vs $1290 \pm 361,7$) apresentando 2,7 vezes de aumento de latência de morte.

Figura 29: Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência de morte de camundongos tratados com pilocarpina (350 mg/Kg, i.p.).



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 Con, quando $p < 0,05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p.

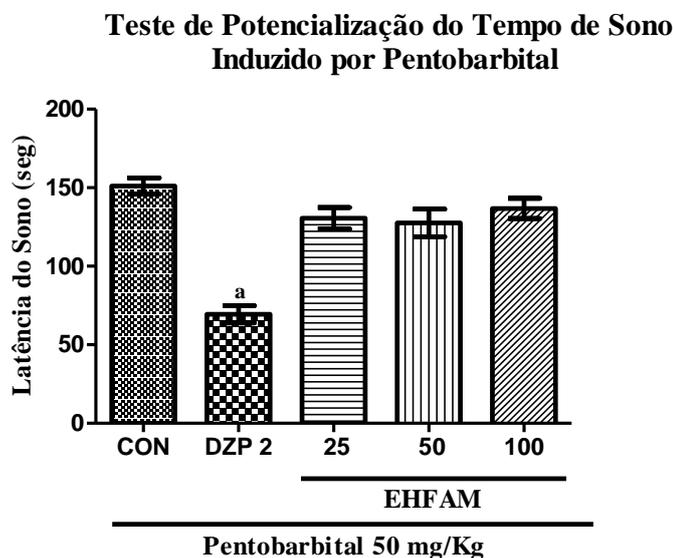
4.3.6 Tempo de Sono

O efeito sedativo-hipnótico foi investigado através da latência e duração da perda de reflexo postural (reflexo de endireitamento), em segundos, Figuras 30 e 31. O EHFAM, promoveu alteração nas doses de 50 e 100 mg/Kg na duração do sono ($1679 \pm 234,2$; $1851 \pm 301,6$, respectivamente) em 199,3% e 219,7% respectivamente, em relação ao controle ($842,3 \pm 97,38$). A concentração de 25 mg/Kg ($1011 \pm 142,2$), não diferiu do controle.

Na latência de sono não houve alteração com administração do EHFAM 25, 50 e 100 mg/Kg ($130,6 \pm 6,87$; $127,6 \pm 8,87$; $136,8 \pm 6,4$, respectivamente), quando comparados ao controle ($151,1 \pm 5,1$).

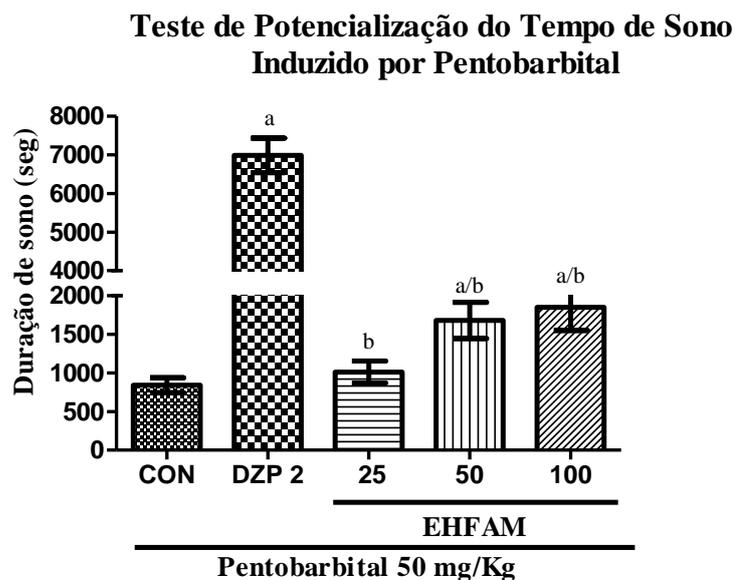
O diazepam (2 mg/Kg) reduziu de forma significativa ambos os parâmetros, a latência em 46% e duração em 829,3% do sono ($69,44 \pm 5,478$; $6986 \pm 445,4$, respectivamente).

Figura 30: Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a latência da perda do reflexo postural de camundongos tratados com pentobarbital (50 mg/Kg).



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 Con, quando $p < 0,05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p.

Figura 31: Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a duração da perda do reflexo postural de camundongos tratados com pentobarbital (50 mg/Kg).



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 Con; “b” vs DZP, quando $p < 0,05$. Con = Controle (veículo), DZP = Diazepam 1mg/Kg, i.p., 25 = EHFAM 25mg/Kg, i.p., 50 = EHFAM 50 mg/Kg, i.p., 100 = EHFAM 100 mg/Kg, i.p.

4.3.7 Teste do Rota rod

O EHFAM, em todas as doses (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.), e o grupo diazepam 1 mg/Kg, não apresentaram efeito sobre a coordenação motora (tempo de permanência sobre a barra giratória e número de quedas) dos camundongos submetidos ao *rota rod* (Tabela 3). O diazepam (2 mg/Kg, i.p.) causou diminuição significativa de 75% do tempo de permanência dos animais sobre o aparelho *rota-rod*, quando comparado aos demais grupos.

Tabela 3: Efeito do EHFAM (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) sobre a coordenação motora de camundongos submetidos ao teste do *rota rod*.

Grupos	Número de Quedas	Tempo de Permanência (seg)
CONT	0	60
DZP 1	0	60
DZP 2	1,5 ± 0,4 ^a	45,0 ± 0,4 ^a
EHFAM 25	0	60
EHFAM 50	0	60
EHFAM 100	0	60

Os dados representam a média ± erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA seguido por Student Newman Keusl (*post hoc*). Valores significativos: “a” vs Con, quando $p < 0,05$. Con= Controle, EHFAM 25= Extrato Hidroalcoólico das folhas de *A. muricata* 25 mg/Kg, EHFAM 50 = Extrato Hidroalcoólico das folhas de *A. muricata* 50 mg/Kg, EHFAM 100= Extrato Hidroalcoólico das folhas de *A. muricata* 100 mg/Kg, DZP 1 e 2 = Diazepam 1 e 2 mg/Kg, i.p.

4.3.8 Dosagem de monoaminas e metabólitos

A administração do EHFAM, promoveu diminuição significativa nos níveis de NA (30,2%) e DA (32,7), em relação aos respectivos controles (Tabela 4). A concentração de DOPAC não alterou com administração do EHFAM, quando comparado ao controle.

Tabela 4: Efeito do pré-tratamento do EHFAM (100 mg/Kg, i.p.) sobre a concentração de monoaminas e metabólitos em corpo estriado de camundongos.

Concentração (ng/g de tecido)		
Monoamina/Metabólito	Con	EHFAM 100
NA	2912 ± 179,3 ^a	2032 ± 297,3
DA	3559 ± 287,7 ^a	2396 ± 350,8
DOPAC	1673 ± 122,3	1397 ± 115,5

Os dados representam a média ± erro padrão da média (EPM), analisados através do teste T, seguido de Unpaired t test. Valores significativos: “a” vs Con, quando $p < 0,05$. Con= Controle e EHFAM 100= Extrato Hidroalcoólico das folhas de *A. muricata* 100 mg/Kg.

5. DISCUSSÃO

Dentre todas as plantas medicinais usadas pelo o homem, as que são reconhecidas por causarem alteração na atividade do SNC têm recebido atenção especial, principalmente as utilizadas para desordens psiquiátricas crônicas (ansiedade, depressão e epilepsia) que, em alguns casos, não são controladas com tratamentos convencionais (CARLINI, 2003). No Brasil, várias plantas medicinais são utilizadas para aliviar a ansiedade, insônia e humor deprimido (GOMES et al., 2008). No estudo de Bento et al., (2013) realizado com extrato hidroalcoólico das folhas de *A. muricata* coletadas na mesma região do presente trabalho, foi revelada a presença de compostos comuns aos identificados no presente estudo, tais como alcalóides, flavonas, flavononóis, flavononas e taninos. Oviedo (2009) também detectou a presença de alcalóides e flavonóides nas folhas de *A. muricata*. Outros trabalhos confirmaram a presença de alcalóides e flavonóides em outras espécies do gênero *Annona* (RINALDI, 2007; NUNES, 2012). Sabe-se que os flavonóides apresentam uma série de atividades farmacológicas, a saber: antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, dentre outras. Os alcalóides também são dotados de importantes ações farmacológicas, tais como atividade antimicrobiana, sedativa, serotoninérgica, analgésica, anticonvulsivante, citotóxico entre outras (ZUANAZZI et al, 2007; RIOS et al., 1989). Devido às propriedades farmacológicas dos alcalóides, esses compostos têm sido usados na medicina no tratamento de desordens do sistema nervoso central (RATHBONE et al., 2002), o que pode justificar o uso desta planta no alívio da ansiedade, depressão e distúrbios do sono.

Ressalta-se também recentemente o conhecimento dos flavonóides possuírem potencial terapêutico no tratamento de condições neurológicas e mentais. Alguns gêneros de Annonaceae são produtores de flavonóides relativamente pouco polares (SOARES et al., 2000; HARBORNE, 1994). Este dado reforça o fato de que os flavonóides possuem um papel modulador nos processos mentais, pois a maior lipofilicidade dos flavonóides facilita a difusão através da Barreira Hemato-Encefálica (BHE) no SNC (DOVICH I e LAJOLO, 2011).

Em um estudo de Caparros-Lefebvre et al.(2002), os autores mostraram que o consumo a longo prazo de *A. muricata* estava relacionado ao aparecimento de uma síndrome parkinsoniana atípica. Este efeito foi posteriormente associado à annonacina, uma acetogenina que apresenta atividade tóxica sobre cultura de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo (LANNUZEL et al., 2008). No presente trabalho, a investigação farmacológica do EHFAM teve início com uma triagem farmacológica geral e um ensaio de toxicidade aguda para a avaliação do perfil farmacológico e identificar sinais de toxicidade do EHFAM, permitindo assim determinar não apenas a DL₅₀ do material, como também selecionar as doses a serem utilizadas nos testes comportamentais e neuroquímicos.

No presente trabalho foi observada que diferentemente da administração intraperitoneal do EHFAM nas doses de 1000 e 2000 mg/Kg, a administração oral do EHFAM na dose de 2000 mg/Kg não apresentou quaisquer sinais de toxicidade e letalidade. Com esses resultados pode-se inferir que a via de administração utilizada interfere na farmacocinética da droga e, conseqüentemente, nos seus efeitos farmacológicos. A DL₅₀ do EHFAM foi observada com a dose de 1000 mg/Kg, i.p. Entretanto faz-se necessária a realização de estudos de caráter bioquímico, hematológico e histopatológico que possam esclarecer o mecanismo através do qual o material vegetal desenvolve ação tóxica na faixa de dose e via de administração estudadas. É importante ressaltar que a determinação da DL₅₀ foi importante para a escolha das doses utilizadas neste trabalho; dessa forma, optou-se por usar doses inferiores a 10% da DL₅₀.

Por sua vez, os dados do *screening* hipocrático mostraram que o EHFAM apresenta-se como um composto dotado de atividade depressora central, tendo em vista a diminuição da motilidade e sedação nitidamente observadas nas doses acima de 500 mg/Kg, i.p. No estudo de Sousa et al., (2007) o diazepam reduziu de forma significativa todos os parâmetros analisados no campo aberto (NC, NG e NR), uma vez que esse composto possui importante atividade sedativa (SOUSA et al., 2007). O EHFAM, em todas as doses testadas (25, 50 e 100 mg/Kg, i.p.) também apresentou uma redução significativa de todos os parâmetros analisados. No aspecto da atividade locomotora dos animais, esta redução sugere uma ação sedativa sobre o sistema nervoso central, caracterizada pela diminuição espontânea da locomoção, possivelmente por diminuição

da excitabilidade do SNC (PEREZ et al., 1998). É importante ressaltar que em doses menores (2,5; 5 e 10 mg/Kg; dados não mostrados) o EHFAM não apresenta efeito sedativo.

A maioria dos animais passa grande parte do tempo no comportamento de auto-limpeza (MACFARLAND e REEDER, 1974), que normalmente consiste em o animal lambe as patas, a cabeça, as costas e a genitália com movimentos repetitivos usando as patas (KRUK et al., 1998; VAN et al., 1994). 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). Em face aos testes realizados no presente trabalho, a redução do *grooming* nos animais tratados com EHFAM, possivelmente seja decorrente da diminuição da concentração de DA no corpo estriado dos animais tratados com uma dose aguda do EHFAM. Também pode estar envolvido o bloqueio de receptores dopaminérgicos (para tanto, seria necessário à realização de testes com antagonistas dopaminérgicos específicos ou ensaios de *binding*).

Neste momento é interessante relembrar o trabalho de Caparros-Lefebvre et al.(2002) que associa o consumo de *A. muricata* com o aparecimento de uma síndrome parkinsoniana atípica, visto que o consumo em longo prazo da planta reduz os níveis de dopamina (CHAMPY et al., 2004). Dessa forma, parece que a redução mais significativa de DA pode estar relacionada com o tempo de administração do extrato, o que sugere a realização de um tratamento crônico com EHFAM a fim de verificar a ocorrência de alteração dos níveis de catecolaminas. Por outro lado, a atuação de um ou mais constituintes do EHFAM com o sistema GABAérgico pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo efeito sedativo da droga observada no teste do CA.

A avaliação de comportamento relacionado à ansiedade em modelos animais é baseada no fato de que a ansiedade em animais é comparável à ansiedade em humanos. Nos testes em modelos animais a ansiedade é avaliada através de sinais comportamentais (tais como a atividade exploratória, locomotora e social) (LEITE; SIQUEIRA, 2006), que se manifestam quando roedores são introduzidos em uma área desconhecida. Estes comportamentos baseiam-se em situações conflitantes, por exemplo, colocar o animal

num ambiente estranho (estressante) ou frente a um predador, gerando assim algumas alterações comportamentais, acompanhadas de manifestações fisiológicas autonômicas (HASCÖET e BOURIN, 1998; LEITE; SIQUEIRA, 2006).

O Labirinto em Cruz Elevado tem sido considerado um importante modelo experimental para o estudo da ansiedade, envolvendo respostas defensivas não condicionadas como fuga, congelamento ou esquiva (LACERDA, 2006). O modelo tem sido empregado para avaliar a resposta dos animais (ARCHER, 1973; PRUT e BELZUNG, 2003), quando estes são introduzidos em um ambiente estranho; a tendência natural do animal em um ambiente novo é de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado pelo ambiente novo (MONTGOMERY, 1958).

No LCE a droga padrão, diazepam (1 mg/Kg , i.p.) apresenta efeito ansiolítico, ao aumentar significativamente o número de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos, diminuindo, ao mesmo tempo, número de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços fechados do aparelho. A administração do EHFAM desenvolveu um padrão de efeito semelhante aquele observado com o diazepam; esta observação pode indicar que o efeito ansiolítico do EHFAM seja mediado semelhante ao diazepam, por meio da interação com o receptor GABA_A. Estes resultados corroboram com o estudo de Oviedo et al. (2009) e Díaz-Véliz (2012) realizado com *A. muricata*, o qual o último relaciona o efeito ansiolítico ao sistema GABAérgico. Para comprovar esta hipótese, o EHFAM foi associado ao flumazenil, um antagonista benzodiazepínico.

O flumazenil é um derivado imidabenzodiazepina que possui afinidade pelo o receptor GABA_A (HAMMERS, 2004). A associação do flumazenil ao diazepam e a droga teste, resultou na reversão parcial do efeito ansiolítico de ambos, nos modelos do campo aberto e labirinto em cruz elevado; estes resultados mostram que o EHFAM, parece exercer efeito sedativo e ansiolítico do tipo benzodiazepínico.

Santos e Salatino (2000) identificaram flavonas e flavonóis a partir das folhas de espécies de Annonaceae. Dentre os tipos de flavonas a hispidulina, demonstrou ação sobre o receptor GABA_A. A análise fitoquímica realizada neste estudo também demonstrou a presença de flavonas, sugerindo que estes compostos possam ser os

responsáveis pelo efeito sedativo e ansiolítico, decorrentes de uma possível interação com o sistema GABAérgico. Por outro lado, no estudo realizado por Oviedo et al. (2009), os autores sugerem que o efeito ansiolítico de *A. muricata* esteja relacionado à atuação dos alcalóides presentes na planta sobre o sistema serotoninérgico. Estes compostos também foram identificados na amostra estudada, todavia não se pode afirmar que o extrato em questão possa atuar também sobre o sistema serotoninérgico. Para tanto seria necessário à realização de testes mais específicos (potencialização do efeito ansiolítico da buspirona ou *binding*) para verificar a possível interação dos componentes do extrato com o sistema serotoninérgico. Outro fator que deve ser levado em consideração é que a concentração e a diversidade dos alcaloides podem sofrer influência do habitat, da distribuição geográfica, e do período da coleta, resultando em variação ecogeográfica de quiomiotipos (LEVIN, 1976; EGYDIO, 2009). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho devem ser observados levando em consideração os fatores ecogeográficos que podem influenciar na composição química e, conseqüentemente, nos efeitos farmacológicos do EHFAM.

A perda da coordenação motora é uma característica comum de muitas desordens neurológicas e um dos efeitos farmacológicos mais facilmente observado em casos de intoxicação (MASSAQUOI et al., 1998). Os benzodiazepínicos, são fármacos mais prescritos para ansiedade, alteram a coordenação motora, comprometendo a execução de atividades que requerem reflexos e controle motor. Estas drogas inibem os reflexos polissinápticos e transmissão internuncial, podendo em altas doses deprimir a transmissão na junção neuromuscular esquelética (KATZUNG et al., 2008).

O teste do *rota rod* é utilizado para avaliar o efeito de drogas sobre a coordenação motora, permitindo detectar alterações neurológicas incluindo ataxia, sedação ou relaxamento muscular, além de efeitos característicos da neurotoxicidade (DUNHAM e MIYA, 1957; DALLMEIER e CARLINI, 1981). A administração do EHFAM nas doses avaliadas (25, 50 e 100 mg/Kg), não provocou quaisquer alterações sobre a coordenação motora dos animais. Esta observação é importante uma vez que a despeito do seu efeito sedativo e ansiolítico, o EHFAM, nas doses testadas, não promove relaxamento muscular e perda dos reflexos, efeitos indesejados comumente observados com drogas benzodiazepínicas, como o diazepam, o qual induziu déficit motor somente a partir da dose de 2 mg/Kg (ALMEIDA, 2006). O uso de doses diferentes do extrato e do diazepam

no teste do *rota rod* foi feito em virtude de muitos agentes depressores, como o etanol, barbitúricos e outros, apresentarem efeito locomotor bifásico (RUSTAY et al., 2003).

A ação sedativa do EHFAM, evidenciada no modelo de campo aberto sugeriu a realização do teste para avaliar a atividade sedativa/hipnótica do extrato. Os barbitúricos atuam potencializando a inibição sináptica mediada pelo o GABA, promovendo hipnose e deprimindo a atividade do SNC (FUJIMORI e COBB, 1995). No presente trabalho foi observado efeito hipnótico do EHFAM no teste com pentobarbital, nas doses avaliadas (25, 50 e 100 mg/Kg), corroborando com o efeito depressor central dos testes preliminares e com os resultados de atividade anticonvulsivante (discutidos mais adiante), uma vez que diminui a latência de sono e também aumentou a duração deste, reforçando os dados de ação central.

Apesar de algumas drogas manifestarem efeito positivo no teste de potencialização do tempo de sono induzido por pentobarbital, as mesmas podem ser desprovidas de ação central (RILEY et al., 1958). Este fenômeno pode ocorrer uma vez que alguns compostos podem interferir na biotransformação do pentobarbital, em nível do complexo P-450, assim podendo apresentar resultados falso-positivos (GOLUBKOVA et al., 1998). Assim, os compostos do EHFAM podem interferir no metabolismo do pentobarbital, aumentando a biodisponibilidade do pentobarbital, por inibir o metabolismo hepático. Nesse caso o efeito não seria de origem central, hipnótico, mas por inibir a função metabólica do fígado.

Foi demonstrado que flavonoides, taninos e alcalóides, modulam enzimas do sistema citocromo P-450, induzindo, ativando e inibindo isoenzimas CYP específicas. Os taninos interagem formando complexos irreversíveis, impedindo a absorção de proteínas e alcalóides, ou promovem a indução de enzimas como CYP, acelerando o metabolismo de fármacos (MOON et al., 2006; WILLIAMSON, 2001). Estes compostos estão presentes no EHFAM, o que pode implicar no resultado obtido. A potencialização do tempo de sono induzida por éter é um teste que pode ser utilizado em situações como aquela descrita anteriormente, uma vez que o efeito hipnótico do éter não depende do metabolismo hepático. Dessa forma, ainda que as evidências apontem para a interação entre componentes do extrato e o sistema GABAérgico, a elucidação do mecanismo de

ação hipnótica do EHFAM só poderia ser elucidado com a realização do teste de potencialização do tempo de sono induzido por éter. Oviedo (2009) realizou o mesmo experimento utilizando éter, que tem a vantagem de não haver influência do metabolismo hepático, entretanto não obteve efeito hipnótico das folhas de *A. muricata*. No entanto, a via utilizada no estudo de Oviedo (2009) foi oral, o que pode influenciar no resultado farmacológico obtido, resultado do metabolismo farmacocinético.

Na patogênese de várias doenças mentais, dentre estas a depressão, as monoaminas (noradrenalina, serotonina, dopamina) estão envolvidas (ELHWUEGI, 2004). Os episódios depressivos são precedidos por fatores estressantes na maioria dos indivíduos acometidos, principalmente de origem psicossocial (PARKER et al., 2003). Portanto, o estresse é tipicamente implicado na etiologia das desordens depressivas, ou como uma consequência delas. Assim o estresse e a depressão são fenômenos inter-relacionados (TURNER e LLOYD, 1999).

Em animais, não há condição que corresponda à condição inata da depressão em seres humanos. Entretanto, vários procedimentos experimentais produzem em animais estados comportamentais (retirada da interação social, perda de apetite, atividade motora reduzida, estresse, entre outros), típicos da depressão humana (PORSOLT et al., 1987). Os modelos animais de depressão são baseados na exposição do animal ao estresse, como um fator de risco para o desenvolvimento da depressão (HAMMEN, 2005; NEMEROFF et al., 2005). Os dois modelos animais mais amplamente utilizados para triagem de novas drogas antidepressivas são os testes do nado forçado e da suspensão da cauda. Esses testes são bastante sensíveis e relativamente específicos para a maioria das classes de drogas antidepressivas, incluindo, os antidepressivos tricíclicos, os inibidores seletivos da recaptção de serotonina, os inibidores da MAO e os atípicos (PORSOLT et al., 1977; STERU et al., 1985).

O teste do nado forçado, também chamado de desespero comportamental ou teste de Porsolt, foi inicialmente proposto como uma variação mais simples do desespero aprendido, e é possivelmente o teste mais amplamente usado para o *screening* de novos compostos com potencial efeito antidepressivo (CRYAN et al., 2005). Apesar de não refletir adequadamente a sintomatologia da depressão em humanos, ele tem um alto valor

preditivo na investigação de drogas antidepressivas (WILLNER, 1984, CRYAN et al., 2002). Os antidepressivos aumentam a latência para a imobilidade e reduzem o tempo de imobilidade apresentado pelos animais (LAPA, 2008).

Neste teste, um animal é previamente forçado a nadar em um espaço confinado. Como consequência, ele se torna imóvel após uma fase de extenso nado e tentativas de escape (Porsolt et al., 1977). As drogas antidepressivas tricíclicas e atípicas reduzem o tempo de imobilidade quando o roedor é recolocado no cilindro com água, 24 horas após o experimento inicial (Porsolt et al., 1978).

Os resultados deste trabalho mostraram que o EHFAM, diminui o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, nas doses avaliadas, apresentando assim atividade do tipo antidepressiva. Um estudo com a fruta da *A. muricata* apresenta efeito do tipo antidepressivo, atribuído aos alcalóides isoquinolínicos, no qual foi sugerido ação agonista destes compostos nos receptores 5HT1A, (HASRAT, 1997). 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.

No trabalho de Díaz-Véliz (2012), realizado com as folhas de *A. muricata*, também evidenciou atividade antidepressiva nas doses de 12,5 e 25 mg/Kg, i.p., no qual também sugere o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos. Estes trabalhos estão de acordo com os dados de ação antidepressiva do EHFAM no presente trabalho, que baseados na literatura supracitada, possivelmente seu efeito antidepressivo seja decorrente da interação de algum dos componentes do EHFAM com receptores noradrenérgicos ou serotoninérgicos, uma vez que não houve aumento na concentração de monoaminas no corpo estriado dos animais tratados com o EHFAM. Todavia, no estudo de Oviedo (2009), não foi observada atividade do tipo antidepressiva na dose de 500 mg/Kg, via oral. 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.

Conforme, Rogóz, (2005), o tratamento em longo prazo com antidepressivos diminui a eficácia destes, ao reduzir os níveis de noradrenalina e serotonina, no entanto apenas a ativação de receptores remanescentes (5-HT_{2A}, 5-HT₇, β -adrenérgicos) estimula as vias de transdução de sinais intracelulares. A densidade e função destes receptores são reduzidos, mas não completamente eliminados, por tratamentos com drogas antidepressivas repetidamente (HENINGER e CHARNEY, 1987).

O conjunto dos achados da investigação da atividade ansiolítica e antidepressiva sugerem que o EHFAM possui um papel dual no seu mecanismo de ação, ao envolver a ativação de receptores GABAérgicos e a possível interação com receptores para monoaminas, respectivamente. Tendo em vista que a ansiedade e a depressão possuem vias neurais em comum, tais como os receptores GABAérgicos, que estão amplamente distribuídos no sistema nervoso, há evidências abundantes que este receptor tenha importante papel nestes processos, como é demonstrado no estudo de Graeff e Hetem (2004), onde os autores sugerem que, além do sistema GABAérgico, os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico estejam implicados na base neuroquímica da ansiedade, podendo estes sistemas de neurotransmissores serem os mediadores da ansiedade normal e patológica nos circuitos cerebrais, como o sistema límbico.

Na depressão, há vários determinantes biológicos implicados no seu desenvolvimento, tais como déficits em áreas estratégicas do cérebro (incluindo regiões límbicas) e fatores emocionais relacionados (STRAUMAN, 2004), como o estresse. Uma vez que o estresse está implicado na etiologia da depressão, é importante ressaltar a participação do hipocampo, que se relaciona aos processos cognitivos como aprendizado e memória, e que são afetados com a resposta ao estresse em indivíduos depressivos (RIEDEL e MICHEAU, 2001; LATHE, 2001). A experiência sensorial ativa o hipocampo, que possui grande densidade de receptores para glicocorticóides (GCs) que, quando ativados, inibem a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, limitando a resposta ao estresse (GUYTON, 2006; HERMAN e CULLINAN, 1997). Assim, eventos estressantes teriam um efeito neurotóxico sobre o hipocampo, provavelmente mediado pelo aumento de GCs, predispondo ao desenvolvimento da depressão (BROWN et al., 1999).

Contudo, os transtornos de ansiedade e depressão são bastante complexos e assim, estudos mais específicos devem ser realizados para elucidar a mediação da atividade biológica do EHFAM, especialmente a relacionada com antagonismo de receptores GABAérgicos.

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), mas o exato mecanismo das convulsões observadas com a imipramina ainda não é compreendido (AGO et al., 2006). Uma vez que o EHFAM apresentou efeito do tipo antidepressivo, foi questionado qual seria o efeito do EHFAM sobre convulsões quimicamente induzidas, uma vez que o extrato apresentou tanto atividade ansiolítica do tipo benzodiazepínica, quanto efeito do tipo antidepressivo. Assim, foi investigado o efeito do EHFAM no modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) e pilocarpina (PILO).

Os mecanismos de ativação, propagação e manutenção da convulsão são pouco esclarecidos (FREITAS, 2011). As convulsões podem ser caracterizadas como manifestações clínicas resultantes de descargas neuronais anormais, produzindo uma superexcitação dos neurônios, podendo ocorrer também pelo o desequilíbrio entre os mecanismos de neurotransmissão inibitórios e excitatórios (ZOUHAR, 1989).

Nas convulsões induzidas por PTZ, o EHFAM apresentou efeito neuroprotetor, embora em menor grau que o fármaco de referência utilizado, o diazepam. No estudo de Oviedo (2009), a *A. muricata* não conferiu proteção contra convulsões induzidas por eletrochoque e pentilenotetrazol. Possivelmente a diferença do efeito anticonvulsivante entre aquele estudo e o presente, 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. No presente trabalho a dose de 100 mg/Kg apresentou atividade anticonvulsivante em ambos os modelos estudados; quando comparada com as demais doses do EHFAM, a dose maior mostrou-se mais efetiva.

Dependendo da região cerebral, 20 a 50% das sinapses usam GABA como transmissor. Demonstrando a importância do sistema GABAérgico na geração e manutenção de certos tipos de convulsão no hipocampo e nos circuitos corticocortálicos (AVOLI, 1996; ENGEL, 1996). Sendo assim, uma disfunção neste sistema, pode gerar distúrbios neurológicos, como convulsões. Também, foi verificado em pacientes com transtornos depressivos, por meio de técnica de ressonância magnética, uma redução do GABA cerebral (SANACORA et al., 1999), o que indica a relação entre estas desordens mentais.

A hipótese GABAérgica prediz que durante os estados de ansiedade há uma sobreposição do sistema glutaminérgico ao GABAérgico (KIM; GORMAN, 2005). Tendo em vista que o sistema GABAérgico está envolvido na neuroquímica da ansiedade, e que o EHFAM, apresentou efeito ansiolítico apresentando um perfil neurofarmacológico voltado a este sistema, é possível que o efeito anticonvulsivante do EHFAM consista em reduzir a excitabilidade neuronal por mediação deste sistema. Esta hipótese fica ainda mais evidente na investigação do efeito do EHFAM quando associado ao flumazenil, que teve seu efeito revertido, fortalecendo a hipótese de que o EHFAM pode atuar sobre a neurotransmissão GABAérgica.

O modelo de epilepsia induzido por pilocarpina (um agonista colinérgico muscarínico) permite investigar o envolvimento de diferentes sistemas de neurotransmissores como moduladores da epileptogênese (CAVALHEIRO, 1991; MARINHO, 1998). A epilepsia do lobo temporal é a forma mais comum de epilepsia e neste modelo, pode se observar dano neuronal de algumas áreas cerebrais, o estriado e o córtex fronto-parietal, podem estar relacionadas de forma importante com os mecanismos de neurotransmissão de propagação e/ou manutenção (epileptogênese) das convulsões límbicas (FREITAS, 2011; MARINHO, 1998).

No modelo de convulsões induzidas por pilocarpina, o EHFAM, também apresentou atividade anticonvulsivante em todas as concentrações testadas (25, 50 e 100 mg/Kg), nos dois parâmetros analisados (latência para convulsão e latência de morte). Neste modelo a pilocarpina age através da ativação do sistema glutamatérgico, por meio dos receptores muscarínicos, alterando a atividade enzimática de sistemas antioxidantes, o metabolismo dos fosfoinositídeos, e também a participação de outros sistemas de

neurotransmissão como o noradrenérgico, dopaminérgico, serotoninérgico e GABAérgico (FREITAS, 2011).

O estresse oxidativo é um estado de vulnerabilidade do sistema de defesa em que há uma produção excessiva das espécies reativas do oxigênio (ERO), a qual supera a capacidade antioxidante de defesa do corpo, aumentando a predisposição para doenças crônicas e degenerativas (SPADA et al, 2008) e o uso de substâncias antioxidantes podem minimizar a incidência de doenças neurodegenerativas. Assim o efeito neuroprotetor do EHFAM, nas convulsões por pilocarpina pode estar relacionado ao efeito antioxidante de compostos presentes no extrato. Essa ação é relatada em vários estudos onde a *A. muricata* apresenta relevante potencial antioxidante atribuído aos compostos polifenólicos que também possuem atividade anticonvulsivante conhecida (BASKAR et al., 2007; LUNA, 2011). Todavia, para confirmar esta hipótese é necessário realizar experimentos mais específicos *in vitro*, que permitam a avaliação do *status* antioxidante em tecidos de animais tratados com EHFAM.

Uma outra hipótese que pode explicar o efeito anticonvulsivante do EHFAM consiste na presença de alcalóides na *A. muricata*, uma vez que na literatura foi descrita atividade anticonvulsivante para alcalóides aporfínicos encontradas em espécies de *Annona* (RIOS et al., 1989).

Contudo, os dados apresentados neste estudo mostram forte implicação do efeito do EHFAM sobre o sistema GABAérgico, haja visto que a liberação de GABA na amígdala lateral e basolateral, pode suprimir aferentes glutamatérgicos, via receptores pre-sinápticos inibitórios de GABA (PAN, et al., 2009; YAMADA, et al., 1999). Em conjunto, os resultados aqui discutidos apontam um padrão de efeito semelhante a drogas que modulam receptores GABAérgicos. E sabendo-se que a modulação alostérica positiva do receptor GABA_A apresenta efeitos sedativo, ansiolítico e anticonvulsivante, sugere-se que a ação do EHFAM nas concentrações testadas, seja decorrente da interação de um ou mais de seus constituintes químicos com o sistema GABAérgico. Estes achados justificam, em parte, o uso popular da planta no tratamento da depressão, ansiedade e distúrbios do sono, validando as propriedades farmacológicas de *A. muricata* para as desordens que acometem o sistema nervoso central.

6. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos na caracterização da atividade do EHFAM no SNC, conclui-se que:

- O EHFAM apresenta toxicidade moderada e sua DL_{50} é de aproximadamente 1000 mg/Kg, i.p.;
- O EHFAM apresentou efeito depressor central no teste hipocrático;
- O efeito depressor do EHFAM foi confirmado no teste do campo aberto, onde o extrato reduziu o NC, o NR e o NR;
- O EHFAM apresentou características de efeito ansiolítico do tipo benzodiazepínico no teste de labirinto em cruz elevado;
- Os efeitos sedativo e ansiolítico do extrato foram parcialmente revertidos pelo flumazenil, um antagonista benzodiazepínico, sugerindo que o mecanismo de ação do EHFAM envolve a participação do sistema GABAérgico;
- Diferentemente dos compostos benzodiazepínicos, o EHFAM nas doses testadas é destituído de efeito miorrelaxante no modelo de *rota rod*;
- O extrato apresentou efeito hipnótico, porém o mecanismo deste efeito ainda é desconhecido (são necessários outros testes para a elucidação do mesmo);
- O EHFAM apresenta efeito neuroprotetor contra crises induzidas por PTZ e pilocarpina, possivelmente por interagir com o sistema GABAérgico;

- O EHFAM promoveu diminuição na concentração de monoaminas no corpo estriado;
- O EHFAM apresenta efeito do tipo antidepressivo, possivelmente mediado pela interação de um ou mais constituintes do extrato com receptores para monoaminas.

7. REFERÊNCIAS

AGO, J.; ISHIKAMA, T.; MATSUMOTO, N.; RAHMAN, A.; KAMEI, C. Mechanism of imipramine-induced seizures in amygdale-kindled rats. **Epilepsy Research**, v.72, p.1-9, 2006.

ALALI, F.Q., LIU, X.X., MCLAUGHLIN, E.J.L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **J Nat Prod**, v.62, n. 3, p. 504- 540, 1999.

ALMEIDA FILHO, N.; 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.

ALMEIDA RN, 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 RN. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.384, 2006.

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

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, K. A. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth ed. text revision (DSM-IV-TR)**. American Psychiatric Press. 2002.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. ed. 4º edição. Washington, DC, AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento Farmacológico do Transtorno de Ansiedade Generalizada: Perspectivas Futuras. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 23, n. 4, p. 233 – 242, 2001.

ANTHONY, JP; FYFE, L; SMITH, H. Plant active components - a resource for antiparasitic agents? **Trends Parasitol**, v.21, p. 462-468, 2005.

APA, American Psychiatric Association. **Diagnostic and Statical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)**. 4. Ed. Washington: Editado por American Psychiatric Association, 1994.

ARAGÃO, G.F.; CARNEIRO, L.M.V.; JUNIOR, A.P.F.; VIEIRA, L.C.; BANDEIRA, P.N. ; LEMOS, T.L.G.; VIANA, G.S. DE B. A possible mechanism for anxiolytic and

antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 827–834, 2006.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 205-35, 1973.

AUGUSTO, L. G. S.; GÓES, L. Compreensões integradas para a vigilância da saúde em ambiente de floresta: o caso da Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 23, 2007.

AUTHIER, N.; BALAYSSACA, D.; SAUTEREAUC, M.; ZANGARELLI, A.; COURTY, P.; SOMOGYID, A.A.; VENNAT, B.; LLORCA, P.M.; ESCHALIER, A. Benzodiazepine dependence: Focus on withdrawal syndrome. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 67, p. 408-413, 2009.

AVOLI, M. GABA-mediated synchronous potentials and seizure generation. **Epilepsia**, v. 37, p. 1035- 1042, 1996.

BALICK, M. J., COX, P. A. Plants, People, and Culture: The science of ethnobotany. **New York: Scientific American Library**, p. 228, 1997.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery from Medicinal Plants. **Life Sciences**, v.78, p. 431-441, 2005.

BARON, D. **Desenvolvimento de plantas jovens de *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. Rainer (Araticum-de-terra-fria) cultivadas em solução nutritiva**. São Paulo, 2010. 111p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP 2010.

BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, T.S. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.45, n. 5, p. 480-485, 2007.

BEAR MF, CONNORS BW, PARADISO MA. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 2a ed. Porto Alegre: Artmed; 2002.

BEBBINGTON, P. The classification and epidemiology of unipolar depression. **Mood Disorders: A Handbook of Science and Practice**. Wiley, Chichester. p.3-28, 2004.

BENÍTEZ, C.I.P.; SMITH, K.; VASILE, R.; RENDE, R.; EDELEN, M.O.; KELLER, M. Use of Benzodiazepines and Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Middle-Aged and Older Adults With Anxiety Disorders: A Longitudinal and Prospective Study. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 16, p. 5-13, 2008.

BENTO, E.B.; MATIAS,E.F.F. ; BRITO JUNIOR, F. E.; OLIVEIRA, D. R.; COUTINHO, H.D.M. ; COSTA, J. G.M. ; KERNTOPF, M. R.; MENEZES, I. R.A. Antimicrobial and Synergistic Activity of *Annona muricata* L., **Association Between Food and Drugs International Journal of Food Properties**,v. 16, p. 738-744, 2013.

BERRIDGE, K.C. Motivation concepts in behavioral neuroscience. **Physiology & Behavior**. v. 81, p. 179-209, 2004.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, p. 137–151, 2006.

BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; JUNEAU, J. P.; BHACCA, N. S.; MUKHERJEE, R. Alkaloids from leaves of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v.18 n.9, p. 1584-1586, 1979.

BIANCHI, MT, BOTZOLAKIS EJ, LAGRANGE AH, MACDONALD RL. Benzodiazepine modulation of GABAA receptor opening frequency depends on activation context: A patch clamp and simulation study. **Epilepsy Res.** v. 85, p. 212-220, 2009.

BOLDI, A.M., Libraries from natural product-like scaffolds. **Current Opinion in Chemical Biology.** v.8, p.281–286, 2004.

BORMANN, J. Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. **Trends Neurosci.**, v. 11, p. 112-116, 1988.

BOTH, F.L. **Avaliação do perfil de psicotrina isolada de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae)** Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BRANDÃO, M. L. - As bases fisiológicas do comportamento. 2ª edição. São Paulo: Atheneu, Psicofisiologia, 2001.

BRISKIN, D. P. Medical plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiology**, v. 124, p. 507-514, 2000.

BROWN, E. S.; RUSH, A. J.; McEWEN, B. Hippocampal remodelling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 4, p. 474-484, 1999.

BRUNETON, Phytochemistry, medicinal plants. J. Pharmacognosy 2. Ed. Paris: Lavoisier; Secaucus: Intercept, p. 784-799, 1999.

BULLER, R.; LEGRAND, V. Novel treatments for anxiety and depression: Hurdles in bringing them to the market. **Drug Discovery**, v. 6, p. 1220-1230, 2001.

BURCUSA, S.L.; IACONO, W. G. Risk for recurrence in depression. **Clinical Psychology Review.** v.27, p. 959-985, 2007.

BURKE HM, DAVIS MC, OTTE C, MOHR DC. Depression and cortisol responses to psychological stress: a meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology.**v.30, p. 846-56, 2005.

CAHILL, L; MCGAUGH, J.L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory, **Trends Neurosci.** v. 21, p. 294 – 299, 1998.

CAMARGOS AF, MELO VH, CARNEIRO MM, Ginecologia ambulatorial. Belo Horizonte: Coopmed, 2008.

CAPARROS-LEFEBVRE, D.; ELBAZ, A. Possible relation of typical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. **The Lancet**, London, v. 354, p. 281-286, 1999.

CAPARROS-LEFEBVRE, D.; SERGEANT, N.; LEES, A.; CAMUZAT, A.; DANIEL, S.; LANNUZEL, A.; BRICE, A.; TOLOSA, E.; DELACOURTE, A.; DUYCKAERTS, C. Guadeloupe parkinsonism: a cluster of progressive supranuclear palsy-like tauopathy. **Brain**, Oxford, v.125, p.801-811, 2002.

CAPASSO, A.; SORRENTINO, L. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of *Kava kava* and *Passiflora* extracts combination. **Phytomedicine**. v.12, p. 39-49, 2005.

CÁRDENAS, E. M. **Fitofarmacologia en psiquiatria**. Disponível em: <<http://ochoa.freeservers.com/medina01.htm>>
Acesso em: 21/04/2013.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 501-512, 2003.

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

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

CARVALHO, L.F.; DIMENSTEIN, M. O modelo de atenção à saúde e o uso de ansiolíticos entre mulheres. **Estudos de psicologia**, v. 9, n. 1, p. 121-129, 2004.

CAVALHEIRO EA, LEITE JP, BORTOLOTTO ZA, TURSKI WA, IKONOMIDOU C, TURSKI L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v. 32, p. 778-82, 1991.

CAVÉ, A. Annonaceae Alkaloides. In: PHILLIPSON, J.D.; ROBERTS, M.F.; ZENK, M.H., Eds. **The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids**. Berlin, New York: Springer-Verlag, p. 79-101, 1985.

CHAMPY, P.; HÖGLINGER, G. U.; FÉGER, J.; GLEYE, C.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; GUÉRINEAU, V.; LAPRÉVOTE, O.; MEDJA, F.; LOMBES, A.; MICHEL, P. P.; LANNUZEL, A.; HIRSCH, E. C.; RUBERG, M. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. **Journal of Neurochemistry**, London, v. 88, p. 63-69, 2004.

CLARDY, J., WALSH, C., Lessons from natural molecules. **Nature**. v.432, p.729-837, 2004.

COSTALL, B., HENDRIE, C.A., KELLY, M.E., NAYLOR, R.J., Actions of sulpiride and tiapride in a simple model of anxiety in mice. **Neuropharmacology** 26, 195–200, 1987.

CROMWELL HC, BERRIDG KC. Implementation of action sequences by a neostriatal site: a lesion mapping study of grooming syntax. **Journal of Neuroscience**, v.16, p.3444-3458,1996.

CRYAN, J.F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. **Nat Rev Drug Discov**, v.4, p.775-790, 2005.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol. Sci.**,v. 23, p. 238-245, 2002.

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

DAVID, J. P., DAVID, J. M. **Plantas Mediciniais. Fármacos Derivados de Plantas**. In: SILVA, P., Farmacologia, 6a Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 134-145, 2002.

DEBOURGES, D.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. Alkaloids of the Annonaceae. Part 77. Alkaloids of *Duguetia spixiana*. **J. Nat. Prod.**, v. 50 n.4, p. 664-673, 1987.

DELANEY, A.J; SAH, P. GABA receptors inhibited by benzodiazepines mediate fast inhibitory transmission in the central amygdala, **The Journal of Neuroscience**, v. 19 , n. 22, p. 9698-9704, 1999.

DEMYTTENAERE, K.; BRUFFAERTS, R.; POSADA-VILLA, J.; GASQUET, I.; KOVESH, V.; LEPINE, J. P.; ANGERMEYER, M. C.; BERNERT, S.; DE GIROLAMO, G.; MOROSINI, P.; POLIDORI, G.; KIKKAWA, T.; KAWAKAMI, N.; ONO, Y.; TAKESHIMA, T.; UDA, H.; KARAM, E. G.; FAYYAD, J. A.; KARAM, A. N.; MNEIMNEH, Z. N.; MEDINA-MORA, M. E.; BORGES, G.; LARA, C.; DE GRAAF, R.; ORMEL, J.; GUREJE, O.; SHEN, Y.; HUANG, Y.; ZHANG, M.; ALONSO, J.; HARO, J. M.; VILAGUT, G.; BROMET, E. J.; GLUZMAN, S.; WEBB, C.; KESSLER, R. C.; MERIKANGAS, K. R.; ANTHONY, J. C.; VON KORFF, M. R.; WANG, P. S.; BRUGHA, T. S.; AGUILAR-GAXIOLA, S.; LEE, S.; HEERINGA, S.; PENNELL, B. E.; ZASLAVSKY, A. M.; USTUN, T. B.; CHATTERJI, S.; WHO WORLD MENTAL HEALTH SURVEY CONSORTIUM. Prevalence, severity, and unmet need for treatment of mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. **JAMA**, v. 291, n. 21, p. 2581-2590, 2004.

DEVI, K. P.; SREEPRIYA, M; DEVAKI, T.; BALAKRISHNA, K. Antinociceptive and hypnotic effects of *Premna tomentosa* L. (Verbenaceae) in experimental animals. **Biochemistry and Behavior**. v.75, p.261-264, 2003.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 2^a Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, p.507, 2002.

DEWICK, P.M. Alkaloids. In: DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. **Chichester**, New York: John Wiley, p. 270-371, 1997.

DÍAZ-VÉLIZ, G.; MORA, S.Q.F. Uso de Modelos animais en el estudio de Plantas Medicinales con propiedades Ansiolíticas y Antidepresivas. **Rev. Farmacol. Chile** v.5, 2012.

DOPHEIDE, J.; BCPP.; PARK, S. The Psychopharmacology of Anxiety. **Psychiatric Times**, v. 19, n.3, 2002.

Disponível em: <<http://www.psychiatrictimes.com/display/article/10168/47826>>

Acesso em: 23/03/2013.

DOVICH, S. S.; LAJOLO, F. M. Flavonoids and their relationship to diseases of the Central Nervous System. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 36, n. 2, p. 123-135, 2011.

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

DUARTE, D.F. Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 55, p. 135 – 146, 2005.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 46, p. 208-209, 1957.

EGYDIO, A.P.M. **Análises das variações fitoquímicas, estrutura genética e importância econômica de *Annona crassiflora* Mart., no cerrado**. Tese (Doutorado)-Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2009.

EISENBERG, D. M.; DAVIS, R. B.; ETTNER, S. L.; APPEL, S.; WILKEY, S.; VAN ROMPAY, M. Trends in alternative medicine use in the United States. **The Journal of the American Medical Association**, v. 280, n. 18, p. 1569-1575, 1998.

ELHWUEGI, A.S. Central monoamines and their role in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology e Biological Psychiatry**, v.28, p.435-451, 2004.

EKWERE, E. O.; MCNEIL, R. T.; OKWUASABA, F.K. The effect of ricinus communis- linn (ricom 1013-j) on semen parameters: a comparative study **JPCS**. v.1, 2011.

Disponível em: <www.arpapress.com/Volumes/JPCS/Vol1/JPCS_1_02.pdf>

Acesso em: 27 de junho de 2013.

ENGEL, JR. J. Excitation and inhibition in epilepsy. **Can. J. Neurol. Sci.**, v. 23, p. 167–74,1996.

ERNST, E. The risk-benefit profile of commonly used herbal therapies: GinKgo, St. John'sWort, Ginseng, Echinacea, Saw Palmetto, and Kava. **Annals Internal Medicine**, 136, p. 42–53, 2002.

ESPERIDIÃO-ANTONIO, V.; MAJESKI-COLOMBO, M.; TOLEDO-MONTEVERDE, D.; MORAES-MARTINS, G.; FERNANDES, J.J.; ASSIS, M.B.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Neurobiologia das emoções. **Rev. Psiq. Clín.** v.35, n. 2, p.55-65, 2008.

FAGUNDES; F.A; OLIVEIRA; L.B. de; CUNHA; L.C; VALADARES; M.C; *Annona coriacea* induz o efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, p.24-29, 2005.

FINNEY, D. J., **Probit analysis**. Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 333, 1971.

FILE, S.E; PELLOW, S. Intrinsic actions of the benzodiazepine receptor antagonist Ro 15-1788. **Psychopharmacology**, v. 88, p. 1-11, 1986.

FIRMO, W C.A.; MENEZES, V. J. M.; P, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, ALVES, L.P.L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S.G. **Contexto Histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais**, Cad. Pesq., v. 18, n. especial, 2011.

FORTUNATO, J. J. **Efeitos comportamentais e neuroquímicos da Hamina em modelos animais de Depressão**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

FOSTER S, TYLER VE TYLER'S HONEST HERBAL. A sensible guide to use of herbs and related remedies. New York: **Haworth Herbal Press**, 1999.

FREIS, E. D. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. **N. Engl J. Med**, v. 251, p. 1006-1008, 1954.

FREITAS, R.M. Sistemas de Neurotransmissão Envolvidos no Modelo de Epilepsia: Uma Revisão de Literatura, **Rev Neurocienc**, v. 19, n. 1, p. 128-138, 2011.

FUJIMORI, H; COBB, D; Potentiation of barbital hypnosis as an evaluation method for central nervous system depressant. **Psychopharmacology**. V.7, p.374-377,1995.

GARNER, M.; MÖHLER,H.; STEIN, D.J.; MUEGGLER, T.; BALDWIN, D.S. Research in anxiety disorders: from the bench to the bedside. **Eur. Neuropsychopharmacol**, v.19, p. 381-390, 2009.

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

GOMES, P.B.; NORONHA, E.C.; DE MELO, C.T.; BEZERRA, J.N.; NETO, M.A.; LINO, C.S.; VASCONCELOS, S.M.; VIANA, G.S.; DE SOUSA, F.C. Central effects of isolated fractions from the root of *Petiveria alliacea* L. (tipi) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 209-214, 2008.

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

GRAEFF, F. G.; HETEM, L. A. B. Neurobiologia. In: **Transtornos de Ansiedade**. São Paulo: Atheneu, p. 107-132, 2004.

GRAEFF, F.G. Ansiedade experimental humana Human experimental anxiety. **Rev. Psiq. Clín.** N.34, n.5, p. 251-253, 2007.

GRAEFF, F.G.; GARCIA-LEAL, C.; DEL-BEN, C.M.; GUIMARAES, F.S. - DOES THE PANIC ATTACK activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? **An Acad Bras Cienc** v.77, p. 1-15, 2005.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M. CAVÉ, A. Aporphine Alkaloids II. *Journal of Natural Products*, v.42, n.4, p. 325-360, 1979.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.

HAMIZAH, SULAIMAN; ROSLIDA, AH; FEZAH, O. ;TAN, KL. ;TOR, YS. ; TAN, CI. **Chemopreventive Potential of *Annona muricata* L Leaves on Chemically-Induced Skin Papillomagenesis in Mice**. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 13, 2012.

HAMMEN, C. Stress and depression. **Annu Rev Cli Psychol**, v.1, p. 293-319, 2005.

HAMMERS, A. Flumazenil positron emission tomography and other ligands for functional imaging. **Neuroimaging Clin. N. Am**, v. 14, p. 537-551, 2004.

HARBORNE, J. B. Phenolics. In: MANN, J.; DAVIDSON, R. S.; HOBBS, J. B.; BANTHORPE, D. V. Their chemistry and biological significance. **Journal Natural Products**. p. 361-388, 1994.

HASCÖET, M., BOURIN, M., A new approach to the light/dark procedure in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.60, p. 645– 653, 1998.

HASRAT, J.A., DE BRUYNE, T., DE BACKER, J.P., VAUQUELIN, G., VLIETINCK , A.J. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT1A receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. **J Pharm Pharmacol**. v. 49, p. 1145-9, 1997.

HEIM, C.; NEWPORT D.J.; HEIT S.; GRAHAM Y.P.; WILCOX M.; BONSALE R.; MILLER A.H.; NEMEROFF C.B. Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood. **JAMA**, v. 284, p. 592-7, 2000.

HENINGER GR; CHARNEY DS. Mechanisms of action of antidepressant treatments: Implications for the etiology and treatment of depressive disorders. In **Psychopharmacology: the third generation of progress** (Meltzer HY, ed), p.535-544: New York: Raven, 1987.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **Trends Neurosci.**, v. 20, p. 78-84, 1997.

HIRUMA-LIMA, C.A.; DI STASI, L.C. Magnoliales medicinais. In: GUIMARÃES, M.E.; SATOS, M.N.; DI STASI, L.C. **Plantas medicinais na Amazônica e na Mata Atlântica**. 2. Ed. São Paulo: UNESP, p. 89-109, 2003.

HÖISTAD, M.; BARBAS, H. Sequence of information processing for emotions through pathways linking temporal and insular cortices with the amygdala. **Neuroimage**. v. 40, n. 3, p. 1016-33, 2008.

IBAMA, Flora (Plantas Medicinais)

Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/flora/plantas_medicinais.htm>

Acesso em: 14 de Fevereiro, 2013.

IRIE, Y.; ITOKAZUA, N.; ANJIKI, N.; ISHIGE, A.; WATANABE, K.; KEUNG, W. M. Eugenol exhibits antidepressant-like activity in mice and induces expression of etallothionein- III in the hippocampus. **Brain Res.**, v. 1011, p. 243–246, 2004.

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

JOHNSTON, G. A. R.; BEART, P. M. Flavonoids: some of the wisdom of sage? **Brit J Nutr.**, v. 142, n. 5, p. 809-810, 2004.

JOHNSTON, G.A.R. GABAA receptor pharmacology, **Pharmacol Ther** v. 69, p. 173–198, 1996.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 10ª edição. Ed. McGraw Hill, 2008.

KESSLER, R. C., BERGLUND, P., DEMLER, O., JIN, R., MERIKANGAS, K. R., & WALTERS, E. E. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 593-602, 2005a.

KESSLER, R. C.; CHIU, W. T.; DEMLER, O.; WALTERS, E. E. Prevalence, severity, and comorbidity of 12month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of General Psychiatry**, v.62, p. 617-709, 2005b .

KESSLER, R. C.; WANG, P. S. The descriptive epidemiology of commonly occurring mental disorders in the United States. **Annual Review of Public Health**, v. 29, p. 115-129, 2008.

KIENZLE-HORN, S. Herbal medicines for neurological diseases. **Current Opinion in Investigational Drugs**, 3, 763–767, 2002.

KIM, J.; GORMAN, J. The psychobiology of anxiety. **Clinical Neuroscience Research**. v. 4, p. 335-347, 2005.

KIRAN, S. R.; DEVI, P. S.; REDDY, K. J. Evaluation of in vitro antimicrobial activity of leaf and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24, 1909–1914, 2008.

KISS, J.P. Theory of active antidepressants: A nonynaptic approach to the treatment of depression. **Neurochemistry international**, v. 52, p. 34-39, 2008.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Review Drug Discovery**. v.4, p. 206–220, 2005.

KRUK, M.R.; WESTPHAL, K.G.; VAN ERP, A.M; VAN ASPEREN, J.: CAVE, B.J.; KUMAR, S.; PORCU, P.; WERNER, D.F.; MATTHEWS, D.B.; DIAZ-GRANADOS J.L.; HELFAND, R.S. The role of GABAA receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. **Psychopharmacology (Berl)**. v.205, (4) p. 529-564, 2009.

LACERDA, G.F.M.L.de **Ansiedade em modelos animais: efeito de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial** Dissertação Universidade Federal do Paraná, 2006.

LAKHAN, S. E.; VIEIRA, K. F. Nutritional therapies for mental disorders. **Nutr J.**, v. 7, n. 2, 2008.

LANNUZEL, A.; MERLE, R.; MICHEL, P. P. Atypical parkinsonism in the Caribbean island of Guadeloupe: Etiological role of the mitochondrial complex I inhibitor annonacin. **Movement Disorders**, New York, v. 23, n. 15, p. 2122- 2128, 2008.

LANOTTE, M.; LOPIANO, L.; TORRE, E.; BERGAMASCO, B.; COLLOCA, L.; BENEDETTI F. Expectation enhances autonomic responses to stimulation of the human subthalamic limbic region. **Brain Behav Immun**. v. 19, n. 6, p. 500-9, 2005.

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

LATHE, R. Hormone and hippocampus. **J. Endocrinol.**, v. 169, p. 205-231, 2001.

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

LEDOUX, J.E; PARE, D; QUIRK, G.J. New vistas on amygdala networks in conditioned fear, **J Neurophysiol**, v.92, n. 1, p. 1 – 9, 2004.

LENT, ROBERT. **Cem Bilhões de Neurônios – Conceitos Fundamentais de Neurociências**, Editora Atheneu. 651-668, Edição 2004.

LEVIN, D.A. Alkaloid-bearing plants: an ecogeographic perspective. **American Naturalist** v. 972, p. 261-284, 1976.

LI AW, C. C. et al. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **J Nat Prod**, v. 65, p. 470-475, 2002.

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, N. G. P.B. **Estudo da possível atividade psicofarmacológica do D-limoneno em modelo comportamental em camundongos.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

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

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, p.544, 2002.

LUCETTI, E.C.P. **Efeitos centrais da cumarina (1,2-benzopirona): estudo comportamental e neuroquímico em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos,** Fortaleza, Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, 2010.

LUNA, A.F.; FREITAS, T.M.B.; ALVES, I.C.; PINTO, C.E.M.; LUZ, E.W.M. **Atividade fitoquímica e antioxidante da folha *Annona muricata* L. frente ao radical ABTS,** Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação, 2010.

Disponível em:

<<http://connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/connepi/CONNAPI2010/paper/view/1003>>.

Acessado em 14/02/ 2013.

LUNA, J. S. **Estudo de Plantas Bioativas. Pernambuco,** Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, p.254, 2006.

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; SILVA, R. M.; RAINER, H. **Annonaceae from Central-eastern Brazil. Rodriguésia.** v. 52, n. 80, p. 65-98. 2001.

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

MACIEL, M. A. M; PINTO, ANGELO C; VEIGA JUNIOR, Valdir F. **Plantas Medicinais: a Necessidade de Estudos Multidisciplinares. Quim. Nova.** Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALONE M.H. Pharmacological approaches to natural product and evaluating. In: Wasner H, Walf LP. **Natural products and plant drugs with pharmacological biological or terapeutical activity.** Berlin: Spring Verlag, p.23-56, 1977.

MALONE MH, ROBICHAUD RC. **A Hippocratic screen for pure or crude drug materials.** Lloydia. v.25, p.320-332, 1962.

MALSEN, A.M; OLIVIER, B; KAS, M.J.H. Behavioural genetics in mood and anxiety: A next step in finding novel pharmacological targets. **Eur. J. of Pharm.** v. 585, p. 436-440, 2008.

MARINHO M.M.F., SOUSA FCF, BRUIN VMS, VALE MR, VIANA GSB. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. **Neurochem Int.** v.33, p. 299-306, 1998.

MASSAQUOI, S.G.; HALLETT, M. Ataxia and other cerebellar syndromes. In: Jankovic J, Tolosa E, editors. **Parkinson's disease and movement disorders.** Baltimore: Williams e Wilkins; 1998.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental.** 2ª Ed. Fortaleza, editora: UFC, 1997.

MELLO M.F.; MELLO, A.A.F. Kohn R. Epidemiologia da saúde mental no Brasil. Porto Alegre: Artmed; 2007.

MELLO, A.A.; MELLO, M.F.; CARPENTER, L.L; PRICE, L.H. Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Rev Bras Psiquiatr.** v. 25, p. 231-8, 2003.

MIRALHA, J. M. de S. **As Annonaceae da Reserva Florestal Ducke.** 2007. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

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

MOON, Y.J.; WANG, X.; MORRIS, M.E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology In Vitro,** v.20, p.187-210, 2006.

NEMEROFF, C.B.; OWENS, M.J. Treatment of mood disorders. **Nature Neurosc.** v.5, p. 1068-1070, 2002.

NEMEROFF, C.B.; VALE, W.W. The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug Discovery. **J. Clin Psychiatry,** v. 66, p.5-13, 2005.

NESTLER E.J.; BARROT, M.; DiLEONE R.J.; EISCH, A.J.; GOLD, S.J., MONTEGGIA, M.M. Neurobiology of Depression. **Neuron,** v. 34, p. 13-25, 2002.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products.** v. 66, p. 1022–1037, 2003.

NOVA, N.S.V. **Ação leishmanicida de alcalóides e acetogeninas extraídas de Annonaceae do Estado de Ceará.** Dissertação de Mestrado - Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, p. 71, 2008.

NOVAS, M. L.; WOLFMAN, C.; MEDINA, J. H.; DE ROBERTIS, E. Proconvulsant and “anxiogenic” effects of n-butyl beta carboline-3-carboxylate, an endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. **Pharmacol. Biochem. Behav.,** v. 30, p. 331-336, 1988.

NUNES, CLARA DOS REIS; BERNARDES, NATALIA RIBEIRO ; GLÓRIA, LORENA DE LIMA; OLIVEIRA, DANIELA BARROS DE . Flavonoides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas **Vértices**, Campos dos Goytacazes/ RJ, v.14, n. 1, p. 39-57, 2012.

NUTT, D.; RICKELS, K.; STEIN, D. J. Neurotransmitter fuction and GAD. In: **Generalized Anxiety Disorder: Symptomatology, Pathogenesis and Management**. London: Martin Dunitz Ltda, p.60-66, 2002.

OLATUNJI, B. O.; CISLER, J. M., & TOLIN, D. F. Quality of life in anxiety disorders: a meta- analytic review. **Clinical Psychology Review**, v. 27, p.572-581, 2007.

OLIVIER, B. Preface. **Eur. J. Pharmacol.** v. 463, p. 1-2, 2003.

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

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals**, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

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.

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. of Ethno-Pharmacology**, v.61, p. 81-83, 1998.

PAGE, J.E. Silencing nature's narcotics: metabolic engineering of the opium poppy. **Trends Biotechnonology**. v. 23, p. 331-333, 2005.

PAN B-X, DONG Y, ITO W, YANAGAWA Y, SHIGEMOTO R, MOROZOV A. Selective gating of glutamatergic inputs to excitatory neurons of amygdala by presynaptic GABA_B receptor. **Neuron**, v. 61, p. 917–929, 2009.

PARENTE, A. C. B. V, GARCIA-LEAL C, DEL BEM C. M, GUIMARAES F. S. And GRAEFF F. G. Subjective and neurovegetative changes in healthy volunteers a panic patients performing simulated public speaking, **European Neuropsychopharmacology**. v.15, n. 6, p. 663-71, 2005.

PARKER, K.J.; SCHATZBERG, A.F.; LYONS, D.M. Neuroendocrine aspectos of hypercortisolism in major depression. **Hormones and Behavior** v. 43, p. 60-66, 2003.

PEREZ, R. M. G.; PEREZ, J. A. L.; GARCIA, L. D. M.; SOSSA, H. M. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. **J. Ethnopharmacology**, v. 62, p. 43-48, 1998.

PERKINTON, M. S.; SIHRA, T. S. A high-affinity presynaptic kainate-type glutamate receptor facilitates glutamate exocytosis from cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). **Neuroscience**, v. 90, p. 1281–1292, 1999.

PETRIE, R.X.A.; REID, I.C.; STEWART, C.A. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder: a critical review. **Pharmacology Therapy**, v. 87, p. 11–25, 2000.

PHAN, K.L.; WAGER, T.; TAYLOR, S.F.; LIBERZON, I. Functional neuroanatomy of emotion: a meta-analysis of emotion activation studies in PET and fMRI. **Neuroimage**. v. 16, p. 331–48, 2002.

PICH, E.M., SAMANIN, R., Disinhibitory effects of buspirone and low doses of sulpiride and haloperidol in two experimental anxiety models in rats: possible role of dopamine. **Psychopharmacology** 89, 125–130, 1986.

PIES, R. W. Clinical manual of psychiatric diagnoses and treatment: a biopsychosocial approach. **Washington, DC: American Psychiatric Press**, 1994.

PINTO, A.C.Q.; CORDEIRO, M.C.R.; ANDRADE, S.R.M.; FERREIRA, F.R.; FILGUEIRAS, H.A.C.; ALVES, R.E. **Annona species**. 2005.

Disponível em:

<<http://www.icuciwmi.org/files/R7187Annona%20monograph%202005.pdf>>

Acesso em: 28/04/2006.

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

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**. v. 36, p. 229–327, 1977.

PORSOLT, R.D.; LEPICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. **Nature**, v.266, p.730–732, 1977.

POSER, G.L.V.; MENTZ, L.A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C.M.O *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, p. 63–74, 2003.

POZETTI, G.L. **Brosimum gaudichaudii Trecul (Moraceae): da planta ao medicamento**, **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 26, n.3, p. 159–166, 2005.

PRUT, L. BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**. v. 463, p. 3–33, 2003.

PRYOR, J. C.; SULSER, F. Evolution of the monoamine hypothesis of depression. Biological aspects of affective disorders. **New York Academic Press**, V.2, P. 77–94, 1991.

PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**. v.43, n.2, p.86-101, 1998.

QUEIROZ, E. F.; ROBLLOT, F.; CAVÉ, A.; PAULO, M. Q.; FOURNET, A. Pseudoephedrine and spinosine, two catechollic berberines from *Annona purpurea*. **Journal of Natural Products**, v.59, p. 438-440, 1996.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ALMEIDA, R.N.; ANTONIOLLI, A.R. CNS pharmacological effects of the hydroalcoholic extract of *Sida cordifolia* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. v.98, p.275-279, 2005.

QURAIISHI S, FRANGOU S. Neuropsychology of bipolar disorder: a review. **J Affect Dis**. v.72, p. 209-26, 2002.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RANG, H.P.; DALE, M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**, 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

RATHBONE, D.A.; BRUCE, N.C. Microbial transformation of alkaloids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 274-281, 2002.

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

RIEDEL, G.; MICHEAU, J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 25, n. 4, p. 835-853, 2001.

RILEY, H.; SPINKS, A. A biological assessment of tranquilizers. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 10, p.657-671, 1958.

RINALDI, M. V. N. *Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcaloides isoquinolínicos de Annona hypoglauca Mart.* Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, p. 125, 2007.

RIOS, J.L.; SIMEON, S.; VILLAR, A.; Pharmacological activity of apophinoid alkaloids: a review. **Fitoterapia**, v. 60, n.5, p. 387-412, 1989.

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,p. 661-671, 2005.

ROSEN, J.B.; SCHULKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychological Review**, 105 (2), 325-50, 1998.

RUIZ, J.S.; CUARADO, A.I.; RODRÍGUEZ, J.M.M. Transtorno de angustia. Crises de pânico y agorafobia em atencuió primaria. **Barcelona: Masson**, 2000.

RUSTAY, N.R.; WAHLSTEN, D.; CRABBE, J.C. Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. **Behav Brain Res**, v.141, p.237-249, 2003.

SANACORA, G.; MASON, G.F.; ROTHMAN, D.L. et al. Reduced cortical - aminobutyric acid levels in depressed patients determined by proton magnetic resonance spectroscopy. **Archives in General Psychiatry**, v. 56, n. 11, p. 1043-1047, 1999.

SANACORA, G.; ZARATE, C.A.; KRYSTAL, J.H.; MANJI, H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nature rev.** 7, 426-437, 2008.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. Medicinal plants, phytomedicines, and phytotherapy. **Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine**, New York: Springer Verlag, 4 ed., p. 1-39, 2001.

SILVA, A. F. S. *Hipperastrum vittatum* (L' her.) Herbet e *Hippeastrum striatum* (Lam Moore: análise química e avaliação biológica dos alcaloides isolados. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. ; **Farmacognosia- da Planta ao medicamento**, 5º Ed., Editora da da UFSC: Santa Catarina, 2004.

SIMÕES, C. M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. p. 1104. 2007.

SLATER, E.; DE KONING, J.; HALLER, J. The hypothalamus: cross-roads of endocrine and behavioural regulation in grooming and aggression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.23, 163-177, 1998.

SOBRINHO, R.B. **Potencial de exploração de Anonaceas no Nordeste do Brasil**. EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL, Fortaleza, 2010.

Disponível em: <http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_3425.pdf>
Acesso em: 21/04/2013.

SOKOLOFF, P., GIROS, B., MARTRES, M.P., BOUTHENET, M.L., SCHWARTZ, J.C., Molecular cloning and characterization of a novel receptor D3 as a target for neuroleptics. **Nature** 347, 146–151, 1990.

SONAVANE, G.S.; SARVEIYA, V.P.; KASTURE, V.S.; KASTURE, S.B. Anxiogenic activity of Myristica fragrans seeds. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 71, 247– 252, 2002.

SPADA, P. D. S.; DE SOUZA, G. G. N.; BORTOLINI, G. V.; HENRIQUES, J. A. P. & SALVADOR, M. Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. *Journal Of Medicinal Food*, v. 11, n. 1, p. 144-151, 2008.

SRAMEK, J.J.; ZAROTSKY, V.; CUTLER, N.R. Generalised anxiety disorder: treatment options. **Drugs**, v. 62, p. 1635-1648, 2002.

STAHL, S. *Psicofarmacologia-Bases Neurociêntíficas e Aplicações Clínicas*. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Editado por Medsi Editora Médica e Científica LTDA, 1998.

STEINER, H., FUCHS, S., ACCILI, D., D3 dopamine receptordeficient mouse: evidence for reduced anxiety. **Physiol. Behav.** 63, 137–141, 1998.

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

STRAUMAN, T.J.; WOODS, T.E.; SCHNEIDER, K.L.; KWAPIL, L.; COE CL. Self-regulatory cognition and immune reactivity: idiographic success and failure feedback effects on the natural killer cell. **Brain Behav Immun**. v. 18, p. 544-54, 2004.

STRUMEYER, D.H., MALIN, M.J. Condensed tannins in grain sorghum: isolation, fractionation, and characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v.23, n.5, p.909-914, 1975.

TOIGO, E. V. P. **Efeitos a longo prazo de diferentes separações dos filhotes no período neonatal sobre as genitoras**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

TORRES, M P. ; RACHAGANI, S.; PUROHIT, V.; PANDEY, P.; SUHASINI JOSHI, S.; MOORE, E. D.; JOHANSSON, S. L.; SINGH, P. K.;GANTI, A K.; BATRA, S. K. Graviola: A novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* through altering cell metabolism. **Cancer Letters**, v.323, p. 29-40, 2012.

TRICHARD C, MARTINOT JL, ALAGILLE M, Time course of prefrontal lobe dysfunction in severely depressed in patients: a longitudinal neuropsychological study. **Psychol Med**. v. 25, p.79-85, 1995.

TURNER, R.J. ; LLOYD, D. A. The stress process and the social distribution of depression.**J. Health Soc. Behav.**, v. 40, p. 4374-404, 1999.

VEIGA JUNIOR, VALDIR F.; PINTO, ANGELO C.; MACIEL, MARIA Aparecida M. Plantas Medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.

WHO. Cross-national comparisons of the prevalences and correlates of mental disorders. WHO International Consortium in Psychiatric Epidemiology. **Bull World Health Organ**, v. 78, p. 413-426, 2000.

WILLIAMS LM, DAS P, LIDDELL BJ, KEMP AH, RENNIE CJ, GORDON E. Mode of functional connectivity in amygdala pathways dissociates level of awareness for signals of fear. **J Neurosci**. v. 26, n. 36, p. 9264-71, 2006.

WILLIAMSON, E.M. **Phytomedicine**, v. 8, p. 401-9, 2001.

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

WITTCHEN, H.U.; JACOBI, F. Size and burden of mental disorders in Europe: a critical review and appraisal of 27 studies. **Eur. Neuropsychopharmacol**, v. 15, p. 357-376, 2005.

YAMADA J, SAITOW F, SATAKE SI, KIYOHARA T, KONISHI S. GABAB receptor-mediated presynaptic inhibition of glutamatergic and GABAergic transmission in the basolateral amygdala. **Neuropharmacology** v. 38, p. 1743-1753, 1999.

YAMANAKA, A. R. **Teste hipocrático do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon* sp. Spreng, 1815) e avaliação *in vitro* do efeito larvicida do geraniol e citronelal sobre *Contraecum* sp. Railliet & Henry, 1912 (Nematoda: Anisakidae)**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, 2008.

YEHUDA, R. Neuroendocrine aspects of PTSD. **Handb Exp Pharmacol**. v.169, p. 371-403, 2005.

ZARATE, C.A.; MANJI, H.K. The role of AMPA receptor modulation in the treatment of neuropsychiatric diseases. **Clinical experimental neurology**. v. 211, p. 7-10, 2008.

ZAVASCHI MLS, SATLER F, POESTER D, VARGAS CF, PIAZENSKI R, RHODE LAP, EIZIRIK CL. Associação entre trauma por perda na infância e depressão na vida adulta. **Rev Bras Psiquiatr** v.24, p.189-95, 2002.

ZOUHAR A, MARES P, LISKOVA-BERNASDOVA K, MUDROCHOVA M. Motor and electrocorticographic epileptic activity induced by bicuculline in developing rats. **Epilepsia**, v. 30, p. 501-10, 1989.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). 6. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 577-614, 2007.

8. APÊNDICE



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

Número de Herbário

Remetente:	Nº 18.2013
HERBÁRIO CARIENSE 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 – Ceará - Brasil CEP: 63.105-100	
Destinatário:	Data: 15.05.2013
Laboratório de Farmacologia Contato: Danilele Oliveira Universidade Regional do Cariri	
Nº Amostras: 01	Tipo de Operação: Número de Herbário

	Nº HERBÁRIO	NOME POPULAR	FAMÍLIA	NOME CIENTÍFICO	RESPONSÁVEL
01	9469	graviola	Annonaceae	<i>Annona muricata</i> L.	Ana Morais-Mendonça


Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva
Curadora do HCDAL

9. ANEXO

TABELA DE MALONE ADAPTADA PARA TESTE HIPOCRÁTICO

Data: _____ Extrato: _____

Concentração da dose: _____

Via de administração: _____ Marcação do animal: _____ Nº _____

Ação	Parâmetros	Controle	10'	30'	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h
Estimulante SNC	1. Aumento da motilidade										
	2 Aumento da FR										
	3 Piloereção										
	4 Exoftalmia										
	5 Mov. estereotipados (tremores, bater a cabeça, moder-se)										
	6 Lamber patas										
	7 Coçar focinho										
	8 Morder cauda										
	9 Convulsão clônica										
	10 Convulsão tônica										
	11 Tremores finos										
	12 Tremores grosseiros										
Depressor SNC	1. Diminuição da motilidade										
	2. Diminuição da FR										
	3. Catatonia										
	4. Ptose palpebral										
	5 Analgesia										
	6 Anestesia										
	7 Perda reflexo corneano										
	8. Ataxia (incoordenação de mov. musculares)										

	9. Dispneia											
	10 Alienação ao ambiente											
	11. Tônus das costas											
	12. Perda de apreens. Pata											
	13. Exoftalmia											
	14. Paralisia do trem posterior											
	15 Sedação											
	16. Salivação											
Outros sinais	1 Orelha Palidez											
	Cianose											
	Hiperemia											
	2 Micção Aumentada											
	Diminuída											
	Coloração											
	3 Diarréia											
	4. Contorção abdominal											
	5 Reação de fuga											
	6 Passividade											
	7. Agressividade											
	8. Grunhidos											
	9. Sialorreia											
	10 Fasciculações											
11 Midríase												
12. Ereção de cauda												

13.Tremor de cauda											
14.Diâmetro pupilar											
15 Pêlos arrepiados											
16 Amontoados no canto (Hipotermia)											
17. Cromadocriorréia											
18.Secreção brônquica											
19.Sudorese (sinal colinérgico)											
20. Letargia											
21. Coma											
22 Catalepsia											
23.Alterações circulatórias											
24.Outras manifestações											
25. Morte											

(MALONE e ROBICHAUD, 1962).