

Pablinny Moreira Galdino

***Lafoensia pacari* A. St. Hil:**  
**Identificação de constituintes ativos e avaliação da atividade antidepressiva**

Tese submetida ao Programa de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.  
Orientador: Prof. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima  
Coorientador: Prof. Dr. Elson Alves Costa

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Galdino, Pablinny

Lafoensia pacari A. St. Hil: : Identificação de  
constituíntes ativos e avaliação da atividade  
antidepressiva / Pablinny Galdino ; orientadora, Thereza  
Christina de Lima ; coorientador, Elson Costa. -  
Florianópolis, SC, 2015.  
124 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Lafoensia pacari. 3. atividade  
antidepressiva. 4. plantas medicinais. 5. 124. I. de Lima,  
Thereza Christina. II. Costa, Elson. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia. IV. Título.

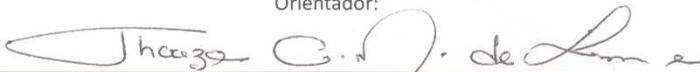
**"Lafoesia pacari A. St.Hil: Identificação de constituintes ativos e avaliação da atividade antidepressiva"**

Por

**Pablinny Moreira Galdino**

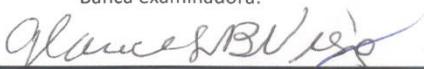
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (008/FMC/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:

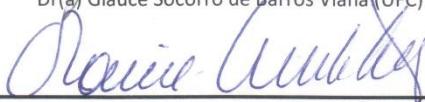


Dr(a) Theresia Christina Monteiro de Lima (FMC/CCB/UFSC)

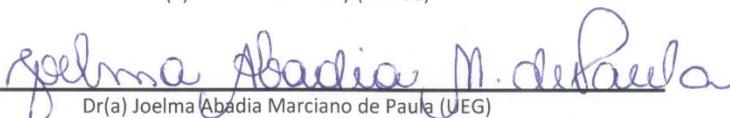
Banca examinadora:



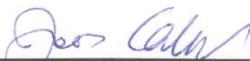
Dr(a) Glaucete Socorro de Barros Viana (UFSC)



Dr(a) Elaine Elisabetsky (UFRGS)



Dr(a) Joelma Abadia Marciano de Paula (UEG)



Dr(a) João Batista Calixto (FMC/CCB/UFSC)



Dr(a) Rui Daniel Schroder Prediger (FMC/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Theresia Christina Monteiro de Lima  
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 10 de abril de 2015.



*Ao meu amado esposo, Adryano, aos meus pais, Gelcimar e Vilma, e ao meu irmão, Gelcimar Junior, por todo o amor, carinho, confiança, apoio e incentivo incondicional.*



## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores. À Professora Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima, pela confiança em mim depositada, sem seu apoio e confiança a conclusão desta etapa de minha formação não seria possível. Ao Professor Dr. Elson Alves Costa que em 2005 abriu as portas de seu laboratório, me aceitando como aluna de Iniciação Científica, abrindo um caminho que permitiu a elaboração dessa tese. Xico, te agradeço o apoio e constante incentivo de buscar novos desafios. Aos dois, agradeço à orientação, mas, principalmente, à amizade, compreensão e incentivo pela pesquisa e docência.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFSC, em especial, à Dra. Cilene Lino de Oliveira e ao Dr. Juliano Ferreira, Dr. Leandro José Bertoglio e Dr. Rui Daniel Schröder Prediger, pelas valiosas considerações no exame de qualificação.

Aos professores Dra. Glauce Socorro de Barros Viana, Dra. Elaine Elisabetsky, Dr. João Batista Calixto, Dra. Joelma Abadia Marciano de Paula, Dr. Leandro José Bertoglio e Dr. Rui Daniel Schröder Prediger, que aceitaram participar da banca avaliadora da defesa.

Aos professores Dr. Anicleto Poli, Dr. Flávio Henrique Reginatto, Dr. José Realino de Paula, Dra. Luce Maria Brandão Torres e Dr. Paulo César Ghedini, pelas contribuições experimentais e/ou acesso aos respectivos laboratórios durante o desenvolvimento deste trabalho, mas, principalmente, pela boa convivência.

Aos amigos do Laboratório de Neurofarmacologia da UFSC, Alexandre, Ana Paula, Andressa, Claudini, Evelyn, Felipe, Gilliard, Maíra, Marcelo, Renata e Vagner, e da pós-graduação, Ana Carolina, Flora, Lucas, Filipe, Paulo e Tatiane. Além de me ajudarem nos experimentos, vocês tornaram minha estadia em Floripa muito mais fácil e prazerosa.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da UFG, Danillo, Daiany Priscilla, Dayane, Fábio, Iziara, James, José Luís, Lanussy, Lécia, Marcus Vinicius, Patrícia, Roberta, pelas contribuições à parte experimental, mas, principalmente, pela amizade de vocês. Aos amigos do meio científico Renê e Stone pelas contribuições à parte experimental, mas, principalmente, pela amizade de vocês.

Aos funcionários dos Laboratórios Multiusuários de Estudos em Biologia I – CCB - UFSC, por me ajudarem sempre de maneira tão atenciosa e prestativa.

Aos funcionários do Biotério Central da UFG e Biotério Setorial da FMC-UFSC, por sempre me auxiliarem nos cuidados e obtenção dos animais, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e não foram citados anteriormente.

À minha família. Com todo carinho agradeço ao meu esposo Adryano, pelo apoio e incentivo incondicional, mesmo isso significando minha ausência física, agradeço principalmente sua compreensão e por ser meu porto seguro em momentos de turbulência, além de me ajudar a encontrar o caminho correto nos momentos que precisei. Aos meus pais e irmão, obrigada por tudo que fizeram e significam em minha vida. Eu amo muito vocês!

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo suporte financeiro, também imprescindíveis no desenvolvimento desta tese.

Em especial, a Deus.

.

*“Por vezes sentimos que aquilo  
que fazemos não é senão  
uma gota de água no mar.  
Mas o mar seria menor se lhe faltasse  
uma gota.”*  
*Madre Teresa de Calcutá*



## RESUMO

A espécie vegetal *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., família Lythraceae, é uma planta medicinal muito utilizada nos estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo popularmente conhecida como pacari ou mangaba-brava. Dentre os vários propósitos medicinais desta planta, encontra-se o uso popular ‘contra o desânimo’. Portanto, o nosso objetivo foi realizar o estudo fitoquímico do extrato bruto e frações obtidas biomonitorados pela atividade tipo antidepressiva. A análise fitoquímica apontou a presença de saponinas, taninos, esteroides, triterpenos e traços de flavonoides no extrato etanólico das cascas do caule de *L. pacari* (EEP) e na fração clorofórmica (FClor), a que melhor mimetizou o efeito do extrato bruto, são encontrados principalmente esteroides e triterpenos. Análises de RMN <sup>13</sup>C, HMQC e CLAE-DAD da fração clorofórmica, permitiram identificar o esteroide β-sitosterol e o triterpeno lupeol entre os principais constituintes desta fração. O pré-tratamento com EEP (100, 300 e 1000 mg/kg, v.o.) no teste do nado forçado (NF) sugere um efeito do tipo antidepressivo sem alteração na deambulação no campo aberto (CA). Após o fracionamento, a FClor foi a que melhor reteve a atividade biológica do extrato, sendo a dose de 70 mg/kg a mais efetiva no NF e no teste de suspensão pela cauda. Tanto o pré-tratamento com PCPA (100 mg/kg i.p., durante 4 dias – inibidor da síntese de serotonina), quanto AMPT (100 mg/kg i.p., 4 h antes – inibidor da síntese de catecolaminas) bloqueou o efeito da FClor, sugerindo o envolvimento do sistema serotoninérgico e catecolaminérgico na atividade observada. Dentre os compostos isolados, apenas o lupeol (40 mg/kg, v.o.) reduziu o tempo de imobilidade no NF sem alterar a deambulação dos animais no CA e as drogas PCPA e AMPT também bloquearam a atividade deste composto. Ao avaliar a atividade das isoformas MAO-A e MAO-B, na presença de FClor e de lupeol, não foi detectada qualquer inibição enzimática. Quanto à capacidade de aumentar o nível hipocampal do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), apenas a FClor se mostrou ativa no protocolo de tratamento estudado. Neste estudo não foi observado aumento na expressão (*Western blotting*) das proteínas CREB e pCREB, após os tratamentos com a FClor (70 mg/kg), o lupeol (40 mg/kg), o β-sitosterol (40 mg/kg) e a imipramina (30 mg/kg). Assim, concluímos que o EEP, a fração rica em triterpenos e o triterpeno lupeol apresentaram efeito do tipo antidepressivo envolvendo as monoaminas endógenas, sem inibir diretamente a enzima MAO. Além disso, a FClor aumentou o nível hipocampal de BDNF, sem a participação da via de sinalização mediada

por CREB. Portanto, a *L. pacari* é uma espécie vegetal promissora na avaliação de fitoconstituintes com atividade antidepressiva.

**Palavras-chave:** *Lafoensia pacari*, biomonitoramento, teste comportamental, monoaminas.

## ABSTRACT

The species *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae Family, is a medicinal plant widely used in the states of Goiás, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, popularly known as “pacari” or “mangaba-brava”. Among the ethnopharmacological uses was the use “to raise the spirits”. Thus, in the present, our aim was to perform the phytochemical study of the crude extract and fractions bio-guided by the antidepressant-like activity. Phytochemical analysis showed the presence of saponins, tannins, steroids, triterpenes and flavonoids traces on the ethanol extract of *L. pacari* stem bark (EEP) and in the chloroform fraction (FClor), the one that better mimicked the crude extract effects, are mostly found steroids and triterpenes. <sup>13</sup>C NMR, HMQC and HPLC-DAD analysis of chloroform fraction have identified the steroid  $\beta$ -sitosterol and the triterpene lupeol among the main constituents of this fraction. Pretreatment with EEP (100, 300 and 1000 mg/kg, p.o.) before the forced swimming test (NF) suggests an antidepressant-like effect with no change in ambulation in the open field (CA). After fractionation, the FClor was the one that best retained the biological activity of the crude extract and the dose of 70 mg/kg was the most effective in the NF and the tail suspension test. Pretreatment with PCPA (100 mg/kg i.p. for 4 days - a serotonin synthesis inhibitor) as well as AMPT (100 mg/kg i.p. 4 hours prior - a catecholamine synthesis inhibitor) blocked the FClor effect, suggesting the involvement of catecholaminergic and serotonergic system in the observed activity. Among the compounds isolated, only lupeol (40 mg/kg, p.o.) reduced the immobility time in the NF without changing the animal's activity in CA. PCPA and AMPT also blocked the lupeol activity. In MAO-A and MAO-B isoforms activity assay in the presence of FClor and lupeol, no enzyme inhibition was detected. Regarding the ability to increase the hippocampal level of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), only FClor was active in the studied treatment protocol. No increases were seen in CREB and pCREB proteins expression (*Western blotting*) after treatment with FClor (70 mg/kg), lupeol (40 mg/kg),  $\beta$ -sitosterol (40 mg/kg) and imipramine (30 mg/kg). We have concluded that the EEP, the triterpenes fraction and lupeol showed an antidepressant-like effect involving endogenous monoamines, without directly inhibiting the MAO enzyme activity. Furthermore, FClor increased hippocampal BDNF levels, without involving of the signaling CREB-mediated pathway. Therefore, *L. pacari* is a promising plant in the study of phytochemicals with antidepressant activity.

**Keywords:** *Lafoensia pacari*, biomonitored study, behavioral test, monoamines.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática de sinapses dopaminérgica, noradrenérgica e serotoninérgica, juntamente com exemplos de fármacos antidepressivos que inibem as proteínas transportadoras destas sinapses. ....	30
<b>Figura 2</b> – Partes aéreas de <i>Lafoensia pacari</i> A. St.-Hil., evidenciando flores, frutos e caule. ....	37
<b>Figura 3</b> – Fluxograma da partição líquido-líquido realizada com EEP e rendimentos de cada fração obtida. ....	44
<b>Figura 4</b> – Modelo representativo do aparato utilizado no teste do campo aberto. ....	48
<b>Figura 5</b> – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do efeito do extrato etanólico das cascas do caule de <i>L. pacari</i> nos testes do campo aberto e do nado forçado. ....	53
<b>Figura 6</b> – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do efeito das frações do extrato etanólico das cascas do caule de <i>L. pacari</i> nos testes do campo aberto e do nado forçado. ....	53
<b>Figura 7</b> – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação da relação dose-efeito da fração clorofórmica do extrato etanólico das cascas do caule de <i>L. pacari</i> nos testes do campo aberto e do nado forçado ou suspensão pela cauda. ....	54
<b>Figura 8</b> – Esquema do protocolo utilizado para a padronização do uso do inibidor de síntese de serotonina, a para-cloro-fenilalanina (PCPA). ....	54
<b>Figura 9</b> – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito da fração clorofórmica do extrato etanólico das cascas do caule de <i>L. pacari</i> nos testes do campo aberto e do nado forçado. ....	55
<b>Figura 10</b> – Esquema do protocolo utilizado para a padronização do uso do inibidor de síntese de catecolaminas, a alfa-metil-para-tirosina (AMPT). ....	56
<b>Figura 11</b> – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito da fração clorofórmica do extrato etanólico das cascas do caule de <i>L. pacari</i> nos testes do campo aberto e do nado forçado. ....	56
<b>Figura 12</b> – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação da atividade de $\beta$ -sitosterol e lupeol, compostos detectados na fração clorofórmica do extrato etanólico das cascas do caule de <i>L. pacari</i> nos testes do campo aberto e do nado forçado. ....	57

<b>Figura 13</b> – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito de lupeol no teste do campo aberto e do nado forçado. ....	57
<b>Figura 14</b> – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito de lupeol nos testes do campo aberto e do nado forçado. ....	58
<b>Figura 15</b> – Perfis cromatográficos obtidos por CCD do extrato etanólico das cascas do caule de <i>Lafoensia pacari</i> e das frações clorofórmica, acetato de etila, n-butanol e aquosa, ácido ursólico, ácido oleanólico, $\alpha$ -amirina e $\beta$ -sitosterol. ....	61
<b>Figura 16</b> – Perfis cromatográficos obtidos por CCD da co-eluição da fração clorofórmica do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> com padrões de $\beta$ -sitosterol, ácido oleanólico, ácido ursólico e $\alpha$ -amirina.....	62
<b>Figura 17</b> – Estrutura química dos compostos presentes na fração clorofórmica do extrato etanólico das cascas do caule de <i>Lafoensia pacari</i> segundo interpretação dos resultados das análises de CG/EM, RMN e HMQC. ....	64
<b>Figura 18</b> – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD. ....	65
<b>Figura 19</b> – Efeito do tratamento (v.o.) com o extrato etanólico das cascas do caule de <i>Lafoensia pacari</i> (EEP) nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg) ou a imipramina (IMI - 30 mg/kg) em camundongos nos tempos de 24, 5 e 1 h antes dos testes de campo aberto e nado forçado. ....	68
<b>Figura 20</b> – Efeito do tratamento (v.o.) com as frações: frações clorofórmica (FClor – 70 mg/kg), acetato de etila (FAcEt - 180 mg/kg), n-butanol (FBut - 370 mg/kg), aquosa (FAq - 1 g/kg) e imipramina (IMI - 30 mg/kg), em camundongos nos tempos de 24, 5 e 1 h antes dos testes do campo aberto e do nado forçado. ....	70
<b>Figura 21</b> – Efeito do tratamento (v.o.) com a fração clorofórmica (FClor) de <i>Lafoensia pacari</i> nas doses de 35, 70 e 140 mg/kg ou a imipramina (IMI - 30 mg/kg) nos tempos de 24, 5 e 1 h antes dos testes comportamentais.....	72
<b>Figura 22</b> – Efeito do pré-tratamento com PCPA (100 mg/kg i.p., 4 dias) no comportamento de animais tratados com fluoxetina (FLX - 30 mg/kg, v.o., 1h, A e B) ou fração clorofórmica (FClor - 70 mg/kg, v.o., 24, 5 e 1 h, C e D) de <i>Lafoensia pacari</i> avaliados nos teste de campo aberto e nado forçado. ....	74
<b>Figura 23</b> – Efeito do pré-tratamento com AMPT (100 mg/kg i.p., 4 h) no comportamento de animais tratados com imipramina (IMI - 30 mg/kg, v.o., 1h, A e B) ou fração clorofórmica (FClor - 70 mg/kg, v.o., 24, 5 e 1 h, C e D) de <i>Lafoensia pacari</i> avaliados nos testes do campo aberto e do nado forçado.....	76

<b>Figura 24</b> – Efeito do tratamento (v.o.) com $\beta$ -sitosterol ( $\beta$ -sitos) e lupeol nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg ou com imipramina (IMI - 30 mg/kg) nos tempos de 24, 5 e 1 h antes dos testes comportamentais, em camundongos.....	78
<b>Figura 25</b> – Efeito do pré-tratamento com PCPA (100 mg/kg i.p., 4 dias) no comportamento de animais tratados com lupeol (40 mg/kg, v.o., 24, 5 e 1 h) avaliados nos testes do campo aberto e do nado forçado .....	80
<b>Figura 26</b> – Efeito do pré-tratamento com AMPT (100 mg/kg i.p., 4 h) no comportamento de animais tratados com lupeol (40 mg/kg, v.o., 24, 5 e 1 h) avaliados nos testes do campo aberto e do nado forçado .....	81
<b>Figura 27</b> – Curvas de inibição da MAO-A e MAO-B na presença de concentrações crescentes de fração clorofórmica do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> , lupeol, clorgilina e pargilina, em homogenato mitocondrial de fígado de camundongos.....	83
<b>Figura 28</b> – Efeito do tratamento (v.o.) com fração clorofórmica do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> (FClor - 70 mg/kg), lupeol (40 mg/kg) e imipramina (30 mg/kg) nos tempos de 24, 5 e 1 h antes do teste do nado forçado, em camundongos, no tempo total de imobilidade (em segundos), sessão de 6 min. Efeito dos mesmos tratamentos sobre o nível hipocampal de BDNF de alguns dos animais (5-6 por grupo) escolhidos aleatoriamente.. .....	85
<b>Figura 29</b> – Efeito do tratamento (v.o.) com fração clorofórmica do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> (FClor - 70 mg/kg), lupeol (40 mg/kg), $\beta$ -sitosterol (40 mg/kg) e imipramina (30 mg/kg) nos tempos de 24, 5 e 1 h, sobre a expressão, avaliada por <i>Western blotting</i> , de CREB fosforilada e CREB, no hipocampo de camundongos e, a razão entre estas duas avaliações.. .....	86



## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b> - Atividades farmacológicas da espécie <i>Lafoensia pacari</i> A. St.Hil. ....	39
<b>Tabela 1</b> – Metabólitos secundários observados no extrato bruto e das frações de <i>Lafoensia pacari</i> por meio da análise em cromatografia em camada delgada. ....	61
<b>Tabela 2</b> - Dados de RMN <sup>13</sup> C de lupeol e β-sitosterol e a comparação com os dados obtidos com FClor de <i>Lafoensia pacari</i> . ....	66
<b>Tabela 3</b> – Resumo dos principais resultados encontrados neste estudo. ....	87



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $^{13}\text{C}$  - isótopo de carbono com massa atômica 13
- 5-HT - serotonina
- $\beta$ -Sitos -  $\beta$ -Sitosterol
- $\delta$  - deslocamentos químicos
- AMPC - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- AMPT - *alfa*-metil-*p*-tirosina
- ANOVA - análise de variância
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BDNF - *Brain-derived neurotrophic factor* (fator neurotrófico derivado do cérebro)
- CA - campo aberto
- CCD - cromatografia em camada delgada
- $\text{CDCl}_3$  - clorofórmio deuterado
- CEME - Central de Medicamentos
- CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CG/EM - cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
- CLAE-DAD - cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodo
- CREB - *AMPC response element binding protein* (proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPC)
- DA - dopamina
- DAT - transportador de dopamina
- DSM-5 - Manual de Diagnóstico e Estatística da Associação Americana de Psiquiatria versão 5
- EEP - extrato etanólico da casca do caule de *L. pacari*
- ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio de imunoadsorção ligado à enzima)
- EM - espectrômetro de massas
- FACet - fração acetato de etila
- FAq - fração aquosa
- FBut - fração n-butanol
- FClor - fração clorofórmica
- FDA - *Food and Drug Administration*
- FLX - fluoxetina
- $G_i/G_o$  - proteína G inibitória
- HMQC - *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence* (correlação heteronuclear múltiplo-quântica)
- IC<sub>50</sub> - concentração inibitória 50%

ICB - Instituto de Ciências Biológicas  
IL - interleucina  
iMAO - inibidor da enzima monoamina oxidase  
IMI - imipramina  
ISRD - inibidor seletivo de recaptação de dopamina  
ISRN - inibidor seletivo de recaptação de noradrenalina  
ISRS - inibidor seletivo de recaptação de serotonina  
ISRSN - inibidor seletivo de recaptação de serotonina e noradrenalina  
L-DOPA –(S)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil) ácido propanoico  
m/v - relação massa-volume  
M<sup>+</sup> - íons moleculares  
MAO - monoamina oxidase  
MAO-A - monoamina oxidase isoforma A  
MAO-B - monoamina oxidase isoforma B  
NA - noradrenalina  
NAT - transportador de noradrenalina  
NIST - *National Institute of Standards and Technology*  
NMDA - N-metil-D-Aspartato  
PCPA - *p*-clorofenilalanina  
pCREB - *phosphorylated CREB* (CREB fosforilada)  
PPPM - Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais  
PVDF - fluoreto de polivinilideno  
RMN - ressonância magnética nuclear  
SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório  
SDS - dodecil sulfato de sódio  
SERT - transportador de serotonina  
SNC - sistema nervoso central  
TMS - tetrametilsilano  
NF - teste do nado forçado  
TNF- $\alpha$  - *Tumor necrosis factors- $\alpha$*  (fator de necrose tumoral- $\alpha$ )  
TSC - teste de suspensão pela cauda  
UFG - Universidade Federal de Goiás  
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina  
USP – Universidade de São Paulo  
UV – ultravioleta  
v.o. - via oral  
v/v - relação volume/volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>27</b>
1.1	Depressão: prevalência, fisiopatologia e tratamento farmacológico .....	27
1.2	Estudo com plantas medicinais .....	34
1.3	Descrição botânica e distribuição geográfica da <i>Lafoensia pacari</i> A. St.-Hil. ....	36
1.4	Testes preditivos de atividade antidepressiva .....	40
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
2.1	Objetivo geral .....	42
2.2	Objetivos específicos .....	42
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
3.1	Material vegetal .....	43
3.2	Obtenção do extrato etanólico das cascas do caule de <i>L. pacari</i> A. St.Hil. (EEP) e frações .....	43
3.3	Análises fitoquímicas .....	45
3.3.1	Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	45
3.3.2	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) .....	45
3.3.3	Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	46
3.3.4	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de fotodiodos .....	46
3.4	Animais .....	47
3.5	Testes comportamentais .....	47
3.5.1	Campo aberto .....	47
3.5.2	Teste do nado forçado .....	48
3.5.3	Teste da suspensão pela cauda .....	48
3.6	Avaliações bioquímicas .....	48
3.6.1	Análise <i>in vitro</i> da atividade da enzima MAO .....	48
3.6.1.1	Obtenção da fração enriquecida em mitocôndria .....	48
3.6.1.2	Determinação da atividade da enzima MAO .....	49

<b>3.6.2</b>	<b>Quantificação <i>ex vivo</i> do nível hipocampal da proteína BDNF por <i>Elisa</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Quantificação <i>ex vivo</i> do nível hipocampal das proteínas CREB e CREB fosforilada por <i>Western blotting</i> .....</b>	<b>50</b>
3.7	Fármacos e soluções .....	51
3.8	Procedimentos e protocolos experimentais .....	52
<b>3.8.1</b>	<b>Avaliações fitoquímicas .....</b>	<b>52</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Efeito do extrato etanólico das cascas do caule de <i>L. pacari</i> no teste de campo aberto e nado forçado.....</b>	<b>52</b>
<b>3.8.3</b>	<b>Efeito das frações do extrato etanólico das cascas do caule de <i>L. pacari</i> nos testes do campo aberto e do nado forçado .....</b>	<b>53</b>
<b>3.8.4</b>	<b>Avaliação da relação dose-efeito da fração clorofórmica nos testes do campo aberto, nado forçado e suspensão pela cauda .....</b>	<b>53</b>
<b>3.8.5</b>	<b>Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito do tipo antidepressivo da fração clorofórmica .....</b>	<b>54</b>
<b>3.8.6</b>	<b>Avaliação do envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito do tipo antidepressivo da fração clorofórmica .....</b>	<b>55</b>
<b>3.8.7</b>	<b>Avaliação dos efeitos comportamentais dos compostos detectados na fração clorofórmica no teste do campo aberto e nado forçado .....</b>	<b>56</b>
<b>3.8.8</b>	<b>Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico e catecolaminérgico no efeito do tipo antidepressivo do lupeol .....</b>	<b>57</b>
<b>3.8.9</b>	<b>Avaliação da inibição da enzima MAO como mecanismo envolvido nos efeitos da fração clorofórmica e lupeol.....</b>	<b>58</b>
<b>3.8.10</b>	<b>Dosagem do nível hipocampal de BDNF, CREB e CREB fosforilada.....</b>	<b>58</b>
3.9	Análise Estatística.....	59
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
4.1	Análises fitoquímicas .....	60
4.2	Efeito do extrato etanólico das cascas do caule de <i>L. pacari</i> nos testes do campo aberto e do nado forçado.....	67

4.3	Efeito das frações de EEP nos testes do campo aberto e do nado forçado	69
4.4	Avaliação da relação dose-efeito de FClor de <i>Lafoensia pacari</i> nos testes do campo aberto, do nado forçado e da suspensão pela cauda.....	71
4.5	Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito da FClor de <i>Lafoensia pacari</i> .....	73
4.6	Avaliação do envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito de FClor de <i>Lafoensia pacari</i> .....	75
4.7	Avaliação dos compostos detectados na FClor de <i>Lafoensia pacari</i> nos testes do campo aberto e do nado forçado .....	77
4.8	Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico e catecolaminérgico no efeito do lupeol .....	79
4.9	Avaliação da atividade da enzima MAO como possível mecanismo envolvido nos efeitos da FClor e do lupeol.....	82
4.10	Dosagem <i>ex vivo</i> do nível hipocampal de BDNF, CREB e CREB fosforilada no hipocampo de camundongos tratados com FClor ou lupeol .....	84
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>SUMÁRIO e CONCLUSÕES</b> .....	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>ARTIGO PUBLICADO NO JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY</b> .....	<b>123</b>
<b>9</b>	<b>PROTOCOLO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b> .....	<b>124</b>



# 1 INTRODUÇÃO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Depressão: prevalência, fisiopatologia e tratamento farmacológico

De forma geral, os transtornos depressivos são caracterizados por manifestações afetivas consideradas inadequadas em termos de intensidade, frequência e duração do quadro comportamental (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA, 2013). Os diferentes transtornos de humor talvez sejam tão antigos quanto os primórdios da humanidade. Hipócrates, no século IV a.C., foi quem inicialmente descreveu um transtorno de humor denominado por ele de *melancolia* (DORON e PAROT, 2001).

Esta condição altamente debilitante e de prevalência elevada em todo o mundo moderno constitui-se na verdade de distintas entidades nosológicas ou subtipos de depressão, que possuem vários sintomas e aspectos etiopatogênicos em comum. Os diferentes transtornos depressivos possuem diagnóstico complexo. Assim, o estudo dos sinais e sintomas do paciente que sofre de transtorno depressivo constitui-se no eixo central dos sistemas de classificação internacional de transtornos mentais (GRANDIN *et al.*, 2006; WARAICH *et al.*, 2004). Os sistemas mais conhecidos e utilizados são o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM), organizado pela Associação Americana de Psiquiatria (APA), e a Classificação Internacional das Doenças (CID), elaborada pela Organização Mundial de Saúde (FLECK *et al.*; 2009; WARAICH *et al.*, 2004).

O transtorno depressivo maior é uma condição debilitante, crônica, recorrente e que compromete muito a qualidade de vida do paciente e dos familiares, além de acarretar significativas perdas econômicas em função de queda de produtividade, demissões, afastamento do trabalho e gastos com o sistema de saúde. Este transtorno é a terceira causa mais comum de incapacidade com afastamento do trabalho e, segundo a última projeção da Organização Mundial de Saúde (OMS), se tornará a primeira em 2030. Ainda, de acordo com a OMS, a depressão ocupa o segundo lugar das doenças mentais mais prevalentes na clínica médica mundial e estima-se que 350 milhões de pessoas vivam com depressão num dado momento da vida (OMS, 2008; OMS, 2012).

Estudos de prevalência realizados por grupos de pesquisas independentes, e em diferentes países ocidentais, demonstram como a depressão é um transtorno frequente. Em 2011, estimava-se que a prevalência deste transtorno na população mundial era de cerca de 14%,

e que no Brasil subia para 18,4%, a maior entre os países em desenvolvimento e a terceira em termos globais (BROMET *et al.*, 2011). Apesar da elevada prevalência desta doença, estima-se que o problema possa ser ainda maior, pois acredita-se que cerca de 30 a 60% dos casos não são diagnosticados quando o paciente procura atendimento médico (FLECK *et al.*, 2009; RONALDS *et al.*, 1997; ROST *et al.*, 1998).

Segundo a quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais (DSM-5), os principais critérios para o diagnóstico da depressão são a constatação de humor deprimido e anedonia (perda da capacidade de sentir prazer na execução de atividades antes prazerosas) por, pelo menos, duas semanas, em associação com, pelo menos, mais quatro sintomas, como: sentimento de desesperança, desvalia, culpa, desamparo, alterações no apetite e sono, fadiga, retardo ou agitação psicomotora, diminuição do desempenho sexual, dificuldade de concentração e raciocínio, pensamentos recorrentes sobre morte, com ou sem tentativa de suicídio (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA, 2013).

A complexidade inerente à etiologia e ao curso dos transtornos depressivos tornam tanto o diagnóstico quanto o tratamento desafios contínuos para especialistas e pacientes. A falha na identificação da doença incorre em gastos desnecessários, persistência dos sintomas, redução da credibilidade no tratamento farmacológico. Estima-se ainda que de 25 a 50% dos pacientes com transtorno bipolar recebem erroneamente o diagnóstico inicial de depressão (GHAEMI *et al.*, 1999; HIRSCHFELD *et al.*, 2003; ANGST, 2007). Além disso, há evidências de que os próprios antidepressivos podem precipitar o desenvolvimento de episódios de mania, sendo este evento mais frequente com o uso de antidepressivos tricíclicos (estimado em 11,2%) em relação aos inibidores seletivos de recaptção de serotonina (estimado em 3,7%) (PEET, 1994; PARKER e PARKER, 2003).

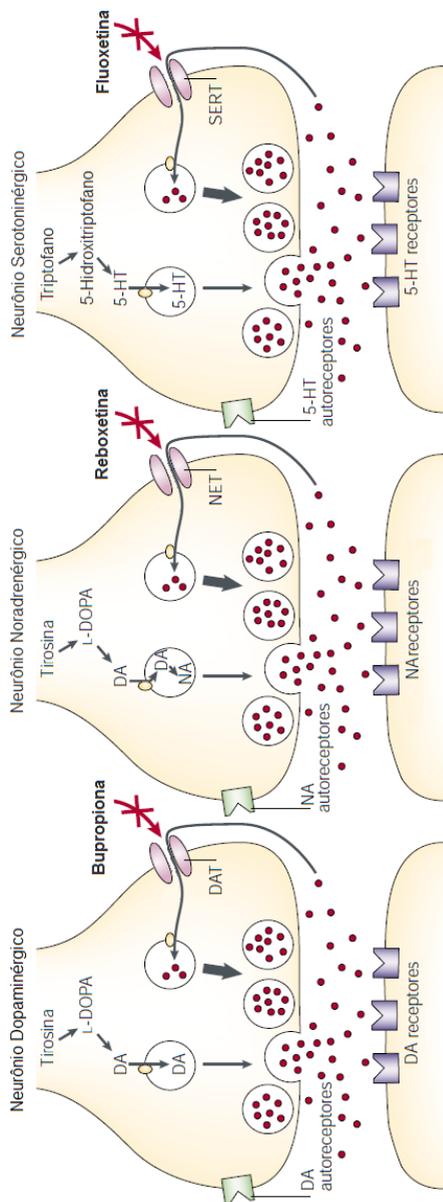
Não obstante, a estes e outros inconvenientes do tratamento com antidepressivos, diversos estudos epidemiológicos das últimas décadas demonstram que a prescrição destes fármacos promove melhora consistente nos sintomas e redução na frequência de suicídios entre os pacientes, sendo que quanto maior o período de tratamento menor a proporção de casos de morte por suicídio (FRANK *et al.*, 2001; JICK *et al.*, 2004; MOLLER, 2006; SIMON *et al.*, 2006).

Os primeiros fármacos antidepressivos foram descobertos por acaso. A iproniazida, o primeiro inibidor da monoamina oxidase (iMAO), era um fármaco utilizado no tratamento da tuberculose e como efeito colateral era observada uma melhora no humor dos pacientes (CRANE,

1956), enquanto que a imipramina, o primeiro antidepressivo tricíclico, foi sintetizada com o propósito de ser um fármaco antipsicótico (KUHN, 1958).

A descoberta do mecanismo de ação da iproniazida e da imipramina contribuíram para a elaboração da hipótese monoaminérgica da depressão, a qual postula que esta doença seria o resultado de um déficit na neurotransmissão de dopamina e noradrenalina, mas principalmente desta última, de modo que, os antidepressivos atuariam restabelecendo os níveis sinápticos destas monoaminas (SCHILDKRAUT, 1965). Posteriormente, nesta observação e no modelo teórico de descrição da manifestação clínica da depressão, foi incluído o papel da serotonina (COPPEN, 1967). Embora esta teoria não explique totalmente as alterações observadas na sintomatologia da depressão, a farmacoterapia atual está basicamente apoiada nela (O'LEARY *et al.*, 2014).

Os iMAOs, como a clorgilina e tranilcipromina, reduzem a metabolização das monoaminas, aumentando o armazenamento destes neurotransmissores nos grânulos secretores, enquanto que os antidepressivos tricíclicos, como a imipramina, inibem de maneira não seletiva os transportadores para monoaminas, reduzindo o processo de recaptção destes neurotransmissores pelo neurônio pré-sináptico e, conseqüentemente, aumentando a neurotransmissão monoaminérgica. Além dos iMAOs e dos tricíclicos, existem os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS), como a fluoxetina, de noradrenalina (ISRN), como a reboxetina, ou ambas (ISRSN), como a venlafaxina, e inibidores seletivos de recaptção de dopamina (ISRD), como a vanoxerina, além de inibidores seletivos de recaptção de dopamina e noradrenalina, como a bupropiona, que variam quanto à capacidade de inibir as proteínas transportadoras para noradrenalina, serotonina e dopamina. (BALDESSARINI, 2006). Alguns destes fármacos estão representados na Figura 1.



**Figura 1** – Representação esquemática de sinapses dopaminérgica, noradrenérgica e serotoninérgica, juntamente com exemplos de fármacos antidepressivos que inibem as proteínas transportadoras destas sinapses. 5-HT, serotonina; DA, dopamina; DAT, transportador de dopamina; L-DOPA, diidroxifenilalanina; NA, noradrenalina; NET, transportador de noradrenalina; SERT, transportador de serotonina. Adaptado de Torres *et al.* (2003).

Alguns antidepressivos reduzem a recaptação ou metabolização das monoaminas horas após a administração do fármaco. Entretanto, a melhora clínica é observada somente após semanas ou meses de tratamento. Esse *delay* levou à formulação da hipótese de que o resultado clínico não é dependente apenas do mecanismo de ação primário dos antidepressivos, mas de alterações funcionais e estruturais que os antidepressivos proporcionam, envolvendo alterações transcricionais que regulam a plasticidade neuronal (DUMAN e MONTEGGIA, 2006; NESTLER *et al.*, 2002).

Já outros antidepressivos, como a agomelatina e a quetamina, possuem mecanismo de ação distintos. A agomelatina é um antidepressivo novo no mercado, que atua com agonista dos receptores da melatonina MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>, e antagonista nos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2C</sub> (SAN e ARRANZ, 2008). Enquanto que a quetamina é um antagonista não competitivo do sítio da fenciclidina no receptor glutamatérgico NMDA (HIROTA e LAMBERT, 1996).

Dentre as adaptações que devem acontecer estão o aumento na liberação de serotonina no hipocampo, mediado por dessensibilização dos autoreceptores somatodendríticos 5-HT<sub>1A</sub>, um receptor inibitório acoplado à proteína G inibitória (Gi/Go) (BARNES e SHARP, 1999; BLIER e MONTIGNY, 1994; CELADA *et al.*, 2004). A liberação de serotonina no núcleo dorsal da rafe ativaria os autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> presentes nos corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos, inibindo a ativação destes. Estes neurônios emitem, a partir do núcleo da rafe, projeções para várias áreas cerebrais envolvidas com a depressão, como o hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal. Uma vez liberada destas projeções, a serotonina ativa os heteroreceptores serotoninérgicos, inclusive heteroreceptores 5-HT<sub>1A</sub> (ALBERT *et al.*, 1990).

Um sistema de regulação semelhante é encontrado na neurotransmissão noradrenérgica. Os autoreceptores noradrenérgico  $\alpha_2$  estão acoplados à proteína G inibitória (Gi/Go), inibindo a síntese e liberação de noradrenalina, e da mesma forma fármacos antidepressivos levariam a uma dessensibilização destes receptores aumenta a ativação dos neurônio noradrenérgico do *locus coeruleus* com consequente aumento da transmissão noradrenérgica (HEIN *et al.*, 1999; KNAUS *et al.*, 2007).

O uso prolongado de antidepressivos, principalmente ISRS, induz dessensibilização dos autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> do núcleo da rafe e de receptores noradrenérgico  $\alpha_2$ , suprimindo o sistema de *feedback* negativo e, como consequência, os neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos aumentam sua atividade e sua capacidade de liberar serotonina e

noradrenalina, respectivamente. Somente após essa neuroadaptação, o aumento efetivo da transmissão serotoninérgica e noradrenérgica nas áreas cerebrais envolvidas com a neurobiologia da depressão é alcançado e o efeito antidepressivo estabelecido (CELADA *et al.*, 2004).

Além de alterar a sensibilidade de receptores monoaminérgicos, os antidepressivos aumentam as cascatas de sinalização intracelular, principalmente as mediadas pela adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (AMPC) e pela proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPC (CREB - *AMPC response element binding protein*), com consequente aumento da expressão de fatores neurotróficos, tal como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF - *Brain-derived neurotrophic factor*); sendo estas alterações correlacionadas à atividade antidepressiva dos fármacos (NAKAGAWA *et al.*, 2002; NESTLER *et al.*, 2002; NIBUYA *et al.*, 1995).

Vários fatores têm chamado a atenção dos pesquisadores para a relação entre as neurotrofinas, o estresse e a depressão. Estudos de neuroimagem mostraram uma redução no volume hipocampal de pacientes depressivos (SHELIN *et al.*, 2003). Esta alteração seria consequência da exposição crônica a fatores estressores que ativam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e aumentam os níveis séricos de cortisol, o qual induziria uma perda neuronal no hipocampo (MOGHADDAM *et al.*, 1994; SAPOLSKY, 1985). Os fármacos antidepressivos, ou outras abordagens que possuem atividade antidepressiva como a eletroconvulsioterapia, aumentam tanto a expressão de BDNF (NIBUYA *et al.*, 1995), quanto a neurogênese hipocampal (MALBERG *et al.*, 2000), contrapondo-se aos efeitos deletérios do estresse. O aumento na expressão de BDNF e da neurogênese podem ser vias comuns pelas quais os antidepressivos exercem seus efeitos terapêuticos, como postula a hipótese neurotrófica da depressão (NESTLER *et al.*, 2002).

Além das monoaminas e neurotrofinas acredita-se que há o envolvimento do sistema glutamatérgico na fisiopatologia da depressão, via participação de seu receptor ionotrópico N-metil-D-Aspartato (NMDA). Sabe-se que a ativação deste receptor desencadeia um processo de excitotoxicidade nas células hipocampais (LIPTON e ROSENBERG, 1994; ZARATE *et al.*, 2002), sendo o tratamento crônico com antidepressivos capaz de reverter essa disfunção na liberação de glutamato (BONANNO *et al.*, 2005). Outras evidências do envolvimento deste sistema são os resultados obtidos com a cetamina, um antagonista do receptor NMDA que apresenta efeitos antidepressivos em tempo muito menor que os fármacos clássicos, pois além de reduzir o tempo de imobilidade em testes pré-clínicos, aumenta o nível hipocampal da

neurotrofina BDNF uma hora após o tratamento (GARCIA *et al.*, 2008) e, em ensaios clínicos, promove rapidamente alterações no estado emocional dos pacientes (MURROUGH *et al.*, 2013; ZARATE *et al.*, 2006).

Além disso, a observação de que pacientes depressivos apresentam níveis sanguíneos elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina (IL) 1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (DOWLATI *et al.*, 2010; MIKOVA *et al.*, 2001), sugere a ativação do sistema imune nesta doença (SMITH, 1991), e isto levou à elaboração de outra hipótese sobre a etiologia da depressão. Esta teoria, que tem ganhado destaque ultimamente, postula que, ao menos em parte, os sintomas relacionados ao transtorno depressivo resultam de aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e de uma redução das citocinas anti-inflamatórias, de modo que as citocinas pró-inflamatórias atuam como neuromoduladoras da atividade neural e podem influenciar negativamente as transmissões sinápticas monoaminérgicas, além de ativarem o sistema neuroendócrino (LEONARD, 2001, 2007; SCHIEPERS *et al.*, 2005).

Há pacientes que são refratários ao primeiro antidepressivo utilizado, fato que dificulta a melhora clínica. Além disso, quanto mais fármacos diferentes são necessários para alcançar a remissão, maior é a probabilidade do paciente apresentar recaídas após o fim do tratamento (KATZ *et al.*, 2004; RUSH *et al.*, 2006).

Aliada à limitação relacionada à demora na melhora clínica, parte dos pacientes desiste do tratamento devido aos efeitos colaterais, tais como xerostomia, constipação, visão turva, sedação, retenção urinária, relacionadas ao uso dos antidepressivos tricíclicos, mas também náuseas, vômitos, cefaleias e disfunção sexual, incluindo inibição da ejaculação e atenuação do orgasmo nas mulheres, mais frequentemente relacionadas ao uso de ISRS (BALDESSARINI, 2006; KATZ *et al.*, 2004; RUSH *et al.*, 2006). Portanto, faz-se necessário novas opções farmacológicas que possam apresentar menos efeitos colaterais, maior eficácia e com a capacidade de promover melhora clínica em um menor tempo de tratamento.

Neste contexto, os produtos naturais, dentre eles as plantas, são importante fonte de estudo na busca por novos fármacos (CRAGG e NEWMAN, 2013; HARVEY, 2008; KOEHN e CARTER, 2005; MOLINARI, 2009; NEWMAN e CRAGG, 2012).

## 1.2 Estudo com plantas medicinais

Os produtos naturais, dentre os quais destacamos as plantas medicinais, são responsáveis por diversos fármacos utilizados na terapêutica como, por exemplo: a codeína, a morfina, a quinina, os digitálicos, a atropina, a papaverina, a vincristina, a vimblastina e o taxol, bem como de vários compostos que são utilizados como ferramentas farmacológicas para pesquisa científica, como a muscarina, a pilocarpina, a nicotina, a ioimbina, a forskolina e a reserpina (NEWMAN e CRAGG, 2012; HARVEY, 2008; RATES, 2001).

Os produtos naturais também são protótipos na obtenção de novas entidades químicas, tal como a procaína e a benzocaína que foram sintetizadas a partir do conhecimento sobre a estrutura química da cocaína (CALIXTO, 2000; CRAGG e NEWMAN, 2013; HARVEY, 2008; NEWMAN e CRAGG, 2012; RATES, 2001; VIEGAS Jr et al., 2006).

O uso de plantas para mitigar males e enfermidades pela espécie humana está intimamente ligado ao seu próprio desenvolvimento. As plantas tradicionalmente utilizadas foram selecionadas através do acúmulo secular de conhecimento (SÁ e ELISABETSKY, 2012). No Brasil, as plantas que são utilizadas é resultado da interação entre as culturas africanas (principalmente Yorubá e Bantu), europeias (principalmente portuguesa) e de nativos indígenas (SÁ e ELISABETSKY, 2012).

As plantas que possuem a capacidade de influenciar a atividade do sistema nervoso central (SNC) sempre chamaram a atenção do homem, uma vez que seu uso sempre foi rodeado por superstições místicas, pensamentos mágicos e rituais religiosos (CARLINI, 2003). Muitas espécies vegetais com atividade no SNC são utilizadas até hoje, por exemplo, como estimulantes: *Coffea arabica* L. e a *Paullinia cupana* Kunth, ou como ansiolíticas: *Passiflora spp.*, *Piper methysticum* G. Fors e *Valeriana officinalis* L. (CARLINI, 2003; McCLATCHEY et al., 2009).

Apesar do enorme avanço científico obtido nos processos analíticos e metodologias de isolamento e identificação, na maioria dos casos não se conhece os princípios ativos responsáveis pela atividade neurofarmacológica das plantas medicinais ou dos fitoterápicos (CALIXTO, 2000; McCLATCHEY et al., 2009), pois são escassos os estudos biomonitorados em que foi possível isolar e caracterizar quimicamente os princípios psicoativos (McCLATCHEY et al., 2009; RATES, 2001).

Segundo uma pesquisa realizada no banco de dados PubMed Central®, em fevereiro de 2015, utilizando como palavras-chave *antidepressant AND herbal*, foram publicados 527 artigos entre os anos de 1986 e 2014. No entanto, apesar deste grande número de publicações, o único medicamento fitoterápico para o tratamento de transtornos depressivos é aquele produzido a partir de *Hypericum perforatum* L., cujo estudo foi feito na ordem inversa à tradicional, primeiro o estudo clínico e depois o pré-clínico (LINDE *et al.*, 1996).

Muitas são as dificuldades encontradas tanto no processo de produção, quanto nas etapas de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, e dentre os motivos, constantemente são discutidas a falta de articulação e interação entre as áreas do conhecimento envolvidas na pesquisa pré-clínica (químicos/fitoquímicos, farmacologistas e profissionais da etnobiologia), o alto custo e o risco dos projetos, o tempo necessário, o baixo número de empresas interessadas e a pouca experiência na área de inovação tecnológica das empresas e pesquisadores (BRAZ-FILHO, 1994; CALIXTO e SIQUEIRA, 2008; McCLATCHEY *et al.*, 2009; RATES, 2001).

Porém, os trabalhos recentes conduzidos pelo pesquisador brasileiro João Batista Calixto, tornaram possível o desenvolvimento do primeiro fitoterápico 100% brasileiro, o Acheflan® produzido a partir da espécie vegetal *Cordia verbenacea* DC, demonstrando que é possível a obtenção de medicamentos baseados em nossa biodiversidade (FERNANDES *et al.*, 2007; MEDEIROS *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2007; TORRES, 2008).

Como citado anteriormente, o único fitoterápico antidepressivo com registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é produzido a partir das partes aéreas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae). Esta é uma planta herbácea com flores amarelas em forma de estrela com estames compridos e folhas opostas salpicadas de pontos glandulares transparentes (SCHULZ *et al.*, 2002).

O *H. perforatum*, conhecido popularmente como erva-de-são-joão ou hipérico, têm sido utilizado pela humanidade desde a Grécia antiga. No desenrolar da História, há evidências de que Dioscorides, Galeno e Paracelsus utilizavam o hipérico para fins medicinais (ISTIKOGLU *et al.*, 2010). Na Antiguidade, acreditava-se que esta planta oferecia proteção contra maus espíritos e má sorte, e era utilizada por curandeiros como remédio para as mentes melancólicas ou perturbadas, condições que hoje chamamos de depressão e ansiedade, além de seu uso como tônico para os nervos (ISTIKOGLU *et al.*, 2010; NEWALL *et al.*, 1996).

Segundo estudos de meta-análise, o hipérico é tão eficaz na clínica quanto os ISRS, como a fluoxetina e a sertralina (LINDE *et al.*, 2008; RAHIMI *et al.*, 2009). Esta eficácia é atribuída aos compostos hiperforina e a hipericina, que atuam como iMAOs e antidepressivos tricíclicos (SUZUKI *et al.*, 1984; MÜLLER *et al.*, 1998). Dentre estes compostos, a hipericina é considerada a mais importante e é utilizada como marcador fitoquímico na padronização do medicamento fitoterápico (ANVISA, 2014; RUSSO *et al.*, 2014).

No entanto, apesar de sua eficácia clínica, sabe-se que o hipérico pode causar fotossensibilização e, até mesmo, fototoxicidade, além de interações medicamentosas devido à sua capacidade indutora sobre as enzimas do citocromo P450 (BARNES *et al.*, 2001; BLUMENTHAL *et al.*, 1998; ERNST, 1999). Portanto, apesar de sua eficácia e aceitação por parte dos pacientes, há necessidade de desenvolver novas opções terapêuticas, dotadas de menos efeitos colaterais e com menor risco de interações medicamentosas.

### 1.3 Descrição botânica e distribuição geográfica da *Lafoensia pacari* A. St.-Hil.

A *Lafoensia pacari* Saint-Hil. é uma Angiosperma da família Lythraceae utilizada principalmente na medicina tradicional dos estados de Goiás e Mato Grosso (CABRAL e PASA, 2009; SOUZA e FELFILI, 2006).

A família Lythraceae compreende 31 gêneros com aproximadamente 600 espécies de distribuição pantropical, com alguns representantes herbáceos e subarbustivos de regiões temperadas. No Brasil, nove gêneros podem ser encontrados, sendo o *Cuphea* e o *Diplusodon* os mais ricos em número de espécies. As Lythraceae são frequentemente cultivadas para fins de ornamentação, podem produzir madeira de boa qualidade, e ainda são utilizadas como fonte de pigmentos, geralmente amarelo, estes retirados da casca do caule, madeira ou folhas de algumas espécies do gênero *Lafoensia* (CAVALCANTI *et al.*, 2001).

O gênero *Lafoensia* Vand. é encontrado apenas nas Américas, o chamado Novo Mundo, compreendendo cinco ou seis espécies de porte arbustivo a árvores altas (GRAHAM, 2013). As espécies deste gênero possuem como característica inflorescências terminais em ramos racemiformes ou tirsoides, folhosos ou não, multifloros ou com poucas flores de pétalas brancas ou amarelas (MEIRA, 2000).

A *L. pacari* (Figura 2), sinônimas botânicas *Lafoensia sessilifolia* Klotzch e *Lafoensia pacari* Saint-Hilaire ssp. *petiolata* Koehne, possui porte arbóreo, podendo atingir até 18 m de altura (CARVALHO *et al.*, 1994; LORENZI, 2002).



**Figura 2** – Partes aéreas de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., evidenciando flores (A), frutos (B) e caule (C). Fonte: <http://www.pirenopolis.tur.br/meioambiente/herbariodigital/Lythraceae/Lafoensia/pacari>. Acesso em 20 de Fevereiro de 2014.

Por volta de 1820, o botânico francês Auguste de Saint Hilaire descreveu *L. pacari* durante sua viagem ao interior do Brasil, quando passou pela Capitania de Goyaz, atuais estados de Goiás e Tocantins. O nome do gênero *Lafoensia* foi uma homenagem ao segundo Duque de Lafões, D. João Carlos de Bragança (1719-1806), fundador da Academia das Ciências de Lisboa, enquanto que o epíteto científico adotado por ele foi o próprio nome popular regional que já era usado na época, pacari, um nome de origem tupi que significa “árvore de madeira preciosa” (LOURTEIG, 1969 *apud* CARVALHO *et al.*, 1994).

A espécie em questão possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrada nos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, chegando até Santa Catarina, além do Paraguai e Bolívia. Tal fato resultou em vários nomes populares, sendo pacari o mais utilizado em Goiás e mangaba-brava o mais frequente nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Já em São Paulo os nomes dedaleiro ou didal são empregados e, em Santa Catarina, o nome popular é louro-da-serra (MARTINS *et al.*, 2008; LORENZI, 2002).

Na medicina popular, a casca do caule e as folhas de *L. pacari* apresentam uma ampla utilização, na forma de decocto ou macerado, para o tratamento de gastrite, úlceras gástricas, feridas, dor, inflamações sistêmicas e locais, câncer, coceira, diarreia, problemas renais, além de ser usado como antitérmico, emagrecedor, cicatrizante e tônico para o

corpo contra desânimo (CABRAL e PASA, 2009; CORRÊA, 1984; POTT e POTT, 1994; TONELLO, 1997).

Diversos trabalhos com esta espécie demonstraram a existência de variadas atividades farmacológicas para a *L. pacari*. Os extratos da planta são dotados de atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e gastroprotetora. Embora tenham sido realizados poucos estudos biomonitorados com esta espécie, nos trabalhos em que houve isolamento de algum constituinte, o mais frequente foi o ácido elágico. Foi ainda demonstrado que este composto é responsável pelos efeitos anti-inflamatório, antioxidante e gastroprotetor dos extratos de *L. pacari* (Quadro 1).

Às vezes as indicações tradicionais para os quais as plantas medicinais são utilizadas devem ser “traduzidas” ou interpretadas pelos pesquisadores que estão coletando os dados etnofarmacológicos (RATES, 2001). Por várias vezes, nos deparamos com plantas usadas popularmente como tônicas apresentando efeito em testes preditivos de atividade antidepressiva, tais como o *Panax ginseng* C.A. Meyer (DANG *et al.*, 2009), a *Trichilia catigua* Juss (TACIANY-BONASSOLI *et al.*, 2012), o *Acanthopanax koreanum* Nakai (JUNG *et al.*, 2013), a *Eugenia brasiliensis* Lam. (COLLA *et al.*, 2012) e o *Ptychopetalum olacoides* Bentham (PIATO *et al.*, 2008).

O uso popular como tônico contra desânimo, aliado aos nossos resultados prévios com o extrato etanólico das cascas do caule de *L. pacari*, que após administração pela via oral por 21 dias (100, 300 e 1000 mg/kg) reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, resultado sugestivo de efeito antidepressivo (GALDINO *et al.*, 2009), nos motivaram a continuar estudando este extrato, a fim de comprovar nossa hipótese preliminar: o extrato de *L. pacari* possui constituintes neuroativos capazes de promover atividade de tipo antidepressiva.

**Quadro 1** - Atividades farmacológicas da espécie *Lafoensia pacari* A. St.Hil.

<b>Atividade avaliada</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Tipo de extrato</b>	<b>Composto responsabilizado pelo efeito</b>	<b>Referências</b>
Antinociceptiva em camundongos	Casca do caule	Aquoso	-	Matos <i>et al.</i> , 2008
Anti-edematogênica em camundongos	Casca do caule	Aquoso	-	Matos <i>et al.</i> , 2008
Anti-inflamatória e anti-edematogênica, em camundongos	Casca do caule	Etanólico	Ácido elágico	Albuquerque <i>et al.</i> , 1996; Rogério <i>et al.</i> , 2003, 2006 e 2008;
Antipirética em ratos	Casca do caule	Etanólico	-	Rogério <i>et al.</i> , 2006
Antiasmática em camundongos	Casca do caule	Etanólico	Ácido elágico	Rogério <i>et al.</i> , 2008
Ansiolítica	Casca do caule	Etanólico	-	Galdino <i>et al.</i> , 2010
Antinociceptiva em camundongos	Casca do caule	Etanólico	-	Nascimento <i>et al.</i> , 2011
Anti-bacteriana	Casca do caule	Etanólico	-	Pereira <i>et al.</i> , 2011
Antifúngica	Casca do caule	Etanólico	-	Silva Jr <i>et al.</i> , 2010; Queiroz-Silva <i>et al.</i> , 2012
Gastroprotetora em ratos	Casca do caule	Metanólico	Ácido elágico	Tamashiro Filho <i>et al.</i> , 2012
Gastroprotetora em seres humanos	Casca do caule	Metanólico	Supostamente o Ácido elágico	Menezes <i>et al.</i> , 2006
Anti-oxidante	Casca do caule	Metanólico	Ácido elágico	Sólon <i>et al.</i> , 2000
Anti-bacteriana	Casca do caule e folhas	Etanólico	-	Lima <i>et al.</i> , 2006
Antinociceptiva em camundongos	Folhas	Etanólico	-	Guimarães <i>et al.</i> , 2010
Anti-inflamatória e anti-edematogênica em camundongos	Folhas	Etanólico	-	Guimarães <i>et al.</i> , 2010
Anti-viral	Folhas	Metanólico	-	Müller <i>et al.</i> , 2007
Antidepressiva	Casca do caule	Etanólico	-	Galdino <i>et al.</i> , 2009

#### 1.4 Testes preditivos de atividade antidepressiva

Diversos protocolos experimentais foram propostos na tentativa de avaliar os diferentes aspectos do comportamentos relacionados à depressão em roedores, tal como utilizar o teste de consumo de sacarose para estimar a anedonia, usar a distância percorrida em uma roda de atividade como medida de fadiga ou realizar protocolos que avaliam a memória de trabalho para inferir sobre a concentração. Mesmo assim, muitos dos sintomas utilizados no diagnóstico da depressão, tais como sentimento de culpa e pensamentos recorrentes sobre morte, dependem da expressão verbal para serem identificados, e são impossíveis de serem modelados em roedores (CRYAN e MOMBÉREAU, 2004).

Para ser considerado um modelo animal relevante, este deve possuir validade analógica, teórica ou preditiva (WILLNER, 1986). A validade analógica é a capacidade de um modelo mimetizar os sintomas do transtorno (McKINNEY e BUNNEY, 1969). A validade teórica corresponde à capacidade do modelo em reproduzir os mecanismos neurobiológicos relacionados à etiologia do transtorno (WILLNER, 1986), o que é um grande desafio, pois a mesma não é completamente compreendida. Já a validade preditiva é a capacidade de um dado parâmetro avaliado no teste ser alterado de modo a antever se a substância em análise será eficaz em humanos (RUSSELL, 1964 *apud* WILLNER, 1986, van der STAAY *et al.*, 2009).

Os dois testes mais utilizados em avaliações em fase pré-clínica de fármacos com potencial antidepressivo, apesar das limitações, são o teste do nado forçado (NF) (PORSOLT *et al.*, 1977) e o teste de suspensão pela cauda (TSC) (STÉRU *et al.*, 1985), pois ambos possuem uma boa validade preditiva.

O NF é baseado na observação de que roedores colocados em um cilindro com água, uma situação inescapável, adotam uma postura de imobilidade ou apenas expressam movimentos leves para deixar sua cabeça emersa, após passar por um período inicial tentando escapar. A administração, aguda ou crônica, de fármacos antidepressivos aumenta o tempo que o animal passa tentando sair desta situação, reduzindo, portanto sua imobilidade (PORSOLT *et al.*, 1977, 1978). O TSC em camundongos é baseado na mesma premissa do NF: o animal quando submetido a essa situação estressante (ser suspenso pela cauda) apresenta o comportamento de imobilidade após períodos de agitação, de modo que antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade (STÉRU *et al.*, 1985).

O comportamento de imobilidade que os animais apresentam nestes testes é interpretado como um “desespero comportamental”, que modelaria os sentimentos de tristeza, retardo psicomotor e fadiga (PORSOLT *et al.*, 1977, 1978; STÉRU *et al.*, 1985), de modo a se relacionar com as alterações psicológicas da depressão (DIXON, 1998; GILBERT e ALLAN, 1998; LUCKI *et al.*, 2001). Há também a interpretação de que a imobilidade se trata de uma estratégia para preservação de energia ou mesmo uma relutância em fazer esforço (CRYAN *et al.*, 2005). Portanto, a redução no comportamento passivo, interpretada como um efeito do tipo-antidepressivo, não é devida a um aumento na atividade locomotora, mas este aumento poderia levar a resultados falso-positivos (COSTA *et al.*, 2013; SLATTERY e CRYAN, 2012).

Além do NF e TSC, existem outros protocolos experimentais que podem ser utilizados no estudo das bases neurobiológicas da depressão e na triagem de fármacos antidepressivos, dentre eles podemos citar como exemplo a bulbectomia olfatória (CAIRNCROSS *et al.*, 1978) e, os testes baseados na exposição a estímulos estressores tais como o desamparo aprendido (MAIER e SELIGMAN, 1976), a separação materna (FRANCIS *et al.*, 1999), o estresse crônico imprevisível (WILLNER *et al.*, 1987) a derrota social (KUDRYAVTSEVA *et al.*, 1991) e a administração crônica de corticosterona (GOURLEY *et al.*, 2008).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi determinar o perfil fitoquímico e realizar o fracionamento bio-monitorado do extrato etanólico da casca do caule de *L. pacari*, avaliando as alterações comportamentais induzidas por este extrato, suas frações e constituintes em testes preditivos de atividade antidepressiva e as possíveis contribuições do sistema monoaminérgico para este efeito.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter o perfil fitoquímico do extrato etanólico da casca do caule de *L. pacari* e frações.
- Avaliar as alterações comportamentais induzidas pelo extrato etanólico das cascas do caule de *L. pacari* e frações no teste de campo aberto e no teste do nado forçado.
- Caracterizar a relação dose-efeito da fração com melhor atividade nos testes de campo aberto, nado forçado e suspensão pela cauda.
- Analisar qual dos compostos detectados na fração que melhor mimetiza o efeito desta fração no teste de nado forçado.
- Investigar o envolvimento dos sistemas serotoninérgico e catecolaminérgico no efeito da fração clorofórmica e do lupeol.
- Investigar se a inibição da enzima MAO está envolvida entre os possíveis mecanismos de ação da fração clorofórmica e do lupeol.
- Analisar se os efeitos induzidos pelos tratamentos com o extrato, fração ativa e constituintes estão relacionados às alterações do nível hipocampal de BDNF e a alteração na via de sinalização mediada por CREB.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

As cascas do caule de *L. pacari* A. St.-Hil. foram coletadas em uma região de Cerrado próximo à cidade de Bela Vista, Goiás, Brasil (837 m, 16°58'54,2" S, 40°55'45,1" O). As amostras foram autenticadas pelo Prof. Dr. José Realino de Paula (Professor de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás) e a exsiccata número UFG-27.031 foi depositada no Herbário da UFG. As cascas foram cortadas em pedaços menores para então serem dessecadas à 40°C por 48 h. Posteriormente este material vegetal foi triturado em moinho de facas, acondicionado em sacos plásticos e armazenado sob refrigeração a - 20°C, até ser utilizado no processo extrativo.

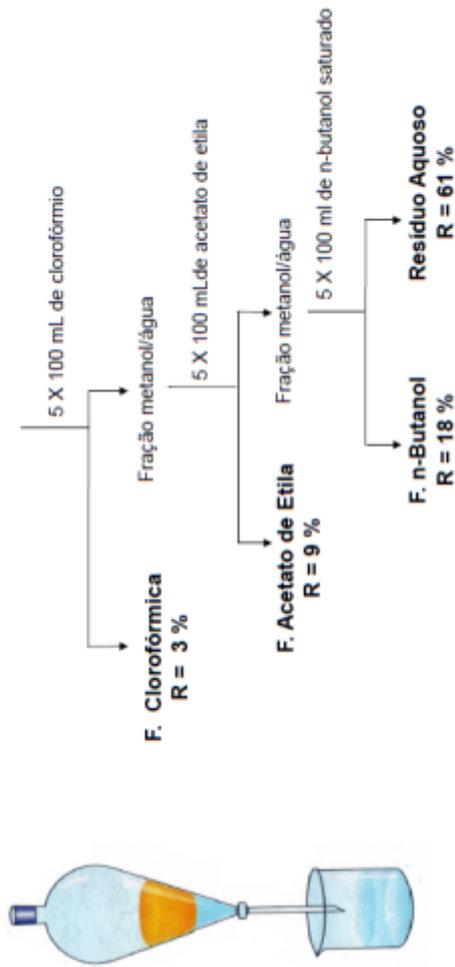
#### 3.2 Obtenção do extrato etanólico das cascas do caule de *L. pacari* A. St.Hil. (EEP) e frações

As cascas do caule foram submetidas ao processo de maceração em solução hidro-alcoólica 70% (v/v) na proporção de 5% (m/v), sob agitação ocasional por 72 h, seguido por filtração e concentração em rotaevaporador operado a 40°C, para retirar o solvente. Este processo extrativo apresentou um rendimento de 16%, em relação à massa inicial do material vegetal e originou o extrato etanólico bruto de pacari (EEP). Para a obtenção das frações o EEP seco foi submetido ao processo de extração líquido-líquido, no qual 20 g do extrato seco foi solubilizado em 400 mL de solução de metanol:água (1:9), uma mistura de solventes polares, e particionado com solventes imiscíveis, com polaridade crescente: clorofórmio, acetato de etila e n-butanol.

Após transferida a fração metanol/água para um funil de separação, foi adicionado 100 mL de clorofórmio, agitou-se e após a separação das fases, a fase clorofórmica foi recolhida em um recipiente limpo e seco, sendo este procedimento repetido por mais quatro vezes. Procedeu-se de modo semelhante para o acetato de etila e n-butanol.

Os solventes das frações foram rotaevaporados e depois dessecados sob corrente de ar frio até a massa permanecer constante. Desta forma, as frações clorofórmica (FClor), acetato de etila (FAcEt), n-butanol (FBut) e aquosa (FAq) foram obtidas. Posteriormente a fração aquosa foi dessecada sob ar frio. O rendimento de cada fração foi calculado em relação ao extrato seco (Figura 3). As frações foram armazenadas em frascos âmbar, a 4°C.

20 g de **EEP** solubilizado em  
400 mL de metanol/água (1:9)



**Figura 3** – Fluxograma da partição líquido-líquido realizada com EEP e rendimentos de cada fração obtida.

### 3.3 Análises fitoquímicas

#### 3.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A análise do perfil fitoquímico do extrato bruto e frações foi realizada por cromatografia em camada delgada desenvolvida em cromatoplasas em sílica gel (Whatman 20 x 20 cm, UV 254, 0,25 mm), utilizando-se cuba cromatográfica previamente saturada com as fases móveis compostas por: a) hexano:acetato de etila (4:1), b) clorofórmio:acetato de etila (1:1), c) clorofórmio:etanol:água (20:8:1), d) n-butanol:etanol:ácido acético (5:1:3) e e) acetato de etila:acetona:ácido acético:água (6:2:1:1).

As eluições cromatográficas foram reveladas com i) anisaldeído para detecção de terpenos e esteroides, ii) cloreto férrico para detecção de compostos fenólicos como, por exemplo, taninos, iii) vanilina sulfúrica, que pode detectar várias classes de metabólitos secundários, como terpenos, gerando manchas azuladas, e saponinas, revelando manchas rosadas, iv) reagente de produtos naturais e visualização em luz UV em 365 nm, para detecção de flavonoides e v) reagente de Dragendorff, para detecção de alcaloides (WAGNER e BLADT, 1996).

#### 3.3.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

Foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (EM) modelo 17A/QP5050A (Shimadzu®, Kyoto, Japão), pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da USP, São Paulo, sob supervisão da Profa. Dra. Luce Maria Brandão Torres. O conjunto das condições de análise foi: gás hélio como carreador sob fluxo isocrático de 1 mL/min; volume de injeção da FClor solubilizado em clorofórmio de 1 µL; temperatura de injeção de 280°C; coluna capilar BPX5 (apolar) (30 m x 0,25 mm) inserida em compartimento com temperatura controlada à 100°C com auxílio de termostato; temperatura de interface de 280°C; modo de ionização do EM operando com impacto de elétrons à 70 eV.

Os espectros obtidos foram comparados pela Profa. Dra. Luce Maria Brandão Torres com o banco de dados da biblioteca do *software* NIST (*National Institute of Standards and Technology Mass Spectral Library 08 MS Search Program v. 2.0*).

### 3.3.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz)  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) e *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence* (HMQC – correlação heteronuclear múltiplo-quântica) de FClor foram obtidos em espectrômetro modelo DRX-500 (Bruker) pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da USP, São Paulo, sob supervisão da Profa. Dra. Luce Maria Brandão Torres.

O clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) foi utilizado como solvente e o tetrametilsilano (TMS; 0,0 ppm) como padrão interno para os deslocamentos químicos ( $\delta$ , ppm). Em alguns casos, o pico do solvente foi utilizado para referência. Os compostos foram identificados com base na comparação com dados da literatura, sendo esta análise realizada pela Profa. Dra. Luce Maria Brandão Torres.

### 3.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de fotodiodos

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em equipamento Waters (Massachusetts, EUA), equipado com bomba quaternária, módulo de separação e2695, detector de arranjo de fotodiodo (Photodiode Array Detector - PDA) 2998 e sistema de processamento de dados Enpower 2.0, pertencentes ao Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFG, sob orientação da Dra. Joelma Abadia Marciano de Paula.

A fase móvel foi composta por mistura de acetonitrila:água (9:1). O volume de injeção foi de 30  $\mu\text{L}$ . As separações cromatográficas foram conduzidas sob fluxo isocrático de 1,0 mL/min em coluna de fase reversa Luna RP C-8 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 110Å - Phenomenex, Torrance, CA, EUA) à temperatura ambiente. O tempo total de eluição foi fixado em 40 min e detecção foi feita à 202 nm. A aquisição e a análise dos dados foram feitas empregando um módulo controlador acoplado a um computador com *software* Enpower 2.0 (protocolo adaptado de Oliveira *et al.*, 2012).

As amostras de extrato bruto, FClor e padrões foram dissolvidas em acetonitrila e filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e a fase móvel em membrana de PVDF 0,45  $\mu\text{m}$ . Todos os solventes utilizados foram de grau cromatográfico. Paralelamente às amostras, soluções padrão de lupeol, ácido oleanólico (Santa Cruz),  $\beta$ -sitosterol, ácido ursólico,  $\alpha$ -amirina (Sigma) e acetato de lupeol (acetilado previamente no

Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais - UFG) foram injetadas para comparação dos respectivos tempos de retenção.

### 3.4 Animais

Camundongos *Swiss* machos adultos, com cerca de 3-4 meses, pesando entre 30-40 g, foram utilizados em todas as avaliações. Os animais foram mantidos em grupos de 15 ou 20 animais por caixa de polipropileno (41 x 34 x 16 cm).

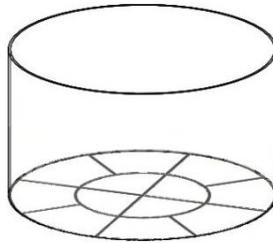
Os experimentos comportamentais foram realizados na Universidade Federal de Goiás. Para tanto, os animais foram fornecidos pelo Biotério Central desta instituição e mantidos no Biotério do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais do Departamento de Farmacologia/ICB/UFG, sob condições controladas de temperatura ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h, com as luzes ligadas às 7:00 h), com livre acesso a água e ração, por um período mínimo de uma semana, para habituação às condições deste local, até serem utilizados nos procedimentos experimentais, conduzidos durante a fase clara do ciclo claro-escuro (entre 13 e 18 h).

Os experimentos foram executados de acordo com os padrões internacionais de bem-estar animal recomendados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Goiás (CEP nº 104/2008), e executados em conformidade com os procedimentos adotados pelo Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA PP00798). Para o tratamento por via oral foi utilizada uma cânula intra-gástrica.

### 3.5 Testes comportamentais

#### 3.5.1 Campo aberto

O campo aberto consiste de uma arena circular com 36 cm de diâmetro e 20 cm de altura com o piso da arena dividido em círculos concêntricos (Figura 4). Os animais foram colocados individualmente no centro da arena para ser avaliada a sua atividade locomotora, medida pelo número de áreas cruzadas com as quatro patas, durante o período de 5 min (ARCHER, 1973). Entre cada sessão, esta arena era limpa com etanol 10%.



**Figura 4** – Modelo representativo do aparato utilizado no teste do campo aberto.

### **3.5.2 Teste do nado forçado**

Cada camundongo foi individualmente colocado em um cilindro plástico (18 cm de diâmetro e 42 cm de altura) com coluna (de 30 cm) de água (temperatura  $24 \pm 1$  °C). Cada sessão teve duração de 6 min e durante este período foi registrado o tempo de imobilidade, quando o animal reduzia sua movimentação, realizando movimentos mínimos para manter a cabeça acima da água (PORSOLT *et al.*, 1978). Para a análise da alteração comportamental induzida pelas diferentes doses de FClor, além deste parâmetro foram avaliados os comportamentos de natação, quando o animal nada circundando a parede interna do cilindro, e de escalada, definido como os movimentos vigorosos com as patas dianteiras direcionados para a parede do cilindro. Entre cada sessão, a água era trocada e o recipiente limpo com etanol 10%.

### **3.5.3 Teste da suspensão pela cauda**

Para este teste os animais eram suspensos individualmente pela cauda, a cerca de 50 cm do chão, com o auxílio de fita adesiva colocada a 1-2 cm da ponta da cauda e por 6 min era avaliado o tempo de imobilidade apresentado pelo animal (STÉRU *et al.*, 1985).

## **3.6 Avaliações bioquímicas**

### **3.6.1 Análise *in vitro* da atividade da enzima MAO**

#### *3.6.1.1 Obtenção da fração enriquecida em mitocôndria*

Para a obtenção da fração enriquecida em mitocôndria, utilizada como fonte da enzima MAO, dois camundongos sem qualquer

manipulação prévia (*naive*) foram submetidos à eutanásia por decapitação, e os fígados utilizados com fonte de extração, pois são os órgãos com maior concentração dessa enzima, foram rapidamente removidos e lavados com tampão fosfato de potássio gelado (0,2 M, pH 7,6, 4°C) para retirar o excesso de sangue. Os tecidos foram homogeneizados em aparelho Turrax® em 4 volumes de solução de sacarose 0,32 M em tampão fosfato de potássio gelado à 4°C. O homogeneizado tecidual foi centrifugado a 1.200 x g, por 7 min, à 4°C, e o sobrenadante obtido foi coletado e centrifugado a 12.500 x g, por 15 min, à 4°C. O precipitado foi então ressuspenso na solução de sacarose para ser recentrifugado sob as mesmas condições. O precipitado final, considerado como a fração enriquecida em mitocôndrias, foi então ressuspenso em 1 mL de solução de KCl 3,6 mM em tampão fosfato de potássio e armazenado em alíquotas à -20°C por, no máximo, quatro dias. A quantidade de proteínas desta solução foi avaliada pelo método de Bradford (1976), utilizando como padrão a albumina de soro bovino. Para o uso a concentração proteica foi ajustada com tampão fosfato de potássio para 0,2 mg/mL.

### 3.6.1.2 Determinação da atividade da enzima MAO

O ensaio colorimétrico da atividade da enzima MAO foi realizado em placa de 96 poços, a partir do protocolo proposto inicialmente por Holt *et al.* (1997) e modificado por Stafford *et al.* (2007). Cada poço teste continha 120 µL de tiramina 2,5 mM em tampão fosfato de potássio (0,2 M, pH 7,6), utilizada como substrato, 40 µL de solução cromogênica composta por ácido vanílico 2 mM, 4-aminoantipirina 1 mM e peroxidase 8 U/mL em tampão de fosfato de potássio, 40 µL da solução de fração enriquecida em mitocôndria 0,2 mg/mL e 40 µL de solução da amostra a ser testada. No poço “branco” a solução cromogênica foi substituída por tampão fosfato de potássio. A placa foi incubada por 30 min à 37°C e, posteriormente, a coloração desenvolvida foi lida espectrofotometricamente à 498 nm. Para diferenciar as atividades da MAO tipo A e B, as frações enriquecidas em mitocôndria foram pré-incubadas com clorgilina (250 nM - inibidor seletivo da MAO-A) ou pargilina (250 nM - inibidor seletivo da MAO-B), respectivamente, à 37°C durante 5 min.

### **3.6.2 Quantificação *ex vivo* do nível hipocampal da proteína BDNF por *Elisa***

Para a quantificação do BDNF os animais foram submetidos à eutanásia por descolamento cervical, seguido por decapitação. Rapidamente, o cérebro foi retirado sobre placa de gelo, os hipocampus dissecados e colocados em microtubos de 1,5 mL previamente pesados. O microtubo com a estrutura foi então pesado, congelado em gelo seco e armazenado à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para o preparo da amostra o tecido foi suspenso em tampão de lise (Tris-HCl 100 mM, NaCl 1 mM, EDTA 4 mM, albumina de soro bovino 2%, Triton-X 100 2%, timerosal 0,01% e coquetel de inibidores de protease - Sigma, pH 7,0) na proporção de 1:40 (p/v) e homogeneizado em aparelho tipo *Potter* à  $0^{\circ}\text{C}$ . O homogeneizado tecidual obtido foi centrifugado a  $16.800 \times g$  por 35 min à  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante recolhido para a dosagem de BDNF. A dosagem foi realizada utilizando *kits* de *ELISA* comercial, seguindo as instruções do fabricante (Uscn Life Science Inc®, China). A quantidade de proteínas do sobrenadante foi avaliada pelo método de Bradford (1976), utilizando como padrão albumina de soro bovino.

### **3.6.3 Quantificação *ex vivo* do nível hipocampal das proteínas CREB e CREB fosforilada por *Western blotting***

O tecido foi homogeneizado, com o auxílio de micro-pistilo, em tampão RIPA gelado composto por Nonidet P-40 1% (Sigma-Aldrich, EUA), deoxicolato de sódio 0,5%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%, tampão PBS (pH 7,4) e com os seguintes inibidores enzimáticos: leupeptina 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , aprotinina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , pepstatina A 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1 mM. Posteriormente, as amostras foram incubadas em gelo por 30 min, em seguida centrifugadas à  $10.000 \times g$  por 10 min à  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi coletado e submetido a outra centrifugação, sob as mesmas condições. O sobrenadante coletado foi então utilizado como o extrato celular total contendo as proteínas dissolvidas no meio. Este extrato total foi armazenado em *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da quantificação das proteínas.

Os extratos dos tecidos foram diluídos de modo a apresentar a mesma concentração de proteína (5,56 mg/ml), e então misturados em volumes iguais ao tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl 150 mM (pH 6,8),  $\beta$ -mercaptoetanol 15%, SDS 6%, azul de bromofenol 0,3%, glicerol 25%) e fervidas por 5 min à  $100^{\circ}\text{C}$ . Quantidades iguais de

proteínas para cada amostra (30 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (15%) sob 90 V por 2h. Na etapa seguinte, as proteínas contidas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, EUA) sob as seguintes condições: 100 V durante 2 h. Após a transferência, as membranas foram saturadas em solução de TBS-T (Tris 1,2 g; NaCl 8,76 g e Tween 0,05% em água destilada) contendo BSA (5%) por, no mínimo, 1 h à 4°C. Após a lavagem em TBS-T (4 vezes), as membranas foram incubadas, durante a noite, sob agitação contínua, à 4°C, com os anticorpos primários contra as seguintes proteínas de interesse para este estudo: anti-β-actina (#3700, 1:1000, *Cell Signaling Technology*, EUA), anti-proteína CREB (#48H2, 1:1000, *Cell Signaling Technology*, EUA) e anti-proteína CREB forforilada na serina 133 (#87HG3, 1:1000, *Cell Signaling Technology*, EUA). Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas em TBS- T (4 vezes) e incubadas com anticorpo secundário específico (coelho, #7074, ou camundongo, #7076) conjugado à peroxidase (1:25.000, *Cell Signaling Technology*, EUA) durante 2 h à temperatura ambiente, após o que as membranas foram lavadas em TBS-T (4 vezes).

Os imunocomplexos foram visualizados usando o sistema de detecção de substrato quimioluminescente *SuperSignal West Femto®* (*Thermo Fischer Scientific*, EUA), e as membranas foram expostas e documentadas através do equipamento de fotodocumentação *ChemiDoc XRS* (Bio-Rad Laboratories), locado no LAMEB I – CCB - UFSC. Os níveis de proteína foram quantificados por densidade óptica utilizando o programa *NIH ImageJ 1.36B* (NIH, EUA) e os valores foram expressos como unidades arbitrárias em relação à β-actina.

### 3.7 Fármacos e soluções

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas:

- *p*-clorofenilalanina (PCPA – Sigma Co., St Louis, EUA, um inibidor da síntese de serotonina) e α-metil-*p*-tirosina (AMPT – Sigma Co., St Louis, EUA, um inibidor da síntese de catecolaminas) solubilizadas em polissorbato 80 (Tween 80®) 2%. Ambas as drogas foram injetadas pela via intraperitoneal na dose de 100 mg/kg.

- imipramina (Trofaniil® - Novartis) e fluoxetina (Génerico - EMS) dissolvidas em água filtrada e utilizadas como controle positivos, administradas pela via oral, ambas na dose de 30 mg/kg.

- extrato etanólico bruto (EEP) solubilizado em água filtrada e administrado pela via oral nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg.

- frações clorofórmica (FClor – doses de 35, 70 e 140 mg/kg), acetato de etila (FAcEt – 180 mg/kg), n-butanol (FBut – 370 mg/kg) e aquosa (FAq – 1 g/kg) solubilizadas em polissorbato 80 (Tween 80<sup>®</sup>) 2% para administração oral.

-  $\beta$ -Sitosterol (Sigma Co., St Louis, EUA) e Lupeol (Santa Cruz Co., Texas, EUA) solubilizados em polissorbato 80 (Tween 80<sup>®</sup>) 2% para serem administrados pela via oral nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg.

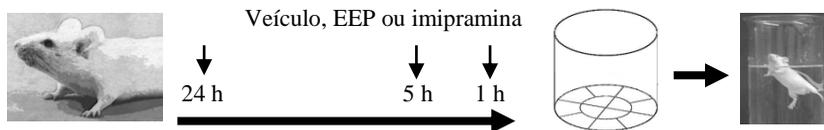
### 3.8 Procedimentos e protocolos experimentais

#### 3.8.1 Avaliações fitoquímicas

O extrato bruto e suas frações foram submetidos à análise de sua composição fitoquímica em cromatografia em camada delgada, quanto aos principais grupos de metabólitos secundários. Após a determinação de que a FClor reteve os efeitos observados no extrato bruto, esta fração foi submetida às análises cromatográfica e espectroscópica para se obter sua constituição química.

#### 3.8.2 Efeito do extrato etanólico das cascas do caule de *L. pacari* no teste de campo aberto e nado forçado

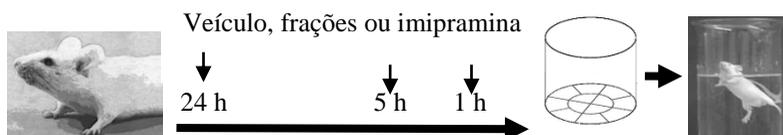
A fim de avaliar se o tratamento pela via oral com EEP seria capaz de alterar o comportamento de camundongos no teste do nado forçado, grupos de animais (n = 10-12 por grupo) foram submetidos ao protocolo de tratamento proposto por Porsolt *et al.* (1978). Os animais foram tratados pela via oral com veículo (água filtrada) 10 mL/kg, EEP 100, 300 e 1000 mg/kg ou imipramina 30 mg/kg nos tempos de 24, 5 e 1 h antes do teste do campo aberto. Logo após serem retirados da arena, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado (Figura 5).



**Figura 5** – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do efeito do extrato etanólico das cascas do caule de *L. pacari* nos testes do campo aberto e do nado forçado.

### 3.8.3 Efeito das frações do extrato etanólico das cascas do caule de *L. pacari* nos testes do campo aberto e do nado forçado

Posteriormente avaliamos qual fração seria capaz de melhor reter os constituintes neuroativos e induzir a mesma alteração comportamental observada com o extrato bruto. Para tanto, grupos camundongos ( $n = 9$ ) foram tratados, pela via oral, com a solução veículo (Tween 80<sup>®</sup> 2%) 10 mL/kg, frações FClor 70 mg/kg, FAcEt 180 mg/kg, FBut 370 mg/kg, FAq 1 g/kg ou imipramina 30 mg/kg nos tempos de 24, 5 e 1h antes dos testes de campo aberto e nado forçado (Figura 6).

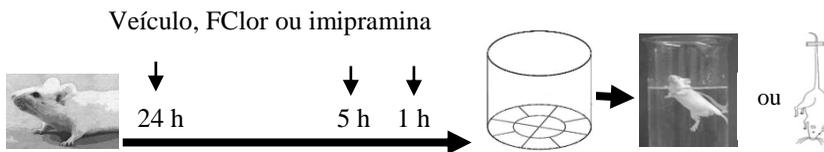


**Figura 6** – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do efeito das frações do extrato etanólico das cascas do caule de *L. pacari* nos testes do campo aberto e do nado forçado.

### 3.8.4 Avaliação da relação dose-efeito da fração clorofórmica nos testes do campo aberto, nado forçado e suspensão pela cauda

Tendo verificado que o resultado com a FClor foi o mais promissor, avaliamos a relação dose-resposta do tratamento com esta fração. Os animais ( $n = 9-10$  por grupo) foram tratados, pela via oral, com a solução veículo (Tween 80<sup>®</sup> 2%) 10 mL/kg, FClor 35, 70 e 140 mg/kg ou imipramina 30 mg/kg nos tempos de 24, 5 e 1h antes dos testes do campo aberto e do nado forçado. Em uma outra sessão experimental, os

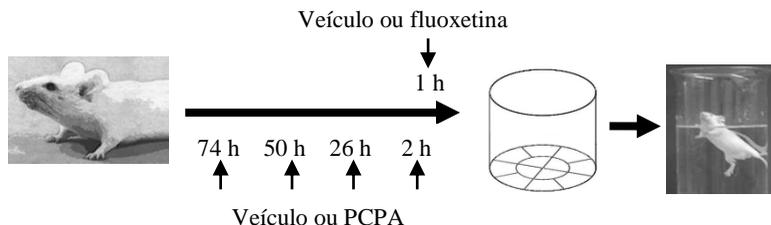
animais após receberem estes mesmos tratamentos foram submetidos ao teste de suspensão de cauda (Figura 7).



**Figura 7** – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação da relação dose-efeito da fração clorofórmica do extrato etanólico das cascas do caule de *L. pacari* nos testes do campo aberto e do nado forçado ou suspensão pela cauda.

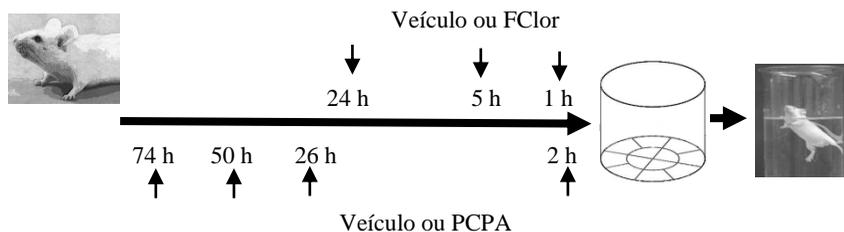
### 3.8.5 Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito do tipo antidepressivo da fração clorofórmica

Para investigar a contribuição do sistema serotoninérgico no efeito de FClor, os animais ( $n = 9-10$  por grupo) foram pré-tratados pela via intraperitoneal com PCPA 100 mg/kg, um inibidor da enzima triptofano hidroxilase (KOE e WEISSMAN, 1966) ou veículo (Tween 80<sup>®</sup> 2%) 10 mL/kg uma vez ao dia, por quatro dias consecutivos. Além deste tratamento, os animais receberam, pela via oral, veículo (salina 0,9%) 10 mL/kg ou fluoxetina 30 mg/kg 1 h antes dos testes do campo aberto e do nado forçado (Figura 8).



**Figura 8** – Esquema do protocolo utilizado para a padronização do uso do inibidor de síntese de serotonina, a para-cloro-fenilalanina (PCPA).

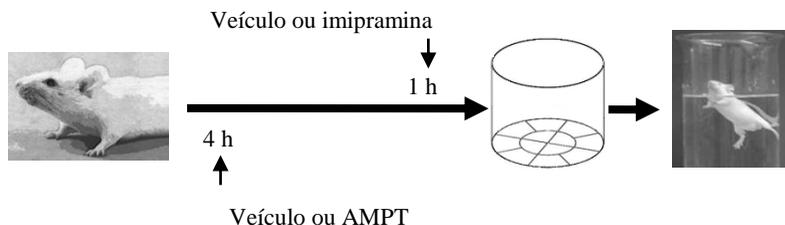
Em outra sessão experimental, além do protocolo de tratamento com PCPA, os animais receberam FClor 70 mg/kg ou veículo (Tween 80® 2%) 24, 5 e 1 h antes dos testes (Figura 9).



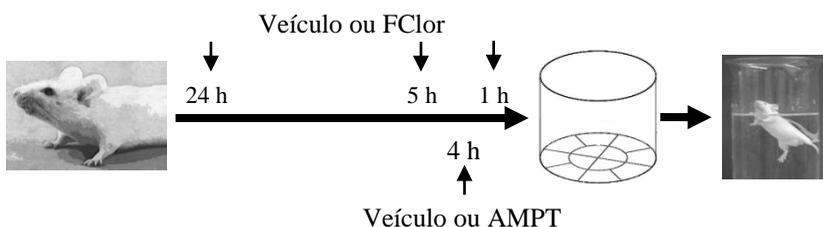
**Figura 9** – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito da fração clorofórmica do extrato etanólico das cascas do caule de *L. pacari* nos testes do campo aberto e do nado forçado.

### 3.8.6 Avaliação do envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito do tipo antidepressivo da fração clorofórmica

Para investigar a contribuição do sistema catecolaminérgico no efeito de FClor, os animais ( $n = 9-10$  por grupo) foram pré-tratados pela via intraperitoneal com AMPT 100 mg/kg, um inibidor da enzima tirosina hidroxilase (CORRODI e HANSON, 1966) ou veículo (Tween 80® 2%) 10 mL/kg, 4 h antes dos testes. Os animais também receberam, pela via oral, veículo (salina 0,9%) 10 mL/kg ou imipramina 30 mg/kg 1 h antes dos testes do campo aberto e do nado forçado (Figura 10). Em outra sessão experimental, além do protocolo de tratamento com AMPT, os animais receberam FClor 70 mg/kg ou veículo (Tween 80® 2%) 24, 5 e 1 h antes dos testes (Figura 11).



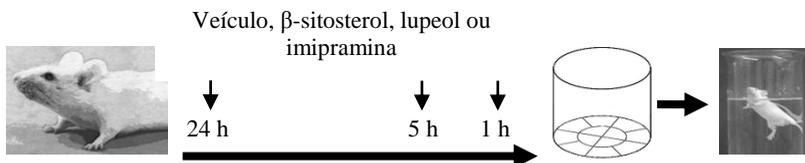
**Figura 10** – Esquema do protocolo utilizado para a padronização do uso do inibidor de síntese de catecolaminas, a alfa-metil-para-tirosina (AMPT).



**Figura 11** – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito da fração clorofórmica do extrato etanólico das cascas do caule de *L. pacari* nos testes do campo aberto e do nado forçado.

### 3.8.7 Avaliação dos efeitos comportamentais dos compostos detectados na fração clorofórmica no teste do campo aberto e nado forçado

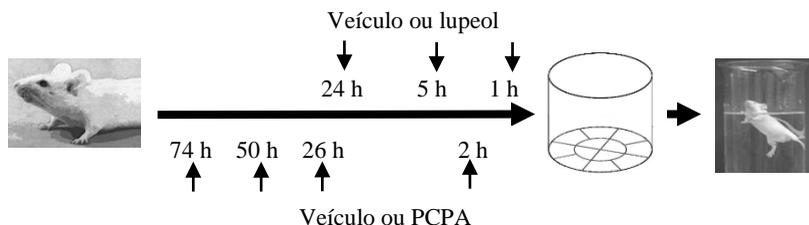
As avaliações fitoquímicas apontaram a presença de  $\beta$ -sitosterol e de lupeol entre os principais constituintes químicos de FClor. Assim, a próxima etapa consistiu em avaliar se, isoladamente, estes compostos seriam capazes de promover as alterações comportamentais anteriormente observadas após o tratamento oral com o extrato ou a fração ativa. Para tanto, os animais foram tratados pela via oral com veículo (Tween 80® 2%) 10 mL/kg,  $\beta$ -sitosterol 10, 20 e 40 mg/kg, lupeol 10, 20 e 40 mg/kg ou imipramina 30 mg/kg nos tempos de 24, 5 e 1 h antes dos testes do campo aberto e do nado forçado (Figura 12).



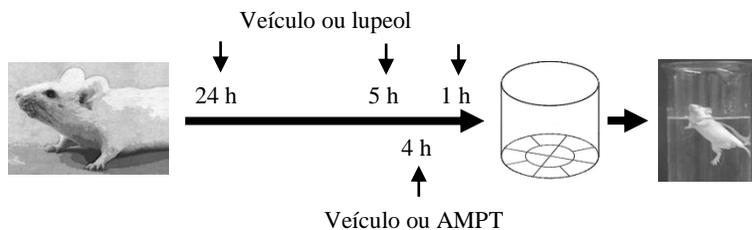
**Figura 12** – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação da atividade de  $\beta$ -sitosterol e lupeol, compostos detectados na fração clorofórmica do extrato etanólico das cascas do caule de *L. pacari* nos testes do campo aberto e do nado forçado.

### 3.8.8 Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico e catecolaminérgico no efeito do tipo antidepressivo do lupeol

Para avaliar a contribuição do sistema serotoninérgico no efeito de lupeol, os animais ( $n = 10$  por grupo) foram pré-tratados com PCPA 100 mg/kg ou veículo (Tween 80<sup>®</sup> 2%) e veículo (Tween 80<sup>®</sup> 2%) ou lupeol 40 mg/kg 24, 5 e 1 h antes dos testes do campo aberto e do nado forçado (Figura 13). E para avaliar a possível contribuição do sistema catecolaminérgico, os animais ( $n = 9$  por grupo) receberam como pré-tratamento o AMPT 100 mg/kg ou veículo (Tween 80<sup>®</sup> 2%) (Figura 14).



**Figura 13** – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito de lupeol no teste do campo aberto e do nado forçado.



**Figura 14** – Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito de lupeol nos testes do campo aberto e do nado forçado.

### 3.8.9 Avaliação da inibição da enzima MAO como mecanismo envolvido nos efeitos da fração clorofórmica e lupeol

Para averiguar se o envolvimento dos sistemas de monoaminas endógenos, visto no efeito tanto de FClor quanto de lupeol, advinham da inibição da enzima responsável pela sua metabolização, foi feita a avaliação *in vitro* da influência da FClor e do lupeol sobre a atividade das isoformas A e B da enzima MAO.

### 3.8.10 Dosagem do nível hipocampal de BDNF, CREB e CREB fosforilada

A fim de investigar se os tratamentos em estudo alteravam a quantidade hipocampal de BDNF, os animais foram tratados (v.o.) com veículo Tween 80<sup>®</sup> 2%, FClor 70 mg/kg, lupeol 40 mg/kg e imipramina 30 mg/kg, 24, 5 e 1 h antes do teste do nado forçado. Logo após a avaliação comportamental os animais foram submetidos à eutanásia e o hipocampo dissecado para quantificação de BDNF por *ELISA*. Para a avaliação de CREB e CREB fosforilada por *Western blotting*, além dos tratamentos já citados, foi incluído um grupo tratado com  $\beta$ -sitosterol 40 mg/kg, utilizado como controle negativo, de modo a demonstrar que o tratamento que não promove alteração comportamental nos testes comportamentais prévios não resultam em alteração na expressão e/ou fosforilação destas proteínas.

### 3.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas utilizando o teste de “*t*” de Student, na validação do teste, comparando diretamente o controle positivo utilizado no teste em relação ao grupo controle tratado com veículo. A análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey foi usado quando os grupos tratados foram analisados em relação ao grupo controle. Em situações que envolveram pré-tratamento e tratamento, foi utilizado a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni.

O nível de significância considerado foi de  $P \leq 0,05$ . A análise estatística e a confecção dos gráficos foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0 (Graph Pad Software, EUA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análises fitoquímicas

As eluições reveladas com anisaldeído apresentam bandas de coloração azulada, indicativas da presença de terpenos/esteroides, possivelmente triterpenos, mais intensas na fração clorofórmica e na acetato de etila. Nas amostras do extrato bruto e das frações clorofórmica e acetato de etila foram observadas manchas sugestivas de terpenos quando as placas foram revelada com vanilina sulfúrica. Nas amostras de extrato bruto e das frações observamos uma coloração azulada sugestiva de taninos após a exposição ao cloreto férrico, sugerindo que o extrato e as frações, exceto a clorofórmica, são ricas em taninos. E, após revelarmos as placas com vanilina sulfúrica, observamos manchas rosadas sugestivas de saponinas nas amostras do extrato bruto e de suas frações, com exceção da clorofórmica.

Com a avaliação da presença de flavonoides no EEP e suas frações, foi vista apenas leve fluorescência amarelada nas amostras do extrato bruto e da fração acetato de etila, sugerindo que nestas amostras há apenas traços desta classe de metabólitos secundários. Além dos resultados supracitados, não observamos manchas sugestivas de alcaloides no extrato bruto ou frações.

Portanto, os resultados sugerem que no extrato bruto há saponinas, taninos, esteroides, triterpenos e traços de flavonoides; na fração clorofórmica apenas esteroides e triterpenos, enquanto que na fração acetato de etila há saponinas, esteroides, triterpenos e traços de flavonoides; e nas frações n-butanol e aquosa há apenas saponinas e taninos. Um resumo dos resultados da triagem fitoquímica realizada é está apresentado na tabela 1.

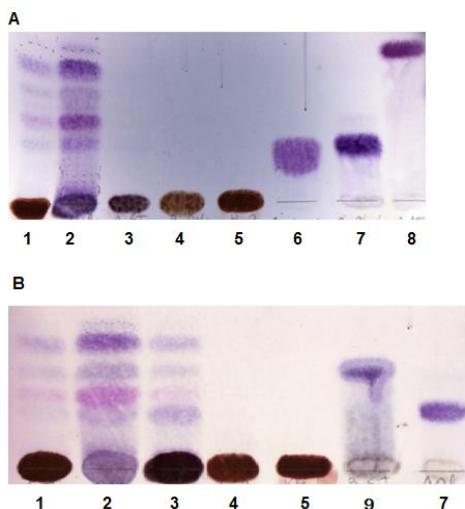
Levando em consideração que a fração clorofórmica, a mais ativa nos ensaios de atividade biológica, é rica em triterpenos e esteroides, esta fração foi submetida às análises subsequentes de CCD. Neste caso, paralelamente foi realizada a co-eluição de soluções de alguns padrões de triterpenos conhecidos, como o ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha$ -amirina e do esteroide  $\beta$ -sitosterol.

Os resultados destas análises estão apresentados nas Figuras 15 e 16. Podemos sugerir que há constituintes na fração clorofórmica que sejam esteroides, e pela semelhança, possivelmente o  $\beta$ -sitosterol, e triterpenos tais como o ácido oleanólico, ácido ursólico,  $\alpha$ -amirina ou outros com perfis cromatográficos semelhantes.

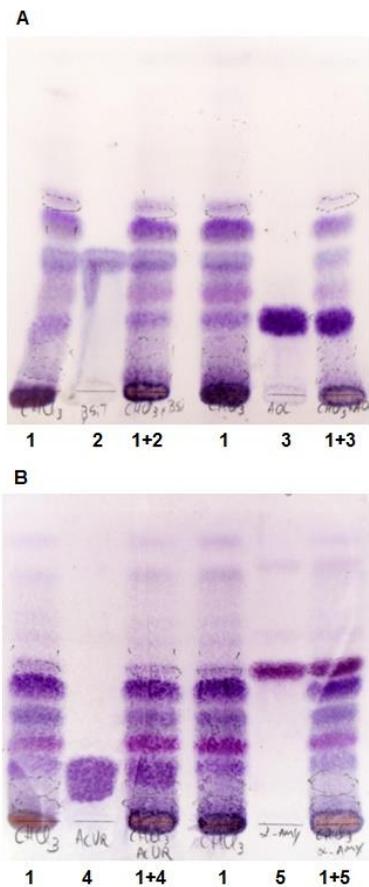
**Tabela 1** – Metabólitos secundários observados no extrato bruto e das frações de *Lafoensia pacari* por meio da análise em cromatografia em camada delgada.

Metabólitos Secundários	EEP	FClor	FAcEt	FnBut	FAq
Taninos	+	-	-	+	+
Esteroides	+	+	+	-	-
Triterpenos	+	+	+	-	-
Flavonoides	+	-	+	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	-
Saponinas	+	-	+	+	+

Encaminhamos então a fração clorofórmica para análises mais precisas na expectativa de obter a composição dos compostos triterpênicos e esteroides presentes na mesma. A interpretação dos resultados das análises de CG/EM, RMN <sup>13</sup>C, HMQC foi realizada pela Profa. Dra. Luce Maria Brandão Torres (USP – São Paulo, SP).



**Figura 15** – Perfis cromatográficos obtidos por CCD do extrato etanólico (1) das cascas do caule de *Lafoensia pacari* e das frações clorofórmica (2), acetato de etila (3), n-butanol (4) e aquosa (5), ácido ursólico (6), ácido oleanólico (7),  $\alpha$ -amirina (8) e  $\beta$ -sitosterol (9). Adsorvente: gel de sílica 60 F<sub>254</sub>. Eluente: hexano:acetato de etila (8:2, v/v). Detecção: anisaldeído e aquecimento.

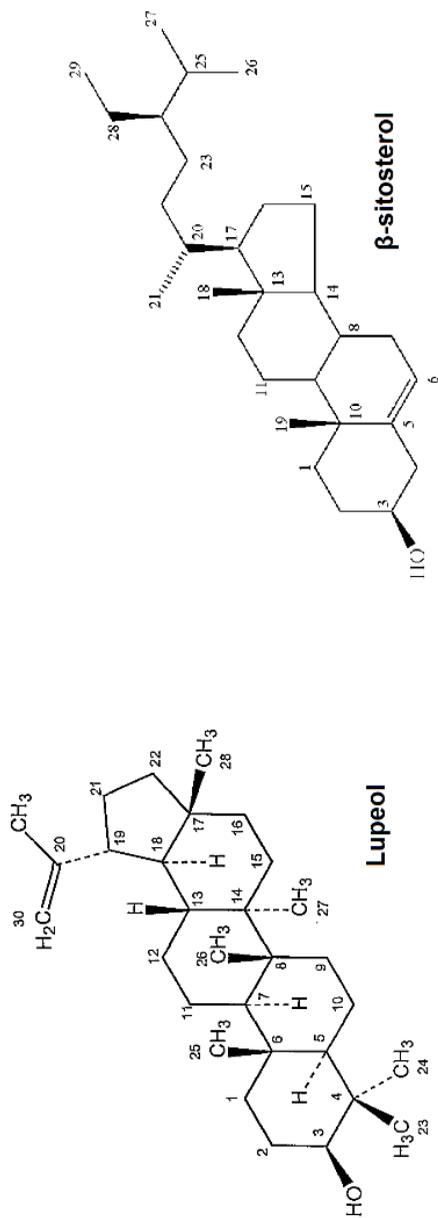


**Figura 16** – Perfis cromatográficos obtidos por CCD da co-eluição da fração clorofórmica do extrato de *Lafoensia pacari* (1) com padrões de  $\beta$ -sitosterol (2), ácido oleanólico (3), ácido ursólico (4) e  $\alpha$ -amirina (5). Adsorvente: gel de sílica 60 F<sub>254</sub>. Eluente: hexano:acetato de etila (8:2, v/v). Detecção: anisaldeído e aquecimento.

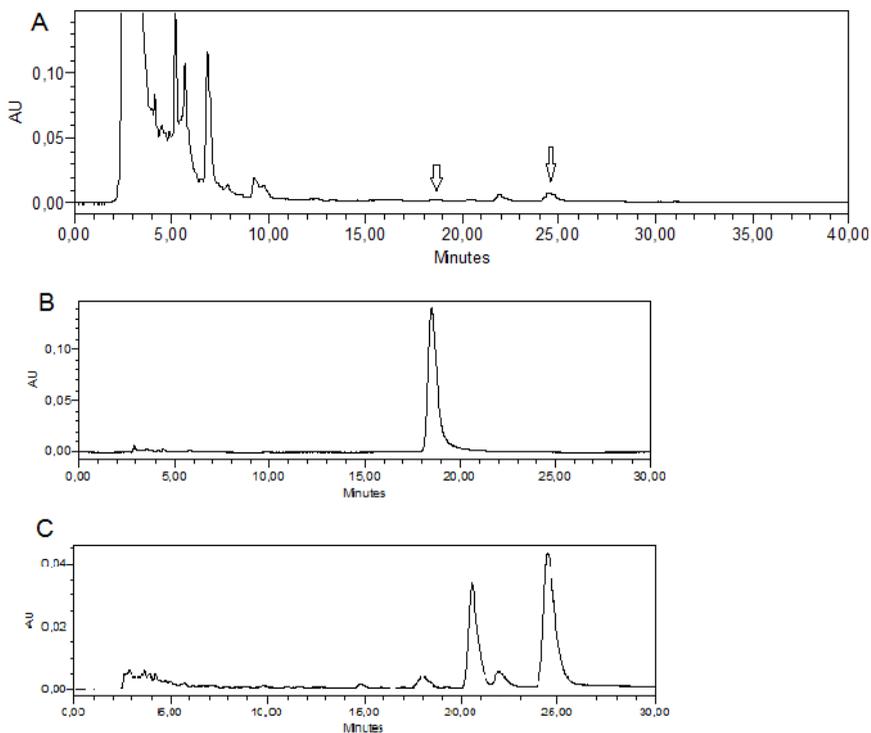
No cromatograma do CG/EM há dois picos cromatográficos de maior abundância relativa, 9,72% e 9,24%, nos tempos de retenção (Tr) de 32,44 min e 33,79 min, respectivamente. Nestes tempos foram detectados os picos de íons moleculares ( $M^+$ )  $m/z = 414$  Da ( $C_{29}H_{50}O$ ), massa característica da fragmentação do lupeol, e 412 Da ( $C_{29}H_{48}O$ ), massa característica da fragmentação do  $\beta$ -sitosterol. Outro pico de íons moleculares detectado foi o de ( $M^+$ )  $m/z = 426$  Da, massa sugestiva da presença de stigmaterol (espectros não apresentados) (MAHATO e KUNDU, 1994; LEMES *et al.*, 2011).

No espectro de RMN  $^1H$  observam-se os sinais de hidrogênios vinílicos em  $\delta$  4,57 e  $\delta$  4,68 referentes aos hidrogênios de H-29 da ligação dupla terminal. No espectro de RMN  $^{13}C$  observa-se os sinais em  $\delta$  109,3 (C-29) e  $\delta$  150,9 (C-20), referentes à dupla terminal, característicos do triterpeno lupeol (MAHATO e KUNDU, 1994, SOUZA *et al.*, 2001). O sinal em  $\delta$  3,23, no espectro de RMN  $^1H$ , é referente ao hidrogênio de H-3 do núcleo esteroide, e no espectro de RMN  $^{13}C$  observa-se os sinais compatíveis com o esteroide  $\beta$ -sitosterol (LEMES *et al.*, 2011) (Tabela 2 e Figura 17). Não foram identificados deslocamentos característicos de ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha$ -amirina.

A análise de CLAE-DAD da fração clorofórmica e de amostras padrão permitiram confirmar a presença de lupeol e  $\beta$ -sitosterol nos Tr de 18,6 min e 24,7 min, respectivamente (Figura 18). Não foram observados picos compatíveis com os padrões de ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha$ -amirina na fração clorofórmica (dados não apresentados).



**Figura 17** – Estrutura química dos compostos presentes na fração clorofórmica do extrato etanólico das cascas do caule de *Lafloensia pacari* segundo interpretação dos resultados das análises de CG/EM, RMN e HMQC.



**Figura 18** – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD. (A) Fração clorofórmica, com setas evidenciando os tempos de retenção compatíveis com os padrões lupeol (B) e  $\beta$ -sitosterol (C – maior pico).

**Tabela 2** - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de lupeol e  $\beta$ -sitosterol e a comparação com os dados obtidos com FClor de *Lafoensia pacari*.

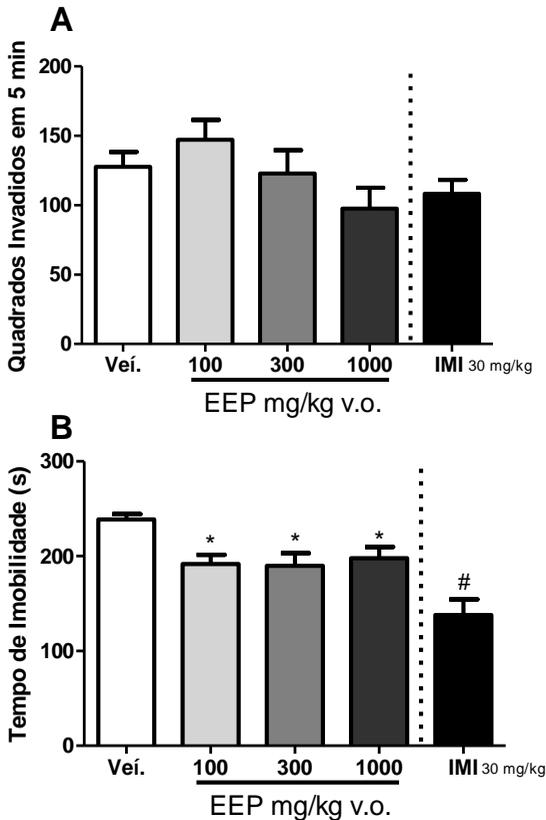
Carbono	Lupeol				$\beta$ -sitosterol			
	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ) <sup>a</sup>	$^1\text{H}$ ( $\delta$ ) <sup>e</sup>	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ) <sup>b</sup>	C	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ) <sup>c</sup>	$^1\text{H}$ ( $\delta$ ) <sup>e</sup>	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ) <sup>d</sup>	C
1	38,7	1,62	38,71	CH <sub>2</sub>	37,7		37,70	CH <sub>2</sub>
2	27,4		27,38	CH <sub>2</sub>	32,3		32,43	CH <sub>2</sub>
3	78,9	3,23 (m)	79,04	CH	72,2	3,23 (m)	71,85	CH
4	38,8	-	38,84	C	42,8	-	42,44	C
5	55,3		55,30	CH	141,2		140,75	C
6	18,3		18,30	CH <sub>2</sub>	122,1		122,56	CH
7	34,2		34,33	CH <sub>2</sub>	32,1		32,15	CH <sub>2</sub>
8	40,8		40,70	C	32,3		32,43	CH
9	50,4		50,51	CH	50,6		50,51	CH
10	37,1		37,07	C	36,9		36,91	C
11	20,9		20,86	CH <sub>2</sub>	21,5		21,32	CH <sub>2</sub>
12	25,1		24,92	CH <sub>2</sub>	40,2		40,70	CH <sub>2</sub>
13	38,0		38,10	CH	42,8		42,44	C
14	42,8		42,44	C	57,2		56,78	CH
15	27,4		27,38	CH	24,7		24,72	CH <sub>2</sub>
16	35,5		34,33	CH <sub>2</sub>	28,7		28,26	CH <sub>2</sub>
17	43,0		42,44	C	56,5		56,36	CH
18	48,2		47,94	CH	12,4		11,99	CH <sub>3</sub>
19	47,9		47,94	CH	19,8		19,82	CH <sub>3</sub>
20	150,9	-	150,44	C	36,6		36,91	CH
21	29,8		29,70	CH <sub>2</sub>	19,2		19,38	CH <sub>3</sub>
22	40,0		39,79	CH <sub>2</sub>	34,4		34,33	CH <sub>2</sub>
23	28,0		28,05	CH <sub>3</sub>	26,5		26,09	CH <sub>2</sub>
24	15,4		15,40	CH <sub>3</sub>	46,2		46,54	CH
25	16,1		16,13	CH <sub>3</sub>	29,6		29,61	CH
26	15,9		15,54	CH <sub>3</sub>	20,2		19,82	CH <sub>3</sub>
27	14,5		14,69	CH <sub>3</sub>	19,5		19,41	CH <sub>3</sub>
28	18,0		18,20	CH <sub>3</sub>	23,5		23,59	CH <sub>2</sub>
29	109,3	4,57 e 4,69	109,68	CH <sub>2</sub> =	12,3		11,87	CH <sub>3</sub>
30	19,3		19,38	CH <sub>3</sub>				

a – Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de Mahato e Kundu (1994). b e d - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos com a análise de FClor. c – Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de Moghaddam *et al.* (2007). e – Dados de RMN  $^1\text{H}$  de Lemes *et al.* (2011) e Souza *et al.* (2001).

#### 4.2 Efeito do extrato etanólico das cascas do caule de *L. pacari* nos testes do campo aberto e do nado forçado

Os camundongos foram tratados com doses crescentes de EEP e o controle positivo usado foi a imipramina, um antidepressivo inibidor da recaptação de monoaminas, sendo avaliados nos testes do campo aberto e do nado forçado.

No teste de campo aberto não houve alteração da atividade locomotora dos animais, sugerindo que uma redução ou aumento nos parâmetros do teste do nado forçado não advêm de resultado falso-positivo relacionado à atividade motora dos animais (Figura 19A). O tratamento pela via oral com EEP (o mesmo tratamento repetido nos tempos de 24, 5 e 1 h antes da avaliação comportamental) com as doses de 100, 300 ou 1000 mg/kg, reduziu 20-22% o tempo total de imobilidade dos animais no teste do nado forçado (ANOVA:  $F_{3,44} = 4,805$ ,  $P < 0,05$ ; Tukey:  $P < 0,05$  para todas as doses do extrato, Figura 19B). A imipramina 30 mg/kg (v.o.) também reduziu em 42% o tempo de imobilidade dos animais ( $t_{20} = 6,144$ ,  $P < 0,001$ , Figura 19B).

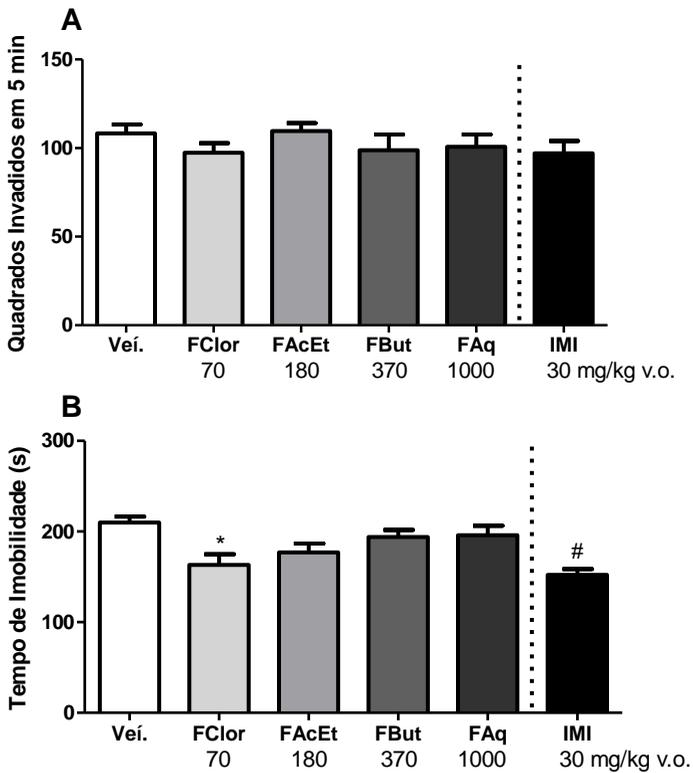


**Figura 19** – Efeito do tratamento (v.o.) com o extrato etanólico das cascas do caule de *Lafoensia pacari* (EEP) nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg) ou a imipramina (IMI - 30 mg/kg) em camundongos nos tempos de 24, 5 e 1 h antes dos testes de campo aberto e nado forçado. A) Número de quadrados invadidos no campo aberto, em sessão de 5 min. B) Tempo total de imobilidade (em segundos) no nado forçado, em sessão de 6 min. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de cada grupo composto por 10 a 12 animais. \* $P < 0,05$ , ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey, #  $P < 0,05$ , teste de “t” de Student comparando o controle positivo imipramina vs veículo (Tween 2% em água filtrada).

### 4.3 Efeito das frações de EEP nos testes do campo aberto e do nado forçado

Quando o mesmo protocolo experimental foi conduzido com as frações do extrato etanólico de *L. pacari* obtidas por partição líquido-líquido do extrato bruto, em doses que mantém uma proporcionalidade em relação à maior dose de EEP avaliada anteriormente, não foi observada qualquer alteração no número de quadrados invadidos no teste de campo aberto após o tratamento com as frações ou a imipramina (Figura 20A).

No teste do nado forçado, a fração clorofórmica (FClor) foi a que melhor reteve a atividade biológica observada com o EEP, reduzindo o tempo de imobilidade em 22% (ANOVA:  $F_{4,40} = 3,656$ ,  $P = 0,0125$ ; Tukey:  $P < 0,05$ ; Figura 20B). Quanto às demais frações, apenas a fração acetato de etila (FACet) reduziu este parâmetro em 15% (Tukey:  $P = 0,09$ ). A imipramina 30 mg/kg (v.o.), controle positivo do teste, como já visto anteriormente, reduziu o tempo de imobilidade do animais em 27% ( $t_{16} = 6,322$ ,  $P < 0,001$ , Figura 20B).



**Figura 20** – Efeito do tratamento (v.o.) com as frações: frações clorofórmica (FClor – 70 mg/kg), acetato de etila (FAcEt - 180 mg/kg), n-butanol (FBut - 370 mg/kg), aquosa (FAq - 1 g/kg) e imipramina (IMI - 30 mg/kg), em camundongos nos tempos de 24, 5 e 1 h antes dos testes do campo aberto e do nado forçado. A) Número de quadrados invadidos no campo aberto, em sessão de 5 min; B) Tempo total de imobilidade (em segundos) no nado forçado, em sessão de 6 min. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de cada grupo composto por 9 animais. \* $P < 0,05$ , ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey, #  $P < 0,05$ , teste de “t” de Student, comparando o controle positivo imipramina vs veículo (Tween 2% em água filtrada).

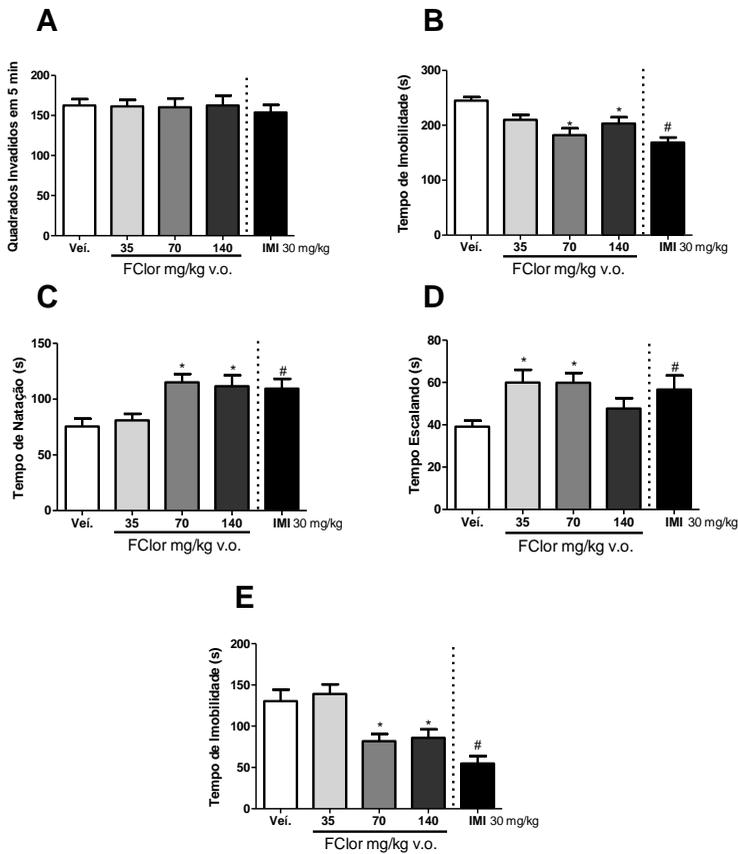
#### 4.4 Avaliação da relação dose-efeito de FClor de *Lafoensia pacari* nos testes do campo aberto, do nado forçado e da suspensão pela cauda

Para avaliarmos a relação entre a dose de FClor e sua capacidade em alterar o comportamento dos animais em teste preditivos de atividade antidepressiva, tratamos os camundongos com FClor nas doses de 35, 70 e 140 mg/kg, utilizando o mesmo esquema de tratamento usado com EEP (24, 5 e 1 h, v.o.). Nestas doses não foi observada qualquer alteração da atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto (Figura 21A).

O tratamento pela via oral nas doses de FClor de 70 e 140 mg/kg reduziu o tempo de imobilidade dos animais 26 e 15 %, comparados aos dados do grupo controle (ANOVA:  $F_{3,40} = 6,567$ ,  $P = 0,001$ ; Tukey:  $P < 0,001$  e  $P < 0,05$ , respectivamente; Figura 21B), assim como o tratamento com imipramina (redução de 31%;  $t_{18} = 6,915$ ,  $P < 0,001$ ; Figura 21B).

Além do parâmetro ‘tempo de imobilidade’, avaliamos também a influência destes tratamentos sobre os parâmetros ‘tempo de natação’ e ‘tempo de escalada’. Observamos que a FClor aumentou o tempo de natação dos animais apenas nas doses de 70 e 140 mg/kg em 53 e 47%, respectivamente (ANOVA:  $F_{3,40} = 7,164$ ,  $P = 0,0006$ ; Tukey:  $P < 0,01$ , ambos, Figura 21C). Quanto à escalada, apenas as doses de 35 e 70 aumentaram a duração deste comportamento em 51% (ANOVA:  $F_{3,40} = 4,606$ ,  $P = 0,0073$ ; Tukey:  $P < 0,05$ , ambos, Figura 21D). Da mesma forma que FClor na dose de 70 mg/kg, a imipramina aumentou a duração destes dois parâmetros em 45 e 43%, respectivamente (natação:  $t_{18} = 3,125$ ,  $P < 0,01$ ; escalada: ( $t_{18} = 2,601$ ,  $P < 0,05$ ; Figuras 21C e D).

Esta análise da relação dose-resposta da FClor também foi realizada no teste de suspensão pela cauda, no qual a FClor, nas doses de 70 e 140 mg/kg reduziu o tempo de imobilidade em 35 e 30%, respectivamente (ANOVA:  $F_{3,35} = 6,852$ ,  $P < 0,05$ ; Tukey:  $P < 0,05$ , para ambos, Figura 21E), enquanto que a dose de 35 mg/kg não foi capaz de alterar esse parâmetro ( $P > 0,05$ ). A imipramina 30 mg/kg também se mostrou ativa neste teste, reduzindo da mesma forma o tempo de imobilidade em 40% ( $t_{17} = 3,915$ ,  $P < 0,01$ , Figura 21E).



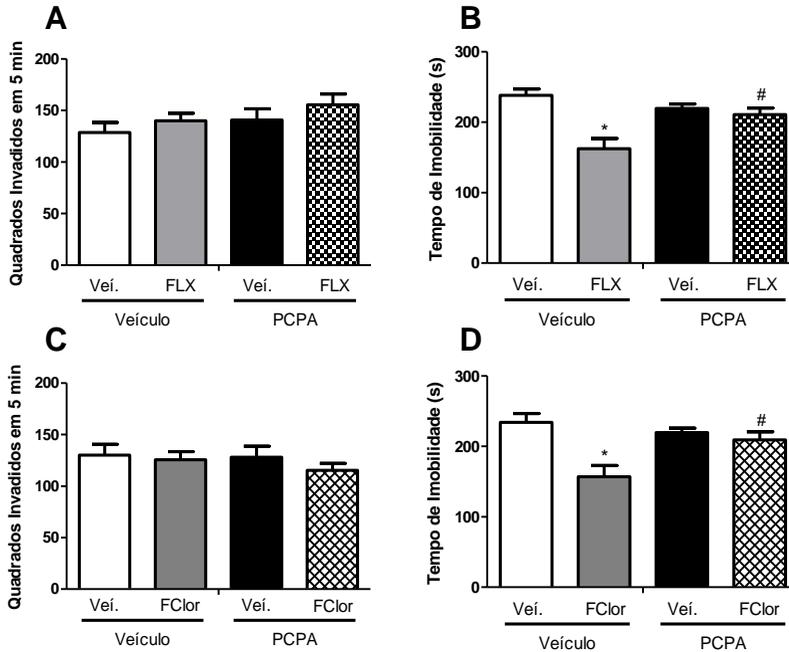
**Figura 21** – Efeito do tratamento (v.o.) com a fração clorofórmica (FClor) de *Lafoensia pacari* nas doses de 35, 70 e 140 mg/kg ou a imipramina (IMI - 30 mg/kg) nos tempos de 24, 5 e 1 h antes dos testes comportamentais. Os parâmetros avaliados foram: número de quadrados invadidos no campo aberto (A), tempo total (em segundos) de imobilidade (B), natação (C) e escalada (D) no nado forçado, e de imobilidade na suspensão pela cauda (E). As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de cada grupo composto por 9 a 11 animais. \* $P < 0,05$ , ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey, #  $P < 0,05$ , teste de “t” de Student comparando o controle positivo imipramina vs veículo (Tween 2% em água filtrada).

#### 4.5 Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito da FClor de *Lafoensia pacari*

O possível envolvimento do sistema serotoninérgico endógeno foi avaliado utilizando o pré-tratamento, por 4 dias, com o inibidor de síntese de serotonina *p*-clorofenilalanina (PCPA) na dose de 100 mg/kg (KOE e WEISSMAN, 1966). Inicialmente, padronizamos o uso deste inibidor de síntese em nossas condições laboratoriais, avaliando a influência do pré-tratamento com este inibidor de síntese nas alterações comportamentais induzidas pela fluoxetina, um inibidor de recaptação seletivo para serotonina, nos testes de campo aberto e nado forçado.

Como demonstrado na Figura 22A, os tratamentos com PCPA ou fluoxetina, ou a coadministração destes, não alteraram a deambulação dos animais no campo aberto. No teste do nado forçado, o tratamento com fluoxetina reduziu o tempo de imobilidade dos animais em 31% e a administração de PCPA preveniu que a fluoxetina alterasse esse parâmetro, enquanto que, *per se*, a PCPA não alterou esse comportamento (ANOVA de duas vias, fator pré-tratamento:  $F_{1,36} = 2,133$ ; ns; fator tratamento  $F_{1,36} = 17,58$ ;  $P < 0,001$ ; interação:  $F_{1,36} = 11,08$ ;  $P < 0,01$ ; Bonferroni: veículo x fluoxetina,  $P < 0,001$ , fluoxetina x fluoxetina+PCPA,  $P < 0,01$ ; Figura 22B).

Da mesma forma, a administração de FClor, PCPA ou a coadministração destes dois tratamentos, não alterou a deambulação dos animais no campo aberto (Figura 22C). No teste do nado forçado, o tratamento com FClor reduziu o tempo de imobilidade dos animais em 33% e a administração de PCPA preveniu esta alteração comportamental, sendo que, *per se*, a PCPA não alterou esse parâmetro (ANOVA de duas vias, fator pré-tratamento:  $F_{1,35} = 2,435$ ; ns; fator tratamento  $F_{1,35} = 12,90$ ;  $P < 0,001$ ; interação:  $F_{1,35} = 7,559$ ;  $P < 0,01$ ; Bonferroni: veículo x FClor,  $P < 0,001$ , FClor x FClor+PCPA,  $P < 0,01$ ; Figura 22D).



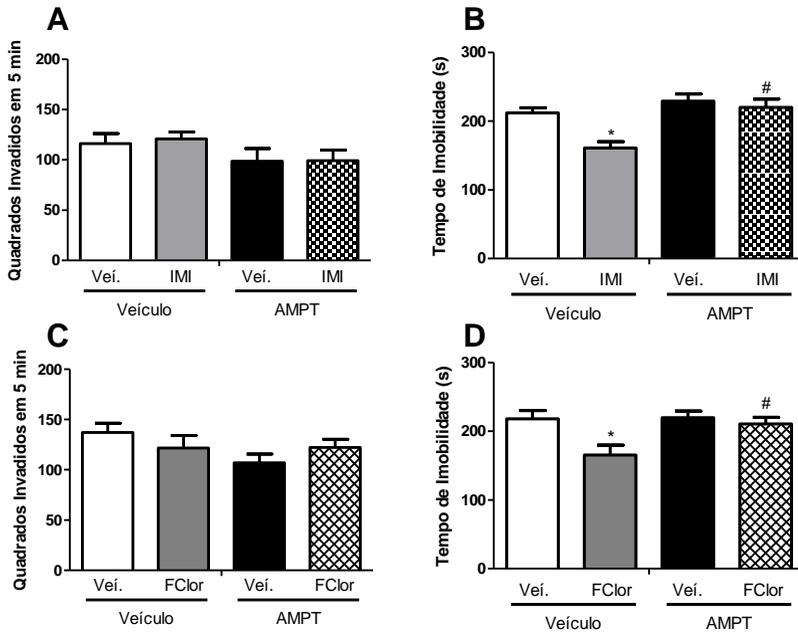
**Figura 22** – Efeito do pré-tratamento com PCPA (100 mg/kg i.p., 4 dias) no comportamento de animais tratados com fluoxetina (FLX - 30 mg/kg, v.o., 1h, A e B) ou fração clorofórmica (FClor - 70 mg/kg, v.o., 24, 5 e 1 h, C e D) de *Lafoensia pacari* avaliados nos teste de campo aberto e nado forçado. Os parâmetros avaliados foram: número de quadrados invadidos (A e C) e tempo total (em segundos) de imobilidade (B e D). As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de cada grupo composto por 9 a 10 animais. \* $P < 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni vs veículo (Tween 2% em água filtrada p.o. e em salina i.p.). #  $P < 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni vs grupo tratado com fluoxetina ou FClor.

#### 4.6 Avaliação do envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito de FClor de *Lafoensia pacari*

O possível envolvimento do sistema catecolaminérgico endógeno foi verificado utilizando o pré-tratamento, 4 h antes, com o inibidor de síntese de catecolaminas alfa-metil-*p*-tirosina (AMPT) na dose de 100 mg/kg (CORRODI e HANSON, 1966). Para a padronização do uso deste inibidor de síntese, avaliamos a influência deste pré-tratamento nas alterações comportamentais induzidas pela imipramina, um inibidor de recaptação de monoaminas capaz de inibir a recaptação de catecolaminas (RAITERI *et al.*, 1976), nos testes do campo aberto e do nado forçado. Como mostrado na Figura 23A, os tratamentos com AMPT ou imipramina, ou sua coadministração, não alteraram a locomoção dos animais.

No teste do nado forçado, o tratamento com imipramina reduziu o tempo de imobilidade dos animais em 24% e a administração de AMPT preveniu esta alteração, enquanto que a AMPT, *per se*, não alterou esse comportamento (ANOVA de duas vias, fator pré-tratamento:  $F_{1,34} = 14,60$ ;  $P < 0,001$ ; fator tratamento  $F_{1,34} = 9,104$ ;  $P < 0,01$ ; interação:  $F_{1,34} = 4,471$ ;  $P < 0,05$ ; Bonferroni: veículo x imipramina,  $P < 0,01$ , imipramina x imipramina+AMPT,  $P < 0,001$ ; Figura 23B).

Com a administração de FClor, AMPT ou a coadministração destes também não foram observadas alterações na atividade locomotora dos animais (Figura 23C). No teste do nado forçado, o tratamento com FClor reduziu o tempo de imobilidade dos animais em 24% e a administração de AMPT impediu esta alteração comportamental, sem mudar, *per se*, a atividade dos animais neste teste (ANOVA de duas vias, fator pré-tratamento:  $F_{1,31} = 4,015$ ; ns; fator tratamento  $F_{1,31} = 6,94$ ;  $P < 0,05$ ; interação:  $F_{1,31} = 3,423$ ; ns; Bonferroni: veículo x FClor,  $P < 0,01$ , FClor x FClor+AMPT,  $P < 0,05$ ; Figura 23D).

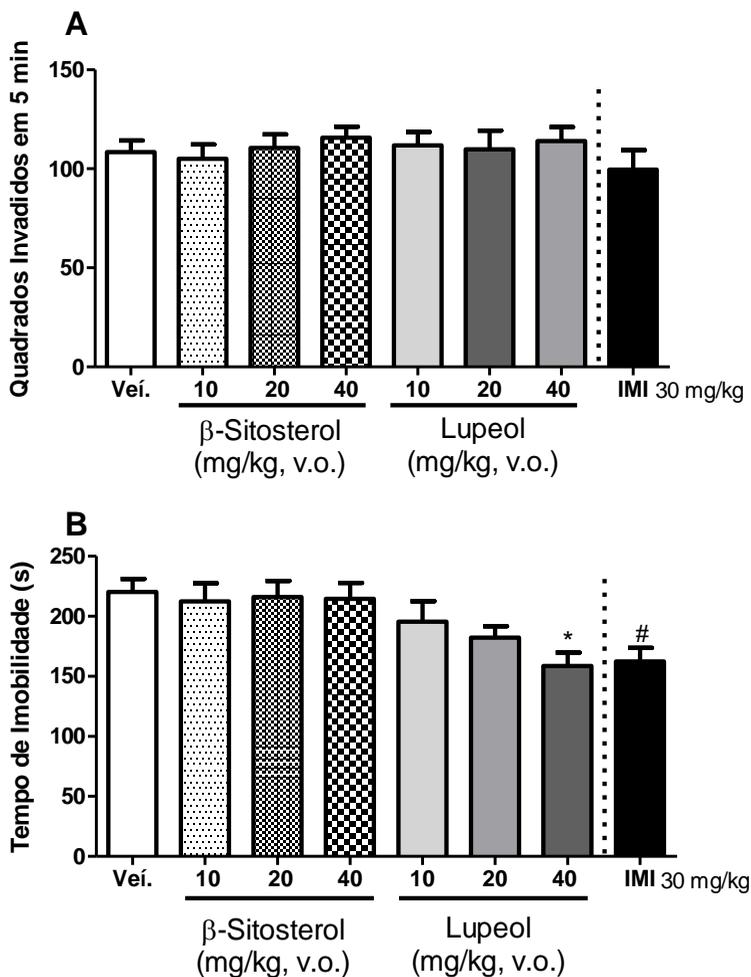


**Figura 23** – Efeito do pré-tratamento com AMPT (100 mg/kg i.p., 4 h) no comportamento de animais tratados com imipramina (IMI - 30 mg/kg, v.o., 1h, A e B) ou fração clorofórmica (FClor - 70 mg/kg, v.o., 24, 5 e 1 h, C e D) de *Lafoensia pacari* avaliados nos testes do campo aberto e do nado forçado. Os parâmetros avaliados foram: número de quadrados invadidos (A e C) e tempo total (em segundos) de imobilidade (B e D). As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de cada grupo composto por 9-10 animais. \* $P < 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni vs veículo (Tween 2% em água filtrada p.o. e em salina i.p.). #  $P < 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni vs grupo tratado com imipramina ou FClor.

#### 4.7 Avaliação dos compostos detectados na FClor de *Lafoensia pacari* nos testes do campo aberto e do nado forçado

Por meio das análises fitoquímicas foi possível identificar o triterpeno lupeol e o esteroide  $\beta$ -sitosterol na FClor de *L. pacari*. Desta forma, a próxima etapa consistiu na execução dos testes comportamentais, após o tratamento com os constituintes caracterizados, para avaliar se isoladamente, em doses biologicamente ativas (AGUIRRE-HERNÁNDEZ *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2012), os mesmos são capazes de promover as mesmas alterações observadas anteriormente com o extrato e a fração ativa.

O tratamento seja com  $\beta$ -sitosterol ou com lupeol (com administrações repetidas nos tempos de 24, 5 e 1 h antes dos testes) não alterou o número de quadrados invadidos pelos animais no teste de campo aberto (Figura 24A). Quando submetidos ao teste de nado forçado, nenhum dos grupos tratados pela via oral com  $\beta$ -sitosterol (com administrações repetidas nos tempos de 24, 5 e 1 h antes dos testes), nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg, apresentou variação no tempo de imobilidade (ANOVA:  $F_{3,36} = 0,0616$ , ns; Figura 24B). O lupeol (com administrações repetidas nos tempos de 24, 5 e 1 h antes dos testes), apenas na dose de 40 mg/kg, reduziu em 28% o tempo de imobilidade (ANOVA:  $F_{3,33} = 4,382$ ,  $P = 0,0106$ ; Tukey:  $P < 0,01$ , Figura 24B), quando comparado ao grupo controle. Após o tratamento com a dose de 20 mg/kg foi observada apenas uma tendência em reduzir esse parâmetro em 17% e a dose de 10 mg/kg se mostrou inativa ( $P > 0,05$ ). O grupo tratado com o controle positivo imipramina ( $t_{18} = 3,695$ ,  $P = 0,0017$ , Figura 24B) apresentou redução de 26% no tempo de imobilidade avaliado pelo teste do nado forçado.



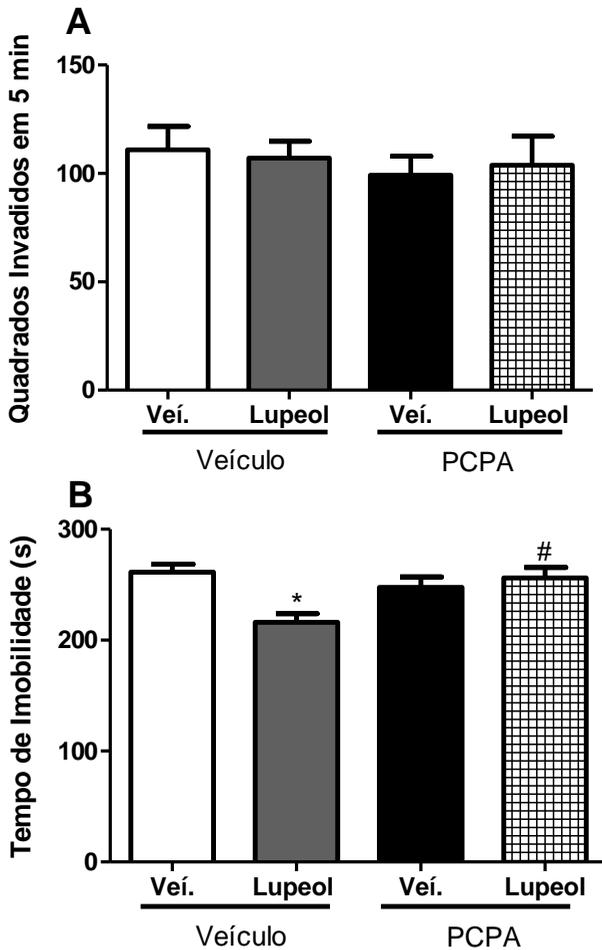
**Figura 24** – Efeito do tratamento (v.o.) com β-sitosterol (β-sitos) e lupeol nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg ou com imipramina (IMI - 30 mg/kg) nos tempos de 24, 5 e 1 h antes dos testes comportamentais, em camundongos. Os parâmetros avaliados foram: número de quadrados invadidos no campo aberto (A) e tempo total (em segundos) de imobilidade no nado forçado (B). As barras representam as médias ± erro padrão da média de cada grupo composto por 9 a 10 animais. \* $P < 0,05$ , ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey, #  $P < 0,05$ , teste de “t” de Student, comparando o controle positivo imipramina vs veículo (Tween 2% em água filtrada).

#### 4.8 Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico e catecolaminérgico no efeito do lupeol

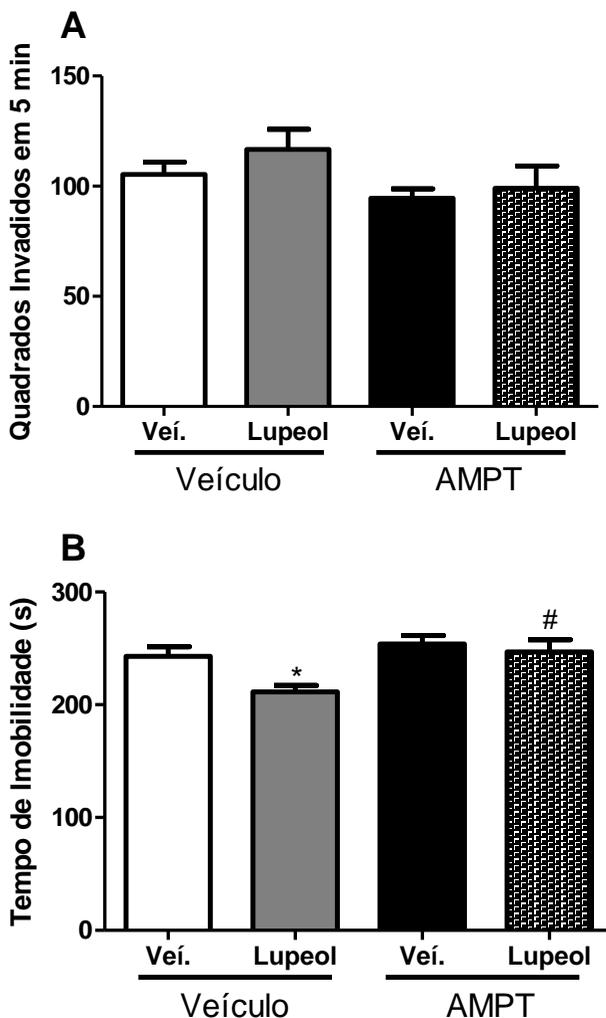
Posteriormente à detecção do efeito do tipo antidepressivo do lupeol, procuramos analisar o envolvimento das vias serotoninérgica e catecolaminérgica no mecanismo de ação deste composto.

Da mesma forma, utilizamos os protocolos de pré-tratamentos com PCPA e AMPT utilizados anteriormente. Como visualizado nos resultados anteriores, a administração de lupeol, PCPA, AMPT ou a coadministração de lupeol com estes inibidores de síntese, não promoveu alterações na atividade exploratória dos animais no campo aberto (Figura 25A e 26A).

No teste do nado forçado, o tratamento com lupeol reduziu o tempo de imobilidade dos animais em 20% e a administração prévia de PCPA (ANOVA de duas vias, fator pré-tratamento:  $F_{1,36} = 2,376$ ; ns; fator tratamento  $F_{1,36} = 4,597$ ;  $P < 0,05$ ; interação:  $F_{1,36} = 9,813$ ;  $P < 0,01$ ; Bonferroni: veículo x lupeol,  $P < 0,01$ , lupeol x lupeol+PCPA,  $P < 0,01$ ; Figura 25B), e AMPT (ANOVA de duas vias, fator pré-tratamento:  $F_{1,32} = 7,854$ ;  $P < 0,01$ ; fator tratamento  $F_{1,32} = 5,373$ ;  $P < 0,05$ ; interação:  $F_{1,32} = 2,137$ ; ns; Bonferroni: veículo x lupeol,  $P < 0,05$ , lupeol x lupeol+AMPT,  $P < 0,01$ ; Figura 26B) preveniu o efeito do tipo antidepressivo do lupeol, sendo que, *per se*, estes inibidores de síntese de monoaminas não alteraram o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao nado forçado.



**Figura 25** – Efeito do pré-tratamento com PCPA (100 mg/kg i.p., 4 dias) no comportamento de animais tratados com lupeol (40 mg/kg, v.o., 24, 5 e 1 h) avaliados nos testes do campo aberto e do nado forçado. Os parâmetros avaliados foram: número de quadrados invadidos (A) e tempo total (em segundos) de imobilidade (B). As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de cada grupo composto por 10 animais. \* $P < 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni vs veículo (Tween 2% em água filtrada p.o. e em salina i.p.). #  $P < 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni vs grupo tratado com lupeol.

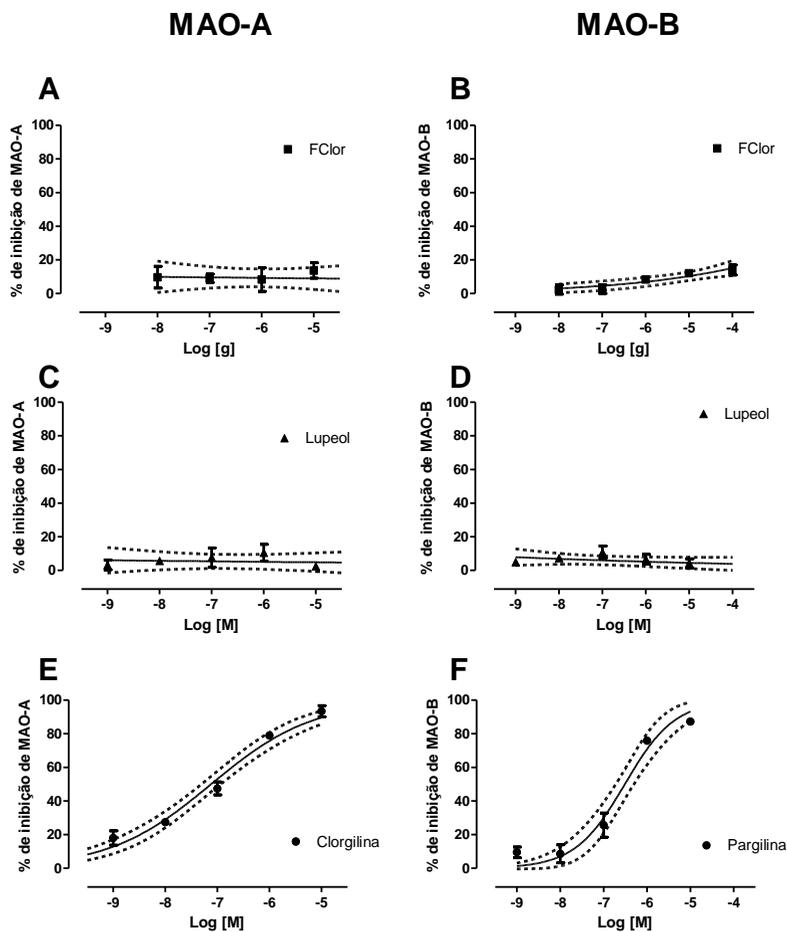


**Figura 26** – Efeito do pré-tratamento com AMPT (100 mg/kg i.p., 4 h) no comportamento de animais tratados com lupeol (40 mg/kg, v.o., 24, 5 e 1 h) avaliados nos testes do campo aberto e do nado forçado. Os parâmetros avaliados foram: número de quadrados invadidos (A) e tempo total (em segundos) de imobilidade (B). As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de cada grupo composto por 9 animais. \* $P < 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni vs veículo (Tween 2% em água filtrada p.o. e em salina i.p.). #  $P < 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni vs grupo tratado com lupeol.

#### 4.9 Avaliação da atividade da enzima MAO como possível mecanismo envolvido nos efeitos da FClor e do lupeol

Visto o envolvimento tanto da via serotoninérgica, quanto da catecolaminérgica, no efeito do tipo antidepressivo da FClor, avaliamos se a FClor ou seu composto ativo lupeol poderiam atuar como inibidores das duas isoformas da enzima MAO, a MAO-A e MAO-B, as principais responsáveis pelo catabolismo destes neurotransmissores (FINBERG, 2014).

A atividade da enzima MAO-A ou MAO-B, não foi alterada pela FClor ou pelo lupeol (Figuras 27A, B, C e D). Já a clorgilina, um inibidor irreversível MAO-A (JOHNSTON, 1968), e a pargilina, um inibidor irreversível MAO-B (AGHAJANIAN *et al.*, 1970), inibiram com  $IC_{50}$  de 76 nM [49 – 115,7 nM] (Figura 27E) e  $IC_{50}$ : 0,3  $\mu$ M [0,19 – 0,49  $\mu$ M] (Figura 27F) a atividade de MAO-A e MAO-B, respectivamente, como esperado.



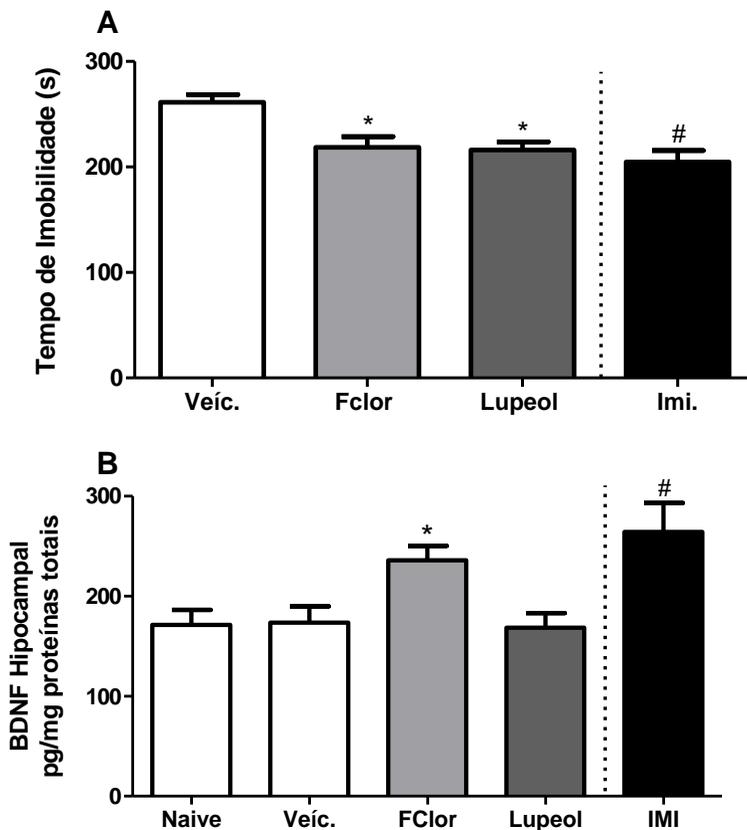
**Figura 27** – Curvas de inibição da MAO-A (A, C e E) e MAO-B (B, D e F) na presença de concentrações crescentes de fração clorofórmica do extrato de *Lafoensia pacari* (FClor, A e B), lupeol (C e D), clorgilina (E) e pargilina (F), em homogenato mitocondrial de fígado de camundongos.

#### 4.10 Dosagem *ex vivo* do nível hipocampal de BDNF, CREB e CREB fosforilada no hipocampo de camundongos tratados com FClor ou lupeol

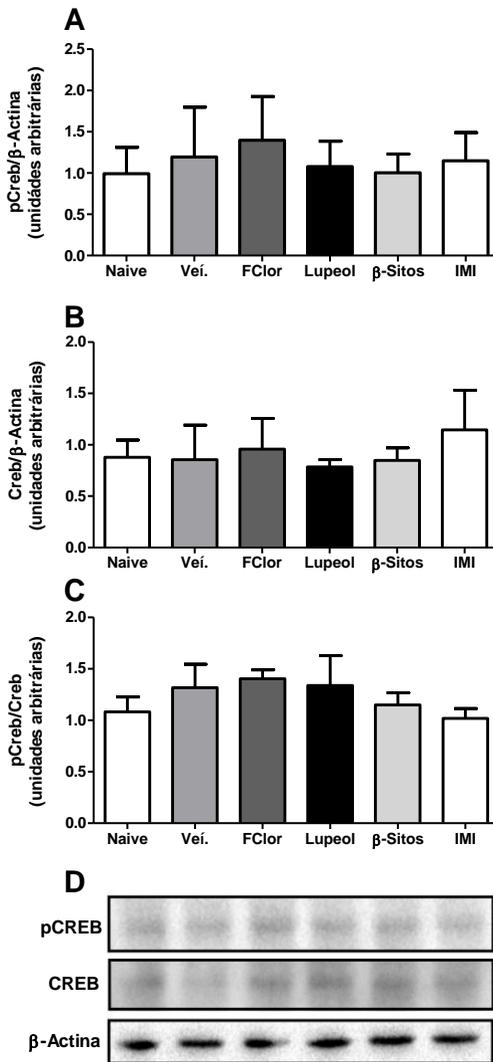
Alguns fármacos antidepressivos possuem a capacidade de aumentar o nível hipocampal de neurotrofina, principalmente de BDNF. Portanto, avaliamos o nível hipocampal desta proteína em animais previamente tratados com FClor (70 mg/kg, v.o.), lupeol (40 mg/kg, v.o.) e imipramina (30 mg/kg, v.o.).

Quando avaliadas em doses que produzem alterações comportamentais preditivas de efeito antidepressivo (ANOVA:  $F_{2,27} = 8,819$ ,  $P = 0,0011$ ; Tukey: veículo x FClor,  $P < 0,01$ , veículo x lupeol,  $P < 0,01$ ; veículo x imipramina:  $t_{17} = 4,390$ ,  $P < 0,001$ , Figura 28A), a FClor e a imipramina foram capazes de aumentar o nível hipocampal de BDNF, porém este efeito não ocorreu após o tratamento com lupeol (ANOVA:  $F_{3,20} = 4,612$ ,  $P = 0,0131$ ; Tukey: veículo x FClor,  $P < 0,05$ , veículo x lupeol, ns; veículo x imipramina:  $t_{10} = 2,677$ ,  $P < 0,0232$ , Figura 28B).

Avaliamos então a via de sinalização CREB/pCREB, uma via de sinalização que pode estar envolvida tanto no aumento da expressão de BDNF, quanto em eventos celulares desencadeados por esta neurotrofina (DUMAN *et al.*, 1997; NAKAGAWA *et al.*, 2002; NESTLER *et al.*, 2002; NIBUYA *et al.*, 1995). Com o nosso protocolo, não foram detectadas quaisquer alterações nesta via de sinalização. Nem mesmo o controle positivo imipramina promoveu mudanças nesta via de sinalização (Figura 29).



**Figura 28** – (A) Efeito do tratamento (v.o.) com fração clorofórmica do extrato de *Lafoensia pacari* (FClor - 70 mg/kg), lupeol (40 mg/kg) e imipramina (30 mg/kg) nos tempos de 24, 5 e 1 h antes do teste do nado forçado, em camundongos, no tempo total de imobilidade (em segundos), sessão de 6 min. Grupo composto por 9-10 animais. (B) Efeito dos mesmos tratamentos sobre o nível hipocampal de BDNF de alguns dos animais (5-6 por grupo) escolhidos aleatoriamente. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão da média. \* $P < 0,05$ , ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey, #  $P < 0,05$ , teste de “t” de Student comparando o controle positivo imipramina vs veículo (Tween 2% em água filtrada).



**Figura 29** – Efeito do tratamento (v.o.) com fração clorofórmica do extrato de *Lafoensia pacari* (FClor - 70 mg/kg), lupeol (40 mg/kg), β-sitosterol (40 mg/kg) e imipramina (30 mg/kg) nos tempos de 24, 5 e 1 h, sobre a expressão, avaliada por *Western blotting*, de CREB fosforilada (A - 43 kDa) e CREB (B - 43 kDa), no hipocampo de camundongos (3 por grupo) e, a razão entre estas duas avaliações (C). As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão da média das quantificações, expressos em unidades arbitrárias, corrigidos pelo valor do controle genômico β-actina (43 kDa). Imagens ilustrativas das bandas obtidas por *Western blotting* (D).

A tabela abaixo (Tabela 3) resume os principais resultados comportamentais e bioquímicos encontrados neste estudo.

**Tabela 3** – Resumo dos resultados encontrados neste estudo.

Teste/Ensaio	Tratamento		Observação	
Nado forçado (imobilidade)	EEP	100 mg/kg	↓	
		300mg/kg	↓	
		1000 mg/kg	↓	
Nado forçado (imobilidade)	Frações	FClor	↓	
		FAcEt	Tendência em ↓	
		FBut	n.s.	
Nado forçado (imobilidade)	FClor	FAq	n.s.	
		35 mg/kg	↓	
		70 mg/kg	↓	
Suspensão pela cauda (imobilidade)	FClor	140 mg/kg	↓	
		35 mg/kg	n.s.	
		70 mg/kg	↓	
Suspensão pela cauda (imobilidade)	FClor	140 mg/kg	↓	
		FClor + PCPA	70 mg/kg + 100 mg/kg	Reversão do efeito de FClor
		FClor + AMPT	70 mg/kg + 100 mg/kg	Reversão do efeito de FClor
Nado forçado (imobilidade)	Lupeol	10 mg/kg	n.s.	
		20 mg/kg	Tendência em ↓	
		40 mg/kg	↓	
	β-sitosterol	10 mg/kg	n.s.	
		20 mg/kg	n.s.	
		40 mg/kg	n.s.	
Nado forçado (imobilidade)	Lupeol + PCPA	40 mg/kg + 100 mg/kg	Reversão do efeito de lupeol	
	Lupeol + AMPT	40 mg/kg + 100 mg/kg	Reversão do efeito de lupeol	
Campo aberto (quadrados invadidos)	Todos citados anteriormente		n.s.	
Atividade da MAO	FClor		n.s.	
	Lupeol		n.s.	
Expressão	BDNF	FClor	↑	
		Lupeol	n.s.	
	CREB	FClor e Lupeol	n.s.	
	pCREB	FClor e Lupeol	n.s.	

Abreviações: ↑, aumento; ↓, diminuição; n.s., não significante.

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho realizou o fracionamento do extrato etanólico da casca do caule de *Lafoensia pacari* bioguiado pelas alterações neurocomportamentais, após o tratamento nos tempos de 24, 5 e 1 h antes dos testes comportamentais, caracterizando o perfil fitoquímico do extrato bruto e de suas frações, para então, por fim, averiguar a possível contribuição do sistema monoaminérgico no efeito da fração mais ativa e do composto identificado que reteve o efeito do tipo antidepressivo.

Em estudo prévio, constatamos que o tratamento com EEP, pela via oral, uma hora antes da avaliação comportamental não é capaz de alterar o tempo de imobilidade de animais submetidos ao NF. No entanto, quando o tratamento é repetido por 21 dias esse parâmetro é reduzido (GALDINO *et al.*, 2009), sugerindo que o extrato possui componentes capazes de atuar como substâncias antidepressivas, mas que seria necessário um tempo maior do que apenas uma hora, como ocorre na clínica, para ocorrerem alterações comportamentais em testes preditivos de atividade conduzidos em camundongos.

Portanto, como primeira etapa na condução dos experimentos referentes à esta tese, averiguamos o efeito de EEP em outro protocolo experimental no qual três administrações (doses repetidas) são realizadas em um intervalo de 24 h (o mesmo tratamento nos tempos de 24, 5 e 1 h antes do NF em camundongos), como proposto por Porsolt *et al.* (1978). Segundo este pesquisador, neste esquema de tratamento o efeito de fármacos antidepressivos é mais pronunciado e, assim, é possível observar alterações comportamentais de fármacos antidepressivos, caso estes se mostrem inefetivos quando avaliados 1 h após o tratamento agudo (PORSOLT *et al.*, 1978). Deste modo, seria possível a realização de uma triagem sobre o efeito do extrato e de suas frações dentro de um decurso temporal menor e com necessidade de material vegetal reduzida em relação a um esquema de tratamento por 21 dias.

O tratamento pela via oral com EEP, nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg, reduziu cerca de 20% o tempo de imobilidade dos camundongos no NF, sem alterar a locomoção destes animais, excluindo um possível efeito falso-positivo advindo de um aumento da atividade motora (PORSOLT *et al.*, 1978; CRYAN e MOMBÉREAU, 2004). Desta forma, demonstramos que o protocolo de tratamento adotado é adequado para as avaliações *in vivo* subsequentes.

Posteriormente, o extrato bruto foi submetido ao fracionamento por extração líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente,

técnica muito utilizada no estudo de extratos de plantas, utilizada com o objetivo de se obter frações semi-purificadas agrupando as substâncias de acordo com a sua polaridade (AKKOL *et al.*, 2010; CECHINEL e YUNES, 1998). Todas as frações obtidas foram submetidas ao mesmo protocolo experimental utilizado com o extrato bruto para identificar a fração que melhor reteve os constituintes ativos e assim induzir à mesma alteração comportamental de EEP.

No processo de extração líquido-líquido, a eficácia da extração das substâncias do extrato bruto depende da afinidade do soluto pelo solvente escolhido para a extração, da razão entre os volumes das fases e do número de extrações, de modo que a massa resultante do processo extrativo é proporcional a quantidade das substâncias presentes no extrato bruto, e a melhor estratégia para definir as doses das frações é observar o percentual de cada fração em relação a massa inicial de extrato bruto (QUEIROZ *et al.*, 2001). Portanto, os camundongos foram tratados com as frações em doses definidas com base no rendimento de cada fração em relação ao extrato bruto (GALDINO *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2013).

Dentre as frações, nenhuma alterou a locomoção dos animais e a FClor foi a que melhor mimetizou os efeitos do EEP, reduzindo o tempo de imobilidade em 22%, enquanto que a fração acetato de etila apresentou apenas uma tendência em reduzir este parâmetro em 15%. Este resultado pode estar relacionado à maior presença dos constituintes ativos em FClor, devido a uma melhor capacidade extrativa do solvente mais apolar. No entanto, como o processo extrativo de partição líquido-líquido pode não arrastar as substâncias a ponto de esgotar os compostos ativos no extrato bruto (QUEIROZ *et al.*, 2001), o próximo solvente utilizado, o acetato de etila, poderá arrastar o restante destas substâncias e uma pequena quantidade destes estará presente na FACEt.

Paralelamente às avaliações *in vivo*, foram realizadas análises fitoquímicas preliminares com o extrato e suas frações para avaliar a presença dos grupos de metabólitos secundários tais como alcaloides, esteroides, flavonoides, taninos, triterpenos e saponinas, relatados previamente nesta espécie ou na família Lythraceae (FERRIS *et al.*, 1971; GALDINO *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2006; SÓLON *et al.*, 2000; TAMASHIRO FILHO *et al.*, 2012).

Com a caracterização fitoquímica do EEP e suas frações, constatamos que FClor, a fração mais ativa na avaliação comportamental, reteve os esteroides e triterpenos presentes no EEP, enquanto que a FACEt reteve tanto os esteroides e triterpenos, quanto as saponinas e os flavonoides, sugerindo que os triterpenos e os esteroides são os mais

importantes, dentre os demais constituintes da planta *L. pacari*, para a indução das alterações comportamentais em testes preditivos da atividade antidepressiva.

*A posteriori*, realizamos o estudo da relação dose-resposta apenas com a FClor nos teste de NF e TSC. Estes dois testes são notoriamente eficientes na triagem de fármacos, pois fornecem resultados rápidos e são relativamente simples de serem executados. Entretanto é necessário sempre ressaltar que estes testes foram criados e validados com base nos efeitos de antidepressivos com mecanismo de ação essencialmente monoaminérgicos. Como consequência desta ressalva, existe sempre a possibilidade de ao se utilizar um destes testes, estar selecionando apenas fármacos com os mesmos mecanismos de ação, e refutar fármacos ineficazes nestes protocolos, mas que poderiam possuir atividade antidepressiva através de outros mecanismos. Sendo assim, a utilização apenas destes dois testes pode limitar a possibilidade de encontrar novas drogas com mecanismos inovadores (CRYAN e MOMBÉREAU, 2004; DEUSSING, 2006; NESTLER e HYMAN, 2010).

A capacidade de Fclor em reduzir o tempo de imobilidade sem causar hiperlocomoção foi observada tanto no NF quanto no TSC, reforçando nossa evidência que FClor possui compostos neuroativos, com possível atividade antidepressiva. A dose intermediária foi a mais efetiva nos dois testes comportamentais, sugerindo que nesta dose é obtido o efeito do tipo antidepressivo máximo (CALABRESE e BALDWIN, 2001).

Na tentativa de melhorar o valor preditivo do NF em ratos, Detke *et al.* (1995) sugeriram que, além do parâmetro imobilidade, fossem avaliados os comportamentos de escalar e nadar dos animais, pois a alteração destes comportamentos estaria relacionada à capacidade dos fármacos em aumentar a transmissão monoaminérgica no SNC, de modo que o aumento na neurotransmissão serotoninérgica se refletiria como aumento no tempo de natação, enquanto o aumento na transmissão noradrenérgica resultaria em aumento no tempo que o animal passa escalando as paredes do aparato (CRYAN *et al.*, 2005).

Esta correlação entre a alteração dos comportamentos citados e o aumento na neurotransmissão que o tratamento causa é amplamente utilizada no estudo do mecanismo de ação de novos fármacos antidepressivos em ratos (CRYAN *et al.*, 2005). Portanto, avaliamos o efeito da FClor sobre os parâmetros ‘tempo de natação’ e ‘tempo de escalada’. A FClor, nas doses de 35 e 70 mg/kg, aumentou a escalada, enquanto que com as doses de 70 e 140 mg/kg observamos um aumento da natação. Baseado na premissa teórica de Detke *et al.* (1995) e os dados

de Cryan *et al.* (2005), podemos sugerir que a FClor foi capaz de aumentar tanto a transmissão noradrenérgica quanto a serotoninérgica. Da mesma forma, a imipramina, além de reduzir o tempo de imobilidade, aumentou tanto a natação quanto a escalada, sugerindo que este fármaco aumentou tanto a neurotransmissão serotoninérgica quanto noradrenérgica. Estes resultados com o controle positivo são coerentes com seu mecanismo de ação, pois o mesmo inibe tanto a recaptação de noradrenalina, quanto de serotonina (RAITERI *et al.*, 1976).

No entanto, devemos ressaltar que esta correlação entre o mecanismo de ação primário do fármaco e as alterações dos parâmetros 'escalada' e 'natação' avaliados no NF está muito bem fundamentada quando os experimentos são conduzidos com ratos (DETKE *et al.*, 1995), ficando esta análise comprometida quando camundongos são utilizados como animal de experimentação, pois nesta espécie animal, não há esta relação clara entre o mecanismo de ação primário do fármaco antidepressivo e sua capacidade de aumentar estes parâmetros comportamentais natação e escalada (COSTA *et al.*, 2013).

Portanto, em camundongos, avaliar os diferentes parâmetros que podem ser quantificados no NF não é o suficiente para especular sobre o possível mecanismo de ação de um dado tratamento. Consequentemente, para inferirmos sobre os possíveis mecanismos envolvidos na alteração comportamental mediada por FClor, utilizamos também uma abordagem farmacológica, na qual os animais foram pré-tratados com dois inibidores de síntese de monoaminas: a *p*-clorofenilalanina (PCPA – 100 mg/kg, durante 4 dias) e a  $\alpha$ -metil-*p*-tirosina (AMPT – 100mg/kg, 4h antes), para reduzir os níveis endógenos de serotonina e catecolaminas em geral, respectivamente.

A PCPA é um inibidor da enzima triptofano hidroxilase, enzima responsável pela etapa limitante no processo de síntese de serotonina, esta droga causa uma lenta e cumulativa depleção de 5-HT, necessitando de pelo menos 3 dias para alcançar o platô de redução nos níveis de 5-HT (KOE e WEISSMAN, 1966). Apesar da observação inicial que o tratamento com PCPA reduz apenas tenuamente os níveis de catecolaminas no encéfalo (KOE e WEISSMAN, 1966) e que o pré-tratamento com este inibidor de síntese não é capaz de interferir no efeito comportamental de inibidores da recaptação de noradrenalina (O'LEARY *et al.*, 2007), há evidências experimentais de que a 5-HT é necessária para a manutenção de um tônus de disparo dos neurônios dopaminérgicos mesencefálicos (MINABE *et al.*, 1996). Portanto, a possibilidade da PCPA reduzir também a atividade dopaminérgica, ao inibir a atividade neuronal, não pode ser descartada.

Já a AMPT é um o inibidor da enzima tirosina hidroxilase, a etapa limitante na síntese das catecolaminas dopamina, adrenalina e noradrenalina, de modo que após 4 h do seu tratamento já é observada uma redução significativa, próxima aos níveis máximos causados por este inibidor de síntese (CORRODI e HANSON, 1966).

Portanto, a PCPA e a AMPT são capazes de bloquear o efeito de fármacos que dependem do aumento sináptico de neurotransmissores endógenos como mecanismo de ação, tais como inibidores de recaptação de monoaminas, sendo consideradas boas ferramentas farmacológicas no estudo do mecanismo de ação dos mais variados tratamentos (O'LEARY *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2002).

Observamos que estes inibidores de síntese não alteraram o comportamento dos animais *per se* em testes preditivos de atividade antidepressiva ou testes que avaliam a coordenação motora, quando utilizados em doses adequadas, apesar de reduzirem consideravelmente os níveis de monoaminas endógenos (CORRODI e HANSON, 1966; KOE e WEISSMAN, 1966), e impedir a alteração comportamental induzida pelos fármacos fluoxetina e imipramina, utilizados como controles positivos.

Após esta etapa de padronização, a influência do pré-tratamento com estes inibidores de síntese na atividade de FClor foi avaliada. Observamos, então, que tanto a PCPA como a AMPT bloquearam o efeito desta fração do extrato bruto de *L. pacari*, sugerindo que tanto a serotonina quanto as catecolaminas endógenas estão envolvidas nas alterações comportamentais induzidas pela FClor.

A neurobiologia da depressão está, ao menos em parte, relacionada à hipofunção dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico (COPPEN, 1967; RANDRUP *et al.*, 1975; SCHILDKRAUT, 1965) e, a maioria dos antidepressivos atua aumentando a disponibilidade sináptica destas aminas. Assim, nossos resultados sugerem que a FClor é capaz de aumentar a neurotransmissão catecolaminérgica e serotoninérgica e, assim, promover um efeito benéfico, como uma possível atividade antidepressiva em humanos.

Paralelo às avaliações sobre o envolvimento das monoaminas no efeito anti-imobilidade de FClor, esta fração foi submetida às análises fitoquímicas de CG/EM, RMN <sup>13</sup>C, HMQC e CLAE-DAD, na expectativa de obtermos a caracterização dos compostos triterpênicos e esteroides. A interpretação dos resultados destas análises nos permitiu identificar o esteroide β-sitosterol e, pela primeira vez em extratos provenientes da *L. pacari*, foi identificado o triterpeno lupeol. Como etapa seguinte, avaliamos se os compostos identificados, quando

administrados isoladamente, em doses biologicamente ativas (AGUIRRE-HERNÁNDEZ *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2012), eram capazes de reduzir o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao NF, utilizando o protocolo experimental adotado neste estudo.

Os animais foram tratados com os compostos identificados, lupeol e  $\beta$ -sitosterol nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg. Como resultado observamos que o esteroide avaliado, o  $\beta$ -sitosterol, não foi ativo em nenhuma das doses testadas, enquanto o lupeol também mostrou-se inativo na dose de 10 mg/kg, mas com a dose de 20 mg/kg foi observada uma tendência em reduzir o comportamento de imobilidade, e a dose de 40 mg/kg deste triterpeno levou à redução significativa da imobilidade, sugerindo, então, que o lupeol pode ser um dos constituintes ativos responsáveis pelo efeito anti-imobilidade observado após o tratamento oral com a FClor.

A este respeito, a classe de metabólitos secundários triterpenos se caracteriza por um grande número de compostos ativos, dentre eles está o lupeol e também a betulina, os ácido oleanólico e ursólico, a  $\alpha$  e a  $\beta$ -amirina. De maneira geral, estes fitoconstituintes são conhecidos principalmente por suas atividades antioxidantes, hepatoprotetora, anti-hipercolesterolêmica, mas se sobressaem evidências sobre suas atividades anti-inflamatória e anticâncer (Di STASI, 1996). Os triterpenos possuem um potencial neurofarmacológico que, até o momento, é pouco explorado. Os poucos triterpenos, avaliados em estudo pré-clínicos comportamentais, mostraram efeitos em testes preditivos de atividade antidepressiva, ansiolítica e anticonvulsivante (ARAGÃO *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2006; FAJEMIROYE *et al.*, 2014; KAZMI *et al.*, 2012; LIANG *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2012; MUCENIECE *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2013).

O triterpeno pentacíclico da família dos lupanos, lupeol, apresenta uma diversidade de atividades biológicas em testes pré-clínicos, tais como anti-inflamatória (ASHALATHA *et al.*, 2010; GEETHA e VARALAKSHMI, 1999; LAMBERTINI *et al.*, 2005; SUDHAHAR *et al.*, 2008), analgésica (de LIMA *et al.*, 2013), antidiabética (ALI *et al.*, 2006; NARVAEZ-MASTACHE *et al.*, 2006; ORTIZ-ANDRADE *et al.*, 2007), antimicrobiana (ABD-ALLA *et al.*, 2009; AHMED *et al.*, 2010; ERAZO *et al.*, 2008; HERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.*, 1994; TANAKA *et al.*, 2004), antiprotozoária (FOURNET *et al.*, 1992; SUKSAMRARN *et al.*, 2003; ZIEGLER *et al.*, 2004), antimutagênica e antitumoral (LEE *et al.*, 2007; LIRA *et al.*, 2008; SULTANA *et al.*, 2003; SUNITHA *et al.*, 2001; SALEEM, 2009; YOU *et al.*, 2003), gastroprotetora (LIRA *et al.*,

2009), hepatoprotetora (AL-REHAILY *et al.*, 2001) e nefroprotetora (MALINI *et al.*, 1995; VIDYA *et al.*, 2000, SHIRWAIKAR *et al.*, 2004).

Quanto à capacidade de atuar sobre o SNC, tem-se que a administração prévia de lupeol é capaz de potencializar o sono barbitúrico (ROCHA *et al.*, 1982 *apud* VIEIRA *et al.*, 2002), sendo que a dose de 30 mg/kg (v.o.) não alterou a deambulação dos animais no teste do campo aberto (LIRA, 2010), enquanto a dose de 50 mg/kg (i.p.) não reduziu o desempenho motor de camundongos no teste da barra giratória (*rota-rod*) (MUCENIECE *et al.*, 2008). Quanto aos ensaios *in vitro* utilizados para extrapolar sobre suas atividades centrais, Muceniece *et al.* (2008) relataram uma ausência de ligação ao sítio benzodiazepínico do receptor GABA<sub>A</sub> em ensaios de *binding*, propriedade esta observada apenas para o triterpeno betulina.

Sobre a farmacocinética do lupeol, Siddique *et al.* (2011) mostraram que o lupeol é absorvido após tratamento pela via intraperitoneal, de modo, que a administração única deste composto na dose de 200 mg/kg (i.p.), em camundongos, resulta em uma concentração plasmática de 3,08 e 5,22  $\mu\text{M}$  após 4 e 8 h, respectivamente. No entanto, o tratamento, por oito semanas, pela via i.p., com a dose de 40 mg/kg, resultou em concentrações plasmáticas maiores, variando de 10 - 20  $\mu\text{M}$ , sugerindo que o lupeol necessita de períodos prolongados de tratamento para alcançar níveis significativos na corrente sanguínea. Isto pode auxiliar a justificar a ausência de efeitos do tipo antidepressivos após o tratamento agudo. No entanto, não há estudos sobre a biodisponibilidade do lupeol após uma administração oral, apenas a constatação de que este composto é ativo após protocolos de tratamento pela via oral (GEETHA e VARALAKSHMI, 1999; LIRA *et al.*, 2009; SUDHAHAR *et al.*, 2008).

De acordo com nosso levantamento bibliográfico, este é o primeiro estudo que avalia o lupeol em testes preditivos de atividade antidepressiva. Após a detecção do efeito de lupeol no NF, avaliamos o envolvimento das vias serotoninérgica e catecolaminérgica endógenas no mecanismo de ação deste composto. Verificamos que, assim como para a FClor, as monoaminas endógenas estão envolvidas no efeito do lupeol, pois os dois inibidores de síntese de monoaminas, a AMPT e a PCPA, impediram que este triterpeno reduzisse o tempo de imobilidade dos animais no NF.

Devido ao envolvimento tanto da via serotoninérgica quanto da catecolaminérgica no efeito comportamental da FClor e do lupeol, levantamos a hipótese de que estas preparações poderiam estar atuando como inibidores da enzima MAO-A, pois várias plantas utilizadas popularmente para melhorar o estado de humor possuem como princípios

ativos fitocompostos inibidores da atividade da MAO-A (JÄGER *et al.*, 2013; KONG *et al.*, 2004; STAFFORD *et al.*, 2007).

A enzima monoamina oxidase (MAO; EC 1.4.3.4.) é uma das principais responsáveis pelo catabolismo dos neurotransmissores dopamina, noradrenalina e serotonina, e está localizada na membrana externa das mitocôndrias, sendo expressa com maior abundância no fígado. A MAO apresenta duas isoformas: a MAO-A, um dos principais alvos de fármacos antidepressivos, e MAO-B, um alvo dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Parkinson (para uma revisão sobre o assunto: FINBERG, 2014).

Nossos ensaios *in vitro*, utilizando uma fração enriquecida em mitocôndrias preparada a partir do homogenato de fígado de camundongos como fonte de MAO, mostraram que a FClor e o lupeol não inibiram a atividade das enzimas MAO-A ou MAO-B. Portanto, descartamos uma possível inibição direta sobre a atividade desta enzima como possível mecanismo envolvido nas alterações comportamentais induzidas pela FClor e pelo lupeol. Este resultado sugere que o possível aumento da transmissão monoaminérgica não se dá por redução direta dos tratamentos avaliados na metabolização destes neurotransmissores pelas isoformas da enzima MAO, mas talvez pelo aumento na liberação ou na inibição de sua recaptação, embora, estudos adicionais, como dosagem de monoaminas por CLAE ou ensaio de recaptação em sinaptossomas ainda se façam necessários para avaliar esta hipótese.

Os inibidores irreversíveis da MAO-A possuem a desvantagem de causar a “reação do queijo”. Ao inibirem a MAO-A intestinal e hepática, estes fármacos reduzem o metabolismo da tiramina, a qual é abundante em alimentos fermentados como queijo e vinho. Devido esta redução do metabolismo, uma maior proporção desta amina é absorvida, exacerbando indiretamente a transmissão noradrenérgica, pois desloca a noradrenalina das terminações sinápticas (BENEDETTI *et al.*, 1983). O fato da FClor e do lupeol não serem iMAOs pode ser uma vantagem em relação a esta classe de fármacos antidepressivos e em relação ao *Hypericum perforatum*, que possui como princípios ativos fitocompostos iMAOs (SUZUKI *et al.*, 1984), reduzindo assim as chances de interação com alimentos ricos em tiramina.

Por outro lado, o tratamento crônico com fármacos antidepressivos clássicos, como os tricíclicos, aumentam a expressão de BDNF hipocampal (NIBUYA *et al.*, 1995) e, segundo a hipótese neurotrófica da depressão, o aumento nos níveis desta neurotrofina seria uma via comum pelos quais os antidepressivos exercem seus efeitos terapêuticos (NESTLER *et al.*, 2002). À luz disso, avaliamos a hipótese

de que o tratamento com a FClor e o lupeol aumenta o nível hipocampal de neurotrofinas, dentre estas o BDNF. Logo, quantificamos pela técnica de *ELISA* os níveis de BDNF em tecido cerebral proveniente do hipocampo dos animais submetidos ao protocolo de tratamento adotado neste estudo (*ex vivo*) e, como resultado, verificamos que, apenas o tratamento com a FClor e com o controle positivo imipramina foram capazes de aumentar este fator, mas não o tratamento com lupeol, apesar de todos os tratamentos reduzirem o tempo de imobilidade dos animais no NF. Portanto, a FClor possui constituintes capazes de aumentar a expressão de BDNF, assim como a imipramina, mas que, o lupeol não parece ser o composto responsável por este efeito.

Porém, não podemos descartar a possibilidade de que a ausência de alteração nos níveis de BDNF após a administração de lupeol possa ser devida à necessidade de um intervalo de tratamento maior do que o utilizado em nosso protocolo experimental. Para excluir esta possibilidade, seria necessário dosar esta neurotrofina após o tratamento por 7 a 21 dias, pois fármacos antidepressivos clássicos necessitam deste intervalo temporal para aumentarem a expressão de BDNF (NIBUYA *et al.*, 1995). Outro ponto interessante, é que na literatura não há relatos sobre a avaliação do nível hipocampal de BDNF utilizando o protocolo de tratamento (24, 5 e 1 h) adotado neste estudo para nenhum tratamento, inclusive com os antidepressivos clássicos.

Além disso, a principal via de sinalização celular implicada no aumento da expressão de BDNF promovida por fármacos antidepressivos é a via do AMPc-PKA-CREB (DUMAN *et al.*, 1997; NAKAGAWA *et al.*, 2002; NESTLER *et al.*, 2002; NIBUYA *et al.*, 1995). A ativação de alguns receptores de membrana para monoaminas leva ao aumento das concentrações intracelulares de AMPc, e este segundo mensageiro, por sua vez, ativa quinases dependentes de AMPc (PKA), as quais fosforilam e assim ativam outros mensageiros intracelulares dentre os quais está o fator de transcrição CREB. Portanto, o tratamento com antidepressivos aumenta a fosforilação de CREB, que aumenta a expressão de BDNF (DUMAN *et al.*, 1997; NAKAGAWA *et al.*, 2002; NESTLER *et al.*, 2002).

Ao avaliarmos se esta via de sinalização estava envolvida no aumento da expressão de BDNF causado pelos tratamentos em estudo não observamos qualquer alteração significativa, nem mesmo com o controle positivo imipramina, o que pode ser, novamente, devido ao tempo de tratamento, pois o tratamento com imipramina 15 mg/kg (i.p.) por 21 dias resulta em aumento na expressão de CREB (NIBUYA *et al.*, 1996), além

de também levar ao aumento da fosforilação deste fator de expressão em células após 3 semanas de exposição (KOCH *et al.*, 2003).

Por outro lado, a possível relação entre inflamação e depressão está cada vez mais clara e fundamentada na literatura. A produção de citocinas pró-inflamatórias pode estar envolvida na patofisiologia da depressão, e parte dos efeitos terapêuticos dos fármacos antidepressivos reside na capacidade destes em reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, de maneira análoga aos fármacos anti-inflamatórios (DIAMOND *et al.*, 2006; LICINIO e WONG, 1999; OHGI *et al.*, 2013; XIA *et al.*, 1996; YIRMIYA *et al.*, 2000).

As citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, como o interferon-gama, a IL-6 e o TNF- $\alpha$ , aumentam a expressão da enzima indolamina-2,3-dioxigenase, enzima que cataliza a degradação de triptofano, aminoácido precursor na síntese de 5-HT, tanto em células do sistema imune localizadas periféricamente quanto no SNC (CONNOR *et al.*, 2008; TU *et al.*, 2005). O aumento da expressão desta enzima, induzida pelas citocinas pró-inflamatórias pode contribuir para a redução na disponibilidade de 5-HT relacionada aos transtornos depressivos (NEUMEISTER, 2003; WIDNER *et al.*, 2002).

Há ainda evidências de que o mediador inflamatório óxido nítrico exerce efeitos negativos sobre a neurogênese e que inibidores da sintetase do óxido nítrico possuem efeito em testes preditivos de atividade antidepressiva (JOCA e GUIMARÃES, 2006; JOCA *et al.*, 2007). Além disso, fármacos anti-inflamatórios, como inibidores da enzima ciclooxigenase-2, podem reduzir o tempo de imobilidade de animais avaliados no NF (GUAN *et al.*, 2014; PAIVA *et al.*, 2010; SANTIAGO *et al.*, 2014) e se cogita que o uso de anti-inflamatórios poderia aumentar a eficácia clínica de antidepressivos (ABBASI *et al.*, 2012; MÜLLER *et al.*, 2006).

Neste sentido, tanto a espécie vegetal *L. pacari* (ALBUQUERQUE *et al.*, 1996; FERNÁNDEZ *et al.*, 2001; MATOS *et al.*, 2008; ROGÉRIO *et al.*, 2003; ROGÉRIO *et al.*, 2006), quanto o lupeol (ASHALATHA *et al.*, 2010; de LIMA *et al.*, 2013; GEETHA e VARALAKSHMI, 1999; LAMBERTINI *et al.*, 2005; SUDHAHAR *et al.*, 2008), são dotados de atividade anti-inflamatória. Portanto, parte dos efeitos comportamentais observados nesta tese poderiam estar relacionados às propriedades anti-inflamatórias desta planta.

A atividade anti-inflamatória do lupeol também é vastamente reconhecida e parece ser devida à capacidade deste triterpeno reduzir a produção de prostaglandinas E<sub>2</sub>, além das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (FERNÁNDEZ *et al.*, 2001; de LIMA *et al.*, 2013), duas citocinas

implicadas na patofisiologia da depressão (DOWLATI *et al.*, 2010; MIKOVA *et al.*, 2001). Além de inibir a expressão destes mediadores inflamatórios, utilizando o ensaio de *docking*, Harish *et al.* (2008), demonstraram que o lupeol pode interagir e inibir diretamente a enzima glicogênio sintase quinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ).

A GSK-3 $\beta$  é uma serina/treonina quinase encontrada em eucariótos, que recebeu esse nome devido a sua capacidade de fosforilar a enzima glicogênio sintase, mas sua atividade celular não se resume a esta fosforilação. Hoje em dia esta quinase é conhecida por participar de várias cascatas de sinalização (JOPE e ROH, 2006), inclusive do processo inflamatório, de modo que seus inibidores possuem atividade anti-inflamatória (CUZZOCREA *et al.*, 2006a,b; LAKSHMANAN *et al.*, 2015).

Recentemente, esta quinase também está sendo implicada na fisiopatologia da depressão (JOPE e ROH, 2006). Aparentemente há uma hiperatividade da GSK-3 $\beta$ , por consequência de uma redução na transmissão serotoninérgica, pois há evidências de que a neurotransmissão mediada por esta monoamina exerce controle inibitório sobre a GSK-3 $\beta$  (LI *et al.*, 2004). Os inibidores da GSK-3 $\beta$  poderiam se tornar uma nova classe de fármacos antidepressivos (DU *et al.*, 2010; GOULD *et al.*, 2004; KAIDANOVICH-BEILIN *et al.*, 2004; ROSA *et al.*, 2008). Apesar de Harish *et al.* (2008) sugerirem que o lupeol pode inibir diretamente a GSK-3 $\beta$ , o efeito de EEP, da FClor sobre esta enzima não é ainda conhecido e, o efeito do lupeol necessita ser melhor esclarecido.

Portanto, uma hipótese que merece ser melhor avaliada, em estudos futuros, é a de que a atividade anti-inflamatória do EEP e do lupeol contribuem, ao menos em parte, para as alterações comportamentais observadas neste estudo.

## 6 SUMÁRIO e CONCLUSÕES

Em resumo, nossos resultados mostraram que:

- No EEP há tanto saponinas, taninos e esteroides, quanto triterpenos, mas apenas quantidades muito pequenas de flavonoides e, que a fração clorofórmica, a fração ativa de *Lafoensia pacari*, é composta majoritariamente por esteroides e triterpenos.

- Dentre os esteroides da fração clorofórmica foi caracterizado o  $\beta$ -sitosterol, e dentre os triterpenos, o lupeol.

- As doses avaliadas do EEP, da fração clorofórmica e do lupeol, mas não de  $\beta$ -sitosterol, possuem a capacidade de reduzir o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado, um teste preditivo de efeito antidepressivo.

- Tanto o efeito da fração clorofórmica quanto do lupeol é, ao menos em parte, mediado pelos sistemas catecolaminérgico e serotoninérgico endógenos.

- Nem a fração clorofórmica nem o lupeol foram capazes de inibir a enzima MAO, seja na isoforma A ou na B, em ensaio *in vitro*.

- Apenas a fração clorofórmica foi capaz de aumentar o nível hipocampal de BDNF.

- Nenhum dos tratamentos analisados alterou a expressão ou fosforilação de CREB.

Desta forma concluímos que o extrato etanólico das cascas do caule de *Lafoensia pacari* possui constituintes neuroativos, que em um processo de partição líquido-líquido ficaram melhor retidos na fração clorofórmica. Dentre estes constituintes, responsáveis pela alteração comportamental em testes preditivos de efeito antidepressivo, está o lupeol. A atividade biológica da fração clorofórmica do extrato e do lupeol parece ser dependente dos sistemas catecolaminérgico e serotoninérgico endógenos, sem, no entanto, envolver uma redução da atividade de MAO. O tratamento com a fração clorofórmica, mas não com o lupeol isoladamente, é capaz de levar à um aumento no nível de BDNF hipocampal, sugerindo que outro(s) composto(s) pode(m) ser responsável(is) por este fenômeno, ou que seja necessária a ação sinérgica do lupeol e demais constituintes.

Entretanto, há a possibilidade do extrato, fração e fitoconstituintes utilizados aumentarem a liberação ou inibirem a recaptção de monoaminas, sendo necessários estudos adicionais para avaliarmos esta hipótese, além de verificarmos outros mecanismos de ação que podem também estar envolvidos no efeito do tipo antidepressivo observado.

Além disso, o tempo de tratamento utilizado pode ter sido insuficiente para permitir a observação de alterações na via de sinalização mediada por CREB e este aspecto também deve ser mais investigado. Estas possibilidades a serem estudadas não invalidam o achado principal deste estudo que mostrou o potencial antidepressivo da *Lafoensia pacari* em testes pré-clínicos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, S.H., Hosseini, F., Modabbernia, A., Ashrafi, M., Akhondzadeh, S. Effect of celecoxib add-on treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: randomized double-blind placebo-controlled study. *J. Affect. Disord.*, 141(2-3):308-14, 2012.
- Abd-Alla, H.I., Shaaban, M., Shaaban, K.A., Abu-Gabal, N.S., Shalaby, N.M., Laatsch, H. New bioactive compounds from *Aloe hijazensis*. *Nat Prod Res.* 23(11):1035-49, 2009.
- Aghajanian, G. K., Graham, A. W., Sheard, M. H. Serotonin-containing neurons in brain: depression of firing by monoamine oxidase inhibitors. *Science* 169(3950):1100–1102, 1970.
- Aguirre-Hernández, E., Rosas-Acevedo, H., Soto-Hernández, M., Martínez, A.L., Moreno, J., González-Trujano, M.E. Bioactivity-guided isolation of beta-sitosterol and some fatty acids as active compounds in the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* var. *mexicana*. *Planta Med.*, 73(11):1148-55, 2007.
- Ahmed, Y., Sohrab, M.H., Al-Reza, S.M., Tareq, F.S., Hasan, C.M., Sattar, M.A. Antimicrobial and cytotoxic constituents from leaves of *Sapium baccatum*. *Food Chem Toxicol.*, 48(2):549-52, 2010.
- Akkol, E.K., Orhan, I., Kartal, M., Yeşilada, E. Bioactivity guided evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Arceuthobium oxycedri* (D.C.) M. Bieb. *J. Ethnopharmacol.*, 128(1):79-84, 2010.
- Albert, P.R., Zhou, Q.Y., Van Tol, H.H., Bunzow, J.R., Civelli, O. Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine1A receptor gene. *J. Biol. Chem.*, 265(10):5825-32, 1990.
- Albuquerque, D.A., Juliani, J.M., Santos, J.A., Hosida, P.Y., Borges, S., Borralho, C.T. Efeito do extrato etanólico de *Lafoensia pacari* sobre peritonite aguda em camundongos. In: Programa e Anais 3ª Reunião especial da SBPC "Ecossistemas Costeiros-do conhecimento a gestão", Florianópolis, SC, UFSC, 1996.
- Ali, H., Houghton, P.J., Soumyanath, A. Alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J Ethnopharmacol.*, 107(3):449-55, 2006.
- Al-Rehaily, A., El-Tahir, K.E.H., Mossa, J.S., Rafatullah, S. Pharmacological studies of various extracts and the major

- constituent Lupeol obtained from hexane extract of *Teclea nobilis* in rodents. *Nat Product Sci.*, 7:76–82, 2001.
- Angst, J. The bipolar spectrum. *Br. J. Psychiatry* 190:189–191, 2007.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Bulas Padrão de Medicamentos Fitoterápicos. Disponível em: <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/bi4x>. 2014. Acesso em 25 de Julho de 2014.
- Aragão, G.F., Carneiro, L.M., Junior, A.P., Vieira, L.C., Bandeira, P.N., Lemos, T.L., Viana, G.S. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 85(4):827-34, 2006.
- Archer, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.*, 21(2):205-35, 1973.
- Ashalatha, K., Venkateswarlu, Y., Priya, A.M., Lalitha, P., Krishnaveni, M., Jayachandran, S. Anti inflammatory potential of *Decalepis hamiltonii* (Wight and Arn.) as evidenced by down regulation of pro inflammatory cytokines-TNF-alpha and IL-2. *J. Ethnopharmacol.*, 130:167–70, 2010.
- Associação Americana de Psiquiatria. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – DSM-5. 5 Edição. Washington: American Psychiatric Association, 2013.
- Baldessarini, R.J. Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. In: Brunton L.L.; Lazo J.S.; Parker K.L. (Eds.). *Goodman & Gilman's, As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p.383-410.
- Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm. Pharmacol.*, 53(5):583-600, 2001.
- Barnes, N.M., Sharp, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38:1083-152, 1999.
- Benedetti, M.S., Boucher, T., Carlsson, A., Fowler, C.J. Intestinal metabolism of tyramine by both forms of monoamine oxidase in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, 32(1):47-52, 1983.
- Blier, P., Montigny, C. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol. Sci.*, 15:220–226, 1994.
- Blumenthal, M., Busse, W.R., Goldberg, A., Grünwald, J., Hall, T., Riggins, C.W., Rister, R.S. (eds). *The complete German Commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines*. American Botanical Council, Boston, 1998.

- Bonanno, G., Giambelli, R., Raiteri, L., Tiraboschi, E., Zappettini, S., Musazzi, L., Raiteri, M., Racagni, G., Popoli, M. Chronic antidepressants reduce depolarization-evoked glutamate release and protein interactions favoring formation of SNARE complex in hippocampus. *J. Neuroscience*, 25:3270–9, 2005.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254, 1976.
- Braz-Filho, R. Química de Produtos Naturais: Importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. 2. A peregrinação de um Pacatubano. *Quim. Nova*, 17:405-445, 1994.
- Bromet, E., Andrade, L.H., Hwang, I., Sampson, N.A., Alonso, J., de Girolamo, G., de Graaf, R., Demyttenaere, K., Hu, C., Iwata, N., Karam, A.N., Kaur, J., Kostyuchenko, S., Lépine, J.P., Levinson, D., Matschinger, H., Mora, M.E., Browne, M.O., Posada-Villa, J., Viana, M.C., Williams, D.R., Kessler, R.C. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. *BMC Med.*, 9:90, 2011.
- Cabral, P.R.F., Pasa, M.C. Mangava-brava: *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae) e a etnobotânica em Cuiabá, MT. *Rev. Biodiversidade*, 8(1):2-21, 2009.
- Cairncross, K.D., Cox, B., Forster, C., Wren, A.F. A new model for the detection of antidepressants drugs: olfactory bulbectomy in the rats comparing to the existing models. *J. Pharmacol. Methods*, 1:131–43, 1978.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A. The frequency of U-shaped dose response in the toxicological literature. *Toxicol. Sci.*, 62:330–338, 2001.
- Calixto, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 33:179-189, 2000.
- Calixto, J.B., Siqueira Jr, J.M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. *Gaz. Méd. Bahia*, 78(S1):98-106, 2008.
- Carlini, E.A. Plants and the central nervous system. *Pharm. Biochem. Behav.*, 75:501-512, 2003.
- Carvalho, P.E.R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira. Brasília: EMBRAPA, CNPF. Colombo, 1994. 640p. <[http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/index\\_especies.htm](http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/index_especies.htm)> Acesso em 17/01/2014.
- Cavalcanti, T.B., Graham, S.A., Silva, M.C. Flora do Estado de Goiás e Tocantins: Lythraceae. Coleção Rizzo 28. Editora da UFG; 2001.

- Cechinel Filho, V., Yunes, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. *Quim. Nova*, 21:99-105, 1998.
- Celada, P., Puig, M., Amargós-Bosch, M., Adell, A., Artigas, F. The therapeutic role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in depression. *J. Psychiatry Neurosci.*, 29(4):252-65, 2004.
- Chen, S.W., Wang, W.J., Li, W.J., Wang, R., Li, Y.L., Huang, Y.N., Liang, X. Anxiolytic-like effect of asiaticoside in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 85(2):339-44, 2006.
- Colla, A.R., Machado, D.G., Bettio, L.E., Colla, G., Magina, M.D., Brighente, I.M., Rodrigues, A.L. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 143(2):720-31, 2012.
- Connor, T. J., Starr, N., O'sullivan, J. B., Harkin, A. Induction of indolamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: a role for IFN-gamma? *Neurosci. Lett.*, 441:29-34, 2008.
- Coppen, A. The biochemistry of affective disorders. *Br. J. Psychiatry*, 113(504):1237-64, 1967.
- Corrêa, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Nacional, Rio de Janeiro, v. 2, p.520, 1984.
- Corrodi, H., Hanson, L. C. F. Central effects of an inhibitor of tyrosine hydroxylation. *Psychopharmacologia*, 10(2):116-125, 1966.
- Costa, A.P., Vieira, C., Bohner, L.O., Silva, C.F., Santos, E.C., De Lima, T.C., Lino-de-Oliveira, C.B. A proposal for refining the forced swim test in Swiss mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 45:150-5, 2013.
- Cragg, G.M., Newman, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*. 1830(6):3670-95, 2013.
- Crane, G.E. The psychiatric side-effects of iproniazid. *Am. J. Psychiatry*, 112(7):494-501, 1956.
- Cryan, J. F.; Mombereau, C.; Vassout, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci. Biobehav. R.*, 29(4-5):571-625, 2005.
- Cryan, J.F., Mombereau, C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol. Psychiatry*, 9(4):326-57, 2004.

- Cryan, J.F., Valentino, R.J., Lucki, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29(4-5):547-69, 2005.
- Cuzzocrea, S., Crisafulli, C., Mazzon, E., Esposito, E., Muia, C., Abdelrahman, M., Di Paola R, Thiemermann C. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 beta attenuates the development of carrageenan induced lung injury in mice. *Br. J. Pharmacol.*, 149:687-702, 2006a.
- Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Di Paola, R., Muia, C., Crisafulli, C., Dugo, L., Collin, M., Britti, D., Caputi, A.P., Thiemermann, C. Glycogen synthase kinase-3 beta inhibition attenuates the degree of arthritis caused by type II collagen in the mouse. *Clin. Immunol.* 120:57-67, 2006b.
- Dang, H., Chen, Y., Liu, X., Wang, Q., Wang, L., Jia, W., Wang, Y. Antidepressant effects of ginseng total saponins in the forced swimming test and chronic mild stress models of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 33(8):1417-24, 2009.
- de Lima, F.O., Alves, V., Barbosa Filho, J.M., Almeida, J.R., Rodrigues, L.C., Soares, M.B., Villarreal, C.F. Antinociceptive effect of lupeol: evidence for a role of cytokines inhibition. *Phytother. Res.* 27(10):1557-63, 2013.
- Detke, M.J., Rickels, M., Lucki, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*, 121(1):66-72, 1995.
- Deussing, J.M. Animal Models of Depression. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 3(4):375-83, 2006.
- Di Stasi, L. C. Química de Produtos Naturais: Principais Constituintes Ativos. In: L.C. di Stasi (Org.), *Plantas Mediciniais: Arte e Ciência, Um Guia de Estudo Multidisciplinar*, Editora UNESP, São Paulo, pp. 109-127, 1996.
- Diamond, M., Kelly, J.P., Connor, T.J. Antidepressants suppress production of the Th1 cytokine interferon-gamma, independent of monoamine transporter blockade. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 16(7):481-90, 2006.
- Dixon, K. Ethological strategies for defence in animals and humans: their role in some psychiatric disorders. *Brit. J. Med. Psychol.* 71(4):417-45, 1998.
- Doron, R., Parot, F. *Dicionário de Psicologia*. Editora Climepsi, Lisboa, 2001.

- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E.K., Lanctôt, K.L. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol. Psychiatry*, 67(5):446-57, 2010.
- Du, J., Wei, Y., Liu, L., Wang, Y., Khairova, R., Blumenthal, R., Tragon, T., Hunsberger, J.G., Machado-Vieira, R., Drevets, W., Wang, Y.T., Manji, H.K. A kinesin singaling complex mediates the ability of GSK-3 $\beta$  to affects mood-associated behaviors. *PNAS*, 107(25):11573-11578, 2010.
- Duman, R.S., Monteggia, L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol. Psychiatry*, 59:1116–27, 2006.
- Duman, R.S., Heninger, G.R., Nestler, E.J. A molecular and cellular theory of depression. *Arch. Gen. Psychiatry*, 54(7):597-606, 1997.
- Erazo, S., Rocco, G., Zaldivar, M., Delporte, C., Backhouse, N., Castro, C., Belmonte, E., Delle Monache, F., García, R. Active metabolites from *Dunalia spinosa* resinous exudates. *Z Naturforsch C*. 63:492–6, 2008.
- Ernst, E. Second thoughts about safety of St. John's wort. *Lancet* 354:2014–2015, 1999.
- Fajemiroye, J.O., Galdino, P.M., Florentino, I.F., Da Rocha, F.F., Ghedini, P.C., Polepally, P.R., Zjawiony, J.K., Costa, E.A. Plurality of anxiety and depression alteration mechanism by oleanolic acid. *J. Psychopharmacol.*, 28(10):923-34, 2014.
- Fernandes, E.S., Passos, G.F., Medeiros, R., da Cunha, F.M., Ferreira, J., Campos, M.M., Pianowski, L.F., Calixto, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur. J. Pharmacol.*, 569(3):228-36, 2007.
- Fernández, M.A., Heras, B., García, M.D., Sáenz, M.T., Villar, A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *J. Pharm. Pharmacol.*, 53(11):1533-9, 2001.
- Ferris, J.P., Boyce, C.B., Briner, R.C., Weiss, U., Qureshi, I.H., Sharpless, N.E. Lythraceae alkaloids. X. Assignment of absolute stereochemistries on the basis of chiroptical effects. *J. Am. Chem. Soc.*, 93(12):2963-8, 1971.
- Finberg, J.P. Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: Focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacol. Ther.*, 143(2):133-152, 2014.
- Fleck, M.P., Berlim, M.T., Lafer, B., Sougey, E.B., Del Porto, J.A., Brasil, M.A., Juruena, M.F., Hetem, L.A. Revisão das diretrizes da associação médica brasileira para o tratamento da depressão. *Rev. Bras. Psiquiatria*, 31(S1):S7-S17, 2009.

- Fournet, A., Angelo, A., Muñoz, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cavé, A. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *J. Ethnopharmacol.*, 37:159–64, 1992.
- Francis, D.D., Champagne, F.A., Liu, D., Meaney, M.J. Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 896:66–84, 1999.
- Frank, L., Revicki, D.A., Sorensen, S.V., Shih, Y.C. The economics of selective serotonin reuptake inhibitors in depression: a critical review. *CNS Drugs*. 15(1):59-83, 2001.
- Galdino, P.M., Nascimento, M.V., Sampaio, B.L., Ferreira, R.N., Paula, J.R., Costa, E.A. Antidepressant-like effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. ethanolic extract and fractions in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 124(3):581-5, 2009.
- Galdino, P.M., Nascimento, M.V.M., Sousa, F.B., Ferreira, R.N., Paula, J.R., Costa, E.A. Central activities of hydroalcoholic extract from *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. stem bark. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 46(3):455-62, 2010.
- Garcia, L.S., Comim, C.M., Valvassori, S.S., Réus, G.Z., Barbosa, L.M., Andreazza, A.C., Stertz, L., Fries, G.R., Gavioli, E.C., Kapczinski, F., Quevedo, J. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 32(1):140-4, 2008.
- Geetha, T., Varalakshmi, P. Anticomplement activity of triterpenes from *Crataeva nurvala* stem bark in adjuvant arthritis in rats. *Gen. Pharmacol.*, 32(4):495-7, 1999.
- Ghaemi, S.N., Sachs, G.S., Chiou, A.M., Pandurangi, A.K., Goodwin, F.K. Is bipolar disorder still underdiagnosed? Are antidepressants overutilized? *J. Affect. Disord.* 52:35–144, 1999.
- Gilbert, P., Allan, S. The role of defeat and entrapment (arrested flight) in depression: an exploration of an evolutionary view. *Psychol. Med.*, 28(3):585:98, 1998.
- Gould, T.D., Einat, H., Bhat, R., Manji, H.K. AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 7:387–90, 2004.
- Gourley, S.L., Wu, F.J., Kiraly, D.D., Ploski, J.E., Kedves, A.T., Duman, R.S., Taylor, J.R. Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. *Biol. Psychiatry*, 63(4):353–359, 2008.

- Graham, S.A. Fossil Records in the Lythraceae. *Bot. Rev.*, 79:48-145, 2013.
- Grandin, L.D., Alloy, L.B., Abramson, L.Y. The Social Zeitgeber Theory, Circadian Rhythms and Mood Disorders: Review and Evaluation. *Clinical Psychology Review*, 26:679-694, 2006.
- Guan, X.T., Shao, F., Xie, X., Chen, L., Wang, W. Effects of aspirin on immobile behavior and endocrine and immune changes in the forced swimming test: Comparison to fluoxetine and imipramine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 124C:361-366, 2014.
- Guimarães, H.A., Nascimento, M.V.M., Tavares, A., Galdino, P.M., Paula, J.R., Costa, E.A. Effects of ethanolic extract of leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae (pacari), in pain and inflammation models. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 20(3):328-33, 2010.
- Harish, B.G., Krishna, V., Santosh Kumar, H.S., Khadeer Ahamed, B.M., Sharath, R., Kumara Swamy, H.M. Wound healing activity and docking of glycogen-synthase-kinase-3-beta-protein with isolated triterpenoid lupeol in rats. *Phytomedicine*, 15(9):763-7, 2008.
- Harvey, A.L. Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today*, 13(19-20):894-901, 2008.
- Hein, L., Altman, J.D., Kobilka, B.K. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature*, 402:181-184, 1999.
- Hernández-Pérez, M., López-García, R.E., Rabanal, R.M., Darias, V., Arias, A. Antimicrobial activity of *Visnea mocanera* leaf extracts. *J. Ethnopharmacol.* 41:115-9, 1994.
- Hirota, K., Lambert, D.J. Ketamine: its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. *Br. J. Anaesth.*, 77(4):441-4, 1996.
- Hirschfeld, R.M., Lewis, L., Vornik, L.A. Perceptions and impact of bipolar disorder: how far have we really come? Results of the national depressive and manic-depressive association 2000 survey of individuals with bipolar disorder. *J. Clin. Psychiatry*, 64:161-174, 2003.
- Holt, A., Sharman, D.S., Baker, G.B., Palcic, M.M. A continuous spectrophotometric assay for monoamine oxidase and related enzymes in tissue homogenates. *Analytical Biochemistry*, 244:384-392, 1997.
- Istikoglou, C.I., Mavreas, V., Geroulanos, G. History and therapeutic properties of *Hypericum perforatum* from antiquity until today. *Psychiatriki*, 21(4):332-8, 2010.

- Jäger, A.K., Gauguin, B., Andersen, J., Adersen, A., Gudiksen, L. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat depression and anxiety for affinity to the serotonin transporter and inhibition of MAO-A. *J. Ethnopharmacol.*, 145(3):822-5, 2013.
- Jick, H., Kaye, J.A., Jick, S.S. Antidepressants and the risk of suicidal behaviors. *JAMA*. 292(3):338-43, 2004.
- Joca, S.R., Guimarães, F.S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology (Berl)*, 185(3):298-305, 2006.
- Joca, S.R., Guimarães, F.S., Del-Bel, E. Inhibition of nitric oxide synthase increases synaptophysin mRNA expression in the hippocampal formation of rats. *Neurosci Lett.*, 421(1):72-6, 2007.
- Johnston, J.P. Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem. Pharmacol.*, 17:1285-1297, 1968.
- Jope, R.S., Roh, M. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Curr. Drug Targets*, 7:1421-34, 2006.
- Jung, J.M., Park, S.J., Lee, Y.W., Lee, H.E., Hong, S.I., Lew, J.H., Hong, E., Shim, J.S., Cheong, J.H., Ryu, J.H. The effects of a standardized *Acanthopanax koreanum* extract on stress-induced behavioral alterations in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 148(3):826-34, 2013.
- Kaidanovich-Beilin, O., Milman, A., Weizman, A., Pick, C.G., Eldar-Finkelman, H. Rapid antidepressant-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus. *Biol. Psychiatry*, 55:781-4, 2004.
- Kallubai, M., Rachamalla, A., Yeggoni D.P., Subramanyam, R. Comparative binding mechanism of lupeol compounds with plasma proteins and its pharmacological importance. *Mol. BioSyst.*, 11:1172-83, 2015.
- Katz, M.M., Tekell, J.L., Bowden, C.L., Brannan, S., Houston, J.P., Berman, N., Frazer, A. Onset and early behavioral effects of pharmacologically different antidepressants and placebo in depression. *Neuropsychopharmacology*, 29(3):566-79, 2004.
- Kazmi, I., Afzal, M., Gupta, G., Anwar, F. Antiepileptic potential of ursolic acid stearoyl glucoside by GABA receptor stimulation. *CNS Neurosci Ther.*, 18(9):799-800, 2012.
- Knaus, A.E., Muthig, V., Schickinger, S., Moura, E., Beetz, N., Gilsbach, R., Hein, L. Alpha2-adrenoceptor subtypes - unexpected functions for receptors and ligands derived from gene-targeted mouse models. *Neurochem.Int.* 51:277-281, 2007.

- Koch, J.M., Kell, S., Aldenhoff, J.B. Differential effects of fluoxetine and imipramine on the phosphorylation of the transcription factor CREB and cell-viability. *J. Psychiatr. Res.*, 37(1):53-9, 2003.
- Koe, B.K., Weissman, A. *p*-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 154:499-516, 1966.
- Koehn, F.E., Carter, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 4(3):206-20, 2005.
- Kong, L.D., Cheng, C.H., Tan, R.X. Inhibition of MAO A and B by some plant-derived alkaloids, phenols and anthraquinones. *J. Ethnopharmacol.*, 91(2-3):351-5, 2004.
- Kudryavtseva, N.N., Bakshtanovskaya, I.V., Koryakina, L.A. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 38(2):315-20, 1991.
- Kuhn, R. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *Am. J. Psychiatry*, 115(5):459-64, 1958.
- Lakshmanan, J., Zhang, B., Nweze, I.C., Du, Y., Harbrecht, B.G. Glycogen synthase kinase 3 regulates IL-1 $\beta$  mediated iNOS expression in hepatocytes by down-regulating c-Jun. *J. Cell Biochem.*, 116(1):133-41, 2015.
- Lambertini, E., Lampronti, I., Penolazzi, L., Khan, M.T., Ather, A., Giorgi, G., Gambari, R., Piva, R. Expression of estrogen receptor alpha gene in breast cancer cells treated with transcription factor decoy is modulated by Bangladeshi natural plant extracts. *Oncol. Res.*, 15:69-79, 2005.
- Lee, T.K., Poon, R.T., Wo, J.Y., Ma, S., Guan, X.Y., Myers, J.N., Altevogt, P., Yuen, A.P. Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor-kappa B activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res.*, 67:8800-9, 2007.
- Lemes, G.F., Ferri, P.H., Lopes, M.N., 2011. Constituintes químicos de *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) R. Harley (Lamiaceae). *Quim. Nova*, 34(1):39-42.
- Leonard, B.E. Psychopathology of depression. *Drugs Today (Barc)*. 43(10):705-16, 2007.
- Leonard, B.E. The immune system, depression and the action of antidepressants. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 25(4):767-80, 2001.
- Li, X., Zhu, W., Roh, M.S., Friedman, A.B., Rosborough, K., Jope, R.S. In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3 beta)

- by serotonergic activity in mouse brain. *Neuropsychopharmacology*, 29:1426–31, 2004.
- Liang, X., Huang, Y.N., Chen, S.W., Wang, W.J., Xu, N., Cui, S., Liu, X.H., Zhang, H., Liu, Y.N., Liu, S., Yang, M., Dong, Y. Antidepressant-like effect of asiaticoside in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 89(3):444-9, 2008.
- Licinio, J., Wong, M.L. The role of inflammatory mediators in the biology of major depression: central nervous system cytokines modulate the biological substrate of depressive symptoms, regulate stress-responsive systems, and contribute to neurotoxicity and neuroprotection. *Mol. Psychiatry*, 4(4):317-27, 1999.
- Lima, F.O., Alves, V., Barbosa, Filho, J.M., Almeida, J.R., Rodrigues, L.C., Soares, M.B., Villarreal, C.F. Antinociceptive effect of lupeol: evidence for a role of cytokines inhibition. *Phytother. Res.*, 27(10):1557-63, 2013.
- Lima, M.R., Souza-Luna, J., Santos, A.F., Andrade, M.C., Sant'Ana, A.E., Genet, J.P., Marquez, B., Neuville, L., Moreau, N. Antibacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 105(1-2):137-47, 2006.
- Linde, K., Berner, M.M., Kriston, L. St John's wort for major depression. *Cochrane Database Syst Rev.*, (4):CD000448, 2008.
- Linde, K., Ramirez, G., Mulrow, C.D., Pauls, A., Weidenhammer, W., Melchart, D., St John's wort for depression - An overview and meta-analysis of randomised clinical trials, *British Medical J.*, 313(7052):253-258, 1996.
- Lipton, S.A., Rosenberg, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.*, 330, 613-22, 1994.
- Lira, S.R., Rao, V.S., Carvalho, A.C., Guedes, M.M., de Moraes, T.C., de Souza, A.L., Trevisan, M.T., Lima, A.F., Chaves, M.H., Santos, FA. Gastroprotective effect of lupeol on ethanol-induced gastric damage and the underlying mechanism. *Inflammopharmacology*, 17(4):221-8, 2009.
- Lira, SRS. Estudo farmacológico dos efeitos gastrointestinais e comportamentais do lupeol e da dilactona do ácido valonéico, isolados de *Cenostigma macrophyllum* Tul., em roedores. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil, 2010.
- Lira, W.M., dos Santos, F.V., Sannomiya, M., Rodrigues, C.M., Vilegas, W., Varanda, E.A. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting

- mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. J. Med. Food, 11:111–9, 2008.
- Lorenzi, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. v. 2, 4ª ed., Editora Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 2002.
- Lourteig, A. Lytráceas. Flora Ilustrada Catarinense, Itajaí, p.1-80, 1969.
- Machado, D.G., Neis, V.B., Balen, G.O., Colla, A., Cunha, M.P., Dalmarco, J.B., Pizzolatti, M.G., Prediger, R.D., Rodrigues, A.L. Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: evidence for the involvement of the dopaminergic system. Pharmacol. Biochem. Behav., 103(2):204-11, 2012.
- Mahato, S.B., Kundu, A.P. <sup>13</sup>C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A Compilation and Some Salient Features. Phytochemistry, 37(6):1517-75, 1994.
- Maier, S.F., Seligman, M.E. Learned helplessness: Theory and evidence. J. Exp. Psychol. Gen., 105(1):3-46, 1976.
- Malberg, J., Eisch, A.J., Nestler, E.J., Duman, R.S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult hippocampus. J. Neurosci, 20:9104-9110, 2000.
- Malini, M.M., Baskar, R., Varalakshmi, P. Effect of lupeol, a pentacyclic triterpene, on urinary enzymes in hyperoxaluric rats. J. Med. Sci. Biol., 48:211–20, 1995.
- Martins, S.V., Brito, E.R., Oliveira-Filho, A.T., Silva, A.F., Silva, E. Floristic composition of two wetland forests in araguaian plain, state of Tocantins, Brazil, and comparison with other areas. Rev. Árvore, 32:129-41, 2008.
- Matos, L.G., Santos, S.R., Ferreira, R.N., Pontes, I.S., Paula, J.R., Costa, E.A. Anti-inflammatory, antinociceptive and sedating effects of *Lafoensia pacari* aqueous extract. Pharm. Biol., 46:341-6, 2008.
- McClatchey, W.C., Mahady, G.B., Bennett, B.C., Shiels, L., Savo, V. Ethnobotany as a pharmacological research tool and recent developments in CNS-active natural products from ethnobotanical sources. Pharmacol. Ther., 123(2):239-54, 2009.
- McKinney, W.T.Jr., Bunney, W.E.Jr. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. Arch. Gen. Psychiatry, 21(2):240-8, 1969.
- Medeiros, R., Passos, G.F., Vitor, C.E., Koepp, J., Mazzuco, T.L., Pianowski, L.F., Campos, M.M., Calixto, J.B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia*

- verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *Br. J. Pharmacol.*, 151(5):618-27, 2007.
- Meira, R.M.S. Anatomia foliar e estudos morfológicos em espécies de *Lafoensia* Vand. (Lythraceae) nativas do Brasil. Tese de Doutorado em Biologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Unicamp, Campinas, p. 32-51, 2000.
- Menezes, V.M., Atallah, A.N., Lapa A.J., Catapani, W.R. Assessing the Therapeutic Use of *Lafoensia pacari* St. Hil. Extract (*Mangava-Brava*) in the Eradication of *Helicobacter pylori*: Double-Blind Randomized Clinical Trial. *Helicobacter*, 11(3):188-95, 2006.
- Mikova, O., Yakimova, R., Bosmans, E., Kenis, G., Maes, M. Increased serum tumor necrosis factor alpha concentrations in major depression and multiple sclerosis. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 11(3):203-8, 2001.
- Minabe, Y., Emori, K., Ashby, C.R. Jr. The depletion of brain serotonin levels by para-chlorophenylalanine administration significantly alters the activity of midbrain dopamine cells in rats: an extracellular single cell recording study. *Synapse*, 22(1):46-53, 1996.
- Moghaddam, B., Bolinao, M., Stein-Behrens, B., Sapolsky, R. Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Research*, 655:251-254, 1994.
- Moghaddam, F. M., Farimani, M. M., Salahvarzi, S., Amin, G. Chemical constituents of dichloromethane extract of cultivated *Satureja khuzistanica*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 4:95-98, 2007.
- Molinari, G. Natural products in drug discovery: present status and perspectives. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 655:13-27, 2009.
- Moller, H.J. Is there evidence for negative effects of antidepressants on suicidality in depressive patients? A systematic review. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 256(8):476-96, 2006.
- Moraes, W.F., Galdino, P.M., Nascimento, M.V., Vanderlinde, F.A., Bara, M.T., Costa, E.A., Paula, J.R. Triterpenes involved in the anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. *J. Nat. Med.*, 66(1):202-7, 2012.
- Muceniece, R., Saleniece, K., Rumaks, J., Krigere, L., Dzirkale, Z., Mezhapuke, R., Zharkova, O., Klusa, V. Betulin binds to gamma-aminobutyric acid receptors and exerts anticonvulsant action in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 90(4):712-6, 2008.
- Müller, N., Schwarz, M.J., Dehning, S., Douhe, A., Ceroveckí, A., Goldstein-Müller, B., Spellmann, I., Hetzel, G., Maino, K., Kleindienst, N., Möller, H.J., Arolt, V., Riedel, M. The

- cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Mol. Psychiatry*, 11(7):680-4, 2006.
- Müller, V., Chávez, J.H., Reginatto, F.H., Zucolotto, S.M., Niero, R., Navarro, D., Yunes, R.A., Schenkel, E.P., Barardi, C.R., Zanetti, C.R., Simões, C.M. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against *Herpes simplex* virus type 1 and rabies virus. *Phytother Res.*, 21(10):970-4, 2007.
- Müller, W.E., Singer, A., Wonnemann, M., Hafner, U., Rolli, M., Schäfer, C. Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of hypericum extract. *Pharmacopsychiatry*, 31(S1):16-21, 1998.
- Murrough, J.W., Perez, A.M., Pillemer, S., Stern, J., Parides, M.K., aan het Rot, M., Collins, K.A., Mathew, S.J., Charney, D.S., Iosifescu, D.V. Rapid and longer-term antidepressant effects of repeated ketamine infusions in treatment-resistant major depression. *Biol. Psychiatry*, 74(4):250-6, 2013.
- Nakagawa, S., Kim, J.E., Lee, R., Malberg, J.E., Chen, J., Steffen, C., Zhang, Y.J., Nestler, E.J., Duman, R.S. Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J. Neurosci.*, 22(9):3673-82, 2002.
- Narvaez-Mastache, J.M., Garduño-Ramírez, M.L., Alvarez, L., Delgado, G. Antihyperglycemic activity and chemical constituents of *Eysenhardtia platycarpa*. *J. Nat. Prod.*, 69:1687-91, 2006.
- Nascimento, M.V., Galdino, P.M., Florentino, I.F., Sampaio, B.L., Vanderlinde, F.A., Paula, J.R., Costa, E.A. Antinociceptive effect of *Lafoensi pacari* A. St.-Hil. independent of anti-inflammatory activity of ellagic acid. *J. Nat. Med.*, 65(3-4):448-54, 2011.
- Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M. Neurobiology of depression. *Neuron*, 34(1):13-25, 2002.
- Nestler, E.J., Hyman, S.E. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.*, 13(10):1161-9, 2010.
- Neumeister, A. Tryptophan depletion, serotonin, and depression: where do we stand? *Psychopharmacol Bull.*, 37(4):99-115, 2003.
- Newall, C.A., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. *Herbal Medicine. A Guide for Health care Professionals*. 1 ed; Pharmaceutical Press, London, 1996.

- Newman, D.J., Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, 75:311-38, 2012.
- Nibuya, M., Morinobu, S., Duman, R.S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci.*, 15(11):7539-47, 1995.
- Nibuya, M., Nestler, E.J., Duman, R.S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J. Neurosci.*, 16(7):2365-72, 1996.
- Ohgi, Y., Futamura, T., Kikuchi, T., Hashimoto, K. Effects of antidepressants on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 103(4):853-9, 2013.
- O'Leary, O.F., Dinan, T.G., Cryan, J.F. Faster, better, stronger: Towards new antidepressant therapeutic strategies. *Eur. J. Pharmacol.*, doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.046, 2014 (IN PRESS).
- O'Leary, O.F., Bechtholt, A.J., Crowley, J.J., Hill, T.E., Page, M.E., Lucki, I. Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl)*, 192(3):357-71, 2007.
- Oliveira, E.M.S., Freitas, S.L., Martins, F.S., Couto, R.O., Pinto, M.V., Paula, J.R., Conceição, E.C., Bara, M.T.F. Isolation and quantitative HPLC-PDA analysis of lupeol in phytopharmaceutical intermediate products from *Vernonanthura ferruginea* (Less.) H. Rob. *Quím. Nova*, 35(5):1041-45, 2012.
- OMS - Organização Mundial de Saúde. Depression, a hidden burden. 2012. Disponível em: [http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/flyer\\_depression\\_2012.pdf?ua=1](http://www.who.int/mental_health/management/depression/flyer_depression_2012.pdf?ua=1). Acesso em 20 de Abril de 2015.
- OMS - Organização Mundial de Saúde. The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva: WHO Press. 153 p., 2008.
- Ortiz-Andrade, R.R., García-Jiménez, S., Castillo-España, P., Ramírez-Avila, G., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S. alpha-Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*, an anti-hyperglycemic agent. *J. Ethnopharmacol.*, 109:48-53, 2007.
- Paiva, V.N., Lima, S.N., Fernandes, M.M., Soncini, R., Andrade, C.A., Giusti-Paiva, A. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. *Behav. Brain Res.*, 215(1):146-51, 2010.

- Parker, G., Parker, K. Which antidepressants flick the switch? *Aust. N. Z. J. Psychiatry*, 37(4):464-8, 2003.
- Passos, G.F., Fernandes, E.S., da Cunha, F.M., Ferreira, J., Pianowski, L.F., Campos, M.M., Calixto, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *J. Ethnopharmacol.*, 110(2):323-33, 2007.
- Peet, M. Induction of mania with selective serotonin re-uptake inhibitors and tricyclic antidepressants. *Br. J. Psychiatry*, 164(4):549-50, 1994.
- Pereira, E.M., Gomes, R.T., Freire, N.R., Aguiar, E.G., Brandão, M., Santos, V.R. *In vitro* antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. *Planta Med.*, 77(4):401-4, 2011.
- Piato, A.L., Detanico, B.C., Jesus, J.F., Lhullier, F.L., Nunes, D.S., Elisabetsky, E. Effects of Marapuama in the chronic mild stress model: further indication of antidepressant properties. *J. Ethnopharmacol.*, 118(2):300-4, 2008.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.*, 47(4):379-91, 1978.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 229(2):327-36, 1977.
- Pott, V.J., Pott, A. *Plantas do Pantanal*, EMBRAPA-CPAP, Brasília, Brazil, 1994.
- Queiroz, S., N., Collins, C., H., Jardim, C., S., F., Métodos de Extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica, *Quím. Nova*, 24(1):68-76, 2001.
- Queiroz-Silva, S.M., Pinheiro, S.M., Queiroz, M.V., Pranchevicius, M.C., Castro, J.G., Perim, M.C., Carreiro, S.C. *In vitro* activity of crude extracts of two plant species in the Cerrado on yeast of the *Candida* SPP variety. *Cien Saude Colet.*, 17(6):1649-56, 2012.
- Rahimi, R., Nikfar, S., Abdollahi, M. Efficacy and tolerability of *Hypericum perforatum* in major depressive disorder in comparison with selective serotonin reuptake inhibitors: a meta-analysis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 33(1):118-27, 2009.
- Raiteri, M., Angelini, F., Bertollini, A. Comparative study of the effects of mianserin, a tetracyclic antidepressant, and of imipramine on uptake and release of neurotransmitters in synaptosomes. *J. Pharm. Pharmacol.*, 28(6):483-8, 1976.

- Randrup, A., Munkvad, I., Fog, R., Gerlach, J., Molander, L., Kjellberg, B., Scheel-Kriiger, J. Mania, depression, and brain dopamine. In Essman WB, Valzelli L (eds), *Current Developments in Psychopharmacology*. New York: Spectrum Publications, 1975, pp.207-229.
- Rates, S.M. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39(5):603-13, 2001.
- Rocha, R.F., Lapa, A.J., Braz-Filho, R. Estudo comparativo da ação depressora central e do efeito analgésico produzido pelo Lupeol (L), Lupenona (LN) e ácido betulínico (B). *Oreades*, 8:366-374, 1982.
- Rodrigues, A.L., Silva, G.L., Mateussi, A.S., Fernandes, E.S., Miguel, O.G., Yunes, R.A., Calixto, J.B., Santos, A.R. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sci.*, 70(12):1347-58, 2002.
- Rogério, A.P., Fontanari, C., Borducchi, E., Keller, A.C., Russo, M., Soares, E.G., Albuquerque, D.A., Faccioli, L.H. Anti-inflammatory effects of *Lafoensia pacari* and ellagic acid in a murine model of asthma. *Eur. J. Pharmacol.*, 580(1-2):262-70, 2008.
- Rogério, A.P., Fontanari, C., Melo, M.C., Ambrosio, S.R., de Souza, G.E., Pereira, P.S., França, S.C., da Costa, F.B., Albuquerque, D.A., Faccioli, L.H. Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of *Lafoensia pacari* extract and ellagic acid. *J. Pharm. Pharmacol.*, 58(9):1265-73, 2006.
- Rogério, A.P., Sá-Nunes, A., Albuquerque, D.A., Anibal, F.F., Medeiros, A.I., Machado, E.R., Souza, A.O., Prado, J.C. Jr, Faccioli, L.H. *Lafoensia pacari* extract inhibits IL-5 production in toxocariasis. *Parasite Immunol.*, 25(7):393-400, 2003.
- Ronalds, C., Creed, F., Stone, K., Webb, S., Tomenson, B. Outcome of anxiety and depressive disorders in primary care. *Br. J. Psychiatr.*, 171:427-33, 1997.
- Rosa, A.O., Kaster, M.P., Binfare, R.W., Morales, S., Martin-Aparicio, E., Navarro-Rico, M.L., Martinez, A., Medina, M., García, A.G., López, M.G., Rodrigues, A.L. Antidepressant-like effect of the novel thiazolidinone NP031115 in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 32:1549–1556, 2008.
- Rost, K., Zhang, M., Fortney, J., Smith, J., Coyne, J., Smith, G.R.Jr. Persistently poor outcomes of undetected major depression in primary care. *Gen. Hosp. Psychiatry*, 20:12-20, 1998.
- Rush, A.J., Trivedi, M.H., Wisniewski, S.R., Nierenberg, A.A., Stewart, J.W., Warden, D., Niederehe G., Thase, M.E., Lavori, P.W., Lebowitz, B.D., McGrath, P.J., Rosenbaum, J.F., Sackeim

- H.A., Kupfer D.J., Luther, J., Fava, M. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR\*Dreport. *Am. J. Psychiatry*, 163(11):1905-17, 2006.
- Russell, R.R. Extrapolation from animals to man. In: *Animal Behaviour and Drug Action*, H. Steinberg (ed), pp 410-418. Churchill, London, 1964.
- Russo, E., Scicchitano, F., Whalley, B.J., Mazzitello, C., Ciriaco, M., Esposito, S., Patanè, M., Upton, R., Pugliese, M., Chimirri, S., Mammì, M., Palleria, C., De Sarro, G. *Hypericum perforatum*: pharmacokinetic, mechanism of action, tolerability, and clinical drug-drug interactions. *Phytother. Res.*, 28(5):643-55, 2014.
- Sá, I.M., Elisabetsky, E. Medical knowledge exchanges between Brazil and Portugal: An ethnopharmacological perspective. *J. Ethnopharmacol.*, 142(3):762-768, 2012.
- Saleem, M. Lupeol. A novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Lett.*, 285:109–15, 2009.
- San, L., Arranz, B. Agomelatine: a novel mechanism of antidepressant action involving the melatonergic and the serotonergic system. *Eur. Psychiatry.*, 23(6):396-402, 2008.
- Santiago, R.M., Barbiero, J., Martynhak, B.J., Boschen, S.L., Silva, L.M., Werner, M.F., Cunha, C., Andreatini, R., Lima, M.M., Vital, M.A. Antidepressant-like effect of celecoxib piroxicam in rat models of depression. *J. Neural Transm.*, 121(6):671-82, 2014.
- Sapolsky, R.M. A mechanism for glucocorticoid toxicity in the hippocampus: increased neuronal vulnerability to metabolic insults. *J. Neurosci.*, 5(5):1228-32, 1985.
- Schiepers, O.J., Wichers, M.C., Maes, M. Cytokines and major depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 29:201–217, 2005.
- Schildkraut, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiatry*, 122(5):509-22, 1965.
- Schulz, V., Hansel, R., Tyler, V. *Fitoterapia Racional - um guia para as ciências da saúde*. Barueri: Manole, 2002.
- Sheline, Y.I., Gado, M.H., Kraemer, H.C. Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am. J. Psychiatry*, 160(8):1516-8, 2003.
- Shirwaikar, A., Setty, M., Bommu, P. Effect of lupeol isolated from *Crataeva nurvala* Buch.-Ham. stem bark extract against free radical induced nephrotoxicity in rats. *Ind. J. Exp. Biol.*, 42:686–90, 2004.

- Siddique, H.R., Mishra, S.K., Karnes, R.J., Saleem, M. Lupeol, a novel androgen receptor inhibitor: implications in prostate cancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, 17(16):5379-91, 2011.
- Silva Jr, I.F., Raimondi, M., Zacchino, S., Cechinel, V., Noldin, V.F., Rao, V.S., Lima, J.C.S., Martins, D.T.O. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 20(3):422-428, 2010.
- Simon, G.E., Savarino, J., Operskalski, B., Wang, P.S. Suicide risk during antidepressant treatment. *Am. J. Psychiatry.*, 163(1):41-7, 2006.
- Slattery, D.A., [Cryan, J.F.](#) Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. [Nat Protoc.](#), 7(6):1009-14, 2012.
- Smith, R.S. The macrophage theory of depression. *Med. Hypotheses*, 35(4):298-306, 1991.
- Solon, S., Lopes, L., Teixeira-de-Sousa, P. Jr, Schmeda-Hirschmann, G. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. *J. Ethnopharmacol.*, 72(1-2):173-8, 2000.
- Sousa, F.B., Martins, J.L., Florentino, I.F., Couto, R.O., Nascimento, M.V., Galdino, P.M., Ghedini, P.C., Paula, J.R., Costa, E.A. Preliminary studies of gastroprotective effect of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent leaves (Ulmaceae). *Nat. Prod. Res.*, 27(12):1102-7, 2013.
- Souza, A.D.L., Rocha, A.F.I., Pinheiro, M.L.B., Andrade, C.H., Galotta, A.L.A.Q., Santos, M.P.S.S. Constituintes Químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). *Quim. Nova*, 24(4):439-442, 2001.
- Souza, C.D; Felfili J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta bot. bras.* 20(1): 135-142. 2006
- Stafford, G.I., Pedersen, P.D., Jäger, A.K., van Staden, J. Monoamine oxidase inhibition by southern African traditional medicinal plants. *South African J. Botany*, 73(3):384-390, 2007.
- Stéru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 85(3):367-70, 1985.
- Sudhakar, V., Ashok Kumar, S., Varalakshmi, P., Sujatha, V. Protective effect of lupeol and lupeol linoleate in hypercholesterolemia associated renal damage. *Mol. Cell. Biochem.*, 317:11–20, 2008.
- Suksamrarn, A., Tanachatchairatana, T., Kanokmedhakul, S. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. *J. Ethnopharmacol.*, 88:275–7, 2003.

- Sultana, S., Saleem, M., Sharma, S., Khan, N. Lupeol, a triterpene, prevents free radical mediated macromolecular damage and alleviates benzoyl peroxide induced biochemical alterations in murine skin. *Ind. J. Exp. Biol.*, 41:827–31, 2003.
- Sunitha, S., Nagaraj, M., Varalakshmi, P. Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia*, 7:516–23, 2001.
- Suzuki, O., Katsumata, Y., Oya, M., Bladt, S., Wagner, H. Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med.*, 50:272-274, 1984.
- Taciany-Bonassoli, V., Micheli-Chassot, J., Longhini, R., Milani, H., Mello, J.C., de Oliveira, R.M. Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 143(1):179-84, 2012.
- Tamashiro-Filho, P., Sikiru, Olaitan. B., Tavares-de-Almeida, D.A., Lima, J.C., Marson-Ascêncio, P.G., Donizeti-Ascêncio, S., Rios-Santos, F., Martins, D.T. Evaluation of antiulcer activity and mechanism of action of methanol stem bark extract of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lytraceae) in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.*, 144(3):497-505, 2012.
- Tanaka, T., Ikeda, T., Kaku, M., Zhu, X.H., Okawa, M., Yokomizo, K., Uyeda, M., Nohara, T. A new lignan glycoside and phenylethanoid glycosides from *Strobilanthes cusia* BREMEK. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 52:1242–5, 2004.
- Tonello, V.M. Estrutura de populações de *Lafoensia pacari* St. Hil. e dados etnobotânicos e fenológicos em Nossa Senhora do Livramento, Mato Grosso. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Brazil, 1997.
- Torres, G.E., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4:13–25, 2003.
- Torres, L.B. Fitoterápicos, uma Oportunidade em Medicamentos no Brasil. 2008. Disponível em: [http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/atualidades\\_simpplantas.html](http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/atualidades_simpplantas.html). Acesso em 26 de Julho de 2014.
- Tu, H., Rady, P.L., Juelich, T., Smith, E.M., Tyring, S.K., Hughes, T.K. Cytokine regulation of tryptophan metabolism in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis: implications for protective and toxic consequences in neuroendocrine regulation. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 25:673–680, 2005.

- van der Staay, F.J., Arndt, S.S., Nordquist, R.E. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav Brain Funct.* 5:11, 2009.
- Vidya, L., Malini, M.M., Varalakshmi, P. Effect of pentacyclic triterpenes on oxalate-induced changes in rat erythrocytes. *Pharmacol. Res.*, 42:313–6, 2000.
- Viegas Jr, C., Bolzani, V.S., Barreiro, E.J. Os Produtos Naturais E A Química Medicinal Moderna. *Quim. Nova*, 29(2):326-337, 2006.
- Vieira R.A., Lapa A.J., de Lima T.C.M. Evaluation of the central activity of the ethanolic extract of *Acosmium subelegans* (Mohlenbr) in mice. *Rev. Bras. Farmacol.*, 12(S1):50-51, 2002.
- Wagner, H., Bladt, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Second edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1996.
- Wang, C., Xu, F.Q., Shang, J.H., Xiao, H., Fan, W.W., Dong, F.W., Hu, J.M., Zhou, J. Cycloartane triterpenoid saponins from water soluble of *Passiflora edulis* Sims and their antidepressant-like effects. *J. Ethnopharmacol.*, 148(3):812-7, 2013.
- Waraich, P., Goldner, E.M., Somers, J.M., Hsu, L. Prevalence and incidence studies of mood disorders: a systematic review of the literature. *Can. J. Psych.*, 49(2):124-138, 2004.
- Widner, B., Laich, A., Sperner-Unterweger, B., Ledochowski, M., Fuchs, D. Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression - what is the link? *Brain Behav. Immun.*, 16(5):590-5, 2002.
- Willner, P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 10(6):677-90, 1986.
- Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., Muscat, R. Reduction of sucrose preference by chronic mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 93:358–364, 1987.
- Xia, Z., DePierre, J.W., Nässberger, L. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells. *Immunopharmacology*, 34(1):27-37, 1996.
- Yirmiya, R., Pollak, Y., Morag, M., Reichenberg, A., Barak, O., Avitsur, R., Shavit, Y., Ovadia, H., Weidenfeld, J., Morag, A., Newman, M.E., Pollmächer, T. Illness, cytokines, and depression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 917:478-87, 2000.

- You, Y.J., Nam, N.H., Kim, Y., Bae, K.H., Ahn, B.Z. Antiangiogenic activity of lupeol from *Bombax ceiba*. *Phytother. Res.*, 17:341–4, 2003.
- Zarate, C.A., Quiroz, J., Payne, J., Manji, H.K. Modulators of the glutamatergic system: implications for the development of improved therapeutics in mood disorders. *Psychopharmacol Bull.*, 36:35–83, 2002.
- Zarate, C.A.Jr., Singh, J.B., Carlson, P.J., Brutsche, N.E., Ameli, R., Luckenbaugh, D.A., Charney, D.S., Manji, H.K. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch. Gen. Psychiatry*, 63(8):856–64, 2006.
- Ziegler, H.L., Franzyk, H., Sairafianpour, M., Tabatabai, M., Tehrani, M.D., Bagherzadeh, K., Hägerstrand, H., Staerk, D., Jaroszewski, J.W. Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* growth: structure–activity relationships for betulinic acid analogues. *Bioorg. Med. Chem.* 12:119–27, 2004.

## 8 ARTIGO PUBLICADO NO JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

Journal of Ethnopharmacology 170 (2015) 218–225



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jep](http://www.elsevier.com/locate/jep)



### Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like properties of *Lafoesia pacari* A. St. Hil



Pablenny M. Galdino<sup>a,b,\*</sup>, Adryano A.V. Carvalho<sup>b</sup>, Iziara F. Florentino<sup>b</sup>, José L.R. Martins<sup>b</sup>,  
Andressa C. Gazola<sup>c</sup>, José R. de Paula<sup>d</sup>, Joelma A.M. de Paula<sup>e</sup>, Luce M.B. Torres<sup>f</sup>,  
Elson A. Costa<sup>b</sup>, Thereza Christina M. de Lima<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Neurofarmacologia, Farmacologia, CCR, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, ICR, UFG, Goiânia, GO, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, IF, UFG, Goiânia, GO, Brazil

<sup>e</sup> Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, UEG, Anápolis, GO, Brazil

<sup>f</sup> Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 2 December 2014

Received in revised form

5 May 2015

Accepted 5 May 2015

Available online 14 May 2015

##### Keywords:

*Lafoesia pacari*

Medicinal plant

Antidepressant-like

Forced swimming test

Cerrado

#### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Lafoesia pacari* A. St-Hil. (Lythraceae), known popularly as “pacari” or “mangaba-brava” is popularly used in the state of Goiás, Brazil. The stem bark or leaves are used to treat cancer, gastric disorders, inflammation and as a tonic to treat loss of enthusiasm.

**Aim of the study:** Previous results suggest that the ethanol:water 7:3 extract of the stem bark of *L. pacari* (Pex) has antidepressant-like activity in male mice. Our aim was to perform the Pex's bioguided fractionation and evaluate the monoaminergic system involvement in the antidepressant effect as well as progress in the study of *L. pacari* mechanism of action.

**Material and methods:** Mice (30–35 g) orally treated (24, 5 and 1 h) with PEX (100, 300 or 1000 mg/kg), chloroform (ChloF–70 mg/kg), ethyl acetate (180 mg/kg), *n*-butanol (370 mg/kg) and aqueous (1 g/kg) fractions were submitted to the forced swimming test. To assess the mechanism of action, different groups of mice were pretreated with *p*-chlorophenylalanine (PCPA–100 mg/kg, 4 days, i.p.) and alpha-methyl-*p*-tyrosine (AMPT–100 mg/kg, 4 h, i.p.) to assess the involvement of serotonergic and catecholaminergic systems in the ChloF effects, respectively. A putative *in vitro* inhibition of monoamine oxidase (MAO) activity as well as the *ex vivo* hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) quantification were carried out. Phytochemical screening, spectroscopy and chromatography analysis were used for identification of compounds present in ChloF.

**Results and discussion:** After the fractionation, the ChloF 70 mg/kg was the most active fraction, reducing the immobility time by 22%. Pre-treatments with both PCPA and AMPT abolished the ChloF effects, suggesting that ChloF antidepressant-like effect is dependent on serotonergic and catecholaminergic systems. ChloF did not inhibit MAO-A or MAO-B activity, excluding this as possible mechanism of action. ChloF augmented hippocampal BDNF level, which could be accounted for its antidepressant-like effect. Phytochemical screening showed the presence of saponins, tannins, steroids and triterpene in the PEX, and the presence of triterpene and steroids in ChloF. The spectroscopy and chromatography analysis identified lupeol,  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol in ChloF.

**Conclusion:** ChloF is the fraction that better retained the crude extract active constituents. ChloF presents antidepressant-like effect that involves both serotonergic and catecholaminergic systems without inhibiting MAO enzymatic activity; this fraction also increases the hippocampal BDNF levels.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

The use of plants as medicines for humankind is connected to its own development. In Brazil, the traditional medicine is a rich mixture of various cultures, mainly African (mostly Yoruba and Bantu), European (mainly Portuguese), and Native South America medical traditions (Sá and Elisabetsky, 2012). Among the many

\* Corresponding author at: Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais - Sala 216, ICB-2 Universidade Federal de Goiás, CP 131, CEP 74001-970, Goiânia, GO, Brazil. Tel.: +55 62 3521 1491; fax: +55 62 352 11204.  
E-mail address: [pablenny@yahoo.com.br](mailto:pablenny@yahoo.com.br) (P.M. Galdino).

## 9 PROTOCOLO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### Resultado de Solicitação de Protocolo

**Protocolo**  
PP00798  
**Título**  
METODOLOGIAS UTILIZADAS NO LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA  
**Data de Entrada**  
11/09/2012

**Resultado:**  
Aprovado  
**Data/ Prazo**  
21/12/2012

**Considerações**  
Ofício nº 126/CEUA/PRPE/2012  
Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA  
Ao(à): Prof(a) Dr(a) Thereza Christina Monteiro de Lima, Departamento de Farmacologia - CCB

Prezado(a) Professor(a),  
Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- RECURSO aprovado ad referendum por quatro anos, para a utilização de sete mil ratos (*Rattus Norvegicus*) e doze mil camundongos (*Mus musculus*).

- Procedência do animal: BIC-UFSC

Revoga-se o Ofício nº 108/CEUA/PRPE/2012  
Data/Prazo:  
01/11/2012  
Considerações:  
Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA  
Ao(à): Prof(a) Dr(a) Thereza Christina Monteiro de Lima, Departamento de Farmacologia - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou pelo indeferimento devido a várias inconsistências no preenchimento do protocolo.

A CEUA recomenda a observação dos pareceres em anexo quando da submissão de um novo protocolo de modo a facilitar sua apreciação.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**  
**Data 21/03/2016**

Data 21/12/2012

**Parecer(es):**



**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC**  
**PRESIDENTE**