

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

AMANDA RODRIGUES NOGUEIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO-SÍMILE DO EXTRATO AQUOSO
LIOFILIZADO DAS FOLHAS DE *Annona crassiflora* MART.

UBERLÂNDIA

2019

AMANDA RODRIGUES NOGUEIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO-SÍMILE DO EXTRATO AQUOSO
LIOFILIZADO DAS FOLHAS DE *Annona crassiflora* MART.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Banca examinadora, do Instituto de Ciências
Biomédicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, como exigência para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Borges Bispo-da-
Silva

UBERLÂNDIA

2019

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO-SÍMILE DO EXTRATO AQUOSO
LIOFILIZADO DAS FOLHAS DE *Annona crassiflora* MART.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado para
obtenção do título de Bacharel em Biomedicina,
pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 12 de dezembro de 2019.

Prof^ª. Dr^ª. Érika Renata Barbosa Neiro, UFU/MG

Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini, UFU/MG

Prof. Dr. Luiz Borges Bispo-da-Silva, UFU/MG

Resumo

Espécies da família Annonaceae tem mostrado atividade antidepressiva-símile. Dentre os metabólitos secundários responsáveis por esse efeito estão os alcaloides aporfinicos. Uma espécie cuja análise fitoquímica das folhas tem mostrado a presença de tais alcaloides, mas que ainda não teve seu potencial efeito antidepressivo-símile investigado é a *Annona crassiflora*. Por esse motivo, elegemos *A. crassiflora* e avaliamos o efeito do tratamento crônico com o extrato aquoso liofilizado de suas folhas (EAC; 30, 55 ou 100 mg/kg, p.o.) sobre o comportamento de camundongos machos C57BL/6 observados no teste de suspensão da cauda (TSC, 18 dias após o tratamento) e no teste do campo aberto (CA, 15 dias após o tratamento). Fluoxetina (10 mg/kg, i.p.) e salina (NaCl 0,9%, i.p. e p.o.) foram empregadas como controle positivo e controle negativo, respectivamente. Os animais foram colocados nos aparatos comportamentais 60 minutos após o tratamento nos dias indicados anteriormente. Todos os procedimentos foram aprovados pela CEUA/UFU (protocolo nº 067/17). Ainda, teste qualitativo para detecção de alcaloides foi realizado com diferentes concentrações do EAC ou atropina (alcaloide controle). Apenas a fluoxetina alterou o tempo de imobilidade dos animais avaliados no TSC. Nenhum dos tratamentos alterou o comportamento geral dos animais avaliados no CA, exceto pelo tempo de imobilidade que foi reduzido pelo tratamento com fluoxetina. Apenas as soluções contendo atropina ou a maior concentração de EAC (superior àquela compatível com as empregadas no tratamento dos animais) formaram precipitado após a adição de gotas de reagente Dragendorff. Assim, os dados sugerem que o EAC não possui efeito antidepressivo-símile, tão pouco altera o comportamento geral dos animais nas doses empregadas. A ausência de efeito pode estar relacionada à pequena quantidade de alcaloides presentes nas amostras, como sugerido pelo teste qualitativo com o reagente de Dragendorff.

Abstract

Aporphine alkaloids from *Annona* species have shown antidepressant-like activity in experimental models. Thus, we selected *Annona crassiflora* to evaluate the possible antidepressant-like effect of its leaf aqueous extract (ACLE). Male C57BL/6 mice were treated with ACLE (30, 55 or 100 mg/kg, p.o.) and their behavior was analyzed in the open field test (OFT, on the 15th day of treatment) and in tail suspension test (TST, on the 18th day of treatment). Fluoxetine (10 mg/kg, i.p.) and saline (0.9% NaCl, i.p. and p.o.) were used as positive and negative control, respectively. Behavioral analyses were conducted 60 minutes after treatments. All procedures were approved by CEUA/UFU (protocol n° 067/17). Qualitative test for detecting alkaloids was performed using different ACLE concentrations or atropine (used as control). Only fluoxetine reduced the immobility in the TST. None of the treatments altered the mice general activity in OFT, except for the freezing behavior, which was reduced by fluoxetine treatment. Only atropine or ACLE at the highest concentration solution gave a positive result when examined by the Dragendorff test for alkaloid. Thus, at the doses used in the present study, ACLE induced no psychostimulant or depressant effects and it does not have antidepressant-like activity. The absence of effects could be related to the small amount of alkaloids present in ACLE, as suggested by the qualitative Dragendorff test.

Lista de abreviaturas e siglas

5-HT	5-hidroxitriptamina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CA	Campo aberto
EAC	Extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>Annona crassiflora</i>
HHSR	Hipotálamo-Hipófise-Suprarrenal
ISRS	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina
MAO-A	Monoamina oxidase A
MAO-B	Monoamina oxidase B
NE	Norepinefrina
NET	Transportador neuronal de norepinefrina
SERT	Transportador neuronal de serotonina
TH	Tirosina hidroxilase
TNF	Teste do nado forçado
TPH-2	Triptofano hidroxilase
TSC	Teste de suspensão da cauda

Lista de Figuras

Figura 1 - Teoria monoaminérgica da Depressão.	11
Figura 2 - Alcaloides aporfinicos identificados nos extratos das folhas de <i>A. cherimolia</i> e <i>A. crassiflora</i>	14
Figura 3 - Folhas de <i>A. crassiflora</i>	17
Figura 4 - Delineamento experimental.....	18
Figura 5 - Teste de suspensão da cauda.....	20
Figura 6 - Avaliação qualitativa da presença de alcaloides no EAC.....	21
Figura 7 – Efeito do EAC na imobilidade dos animais no TSC.....	22
Figura 8 - Efeito do EAC no comportamento geral dos animais no teste do CA.....	23

Sumário

1. Introdução.....	9
1.1 Depressão e Teoria Monoaminérgica Clássica.....	9
1.2 Produtos Naturais como Fonte de Agentes Antidepressivos.....	12
1.3 Produtos Naturais como Fonte de Agentes Antidepressivos: o Gênero <i>Annona</i>	13
1.4 Testes Comportamentais Empregados na Avaliação de Fármacos Antidepressivos.....	15
2. Objetivos.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos.....	16
3. Metodologia.....	16
3.1 Obtenção do extrato aquoso.....	16
3.2 Avaliação qualitativa da presença de alcaloides no EAC.....	17
3.3 Animais.....	18
3.4 Procedimentos experimentais.....	18
3.5 Teste do CA.....	19
3.6 TSC.....	19
3.7 Análise estatística.....	20
4. Resultados.....	21
4.1 Avaliação qualitativa da presença de alcaloides no EAC.....	21
4.2 Efeito do EAC na imobilidade dos animais no TSC.....	22
4.3 Efeito do EAC no comportamento geral dos animais no teste do CA.....	23
5. Discussão.....	24
6. Conclusão.....	25
7. Referências bibliográficas.....	26
ANEXO I.....	30

1. Introdução

1.1 Depressão e Teoria Monoaminérgica Clássica

O transtorno depressivo maior é uma das doenças psiquiátricas mais prevalentes e debilitantes no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em escala global, o número de casos da doença aumentou 18% de 2005 a 2015. No Brasil, estima-se que 5,8% da população seja afetada. A desordem se manifesta através de disfunções cognitivas, emocionais, motoras e de memória, as quais podem levar à apresentação dos seguintes sintomas: falta de energia, redução da sensação de prazer e alegria, desinteresse de modo geral, dificuldade de concentração, humor depressivo ou irritável, dentre outros (AVENEVOLI et al., 2015; DEAN; KESHAVAN, 2017; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS, 2017). Além disso, a depressão tem sido considerada como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas, como hipertensão e diabetes (ZHANG; CHEN; MA, 2018).

A fisiopatologia da depressão está associada a alterações estruturais e neuroquímicas nas regiões corticolímbicas do cérebro, destacando-se aquelas que acometem os sistemas monoaminérgicos, o eixo (HHSR) e a neurogênese e neuroplasticidade (DEAN; KESHAVAN, 2017). Descrições detalhadas das diferentes teorias dos distúrbios afetivos e da depressão estão além do escopo do presente trabalho. Assim, considerando os objetivos do nosso estudo, passaremos a uma descrição mais detalhada do que se convencionou chamar de hipótese monoaminérgica (ou teoria das monoaminas) clássica da depressão. Como nos informa Rang et al. (2016):

A teoria das monoaminas da depressão, que foi primeiramente proposta por Schildkraut em 1965, afirma que a depressão pode ser causada por déficit funcional de transmissores de monoaminas, norepinefrina e 5-hidroxitriptamina (5-HT) (...). A hipótese das monoaminas cresceu originalmente de associações entre os efeitos clínicos de vários fármacos que causam ou amenizam os sintomas de depressão e os seus conhecidos efeitos neuroquímicos sobre a transmissão monoaminérgica no cérebro. (RANG et al., 2016. p 570).

Como muitos fármacos antidepressivos atuam em alguma etapa das neurotransmissões monoaminérgicas, cabe descrevê-las em suas linhas gerais. A serotonina (5-HT) é sintetizada a

partir de triptofano, em uma via biossintética cuja primeira etapa é catalisada pela enzima TPH-2. Já a NE é sintetizada a partir da tirosina, em uma via biossintética cuja primeira etapa é catalisada pela TH. Após a síntese, essas monoaminas são armazenadas em vesículas sinápticas e liberadas na fenda após estímulo neuronal. Na fenda, esses neurotransmissores podem interagir com transportadores pré-sinápticos, que realizam a recaptação das moléculas (SERT ou NET), com autorreceptores que regulam a liberação de ambos os mediadores (receptores serotoninérgicos 5-HT_{1a} e 5-HT_{1b}; receptor adrenérgico α -2), os quais diminuem a liberação dessas monoaminas na fenda sináptica. Outro mecanismo de regulação ocorre através da enzima MAO-A, a qual degrada monoaminas ainda no neurônio pré-sináptico. No neurônio pós-sináptico, esses neurotransmissores estimulam diferentes receptores desencadeando respostas biológicas diversas (Figura 1) (BELMAKER; AGAM, 2008).

Dentre as observações em pacientes acometidos com a doença que corroboram com a hipótese monoaminérgica da depressão podemos citar (Figura 1): (i) recidiva quando há inibição da TH ou quando há redução da ingestão de triptofano; (ii) aumento da frequência de mutações que afetam a TPH-2, às quais se atribui diminuição nos níveis de 5-HT; (iii) alterações na MAO-A que aumentam a afinidade da enzima pelas monoaminas; (iv) polimorfismos no SERT; e (v) aumento de receptores α -2 adrenérgicos (BELMAKER; AGAM, 2008). Além disso, apesar dos dados serem contraditórios em relação a análises *post mortem* e *in vivo*, a maioria dos estudos apontam que pacientes depressivos apresentam aumento na quantidade dos autorreceptores 5-HT_{1a}, o que causa diminuição na liberação de 5-HT (GARCIA-GARCIA; NEWMAN-TANCREDI; LEONARDO, 2014; HEN; NAUTIYAL, 2017). Dados semelhantes foram relatados em animais com relação à expressão de receptores 5-HT_{1b} em algumas regiões do encéfalo (HEN; NAUTIYAL, 2017).

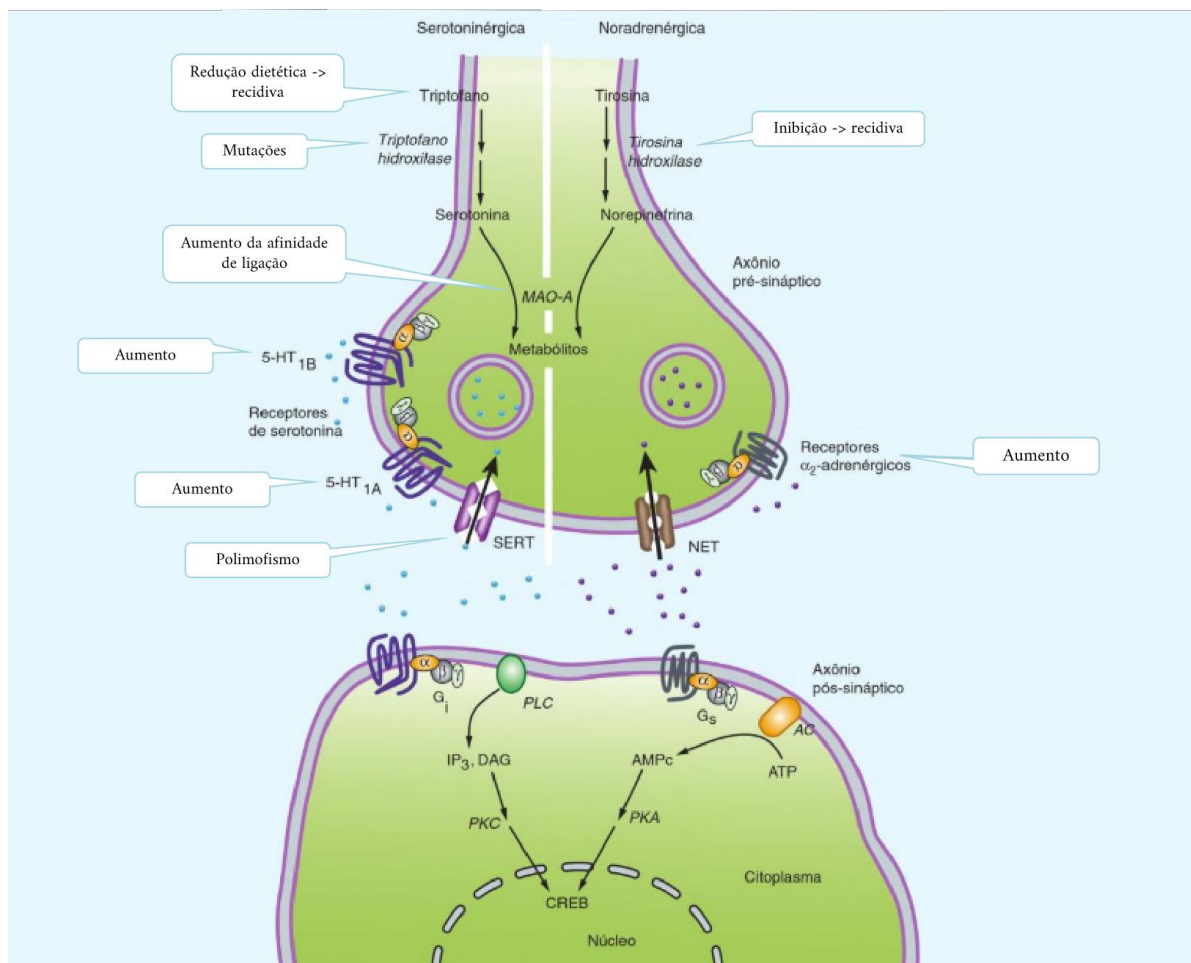


Figura 1 - Teoria monoaminérgica da Depressão. Neurotransmissão pré-sináptica serotoninérgica ao lado esquerdo e noradrenérgica ao lado direito. Alterações na transmissão monoaminérgica (5-HT e NE) encontradas em pacientes com transtorno depressivo, as quais corroboram a teoria monoaminérgica da depressão. PLC: fosfolipase C; IP3: Inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol; PKC: Proteína quinase C; AC: Adenilato ciclase; ATP: Adenosina trifosfato; AMPc: Adenosina monofosfato-cíclico; PKA: Proteína quinase A; CREB: Proteína de resposta ao AMPc. (ADAPTADO de DEBATTISTA, 2014).

Como anteriormente citado, outra observação que reforça a hipótese monoaminérgica da depressão é o fato de que alguns pacientes respondem ao tratamento com fármacos que alteram os níveis de monoaminas encefálicas, principalmente 5-HT e NE (DEAN; KESHAVAN, 2017). Atualmente, existem várias classes de fármacos utilizados no tratamento da depressão, a saber: (i) inibidores da recaptação de monoaminas [antidepressivos tricíclicos, ISRSs, inibidores mais recentes da recaptação de NE e 5-HT]; (ii) antagonistas do receptor de monoamina (como a mirtazapina); (iii) inibidores da MAO (RAMOS et al., 2016; RANG et al., 2016).

As evidências farmacológicas não possibilitam a distinção clara a ser feita entre as teorias da norepinefrina e da 5-HT para a depressão. Clinicamente, parece que os inibidores da captura da norepinefrina e da 5-HT são igualmente eficazes como antidepressivos, embora pacientes individualmente possam responder melhor a um ou a outro fármaco. Outras evidências, em suporte da teoria monoaminérgica, é o fato de os agentes conhecidos por bloquearem a síntese de norepinefrina ou de 5-HT, diminuírem consistentemente o humor e reverterem os efeitos terapêuticos dos fármacos antidepressivos que atuam seletivamente somente nesses dois transmissores. (RANG et al., 2016, p 570 - 571).

Apesar do amplo arsenal terapêutico, muitas vezes o tratamento não é eficaz e existem diversos efeitos colaterais associados ao tratamento, a depender da classe farmacológica, tais como: náusea, hipotensão ortostática, arritmias cardíacas, ansiedade, insônia, disfunção sexual, etc. Por esses motivos, a busca por fármacos eficazes em reduzir os sintomas da depressão, causando o mínimo possível de desconforto aos pacientes, ainda se faz necessária (LEE; BAE, 2017; RAHMATI et al., 2017). Dada à riqueza da nossa biodiversidade, uma opção interessante é a avaliação de espécies que possam ser empregadas como fitoterápicos no tratamento da depressão.

1. 2 Produtos Naturais como Fonte de Agentes Antidepressivos

Algumas espécies vegetais possuem substâncias capazes de interferir com mecanismos relacionados à neurobiologia da depressão, tais como: (i) neurotransmissão monoaminérgica; (ii) expressão de fatores neurogênicos/neurogênese; (iii) regulação do eixo HHSR (FARAHANI et al., 2015). Assim, o *Hypericum perforatum*, popularmente conhecido como *erva-de-são-jão*, é capaz de inibir a recaptação de 5-HT, NE e dopamina, além de modular o sistema neuroendócrino, apresentando efeito antidepressivo em animais e humanos (GALEOTTI, 2017). O óleo essencial de Valeriana indiana (*Valeriana wallichii*) aumentou os níveis de 5-HT e NE em animais (SAH; MATHELA; CHOPRA, 2011). Substâncias presentes no extrato etanólico de Jatamansi (*Nardostachys jatamansi*) diminuíram a atividade das enzimas MAO-A e MAO-B (DHINGRA; GOYAL, 2008). O extrato aquoso de *Allium macrostemon* aumentou a liberação de BDNF e a neurogênese (LEE et al., 2010). O extrato aquoso de *Cimicifuga foetida* apresentou efeito antidepressivo que parece estar relacionado à inibição do eixo HHSR e consequente diminuição dos níveis de glicocorticoides (YE et al., 2012). Diversos metabólitos secundários parecem estar

envolvidos na atividade antidepressiva de produtos naturais, dentre eles os alcaloides (FAJEMIROYE et al., 2016).

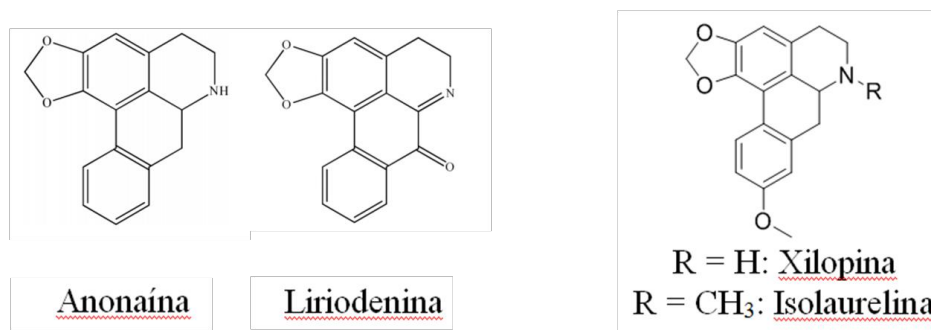
Alcaloides (ou alcaloides verdadeiros) são compostos de caráter básico, cuja estrutura contém um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico (HENRIQUES; KERBER; MORENO, 2003). Os alcaloides são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas e são formados a partir de aminoácidos. O aminoácido empregado na síntese define a estrutura geral dos derivados, o que origina diversas classes de alcaloides como alcaloides indólicos (derivados do L-triptofano) e alcaloides benzilisoquinólicos (derivados da L-tirosina), etc (HENRIQUES; KERBER; MORENO, 2003). Em seu artigo de revisão, Perviz, Khan e Pervaiz (2016) compilaram os resultados das pesquisas realizadas na última década, os quais apontam, na esfera básica, os alcaloides como promissores candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos antidepressivos. De fato, alcaloides de grupos diversos mostraram efeitos antidepressivo-símiles em modelos experimentais e dentre os mecanismos propostos estão aqueles que envolvem a neurotransmissão monoaminérgica, tais como inibição da MAO, inibição da recaptação de 5-HT e/ou NE e aumento da taxa de renovação de 5-HT (PERVIZ; KHAN; PERVAIZ, 2016).

1.3 Produtos Naturais como Fonte de Agentes Antidepressivos: o Gênero *Annona*

Annonaceae é uma família predominantemente subtropical e tropical formada por aproximadamente 135 gêneros e 2500 espécies. No Brasil são encontrados 30 gêneros e pouco mais de 370 espécies (LÚCIO et al., 2015). Essa família desempenha um papel importante na economia local, devido à ampla variedade de frutos comestíveis, bem como pelas propriedades medicinais que apresenta. Dentre essas, cabe ressaltar a atividade antidepressiva-símile descrita para espécies do gênero *Annona*.

O óleo essencial das folhas da *Annona vepretorum*, conhecida no nordeste do país como “pinha da Caatinga”, demonstrou efeito antidepressivo-símile em camundongos *Swiss*. O mecanismo proposto parece envolver aumento da neurotransmissão mediada por 5-HT (DINIZ et al., 2019). O extrato etanólico das folhas de *Annona muricata*, conhecida popularmente como Graviola, produziu efeito antidepressivo-símile em ratos (BIKOMO; EBUEHI; MAGBAGBEOLA, 2017), além disso, metabólitos secundários do fruto da *A. muricata*

demonstraram ação em receptores serotoninérgicos desencadeando efeito antidepressivo-símile (HASRAT et al., 1997). Ainda, o tratamento de camundongos com extratos enriquecidos em alcaloides aporfínicos (anonaína e liriodenina, alcaloides benzilisoquinolínicos derivados da L-tirosina; figura 2) das folhas de *Annona cherimolia* (conhecida como Chirimoya) aumentou a quantidade de 5-HT e dopamina no encéfalo de camundongos *Swiss*, o que parece explicar a ação antidepressiva-símile do referido extrato (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 2012; PERVIZ; KHAN; PERVAIZ, 2016). Recentemente, nosso grupo identificou, através da espectrometria de massa, alcaloides aporfínicos (isolaurelina, xilopina) no extrato aquoso das folhas da espécie *Annona crassiflora* Mart (figura 2).



Folhas de A. cherimolia

Folhas de A. crassiflora

Figura 2 - Alcaloides aporfínicos identificados nos extratos das folhas de *A. cherimolia* e *A. crassiflora* [modificado de Martinez-Vazquez et al. (2012) e Ferraz et al. (2019)].

A *A. crassiflora* Mart é uma planta utilizada na medicina tradicional, encontrada no Cerrado brasileiro e conhecida popularmente como “marolo” ou “araticum”. A administração oral da infusão de suas folhas é utilizada no tratamento da malária, reumatismo, acidentes ofídicos e doenças inflamatórias (DA COSTA OLIVEIRA et al., 2019). Além dos alcaloides xilopina e isolaurelina, diversos outros têm sido identificados nas folhas de *A. crassiflora*, como anonaína, anorretina e romucosína (EGYDIO; VALVASSOURA; SANTOS, 2013; FERRAZ et al., 2019). Como citado, espécies do gênero *Annona* têm sido reportadas pelo efeito antidepressivo-símile, principalmente devido à presença de alcaloides. Cabe ressaltar que a anonaína é um agonista de receptores 5-HT_{1a}, os quais estão envolvidos na fisiopatologia da

depressão, reforçando o potencial antidepressivo de espécies que contenham alcaloides desse grupo (HASRAT et al., 1997; LI et al., 2013).

1.4 Testes Comportamentais Empregados na Avaliação de Fármacos Antidepressivos

Como a depressão é uma doença heterogênea e multifatorial, cujos sintomas envolvem as esferas psicológicas, comportamentais e fisiológicas, modelos experimentais são difíceis de serem desenvolvidos (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). Assim, sintomas como pensamentos reverberantes e excessivos, aqueles relativos à morte, bem como impulsos suicidas são, obviamente, impossíveis de serem reproduzidos em roedores. Como então é possível estudar substâncias com potencial antidepressivo? Como ressaltam Cryan et al. (2005), após períodos de tempo realizando tentativas de fuga, roedores adotam uma postura imóvel quando colocados em uma situação estressante inescapável. O estresse inescapável pode ser um cilindro cheio de água, como o que se observa no TNF, ou permanecer suspenso pela cauda sem que haja possibilidade de fuga, situação que nomeia outro teste muito empregado em estudos neuropsicofarmacológicos, o TSC (Figura 5). Esses testes não configuram modelos de depressão, contudo, por motivos ainda não esclarecidos, o pré-tratamento com diferentes classes de antidepressivos aumenta o tempo despendido pelos animais em comportamentos direcionados para o escape da situação (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). Assim, tanto o TNF quanto o TSC apresentam excelente validade preditiva, possibilitando, portanto, o estudo de drogas com potencial antidepressivo. Apesar das semelhanças, uma diferença importante observada entre esses dois paradigmas é que o TNF é pouco sensível aos ISRSs, enquanto que esses agentes apresentam atividade no TSC (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). Ao menos agudamente, essa insensibilidade aos ISRSs tem sido confirmada no TNF (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 2012).

Embora esses testes possuam validade preditiva, uma consideração importante é o fato de que ambos estão suscetíveis a resultados falso-positivos. Substâncias com ação psicoestimulatória podem aumentar a atividade motora dos animais, resultando em uma alteração do comportamento entendido como direcionado à fuga. O teste do CA é utilizado para analisar o

comportamento geral dos animais, permitindo inferir se o resultado do TNF ou do TSC é derivado de uma ação psicoestimulatória (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005).

Tendo em vista que a depressão é uma das principais causas de incapacitação no mundo, tornando-se um problema de saúde pública e que os tratamentos existentes não são 100% eficazes, há a necessidade de se desenvolver novas drogas antidepressivas. Considerando a presença de alcaloides aporfinicos nas folhas de *A. crassiflora*, os quais parecem apresentar potencial efeito antidepressivo, no presente estudo avaliamos o efeito do tratamento crônico do extrato aquoso liofilizado das folhas dessa espécie sobre o comportamento de camundongos no TSC e sobre o comportamento dos animais em campo aberto.

2. Objetivos

2.1 Geral

Avaliar os efeitos do tratamento crônico do extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora* em camundongos machos da linhagem C57BL/6.

2.2 Específicos

- Preparar o extrato aquoso liofilizado das folhas de *A. crassiflora*;
- Avaliar a presença de alcaloides no EAC através de teste qualitativo;
- Avaliar o comportamento geral dos animais no teste do CA após tratamento por 15 dias;
- Avaliar o comportamento geral dos animais no TSC após tratamento por 18 dias.

3. Metodologia

3.1 Obtenção do extrato aquoso

As folhas de *A. crassiflora* (Fig. 3) foram coletadas em um campo de vegetação espontânea localizado na área rural do Município de Lassance, Minas Gerais em dezembro de 2016. A espécie foi identificada pela Dr. Adriana Arantes e uma exsicata foi depositada no Herbário da

UFU (Uberlândia, MG, Brazil) com o número 73.547. Após coletadas, as folhas foram separadas, lavadas com água destilada e colocadas para secagem em estufa a 40 °C por dois dias. As folhas secas foram então trituradas em liquidificador para iniciar a extração, a qual foi realizada com água destilada na proporção de 10% (m/v) à temperatura ambiente por 48 horas. O extrato obtido foi filtrado, congelado e submetido à liofilização (rendimento: 1,84%).



Figura 3 - Folhas de *A. crassiflora*; coletadas em campo de vegetação espontânea na cidade de Lassance, Minas Gerais. À esquerda, galho de folhas da espécie. À direita, folhas após separação.

3. 2 Avaliação qualitativa da presença de alcaloides no EAC

Para detectar a presença de alcaloides no EAC, foram preparadas soluções contendo diferentes concentrações de EAC (2 mg/ml, 3,75 mg/ml, 12,5 mg/ml e solução “saturada” contendo 25 mg/ml) ou atropina (alcaloide utilizado como controle positivo do teste, 2 mg/ml). As concentrações de 3,75 mg/ml e 12,5 mg/ml correspondem às concentrações médias de EAC preparadas para tratar os animais com a menor (30 mg/kg) e maior (100 mg/kg) dose de extrato, respectivamente, considerando a administração de 0,2 ml de solução para cada animal com peso médio de 25 g. O EAC ou a atropina foram solubilizados em ácido clorídrico (HCl) 1% (DE ASSIS et al., 2009). Após solubilização, gotas de reagente de Dragendorff (8 g de subnitrato de bismuto, 20 ml de ácido nítrico a 30%, 22,8 g de iodeto de potássio para volume final em água destilada de 100 ml) (COSTA, 2001) foram adicionadas às soluções. Assim, foram preparadas duas alíquotas de 1 ml de cada uma das referidas soluções em tubos de ensaio, sendo uma para controle negativo e outra para detecção de alcaloides. Nas alíquotas de EAC foram adicionadas 5

gotas do reagente de Dragendorff e uma gota na solução de atropina. Foi adicionado HCl 1% para igualar os volumes finais. A formação de precipitado indicou a presença de alcaloides.

3.3 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 de dez semanas de idade, os quais foram mantidos em ciclo de iluminação de 12h claro/escuro e temperatura de 21°C em gaiolas na Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR - UFU). O protocolo utilizado neste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU; processo nº 067/17; anexo I).

3.4 Procedimentos experimentais

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais (n=7): grupo Sal (controle negativo), que recebeu tratamento com veículo (solução salina - NaCl 0,9%) por via i.p. e p.o.; grupo Flu (controle positivo), que recebeu fluoxetina (10 mg/kg i.p.) e veículo (p.o.); grupos EAC30, EAC55 e EAC100 (30, 55 e 100 mg/kg p.o., respectivamente) e veículo (i.p.). Os tratamentos foram iniciados quando os animais atingiram 10 semanas de idade, sendo este considerado o dia 1. No 15º dia de tratamento foi realizado o teste do CA e no 18º, e último dia de tratamento, o TSC (Figura. 4). Durante os 18 dias, os animais receberam os respectivos tratamentos no mesmo período do dia.

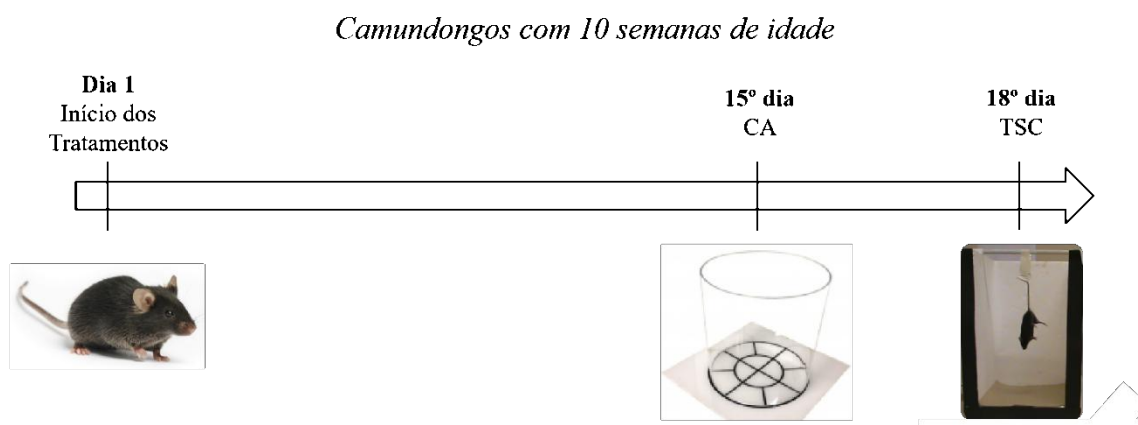


Figura 4 - Delineamento experimental. Dia 1 - Início dos tratamentos com salina, EAC ou fluoxetina; 15º dia - realização do teste do campo aberto (CA); 18º dia – realização do teste de suspensão da cauda (TSC).

3. 5 Teste do CA

O CA consiste em um aparato circular (30 cm x 30 cm x 30 cm), transparente, com 12 quadrantes e uma área circular definidos em sua base. No dia do teste, cada animal recebeu o tratamento, de acordo seu grupo experimental, uma hora antes de ser submetido ao teste. Para iniciar o teste, os animais foram inseridos um a um, cuidadosamente no centro da arena, onde permaneceram durante cinco minutos. Após cada sessão o aparato foi limpo com etanol 5%. A análise foi realizada através da filmagem do teste, sendo que os comportamentos avaliados foram: (i) *locomção*: número de quadrantes percorridos pelo animal com as 4 patas; (ii) *imobilidade*: tempo (em segundo) em que o animal permaneceu estático; (iii) *limpeza*: tempo (em segundos) em que o animal realizou autolimpeza; (iv) *levantar*: número de vezes em que o animal permanece sob as duas patas traseiras; (v) *tempo no centro do aparelho*: permanência (em segundos) do animal na área central delimitada no aparato. Todos os parâmetros avaliados foram utilizados como indicativo da atividade dos tratamentos sobre o comportamento geral dos animais.

3. 6 TSC

O aparato empregado no TSC consiste em uma caixa retangular 20 cm x 20 cm x 30 cm, com uma barra de vidro fixada no topo da caixa (afastada 7 cm da parte frontal do aparelho). Os animais foram suspensos através de suas caudas com auxílio de uma fita adesiva que os mantinha a 6 cm da barra de vidro (Figura 5). Como trabalhamos com camundongos da linhagem C57BL/6 que naturalmente escalam as caudas na tentativa de fugir da situação imposta pela suspensão, inserimos cilindros acrílicos (3,5 cm de comprimento X 0,8 cm de diâmetro) nas caudas dos animais, os quais evitavam a escalada (Figura 5). Cada animal permaneceu 6 minutos em suspensão e o comportamento de cada um foi gravado para posterior determinação do tempo (em segundos) de imobilidade (definido como ausência de movimentação), o qual pode ser reduzido por substâncias com potencial antidepressivo.

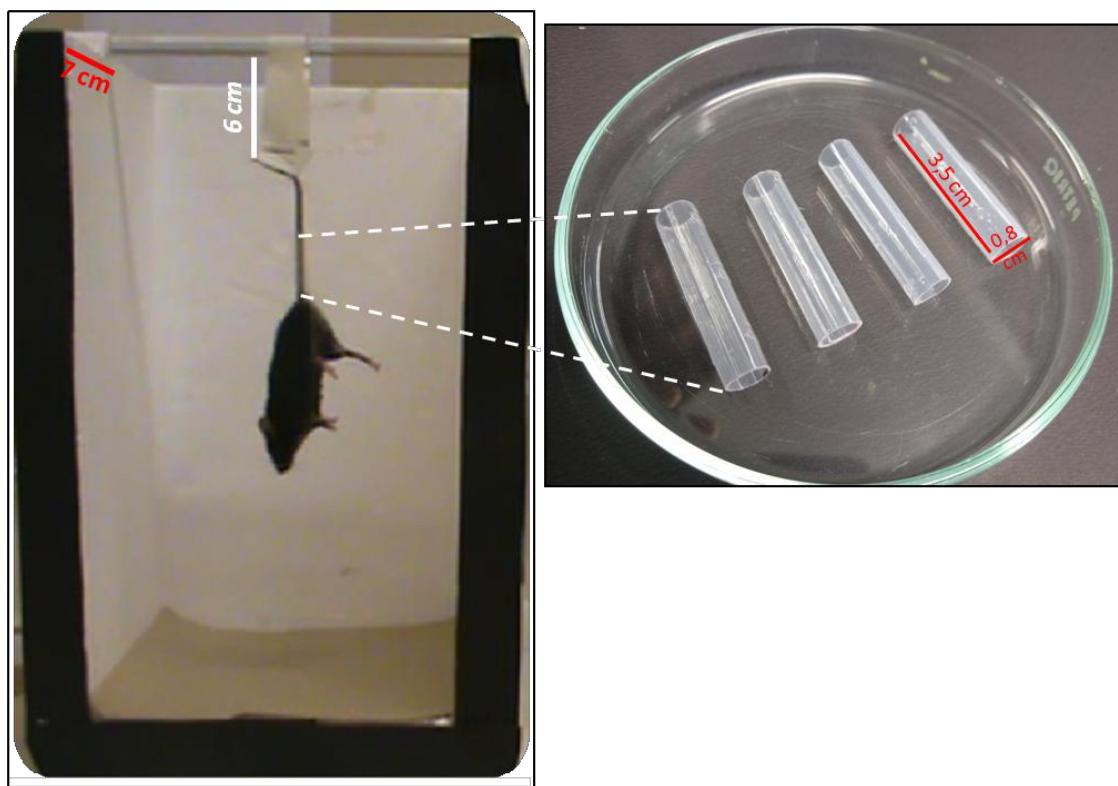


Figura 5 - Teste de suspensão da cauda. Aparato utilizado no presente trabalho. Tubos de acrílico foram inseridos nas caudas dos animais para evitar o comportamento de escalada tipicamente observada em camundongos da linhagem C57BL/6.

3.7 Análise estatística

Dados que apresentaram distribuição normal de acordo com o teste de *Kolmogorov-Smirnov* foram avaliados através da *Análise de Variância* (ANOVA) seguida do pós-teste de *Dunnett*. Dados que não tiveram distribuição normal foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn*. As análises foram realizadas utilizando-se o software *GraphPad Prism*®. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de *P* foi menor que 0,05.

4. Resultados

4.1 Avaliação qualitativa da presença de alcaloides no EAC

O teste com reagente de Dragendorff evidenciou formação de precipitado visível apenas nas soluções contendo EAC <25 mg/ml (solução supersaturada – solubilização incompleta do extrato) ou atropina 2 mg/ml (Figura. 5).

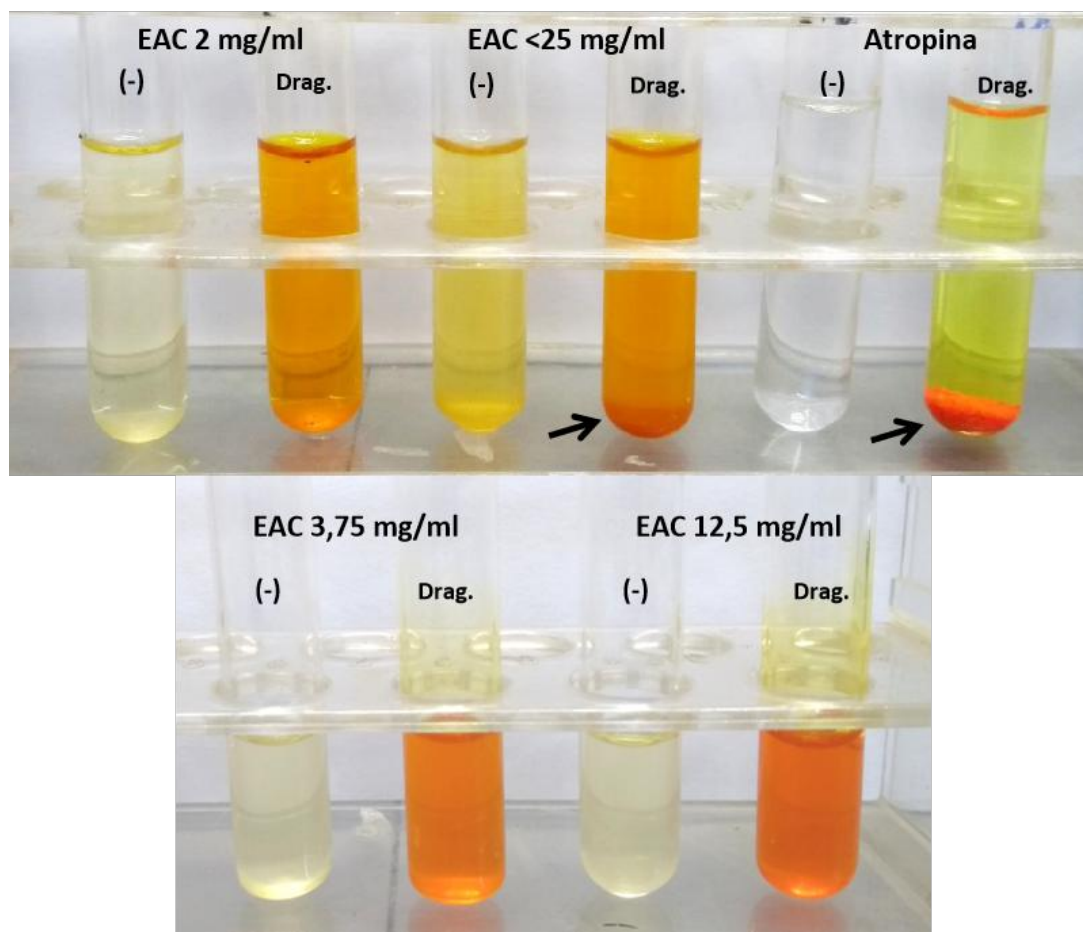


Figura 6 - Avaliação qualitativa da presença de alcaloides no EAC. (-): controle negativo do teste, contém apenas solução de EAC ou Atropina (alcaloide empregado como controle positivo do teste). **Drag.:** solução contendo EAC ou Atropina com adição de gotas de reagente de Dragendorff. As setas indicam a formação de precipitado.

4.2 Efeito do EAC na imobilidade dos animais no TSC

O tratamento com fluoxetina reduziu o tempo de imobilidade dos animais quando comparado ao grupo salina (Sal). Contudo, nenhuma das doses do EAC reduziu de forma significativa esse parâmetro.

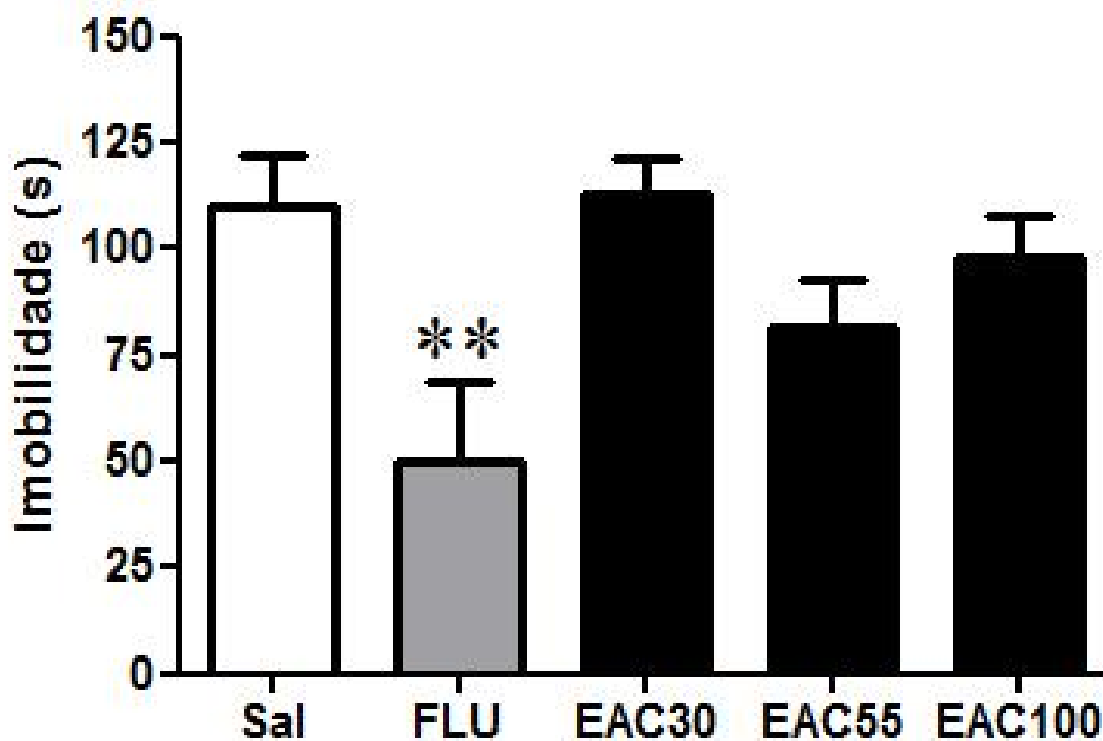


Figura 7 – Efeito do EAC na imobilidade dos animais no TSC. Tempo de imobilidade, em segundos, avaliado durante seis minutos. Sal: controle negativo; veículo i.p. e p.o.; FLU: controle positivo; fluoxetina 10 mg/kg i.p. e veículo p.o.; EAC30, EAC55 e EAC100: extrato aquoso liofilizado de *A. crassiflora* nas doses de 30, 55 e 100 mg/kg p.o., respectivamente, e veículo i.p. Todas as administrações foram realizadas 60 min antes do início do teste (18º dia de tratamento). ** $p < 0,05$ vs. Sal (ANOVA, seguido pelo pós-teste de Dunnett).

4.3 Efeito do EAC no comportamento geral dos animais no teste do CA

Nenhum dos tratamentos alterou de forma significativa o comportamento dos animais observados no campo aberto, com exceção do grupo tratado com fluoxetina, o qual apresentou redução significativa no tempo de imobilidade quando comparado ao grupo salina (Sal).

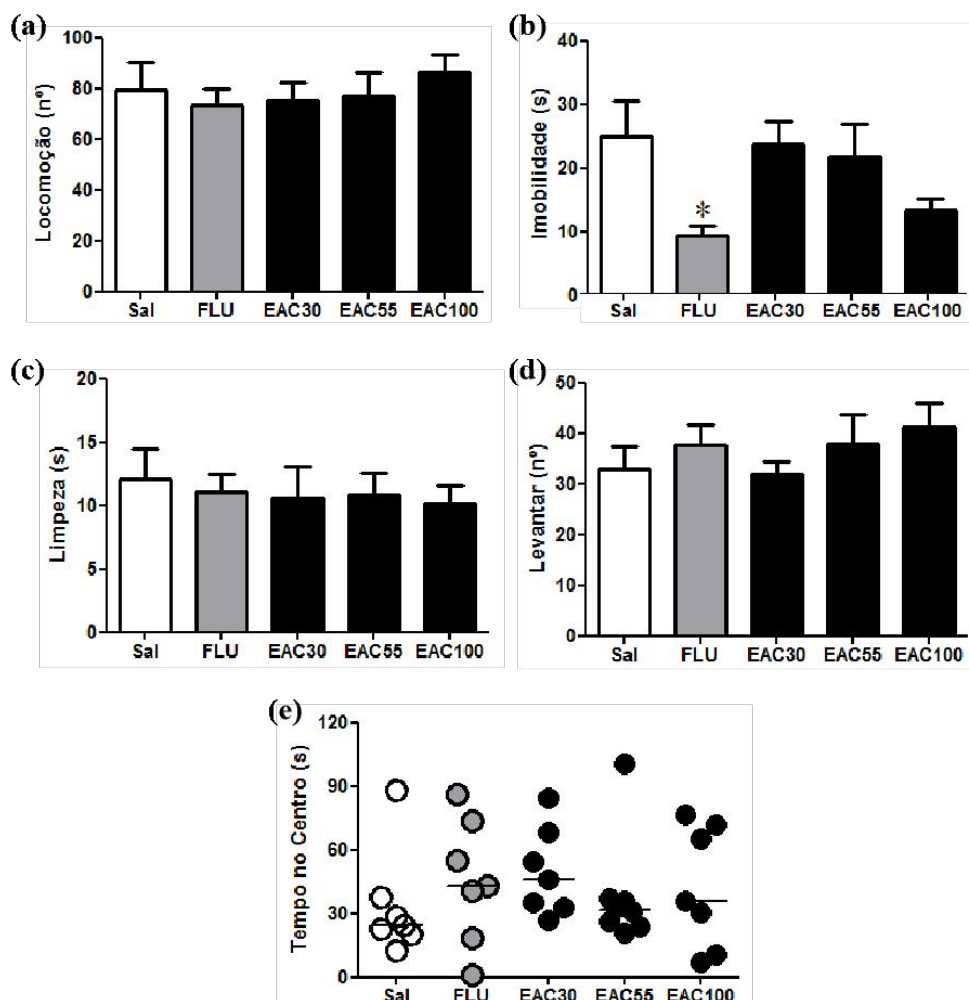


Figura 8 - Efeito do EAC no comportamento geral dos animais no teste do CA - Parâmetros avaliados durante 5 (cinco) minutos: (a) locomoção (número de quadrantes percorridos com as quatro patas); (b) imobilidade (tempo, em segundos, em que o animal permaneceu estático); (c) limpeza (tempo, em segundos, em que o animal realizou autolimpeza); (d) levantar (número de vezes em que o animal permanece sob as duas patas traseiras); (e) tempo de permanência no centro do aparelho em segundos. Sal: controle negativo; veículo i.p. e p.o.; FLU: controle positivo; fluoxetina 10 mg/kg i.p. e veículo p.o.; EAC30, EAC55 e EAC100: 30, 55 e 100 mg/kg p.o., respectivamente, e veículo i.p.. Todas as administrações foram realizadas 60 min antes do início do teste (15º dia de tratamento). (a), (b), (c) e (d) analisados pela ANOVA seguida do pós-teste de Dunnett; (e) analisado pelo Kruskal-Wallis seguido do pós-teste Dunn. * $p < 0,05$ vs. controle negativo.

5. Discussão

O teste para detecção de alcaloides empregado neste trabalho é baseado na reação entre tetraiodo bismutato (BiI_4^-), presente no reagente de Dragendorff, com o átomo de nitrogênio presente nas moléculas dos alcaloides. Essa reação forma pares de íons insolúveis em água, segundo a reação geral: $\text{Alcaloide}^{n+} + n\text{BiI}_4^- \rightarrow (\text{Alcaloide}^{n+})(\text{BiI}_4^-)_n$. Esses pares de íons formam precipitados de coloração variada, no nosso caso, observamos a formação de precipitado alaranjado apenas nas amostras contendo maior concentração de EAC ou o alcaloide empregado como controle positivo do ensaio, a atropina. Esses resultados sugerem a presença de alcaloides em nossas amostras, corroborando dados prévios do nosso grupo que evidenciaram a presença de xilopina e isolaurelina no EAC (FERRAZ et al., 2019) .

O tratamento com EAC por 18 dias não alterou o tempo de imobilidade dos animais no TSC, sugerindo ausência de efeito antidepressivo-símile com as doses estudadas. Considerando a descrição de efeitos antidepressivo-símiles associados a frações enriquecidas em alcaloides aporfínicos, contendo anoneína e liriodenina, da espécie *A. cherimolia* (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 2012), nossos dados sugerem ao menos duas possibilidades: (i) que os alcaloides presentes no EAC, identificados previamente como sendo xilopina e isolaurelina, são destituídos de atividade antidepressiva-símile; (ii) que a quantidade de alcaloides presentes no EAC nas doses empregadas no presente estudo é insuficiente para evidenciar efeitos antidepressivo-símiles. Com relação a essa segunda hipótese, ensaios de detecção de alcaloides realizados com concentrações de extrato semelhantes àsquelas administradas aos camundongos não evidenciaram formação de precipitado, sugerindo baixa concentração de alcaloides. Dessa forma, experimentos com extrato enriquecido em alcaloides são necessários para resolver essa questão.

Nenhuma das doses testadas do EAC alterou os comportamentos dos animais observados no campo aberto, sugerindo ausência de efeitos estimulantes ou depressores. Cabe ressaltar que a fluoxetina diminuiu o tempo de imobilidade dos animais sem, no entanto, alterar os comportamentos de locomoção, tempo no centro, levantar e limpeza. Assim, o efeito da fluoxetina observado no TSC não pode ser atribuído à psicoestimulação, validando o ensaio

empregado no presente estudo e corroborando dados de literatura (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005).

Quando o animal é colocado no aparato do CA, a tendência é se locomover na periferia em contato com a parede do mesmo (tigmotaxia) e evitar o centro da arena. Assim, um animal que passa mais tempo na periferia da arena pode estar mais ansioso; por outro lado, passar mais tempo no centro da arena pode ser indicativo de um estado menos ansioso (LEPPÄNEN; EWALDS-KVIST; SELANDER, 2005; LEPPÄNEN; RAVAJA; EWALDS-KVIST, 2006; MCGOWAN; COOGAN, 2013). Apesar dessa relação com a ansiedade e de o CA ser sensível às drogas ansiolíticas, o teste não costuma ser utilizado para se avaliar atividades ansiolíticas ou ansiogênicas, mas sim para se avaliar comportamentos não específicos e gerais (CHOLERIS et al., 2001). Assim, nossos dados sugerem indiretamente que o EAC também não altera o estado emocional dos animais e possivelmente não apresenta efeitos ansiolítico-símiles. Contudo, isso permanece por ser confirmado com testes mais específicos, como o labirinto em cruz elevado.

6. Conclusão

O tratamento crônico com EAC não apresentou atividade antidepressiva-símile, psicoestimulante ou depressora nas doses empregadas.

7. Referências bibliográficas

AVENEVOLI, S. et al. Major Depression in the National Comorbidity Survey–Adolescent Supplement: Prevalence, Correlates, and Treatment. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 37- 44.e2, 1 jan. 2015.

BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Major depressive disorder. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 1, p. 55–68, 3 jan. 2008.

BIKOMO, E. O.; EBUEHI, O. A. T.; MAGBAGBEOLA, O. A. Antidepressant Activity of Ethanol Leaf Extract of *Annona muricata* L., in Sprague-Dawley Rats. **American Journal of Biochemistry**, v. 7, n. 1, p. 1–5, 2017.

CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: Effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235–260, 2001.

COSTA, A. F. Alcaloides. In: **Farmacognosia - Volume III**. [s.l.] Calouste, 2001. p. 801–805.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4–5, p. 571–625, 2005.

DA COSTA OLIVEIRA, C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the hydroalcoholic fractions from the leaves of *Annona crassiflora* Mart. in mice. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 2, p. 397–408, 1 abr. 2019.

DE ASSIS, C. M. et al. Isolamento e avaliação da atividade biológica dos alcalóides majoritários de *Tabernaemontana angulata* Mart. ex Müll. Arg., Apocynaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2 B, p. 626–631, abr. 2009.

DEAN, J.; KESHAVAN, M. The neurobiology of depression: An integrated view. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 27, p. 101–111, 1 jun. 2017.

DEBATTISTA, C. Agentes antidepressivos. In: **Farmacologia básica e clínica**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. p. 521–541.

DHINGRA, D.; GOYAL, P. K. Inhibition of MAO and GABA: Probable mechanisms for antidepressant-like activity of *Nardostachys jatamansi* DC. in mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 46, n. 4, p. 212–218, abr. 2008.

DINIZ, T. C. et al. Anticonvulsant, sedative, anxiolytic and antidepressant activities of the essential oil of *Annona vepretorum* in mice: Involvement of GABAergic and serotonergic systems. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1074–1087, 1 mar. 2019.

EGYDIO, A. P. M.; VALVASSOURA, T. A.; SANTOS, D. Y. A. C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 145–151, fev. 2013.

FAJEMIROYE, J. O. et al. Treatment of anxiety and depression: Medicinal plants in retrospect. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 3, p. 198–215, 1 jun. 2016.

FARAHANI, M. S. et al. Plant-derived natural medicines for the management of depression: An overview of mechanisms of action. **Reviews in the Neurosciences**, v. 26, n. 3, p. 305–321, 1 jun. 2015.

FERRAZ, C. R. et al. Antidiarrhoeic effect and dereplication of the aqueous extract of *Annona crassiflora* (Annonaceae). **Natural Product Research**, v. 33, n. 4, p. 563–567, 16 fev. 2019.

GALEOTTI, N. *Hypericum perforatum* (St John's wort) beyond depression: A therapeutic perspective for pain conditions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 200, p. 136–146, 22 mar. 2017.

GARCIA-GARCIA, A. L.; NEWMAN-TANCREDI, A.; LEONARDO, E. D. 5-HT_{1A} receptors in mood and anxiety: Recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 4, p. 623–636, 2014.

HASRAT, J. A. et al. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HT_{1A} receptor agonists in rats: Unexploited antidepressive (lad) products. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, n. 11, p. 1145–1149, 1997.

HEN, R.; NAUTIYAL, K. M. Serotonin receptors in depression: From A to B. **F1000Research**, v. 6, 2017.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcaloides: Generalidades e aspectos básicos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. [s.l: s.n.]. p. 641–656.

LEE, G.; BAE, H. Therapeutic effects of phytochemicals and medicinal herbs on depression. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

LEE, S. et al. Antidepressant-like activity of the aqueous extract of *Allium macrostemon* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 386–395, set. 2010.

LEPPÄNEN, P. K.; EWALDS-KVIST, S. B. M.; SELANDER, R. K. Mice selectively bred for open-field thigmotaxis: Life span and stability of the selection trait. **Journal of General Psychology**, v. 132, n. 2, p. 187–204, 1 abr. 2005.

LEPPÄNEN, P. K.; RAVAJA, N.; EWALDS-KVIST, S. B. M. Twenty-three generations of mice bidirectionally selected for open-field thigmotaxis: Selection response and repeated exposure to the open field. **Behavioural Processes**, v. 72, n. 1, p. 23–31, mar. 2006.

LI, H. T. et al. The pharmacological activities of (-)-anonaine. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8257–8263, jul. 2013.

LÚCIO, A. S. S. C. et al. Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. **Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 74, p. 233–409, 2015.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. et al. Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 164–170, 6 jan. 2012.

MCGOWAN, N. M.; COOGAN, A. N. Circadian and behavioural responses to shift work-like schedules of light/dark in the mouse. **Journal of Molecular Psychiatry**, v. 1, n. 1, p. 7, 2013.

PERVIZ, S.; KHAN, H.; PERVAIZ, A. Plant alkaloids as an emerging therapeutic alternative for the treatment of depression. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. FEB, 15 fev. 2016.

RAHMATI, B. et al. Antidepressant and anxiolytic activity of *Lavandula officinalis* aerial parts hydroalcoholic extract in scopolamine-treated rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 958–965, 2017.

RAMOS, M. et al. Pharmacogenetic studies: A tool to improve antidepressant therapy. **Drug Metabolism and Personalized Therapy**, v. 31, n. 4, p. 197–204, 1 dez. 2016.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale: Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

SAH, S. P.; MATHELA, C. S.; CHOPRA, K. Antidepressant effect of *Valeriana wallichii* patchouli alcohol chemotype in mice: Behavioural and biochemical evidence. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 1, p. 197–200, 26 abr. 2011.

YE, L. et al. Antidepressant-like effects of the extract from *Cimicifuga foetida* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 683–691, 18 dez. 2012.

ZHANG, Y.; CHEN, Y.; MA, L. Depression and cardiovascular disease in elderly: Current understanding. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 47, p. 1–5, 1 jan. 2018.

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação do efeito tipo-antidepressivo do extrato aquoso liofilizado das folhas de *Annona crassiflora* Mart”, protocolo nº 067/17, sob a responsabilidade de **Luiz Borges Bispo da Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **29 de setembro de 2017**.

(We certify that the project entitled “Avaliação do efeito tipo-antidepressivo do extrato aquoso liofilizado das folhas de *Annona crassiflora* Mart”, protocol 067/17, under the responsibility of Luiz Borges Bispo da Silva - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of September 29th, 2017).

Vigência do Projeto	Início: 01/12/2017 Término: 01/07/2018
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongos
Número de animais	60
Peso / Idade	- / 9 semanas
Sexo	Machos
Origem / Local	Centro de bioterismo e experimentação animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA/UFU)
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 02 de outubro de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU