



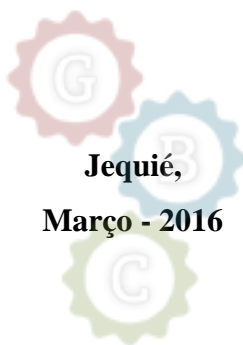
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE
E CONSERVAÇÃO



CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E PSICOFARMACOLÓGICA DOS
EXTRATOS DE *Annona dolabripetala* Raddi (ANNONACEAE)

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Jequié,
Março - 2016

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Wagner Rodrigues de Assis Soares

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E PSICOFARMACOLÓGICA DOS
EXTRATOS DE *Annona dolabripetala* Raddi (ANNONACEAE)**



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Orientadora: Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula.

Co-orientador: Dr. Gesivaldo Santos



**Jequié,
Março – 2016**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Soares, Wagner Rodrigues de Assis.

S657. Caracterização fitoquímica e psicofarmacológica dos extratos de *Annona dolabripetala* Raddi (ANNONACEAE)/Wagner Rodrigues de Assis Soares.- Jequiê, UESB, 2016.

90 f. il.; 30cm. (Anexos)

Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação)-Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2016. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanderlúcia Fonseca de Paula.

1. *Annona dolabripetala* Raddi (ANNONACEAE) – Caracterização fitoquímica e psicofarmacológica 2. “Araticum” ou “pinha do mato” - Efeitos sobre o sistema nervoso central I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título.

CDD – 547.9

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Agradecimentos

Agradeço primeiramente a **Deus** por todas as bênçãos que tem trazido para minha vida e pela força, perseverança, persistência e paciência, que tem me dado para seguir em frente lutando e vencendo os desafios da vida! Um destes desafios foi idealizar, realizar e concluir este trabalho!

A minha orientadora, **Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula** pelo exemplo de profissionalismo e competência e dedicação naquilo que faz de melhor, que é o trabalho na área de Produtos Naturais, com a qual aprendi muito mais do que imaginava.

Ao meu Co-orientador, **Prof. Dr. Gesivaldo Santos**, agradeço pelos ensinamentos na área da psicofarmacologia, pelo exemplo profissional pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Bruno Silva Andrade** pelas contribuições, conselhos e principalmente pela amizade durante estes últimos 10 anos de convivência.

As Profa. Dra. **Carla Patrícia** e **Profa. Dra. Leandra Gomes** pelo suporte com relação ao Biotério da UESB. Ao **Biotério do Instituto Gonçalo Muniz (Fiocruz-SSA)** pela disponibilização do camundongos.

A todos colegas e amigos do **Laboratório de Produtos Naturais-DQE/UESB**, pelas contribuições e conselhos na realização do trabalho, mas principalmente ao Aluno **Daniel Silva de Santana** pelo isolamento do ácido kaurenico.

A todos colegas e amigos do **Laboratório de Investigação Neurocomputacional e Cognitiva DCB-UESB**, principalmente **Bruna, Beatriz, Tarciano** e **Roberta** pelo contribuição nos ensaios psicofarmacológicos e pela amizade.

A todos colegas e amigos do **Laboratório de Imunobiologia DCB-UESC**, principalmente à **Profa. Dra. Jane Lima dos Santos**, pelo aprendizado com o manejo em culturas de células.

Ao Laboratório de **Patologia do Hospital Veterinário UESC**, principalmente a **Profa. Dra. Ana Flávia Michel** pelas contribuições nos procedimentos cirúrgicos e processamento do material para histopatologia.

A todos do **Herbário da UESB**, principalmente a **Profa. Dra. Guadalupe Macedo**, a **Rogéria** e **Gerivaldo Silva (Neném)**, pela contribuição na coleta e identificação do material botânico.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Genética Biodiversidade e Conservação**, e todos os professores que de alguma forma contribuíram para minha formação. A **Capex** pelo apoio.

Ao minha família meu pai, **Jairo Rodrigues**, minha mãe **Maria de Lourdes** e meus irmãos **Jairo** e **Frederico** pelo amor dispensado a mim e pelos exemplos de vida que me dão!! Amo todos vocês!!!!

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta por mais uma conquista!!!!

RESUMO

Annona dolabripetala Raddi (Annonaceae) é uma espécie endêmica em regiões de floresta (mata atlântica brasileira), popularmente conhecida como “araticum” e “pinha do mato”. As espécies do gênero *Annona* são usadas na medicina popular devido aos seus efeitos sedativos, ansiolíticos, anticonvulsivos, analgésicos e anti-inflamatórios. Este estudo investigou a fitoquímica e as possíveis atividades psicofarmacológicas dos extratos metanólico das folhas (EMFAD) e etanólico da casca (EEtCAD) de *A. dolabripetala* sobre sistema nervoso central de camundongos. Dos óleos essenciais das folhas foram identificados os constituintes voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e por comparação com dados da literatura. O extrato da casca foi submetido a cromatografia e técnicas espectroscópicas para isolamento e caracterização de seus constituintes não voláteis. Foram avaliados os efeitos ansiolítico e analgésico dos extratos das folhas e da casca do caule, utilizando a triagem farmacológica comportamental, labirinto em cruz elevado e o teste de analgesia central por estímulo térmico, respectivamente. Foi também realizada uma análise histológica do fígado, baço e rins por microscopia óptica convencional. Os terpenoides majoritários presentes no óleo essencial das folhas foram: linalol, geraniol, α -copaeno, aromadendreno e germacreno-D, enquanto que na casca foi isolado um diterpeno conhecido como ácido *ent*-16-kaur-19-oico (ácido kaurenoico). A administração oral durante 14 dias, do EMFAD e do EEtCAD, na dose de 300 mg.kg⁻¹, induziram ação ansiolítica e depressora sobre o SNC. O EMFAD apresentou perfil tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado, com uma maior latência nos braços abertos (246,8 \pm 125,7) quando comparado ao diazepam (200,2 \pm 156,6), na concentração de 2,5 mg.kg⁻¹. O EEtCAD apresentou um perfil depressor no labirinto em cruz elevado, com um número maior de latência nos braços fechados (186,8 \pm 69,0) quando comparado ao diazepam (127,5 \pm 142,7). Os efeitos de analgesia central dos EEtCAD, EMFAD não foram significativos, ($p > 0,05$) quando comparados à morfina. Ambos extratos EEtCAD e EMFAD induziram hipertrofia hepática centro lobular, indicativo de possível ação de toxicidade aguda nos camundongos. Os resultados indicam que o EMFAD e o EEtCAD de *A. dolabripetala* tem pronunciados efeitos sobre o sistema nervoso central. O ácido kaurenoico (*ent*-16-kaur-19-oico) e os terpenóides, podem ser os responsáveis pelas ações depressora do EEtCAD e ansiolítica do EMFAD desta espécie.

Palavras-chaves: *Annona dolabripetala*. Annonaceae. Fitoquímica. Psicofarmacologia. Sistema Nervoso Central.

ABSTRACT

Annona dolabripetala Raddi (Annonaceae) is an endemic species in forest areas (Brazilian Atlantic Forest), popularly known as "soursop" and "cone of the bush." The species of the genus *Annona* are used in popular medicine owing to its sedative, anxiolytic, anticonvulsant, analgesic and anti-inflammatory. This study investigated the phytochemical and possible psychopharmacological activities of methanol extracts of the leaves (EMFAD) and ethanolic bark (EEtCAD) from *A. dolabripetala* on central nervous system of mice. From essential oils leaves the volatile constituents were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry and comparison with literature data. The bark extract was subjected to chromatography and spectroscopic techniques for the isolation and characterization of its non-volatile constituents. Were evaluated the analgesic and anxiolytic effects of the extracts of leaves and stem bark using behavioral pharmacological screening, elevated plus maze and central analgesia test for thermal stimulation, respectively. A histological analysis of liver, spleen and kidneys by conventional optical microscopy was also performed. The terpenoids majority present in the essential oil of the leaves were linalool, geraniol, α -copaene, aromadendrene and germacrene-D, whereas the shell has been isolated one diterpene known as ent-16-Kaur-19-oic acid (kaurenoic acid). The oral administration for 14 days, the EMFAD and EEtCAD at a dose of 300 mg.kg⁻¹, induced anxiolytic and depressant action of the CNS. The EMFAD presented anxiolytic profile type in the elevated plus maze, with a higher latency in the open arms (246.8 \pm 125.7) compared to diazepam (200.2 \pm 156.6) at a concentration of 2.5 mg.kg⁻¹. The EEtCAD showed a depressant profile in the elevated plus maze, with a greater number of latency in the closed arms (186.8 \pm 69.0) compared to diazepam (127.5 \pm 142.7). The effects of central analgesy of EEtCAD, EMFAD were not significant ($p > 0.05$) when compared to morphine. Both extracts induced liver hypertrophy center lobular, indicative of possible action of acute toxicity in mice. The results indicate that the EMFAD and EEtCAD *A. dolabripetala* has pronounced effects on the central nervous system. The kaurenoic acid and terpenoids, may be responsible for the depressant actions of EEtCAD and anxiolytic of EMFAD this species.

Keywords: *Annona dolabripetala*. Annonaceae. Phytochemistry. Psychopharmacology. Central System Nervous.



LISTA DE ABREVIATURAS

V.O. - Via oral

I.P. - Via intraperitoneal

LPN - Laboratório de produtos naturais

RMN de ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN de ^1H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SAR - *Structure Activity Relationship* (Relação Estrutura-Atividade)

SNC - Sistema Nervoso Central

SNA - Sistema Nervoso Autônomo

5-HT – 5-Hidroxitriptamina (serotonina)

HUESB – Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

DQE – Departamento de Química e Exatas

EMFAD – Extrato Metanólico da Folha de *Annona dolabripetala*

EEtCAD – Extrato Etanólico da Casca de *Annona dolabripetala*

CEUA – Comitê de Ética em Uso de Animais

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

AST - Aspartato aminotransferase

ALT - Alanina aminotransferase

ALP - Fosfatase alcalina

GGT - γ -Glutamil transferase

GABA- ácido gama-aminobutírico

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Distribuição geográfica da espécie *Annona dolabripetala* no Brasil dentre os seus domínios fitogeográficos (Mata Atlântica). 15
- Figura 02.** Árvore, galho com folha e fruto para exsicata e frutos *in natura* e dimensão das folhas e frutos de *A. dolabripetala*. 16
- Figura 03.** Exemplos de acetogenina isolada de espécies do gênero *Annona*. 17
- Figura 04.** Exemplo de alcalóides isolados de espécies do gênero *Annona*. 18
- Figura 05.** Exemplo de terpenóides isolados de espécies do gênero *Annona*. 19
- Figura 06.** Exemplos de diterpenos, do tipo *ent*-kaureno isolados de espécies de *Annona*. 19
- Figura 07.** Fórmula estrutural da quercertina e do keampferol, presente nas folhas de espécies do gênero *Annona* 20
- Figura 08.** Formula estrutural da trigonelina. 20
- Figura 09.** Fórmula estrutural da palmitona. 22
- Figura 10.** Estrutura dos alcalóides (1-Asimilobina, 2-Nornuciferina, 3-Annonaina) isolados do fruto de *Annona muricata*. 23
- Figura 11.** Fluxograma metodológico da estratégia farmacológica. 26
- Figura 12.** Fluxograma metodológico da estratégia fitoquímica. 27
- Figura 13.** Exsicata (n. 9665) da *A. dolabripetala* depositada no herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 28
- Figura 14.** Técnica de hidrodestilação utilizando aparelho de Clevenger. 30
- Figura 15.** Foto labirinto em cruz elevado (A) e suporte para câmera de filmagem e registro do comportamento animal (B). 34
- Figura 16.** Foto do labirinto em cruz elevado em vista superior registrada pelo câmera e armazenada no MyCam® v1.1 e arquivada para análise do comportamento animal. 34

- Figura 17.** Analgesímetro para avaliação do potencial analgésico dos extratos metanólico da folha e etanólico da casca de *A. dolabripetala*. 35
- Figura 18.** Espectro de massas (CG/EM) obtido do óleo essencial extraído da folhas frescas de *Annona dolabripetala* Raddi. 37
- Figura 19.** Constituintes químicos encontrados no óleo essencial de *A. dolabripetala* Raddi. 41
- Figura 20.** Constituintes químicos encontrados no óleo essencial de *A. dolabripetala* Raddi, (continuação). 42
- Figura 21.** Cromatograma do ácido kaurenico obtida do extrato hexânico de *A. dolabripetala*. 43
- Figura 22.** Espectro de massas (IE), obtido pelo CG/EM do ácido kaurenico 44
- Figura 23.** Formula estrutural do ácido kaur-16-en-19-oico 44
- Figura 24.** Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz, δ/ppm , CDCl_3) para o ácido *ent*-Kaur-16-en-19-oico isolado da casca de *A. dolabripetala*. 46
- Figura 25.** Espectro de ^1H RMN (300 MHz, δ/ppm , CDCl_3) para o ácido *ent*-Kaur-16-en-19-oico isolado da casca de *A. dolabripetala*. 47
- Figura 26.** Triagem farmacológica comportamental com os extratos e controle (salina) de *A. dolabripetala*. **A.** hiperatividade, **B.** Irritabilidade, **C.** Agressividade, **D.** Tremores, **E.** Movimento das vibrissas, **F.** Coprofagia. 49
- Figura 27.** Triagem farmacológica comportamental com os extratos da folha, casca e controle (salina) de *A. dolabripetala*, mostrando os sinais de estimulação do SNC. **G.** Levantar, **H.** Escalar, **I.** Vocalizar **J.** Estereotipia. 50
- Figura 28.** Sinais ligados a depressão no SNC dos extratos de *A. dolabripetala*. **A.** Ptose palpebral **B.** Sedação **C.** Anestesia **D.** Ataxia. 53
- Figura 29.** Sinais ligados a depressão no SNC dos extratos de *A. dolabripetala*. **E.** Analgesia **F.** Ambulação diminuída **G.** Resposta ao toque diminuída, **H.** Perda do reflexo corneal, **I.** Perda do reflexo auricular. 53

Figura 30. Efeitos sobre o sistema nervoso autônomo dos extratos de *A. dolabripetala*. **A.** Diarréia, **B.** Constipação **C.** Micção, **D.** Bolos fecais **E.** Redução do Tônus muscular, **F.** Redução da força para agarrar. **G.** Piloereção **H.** Coprofagia 55

Figura 31. Análise do labirinto em cruz elevado para os extratos de *A. dolabripetala*. **A.** Entrada em braços abertos **B.** Latência em Braços abertos, **C.** Entrada em braços fechados **D.** Latência em braços fechados. 58

Figura 32. Ensaio de analgesia por estímulo térmico (*Tail flick*). Anova das médias dos tempos de latência da retirada de cauda de camundongos tratados com os extratos da folha (1), casca (2) de *A. dolabripetala* Raddi, controle salina (3) e morfina (4). 61

Figura 33. Ensaio de analgesia por estímulo térmico (*Tail flick*). Avaliação interquartilica das latências da retirada de cauda de camundongos tratados com os extratos da folha (MGFOL), casca (MGCAS) de *A. dolabripetala* Raddi, controle salina (MGCTRL) e morfina (MORF). 62

Figura 34. Histologia do fígado de ratos tratados com o extrato de folha (**A**), extrato da casca (**B**) e grupo controle tratado com solução salina (**C**). 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do óleo essencial extraído das folhas frescas *A. dolabripetala*. 38

Tabela 2. Composição química do óleo essencial extraído das folhas frescas *A. dolabripetala*, (continuação). 39

Tabela 3. Comparação dos dados de RMN da fração HCAD 2.2 com os dados do ácido kaurenoico (ácido *ent*-Kaur-16-en-19-oico) 45

Tabela 4. Principais sinais e sintomas comportamentais de ação sobre o sistema nervoso central 86

Tabela 4. Compostos voláteis descritos para as espécies do gênero *Annona* 88

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO.....	13
2.0	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	Considerações sobre o gênero <i>Annona</i>.....	14
2.1.1	Etnobotânica e distribuição geográfica.....	14
2.1.2	Fitoquímica e usos medicinais.....	16
2.1.3	Atividade psicofarmacológica.....	21
3.0	OBJETIVOS.....	25
3.1	Objetivo geral.....	25
3.2	Objetivos específicos.....	25
4.0	METODOLOGIA.....	25
4.1	Estudo fitoquímico de <i>Annona dolabripetala</i> Raddi.....	28
4.1.1	Coleta, identificação e herborização da planta.....	28
4.1.2	Reagentes, equipamentos e materiais.....	28
4.1.3	Preparação dos extratos das folhas e da casca.....	29
4.1.4	Avaliação preliminar dos constituintes químicos dos extratos.....	29
4.1.5	Extração e análise dos óleos essenciais das folhas.....	30
4.1.6	Isolamento do ácido kaurenico do extrato hexânico da casca.....	30
4.1.7	Análise do ácido kaurenico por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)	31
4.1.8	Análise e identificação do ácido kaurenico por de RMN de ¹ H e ¹³ C.....	31
4.2	Ensaio para avaliação da atividade psicofarmacológica dos extratos das folhas e casca de <i>A. dolabripetala</i>	31
4.2.1	Animais experimentais.....	31
4.2.2	Triagem farmacológica comportamental.....	32
4.2.3	Labirinto em cruz elevado (<i>elevated-plus-maze</i>).....	33
4.2.4	Ensaio de analgesia central por estímulo térmico (<i>Tail flick</i>).....	34

4.2.5	Análises estatísticas.....	35
4.3	Análise histopatológica dos órgãos dos animais experimentais.....	36
5.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1	Estudo fitoquímico de <i>Annona dolabripetala</i> Raddi.....	37
5.1.1	Avaliação preliminar dos constituintes químicos.....	37
5.1.2	Análise dos óleos essenciais das folhas.....	37
5.1.3	Identificação do ácido kaurenico do extrato hexânico da casca.....	43
5.2	Análise dos ensaios psicofarmacológicos dos extratos de <i>A. dolabripetala</i>	47
5.2.1	Avaliação da Triagem farmacológica comportamental.....	47
5.2.2	Avaliação da atividade ansiolítica.....	57
5.2.3	Avaliação da atividade analgésica central.....	60
5.3	Análise histopatológica dos órgãos dos animais experimentais.....	64
6.0	CONCLUSÕES	67
7.0	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68
8.0	REFERÊNCIAS.....	69
	ANEXOS.....	84



1.0 INTRODUÇÃO

A biodiversidade é um patrimônio mundial e contribui de forma indispensável com recursos ecológicos que mantém em equilíbrio o ecossistema e toda a dinâmica que envolve as sociedades humanas no planeta. Ao longo da história contemporânea, a sociedade começou a vislumbrar a importância econômica da biodiversidade, bem como a sua contribuição no conhecimento tradicional para a ciência. Uma das formas de tornar significativa esta diversidade biológica, está representada pelas fontes naturais da fauna e flora, associado aos conhecimentos tradicionais que podem ser úteis, tanto na aplicação de um recurso biológico em modelos sustentáveis, quanto na pesquisa agropecuária e biomédica.

O conhecimento tradicional dos povos primitivos (indígenas e quilombolas), acerca da flora e do seu potencial medicinal, pode ser considerado um dos fatores fundamentais para o descobrimento de novas substâncias dentro do arsenal químico da natureza. A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da relação íntima entre as estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas. Desta forma, a evolução dos processos metabólicos dos seres vivos acabam por dotar a natureza com uma infinidade de modelos químico-moleculares com diversas aplicações farmacológicas.

Os sistemas tradicionais de cuidado à saúde exercem um papel preponderante, enquanto medicina alternativa complementar. Na busca de novas opções menos onerosas, as comunidades, através da troca constante de conhecimentos com o ambiente científico nos centros universitários e de pesquisa, oferecem material de investigação à fitoquímica aplicada, resultando, desta forma, em compostos isolados e purificados, com atividades farmacológicas para uso como produtos fitoterápicos ou medicamentos na saúde humana. Portanto, a bioprospecção está ligada à cultura das comunidades, suas práticas e comportamentos relacionados ao uso da biodiversidade da flora, trazendo como benefício ao longo da história a descoberta de novas fontes de substâncias com aplicação medicinal.

Diversas são as famílias e espécies de plantas que detém propriedades medicinais. Os compostos ativos naturais, extraídos das mesmas, vêm gerando impacto na humanidade e modificando o comportamento da terapêutica clínica moderna. A família Annonaceae

(conhecidas como Anonnas) se destaca na ocorrência de compostos químicos com uso medicinal, apresentando larga distribuição em regiões tropicais e subtropicais. Espécies do gênero *Annona*, apresentam diversas atividades biológicas descritas, que vão desde ação antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral, antiparasitário, até aplicação dos seus constituintes químicos como bioinseticidas. Apesar de um amplo número de atividades biológicas, poucos são os estudos relacionados à ação de seus extratos e constituintes químicos, sobre sistema nervoso central (SNC).

Em virtude, da escassez de estudos científicos em fitoquímica, além da ausência de estudos ligados à psicofarmacologia, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo do perfil fitoquímico através do isolamento e identificação dos constituintes químicos do extrato obtido da casca e um estudo da atividade psicofarmacológica dos extratos (folha e casca) da espécie *Annona dolabripetala* Raddi.

2.0 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Considerações sobre o gênero *Annona*

2.1.1. Etnobotânica e distribuição geográfica

Segundo Lopes e Mello-Silva (2014) a família Annonaceae apresenta no Brasil 29 gêneros e 386 espécies, distribuídas principalmente na Amazônia, Mata atlântica e Cerrado. Os principais gêneros da família Annonaceae na flora brasileira são: a *Annona* L., *Duguetia* A.St-Hil., *Guatteria* Ruiz & Pav. e *Xylopia* L. (Lopes e Mello-Silva, 2014). O gênero *Annona* L. compreende cerca de 200 espécies neotropicais e africanas (Maas, 2016). No Brasil, ocorrem 82 espécies, sendo que destas, 24 são endêmicas, distribuídas em regiões como a Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (Maas et al., 2016).

A espécie *Annona dolabripetala* é endêmica para o Brasil (Maas et al., 2016), podendo ser encontrada no domínio fitogeográfico de Mata Atlântica. Esta espécie ocorre na região Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro) e Sul (Paraná) (**Figura 01**) sendo conhecida popularmente como: Araticum, Ata, Araticú, biribá do mato e pinha do mato (Maas et al., 2016). Em estudos florísticos, botânicos e ecológicos de parques nacionais de

conservação da biodiversidade descrevem esta espécie (Lopes e Mello-Silva, 2014; Moraes et al., 2014; Chelene, 2014), como uma das utilizadas em áreas de reflorestamento com maior valor de cobertura vegetal na sucessão ecológica em ambientes degradados (Costa, 2014; Rossi, 2014).

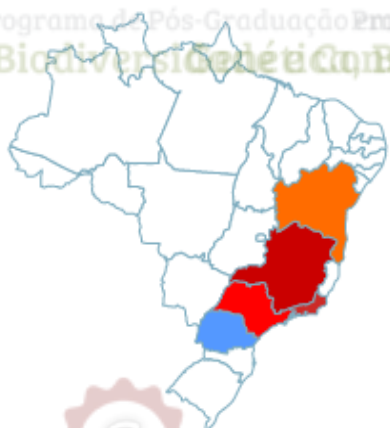


Figura 01. Distribuição geográfica da espécie *Annona dolabripetala* no Brasil dentre os seus domínios fitogeográficos (Mata Atlântica) (Maas et al., 2016). Fonte: Lista de Espécies da Flora do Brasil 2016, in: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>.

Annona dolabripetala Raddi (**Figura 02**) é uma árvore de 4 a 6 metros de altura, com tronco cinza escuro medindo de 10 a 25 cm de diâmetro. Os ramos novos são vilosos (coberto de pêlos curtos e densos) e as nervuras das folhas são ferrugineas e pubescentes. As folhas são simples, oblongas a lanceoladas, medindo de 5 a 13 cm de comprimento e 1,5 a 3,2 cm de largura, com base obtusa e ápice ou ponta acuminada ou afinada. As flores são esverdeadas, axilares e tem forma de hélice, com 3 pétalas esverdeadas e pubescentes em forma de asas, com nectários localizados na base das pétalas. Os frutos são sincárpicos de 2 a 4 cm de diâmetro, apresentando poupa branca com casca subdividida, de cor amarela clara; quando maduros têm sabor adocicada e muitas sementes de 4 a 5 mm de comprimento. Frutificando nos meses de abril a maio (Mello-Silva et al., 2012; Dutra et al., 2012). Apesar de ser uma planta de clima subtropical, essa espécie resiste a climas mais frios podendo ser cultivada em todo o Brasil, em diferentes altitudes, adaptando-se bem aos solos argilosos e vermelhos profundos, com pH de ácido a neutro e com boa quantidade de matéria orgânica dissolvida. No Estado da Bahia, essa espécie tem ocorrência em biomas mata de cipó, presentes no município de Jequié segundo a descrição de Macedo (2007).



Figura 02. Imagem cedida pelo autor: Árvore galho com folha e fruto para exsicata e frutos *in natura*; Dimensão das folhas e frutos de *A. dolabripetala*, Fonte: Dutra et al., 2012.

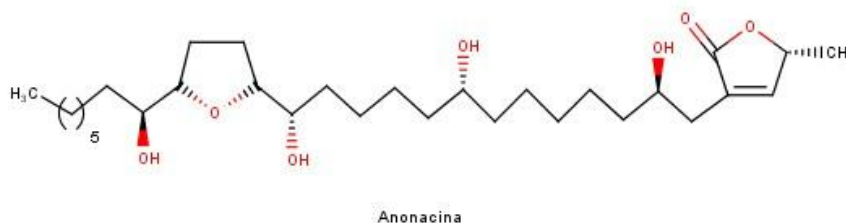
2.1.2 Fitoquímica e usos medicinais

A família Annonaceae tem sido estudada em todo mundo, principalmente quanto ao seu perfil fitoquímico e farmacológico (Leboeuf et al., 1982; Castillo-Sánchez et al., 2010). Um dos principais representantes desta família é o gênero *Annona*, que tem despertado interesse tanto pelo seu potencial frutífero e comercial, quanto pelos usos medicinais (Oliveira et al., 2012).

O gênero *Annona*, pode ser considerado uma grande fonte de novos metabólitos secundários ativos e que tem levado à descoberta de moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos naturais, semissintéticos e sintéticos (Serna e Cardona, 2006; Cortes et al., 2014; Junior et al., 2014), tendo grande importância econômica e medicinal (Martínez-Vázquez e Estrada-Reyes, 2014).

O primeiro estudo fitoquímico foi realizado por Leboeuf (1982) que descreveu diversas substâncias químicas presentes na Família Annonaceae e no gênero *Annona*. As espécies bem estudadas deste gênero são aquelas que têm uma maior relação com o interesse comercial, nutricional e industrial, tais com a *A. crassiflora* (araticum), *A. squamosa* (fruta-do-conde), *A. muricata* (graviola), *A. reticulata* (condessa) e *A. cherimola* (cherimoia) (Almeida, et al., 2011; Junior et al., 2014). Os frutos destas espécies são usados para preparação de produtos processados e semi-processados, como sucos, sorvetes e sobremesas (Junior et al., 2014). Além disso, várias espécies do gênero *Annona*, possuem frutos com potencial farmacológico como à presença de substâncias antioxidantes como a vitamina C, antocianinas, flavonoides e compostos fenólicos (Oliveira et al., 2012).

O aumento do consumo de frutos deste gênero se difundiu na medicina tradicional pelo seu potencial no tratamento do câncer (Albuquerque et al., 2007). O seu grande uso popular, levou ao crescente número de estudos fitoquímicos (Barreto et al., 2015), resultando no isolamento de uma nova classe de compostos (**Figura 03**) conhecido como acetogeninas (Pedro et al., 2012). Esses compostos foram descritos como princípios ativos naturais, candidatos a novos quimioterápicos no combate aos tumores (Liaw et al., 2010). As espécies de interesse comercial e nutricional descritas por Junior et al. 2014, passaram a ser estudadas segundo o perfil fitoquímico, de onde foram isoladas uma grande quantidade de acetogeninas (Barreto et al., 2015) com potencial antitumoral e citotóxico (Kim et al., 2010; Liaw et al., 2010).

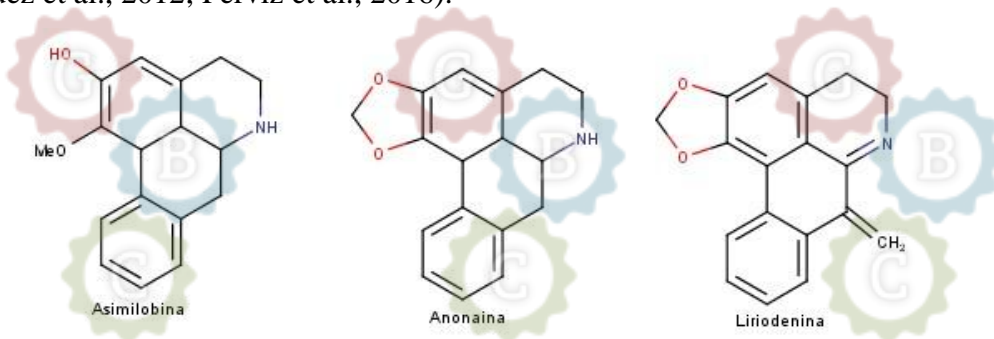


Fonte: Rabêlo, 2014.

Figura 03. Exemplo de uma acetogenina isolada de espécies do gênero *Annona*.

Além das acetogeninas, são descritos para o gênero *Annona* outras classes de substâncias de interesse químico e medicinal (Leboeuf et al., 1982; Jamkhande e Wattamwar, 2015). Pode-se destacar em relação de importância farmacológica e pelo número de estudos científicos as

seguintes classes: a) Terpenoides com propriedades inseticidas (Costa et al., 2011; Costa et al. 2012), ação sobre o sistema nervoso central (Passos et al. 2009), citotóxicas (Bakkali et al., 2008), anti-inflamatórias e analgésicas (Chavan et al., 2011; Chavan et al., 2012); b) Óleos essenciais apresentando compostos aromáticos com ações inseticidas (Krinski et al. 2014), antioxidantes (Costa et al., 2011), antimicrobianas (Elhawary et al., 2013), antiparasitárias (Costa et al., 2013), citotóxicas e antitumorais (Costa et al., 2013); c) Flavonóides com ações antioxidantes (Nunes et al., 2012; Almeida et al., 2014), anti-inflamatórias (Coutinho et al., 2009), antitumorais, anti-proliferativa (Marques et al., 2013; Firdous et al., 2014) e psicofarmacológicas (Grosso et al., 2013); d) Alcalóides (**Figura 04**), apresentando propriedades citotóxicas, antiparasitárias, antitumorais (Cortes et al., 2014) e psicofarmacológicas (Martínez-Vázquez et al., 2012; Perviz et al., 2016).



Fonte: Rabêlo, 2014.

Figura 04. Exemplos de alcaloides isolados de espécies do gênero *Annona*.

As espécies do gênero *Annona*, apresentam aromas e cheiros bem marcantes encontrados em flores, folhas e cascas de frutos (Andrade et al., 2007). Os constituintes desses aromas são usualmente bem conhecidos como: monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides, compostos aromáticos e ésteres de ácidos alifáticos (Maia et al. 2015). Segundo Maia et al., (2015), os compostos terpenoides se difundem bem dentre as espécies do gênero *Annona* e alguns destes compostos são encontrados com maior frequência, tais como: biclogermacreno, Germacreno-D, muuroleno, δ -cadineno, espatulenol, (*E*)-e(*Z*)-cariofileno, α -copaeno e α -felandreno (Campos et al., 2014; Costa et al., 2011; 2013; Costa et al., 2012). Alguns deles podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos, funcionando como indicadores para a família Annonaceae, tais como: Germacreno-D, espatulenol e (*E*)-cariofileno, enquanto que outros compostos como α -pineno, biclogermacreno e espatulenol são descritos, como marcadores para o gênero *Annona* (**Figura 05**) (Costa et al., 2012).

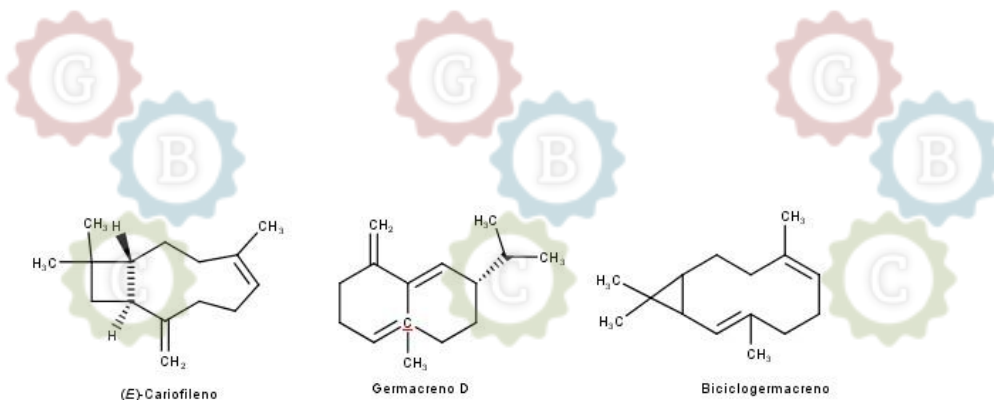


Figura 05. Exemplo de sesquiterpenos isolados de espécies do gênero *Annona*.

Além destas classes de compostos, outras moléculas chamam atenção tais como: carboidratos, aminoácidos, proteínas, lipídios (óleos e ácidos graxos), polifenóis, catequinas, proantocianidinas, taninos, triterpenos, esteróis, saponinas, vitaminas e carotenos (Lebouef et al., 1982). Uma classe de compostos diterpênicos (**Figura 06**) da série dos *ent*-kaureno (Garcia et al., 2007) foi encontrada nas cascas do caule das espécies do gênero *Annona* (*A. vepretorum*, *A. senegalensis*, *A. reticulata*, *A. squamosa* e *A. glabra*) e tendo chamado atenção por conta do crescente número de trabalhos envolvendo isolamento, purificação e caracterização dos constituintes químicos e, também, pelas diversas atividades biológicas, tais como: analgésica e anti-inflamatória (Chavan et al., 2012; Chavan et al., 2011), citotóxica (Dutra et al., 2014), psicofarmacológica (Okoye et al., 2013), antimicrobiana (Wilkins et al., 2002), indutor de apoptose (Ruiz et al., 2008) e imuno-moduladora (Ríos et al., 2009).

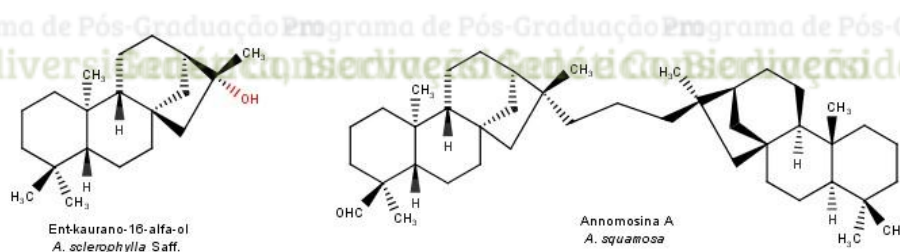


Figura 06. Exemplos de diterpenos, do tipo *ent*-kaureno isolados de espécies de *Annona*.

Com relação à espécie em estudo, *A. dolabripetala* Raddi, trabalhos referentes à caracterização fitoquímica e usos medicinais são escassos, sendo descritos apenas a presença de compostos com estruturas químicas reconhecidas (flavonóides e alcalóides). Santos e Salatino (2000), registraram a presença de flavonoides glicosilados nesta espécie, tais como: Kaempferol e quercertina (**Figura 07**). Estes flavonoides, estão presentes em outras espécies do gênero *Annona*, apresentando atividades biológicas tais como: antioxidante (Almeida et al., 2014), anti-

inflamatória (Coutinho et al., 2009), antitumoral (Marques et al., 2013) e psicofarmacológica (Grundmann et al., 2009; Grosso et al., 2013).



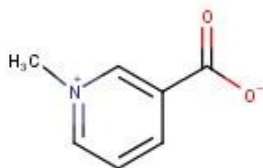
Núcleo básico do flavonoides

Fonte: Nunes et al., 2012.

Quercetina - R1: OH, R2: OH, R3: OH e
Kaempferol - R1: OH, R2: H, R3: OH.

Figura 07. Fórmula estrutural da quercetina e do keampferol, presente nas folhas de espécies do gênero *Annona*.

Machado et al., (2013) descrevem o isolamento e quantificação da trigonelina (**Figura 08**) um alcalóide presente nos extratos foliares de algumas espécies de *Annona* (*A. muricata*, *A. laurifolia*, *A. dolabripetala*, *A. sylvatica*, *A. cherimolia* e *A. coriacea*). Esta substância é comumente encontrada em uma variedade de organismos vivos tais como, animais, plantas, fungos, bactérias e algas (Blunden e Patel, 2001). Além da sua diversidade biológica, apresenta também, propriedades farmacológicas, tais como: protetora contra patógenos, hipoglicemiante, hipocolesterolêmica, antitumoral e antisséptica (Corol et al., 2012; Zhou, Chan e Zhou, 2012).



Fonte: Machado et al., 2013.

Figura 08. Formula estrutural da trigonelina.

Dentre as espécies descritas por Machado et al., (2013), como produtoras de trigonelina, *A. dolabripetala*, destaca-se das demais como aquela espécie que apresentou a quarta maior concentração desta substância no extrato metanólico foliar ($4,94 \pm 0,25 \text{ mg.g}^{-1}$). Diante de tais informações, e da escassa quantidade de dados sobre a fitoquímica desta espécie, o seu potencial

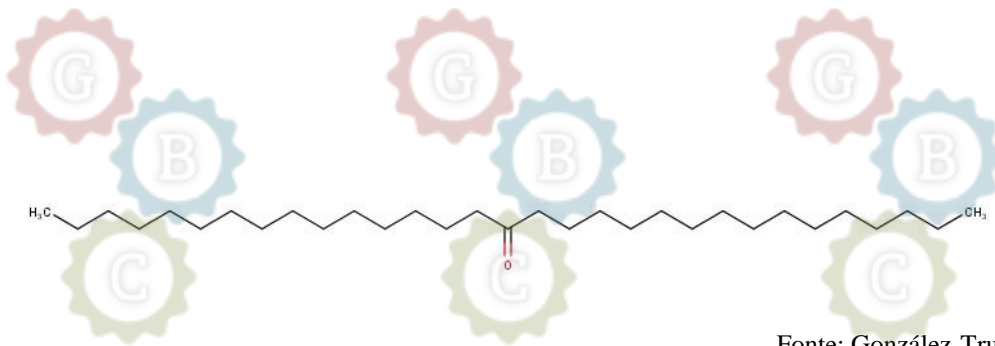
farmacológico pode ser explorado, principalmente no que se refere à ação sobre o sistema nervoso central.

2.1.3 Atividade psicofarmacológica

Os estudos sobre atividade psicofarmacológica do gênero *Annona*, basearam-se inicialmente no conhecimento popular e no uso tradicional destas espécies no tratamento de distúrbios do sistema nervoso central (Hasrat et al., 1997). As metodologias para avaliar o potencial psicofarmacológico, dos extratos, frações e compostos isolados de espécies deste gênero, visavam identificar e caracterizar o perfil antidepressivo, ansiolítico, sedativo e anticonvulsivante, tentando confirmar os efeitos medicinais (Diniz et al., 2015; Albuquerque et al., 2007).

Os constituintes químicos presentes nos extratos de espécies deste gênero podem explicar boa parte dos seus efeitos sobre o SNC. Em seus óleos essenciais, foram detectadas quantidades significativas de compostos terpenóides (diterpenos, triterpenos e sesquiterpenos) (Leboeuf et al., 1982). Passos et al. (2009) descrevem que estes compostos são responsáveis por ações terapêuticas encontradas em plantas medicinais usadas com finalidades sedativas, ansiolíticas, antidepressivas, antinociceptivas, analgésicas, tranquilizantes e anticonvulsivantes. Muitos óleos essenciais, do gênero *Annona* possuem uma variedade de atividades farmacológicas, sendo os compostos terpenóides um dos principais responsáveis pelos seus efeitos no SNC.

Outros compostos, encontrados neste gênero têm sido descritos como ativos sobre o sistema nervoso central. A palmitona (**Figura 09**) descoberta no extrato hexânico da espécie *A. diversifolia*, endêmica do México, é considerada uma fitodroga para tratamento de convulsões. (González-Trujano et al., 1998; González-Trujano et al., 2006 [a, b]). Muitos dos trabalhos envolvendo psicofarmacologia de *Annona* descrevem a caracterização das ações desta molécula e de extratos sobre SNC. Além de anticonvulsivante, os extratos desta espécie, apresentam efeitos ansiolíticos, relacionados com receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA_A), envolvidos nos processos de sedação e depressão do sistema nervoso central (Lopez-Rubalcava et al., 2006; González-Trujano et al., 2006b).



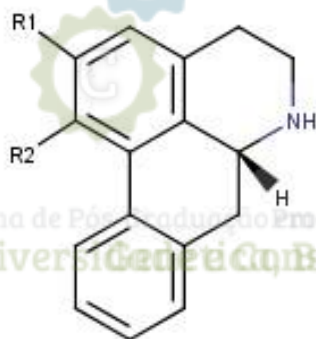
Fonte: González-Trujano et al., 2001.

Figura 09. Fórmula estrutural da palmitona.

González-Trujano et al., (2009) avançaram nos estudos dos extratos de *A. diversifolia*, ao aplicar novas metodologias de avaliação neuronal, tais como o eletroencefalograma (EEG), avaliando o potencial anticonvulsivante, em áreas como as amígdalas e hipocampo. O extrato hexânico e a palmitona, promoveu efeito neuroprotetor, verificado através de alterações bioquímicas neuronais no processo de modulação do sistema glutaminérgico. Os estudos com *A. diversifolia* estimularam trabalhos com outras espécies de *Annona*. Lopez-Rubalcava et al., (2006) avaliaram o extrato hexânico das folhas de *A. cherimolia* e comprovaram seu efeito psicofarmacológico, suportando a hipótese de que constituintes químicos do extrato hexânico desta planta interagem com o receptor GABA-A (ácido gama-aminobutírico) e induzem ação ansiolítica.

Carballo et al., (2010) avaliaram a atividade antinociceptiva da palmitona e dos extratos de *A. diversifolia*, que continham, terpenoides, alcaloides e flavonoides. Estes compostos, segundo o autor, podem estar envolvidos no efeito antinociceptivo do extrato de *A. diversifolia*, podendo estar relacionados também com ações sobre SNC. Os resultados indicaram eficácia do extrato na redução da dor artrítica e apontam para o envolvimento de receptores de serotonina (5-HT) e opióides endógenos, relacionados com respostas farmacológicas no SNC (Wannmacher, 2006; Ferreira et al., 2006).

Os alcalóides são descritos como outra classe de compostos com ações psicofarmacológicas. Hasrat et al., (1997) descreveram a atividade de alcalóides isoquinolínicos (**Figura 10**) extraídos dos frutos de *A. muricata*, avaliando a capacidade de interação farmacológica com receptores serotoninérgicos. No Suriname, os frutos e folhas desta espécie possuem uma ação tranquilizante na medicina tradicional, e os resultados mostraram que o extrato exibiu uma alta ação sobre o receptor de serotonina (5-hidroxitriptamina), agindo como antagonista em relação à rauwolscina, uma molécula usada como antagonista serotoninérgica (Heyde, 1985).



Fonte: Hasrat et al., 1997.

Asimilobina - R1: H, R2: CH₃

Nornuciferina - R1: CH₃, R2: CH₃

Annonaina - R1 e R2: C₂H₅

Figura 10. Estrutura dos alcalóides (1- Asimilobina, 2-Nornuciferina, 3-Annonaina) isolados do fruto de *Annona muricata*.

O alcalóide annomontina isolado das raízes de *A. purpúrea* apresentou atividades psicofarmacológicas em modelos experimentais. A administração intraperitoneal da annomontina em camundongos induziu efeitos ansiolíticos, observado no teste de labirinto em cruz elevado. Esta atividade indicou que os efeitos farmacológicos podem ser mediados pela ação do receptor GABA-A (ácido gama-aminobutírico) através da interação deste alcalóide com o sítio de ligação aos benzodiazepínicos (Rejón-Orante et al. 2011). Já os extratos foliares contendo alcalóides (fração total de alcalóides) de *A. cherimolia*, demonstraram efeito antidepressivo e sedativo em camundongos (Martínez-Vazquez et al., 2012). Estes dados fortalecem o uso desta espécie na medicina tradicional como agente antidepressivo natural (Martínez-Vazquez et al., 2012).

Outro alcalóide que tem chamado a atenção pela grande variedade de atividades farmacológicas é a trigonelina (Zhou, Chan e Zhou, 2012). Machado et al. (2013) descrevem a presença dessa molécula em espécies do gênero *Annona* de ocorrência no Brasil. Esse constituinte químico apresenta efeitos em modelos *in vivo* e *in vitro* que envolvem ações: na memória e no aprendizado, sedativa, anticolinérgica, anti-histamínica, inibidora do receptor GABA-A, inibidora de acetilcolinesterase, estimuladora da liberação de dopamina, inibidora da agregação de peptídeo β-amiloide e neuroprotetora contra desordens cerebrais (Zhou, Chan E Zhou, 2012). Alcalóides isolados de extratos de espécies do gênero *Annona*, portanto, apresentam atividade no SNC contribuindo de maneira significativa em respostas psicofarmacológicas (Oviedo et al., 2009).

Os flavonóides descritos para o gênero *Annona* demonstraram atividade psicofarmacológica em trabalhos anteriores (Grosso et al., 2013; Nunes et al., 2012). Por outro lado foi encontrado um número reduzido de trabalhos ligados à esse tipo de atividade, para o gênero em questão (Grundmann et al., 2009). O keampferol e a quercertina, demonstraram atividade ansiolítica em modelos experimentais (Grundmann et al., 2009; Herrera-Ruiz, 2008) e estão presentes de forma marcante nos extratos foliares de muitas espécies do gênero *Annona* (Santos e Salatino, 2000). A presença destes compostos com atividade no SNC em espécies do gênero *Annona* (Nunes et al., 2012) contribui ainda mais para aumentar o potencial ansiolítico e sedativo dos extratos deste gênero (Vissienon et al. 2012). Esses compostos também são descritos em espécies de outras famílias, como: *Apocynum venetum* (Apocynaceae) e *Tilia americana* (Tiliaceae) (Grundmann et al., 2009; Herrera-Ruiz, 2008).

Todos os trabalhos sobre atividade psicofarmacológica de espécies do gênero *Annona*, estão relacionados a estas classes químicas supracitadas e são datados entre 1997-2013. Boa parte deles tenta descrever através de procedimentos experimentais *in vivo* as ações destas espécies descritas na medicina tradicional (Diniz et al., 2015).

3.0 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Descrever o perfil fitoquímico e psicofarmacológico dos extratos das folhas e casca da espécie *A. dolabripetala* Raddi (Annonaceae).

3.2. Objetivos específicos

- a) Extrair, purificar e identificar os constituintes químicos da casca desta espécie, utilizando técnicas cromatográficas clássicas, Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C .
- b) Caracterizar o perfil psicofarmacológico *in vivo* em camundongos, usando a metodologia de triagem farmacológica comportamental, e o potencial ansiolítico e antidepressivo dos extratos das folhas e cascas, através do labirinto em cruz elevado.
- c) Caracterizar o perfil analgésico central dos extratos, através do teste de retirada de cauda (Tail flick).
- d) Avaliar as possíveis alterações histopatológicas nos órgãos dos animais experimentais.

4.0 METODOLOGIA

O procedimento experimental (**Figuras 11 e 12**) foi dividido entre a estratégia fitoquímica desenvolvida no Laboratório de Produtos Naturais da UESB e estratégia farmacológica no Biotério da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, a avaliação histológica foi desenvolvida no Laboratório de Histologia do Hospital Veterinário da UESC. Um resumo dos procedimentos utilizados são visualizados nos fluxogramas abaixo.

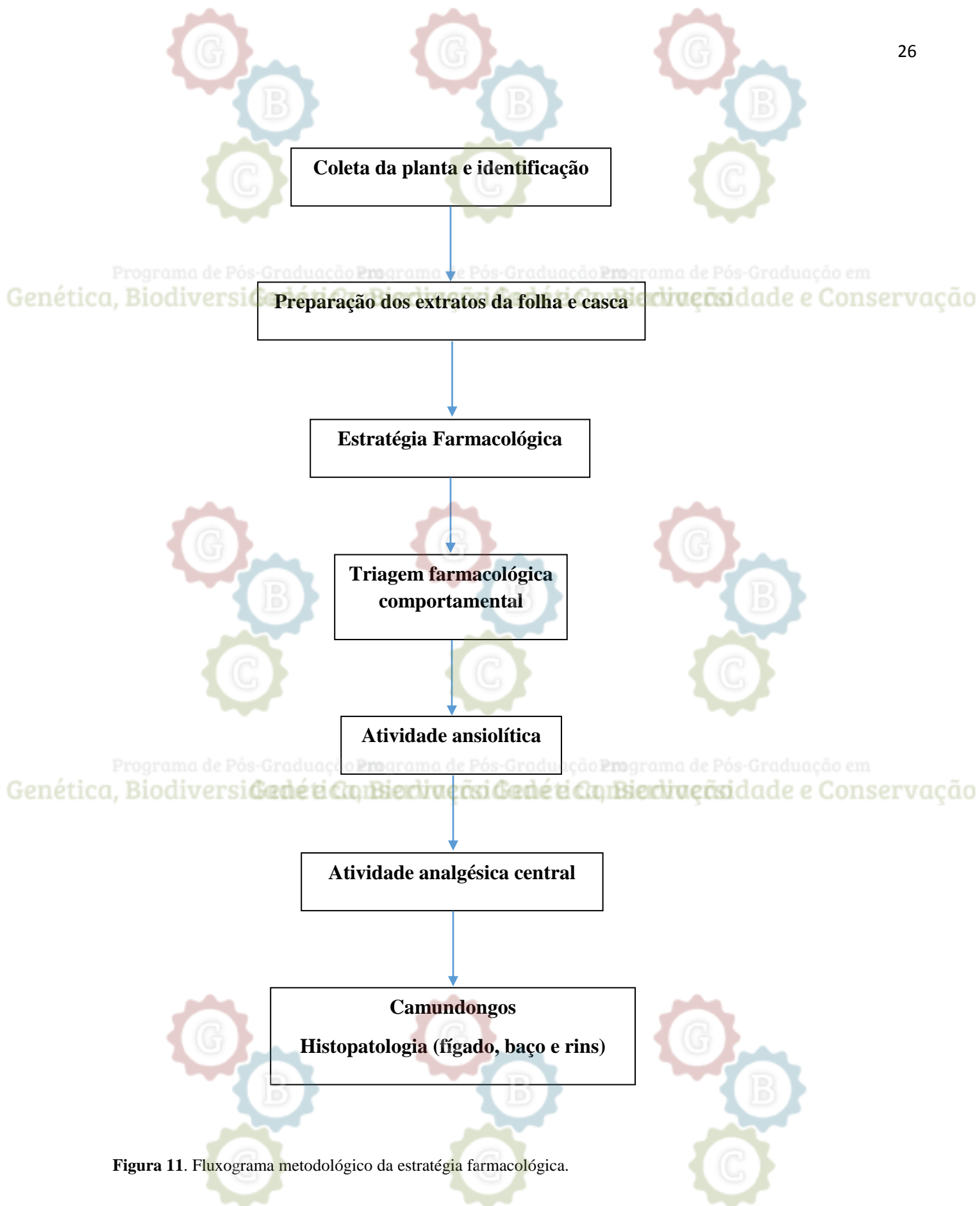


Figura 11. Fluxograma metodológico da estratégia farmacológica.

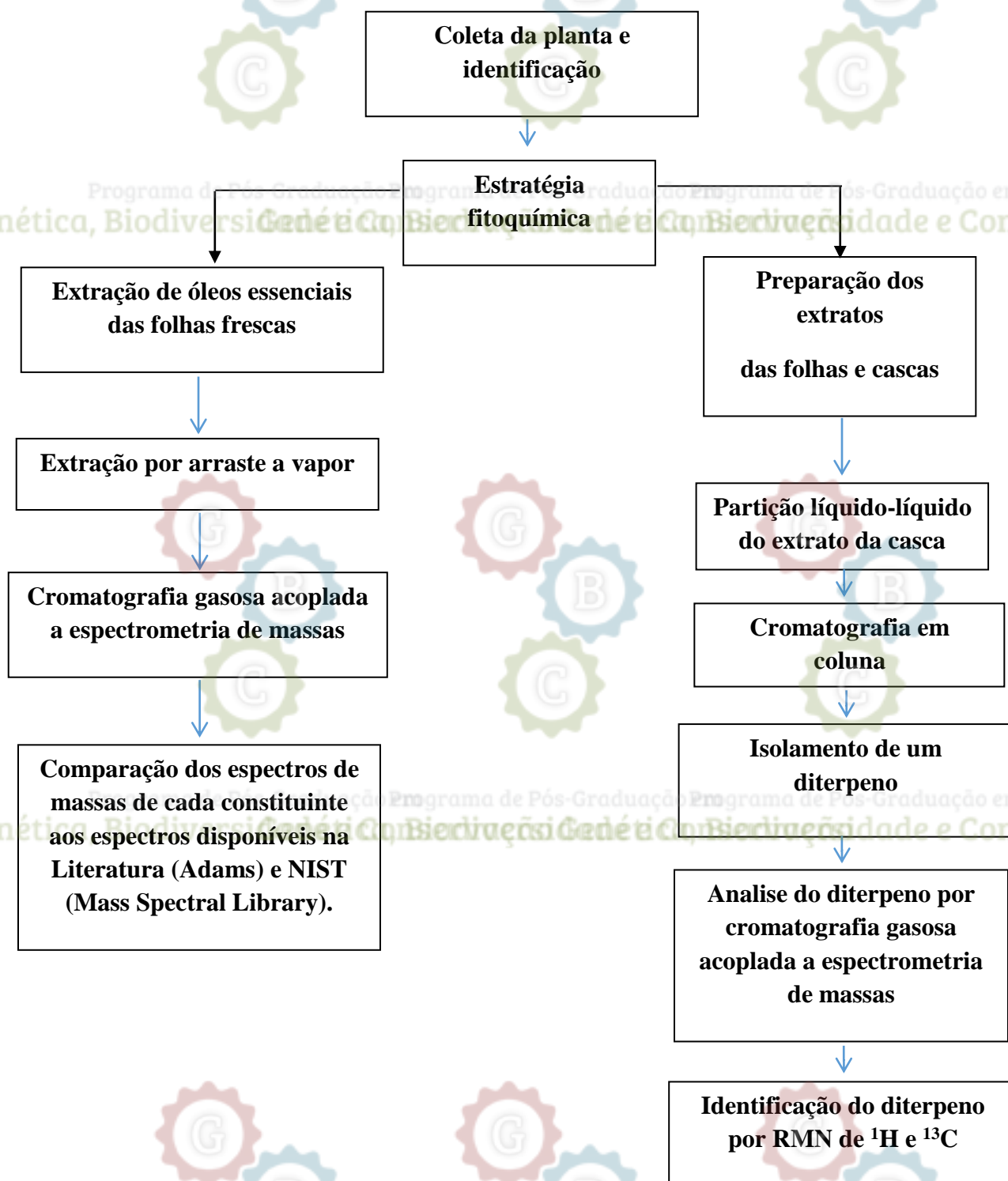


Figura 12. Fluxograma metodológico da estratégia fitoquímica.

4.1 Estudo fitoquímico de *Annona dolabripetala* Raddi

4.1.1 Coleta, identificação e herborização da planta

O material vegetal foi coletado em um fragmento florestal situado no domínio de floresta estacional decidual, localizado na fazenda Brejo Novo (13°56'41" S e 40°06'33,9" W) com altitudes entre 617 m e 755 m, em uma propriedade particular situada a 12 km da sede do município de Jequié, Bahia. Foram coletados aproximadamente em peso bruto: 1,435g de folhas, 418,19g de casca do tronco, 469,05g da madeira (caule) e 62 g pequenos frutos verdes. Uma parte do material coletado foi encaminhada para identificação no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. A exsicata depositada foi registrada como *Annona dolabripetala* n.9565 (HUESB) (**Figura 13**).



Figura 13. Exsicata (N. 9665) de *Annona dolabripetala* depositada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

4.1.2. Reagentes, equipamentos e materiais

Foram utilizadas reagentes de grau analítico, disponíveis no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química e Exata, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. (LPN/DQE/UESB). Todos os equipamentos, materiais e reveladores utilizados são listados abaixo: Câmara reveladora de placas BOITTON ($\lambda = 254$ e 365 nm) utilizada para revelar as cromatoplas; Evaporador rotatório (Fisatom) utilizado na evaporação dos solventes orgânicos e concentração dos extratos; Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C a 300 MHz Varian Mercury 300 (Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa – MG) utilizado para análise de RMN do ácido kaurenico; Sílica gel 60 (0,063 – 0,200

mm) da Merck ou Vetec - cromatografia em coluna; Sílica gel 60 GF254 da Merck –material para cromatografia em coluna; Solventes (P.A.) Vetec, FMaia e Synth - preparo dos extratos por maceração e purificação das substâncias por cromatografia em coluna; Iodo da marca VETEC - revelador de compostos em cromatoplas; Reagente de Kedde - identificação da presença de acetogeninas; Reagente de NEU -identificação da presença flavonoides; Reagente de Dragendorff - identificação da presença de alcaloides.

4.1.3. Preparação dos extratos das folhas e casca

As folhas secas de *A. dolabripetala* (635,43g) foram extraídas por maceração em hexano, acetato de etila e metanol sucessivamente à temperatura ambiente durante 15 dias. Este procedimento foi repetido três vezes para cada solvente. Ao final das três extrações, volume reduzido em evaporador rotativo à vácuo e em seguida cada extrato foi colocado em capela de exaustão para completa eliminação do solvente. Foram obtidos ao final do processo 13,5 g (2%) do extrato hexânico, 12,02 (1,8%) g do extrato acetato de etila, 92,32g (14,3%) do extrato metanólico (EMF). Todos os extratos foram colocados em local seco e arejado, para evitar proliferação de microrganismos. As cascas secas (418,19g) foram submetidas a extração com álcool etílico (P.A) por maceração a temperatura ambiente de forma semelhante aos extratos da folha. Após a evaporação do solvente obteve-se 25,58 g (6,1%) do extrato etanólico da casca (EEtCAD). O extrato metanólico da folhas (EMFAD) e o extrato etanólico da casca (EEtCAD) foram usados nos ensaios biológicos.

4.1.4. Avaliação preliminar dos constituintes químicos dos extratos

A triagem fitoquímica preliminar, teve o objetivo de estabelecer a possível natureza química dos compostos existentes nos extratos metanólico da folha e etanólico da casca de *A. dolabripetala*. Foram realizados testes para classes específicas de constituintes químicos, alcaloides, flavonoides e acetogeninas. A avaliação dos extratos foi realizada em placa de sílica gel com suporte de vidro e as amostras eluídas em diferentes sistemas de solventes. A presença de alcaloides, acetogeninas e flavonoides foram determinadas pelos reagentes de Dragendorff, Kedde e solução de NEU (WAGNER; BLADT, 1996).

4.1.5. Extração e análise dos óleos essenciais das folhas

As folhas frescas de *A. dolabripetala* (800 g), foram trituradas em pedaços menores e submetidas à extração por arraste a vapor em aparelho tipo Clevenger (**Figura 14**) durante 2 horas. Ao final do processo, foi obtida uma mistura de fases aquosa e oleosa. Posteriormente, as fases foram separadas, resultando em 0,227g de óleo essencial (OE1) de coloração amarelada. Uma quantidade menor (180g) de folhas foi reservada e seca em estufa por 72h, de onde foram obtidas o óleo essencial (OE2- 0.220g) das folhas secas para análise comparativa dos constituintes químicos. A identificação dos constituintes foi realizada por análise em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). A identificação dos constituintes químicos foi feita com base na comparação dos seus índices de retenção relativos, calculado usando uma série de *n*-alcanos (C8-C28) aplicando a equação de Van den Dool & Kratz e comparando os espectros de massas de cada constituinte aos espectros disponíveis na biblioteca do Adams (2009).



Fonte: foto cedida pelo autor.

Figura 14. Técnica de hidrodestilação utilizando aparelho tipo Clevenger.

4.1.6. Isolamento do ácido kaurenico do extrato hexânico da casca

A fração hexânica (676 mg), obtida por partição líquido-líquido do extrato etanólico da casca foi submetida a cromatografia em coluna preenchida com sílica gel 60. Deste processo foram obtidas 24 frações: fração 01-06 (eluída com 400 mL de hexano/acetato (9:1), fração 7-13 (hexano/acetato (8:2) – 450 mL); fração 14-17 (hexano/acetato (7:3) – 450 mL); fração 18-19 (hexano/acetato (1:1) – 500 mL); fração 20-21 (EtOAc – 300 mL); fração 22-23 (EtOAc/metanol (1:1) – 250 mL); fração 24 (metanol – 200 mL). A fração 02 foi lavada com hexano gelado, por

três vezes, para obtenção de 3 sub-frações, fração HCAD-2.0, HCAD-2.1 e HCAD 2.2 (26 mg - 3,8%), sendo esta última, submetida a análise por CG-EM e RMN de ^1H e ^{13}C .

4.1.7. Análise do ácido kaurenico por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

A obtenção do espectro de massas do ácido kaurenico por CG-EM foi realizada em aparelho da Shimadzu modelo-QP2010 SE. As condições de análise por CG-EM foram: temperaturas do injetor e da interface, 290 °C, temperatura inicial da coluna 100 °C, durante 1 min., sendo aumentada 5 °C min⁻¹, até atingir 285 °C; fluxo do gás de arraste (He) foi de 1,8 mL min⁻¹. As condições para análise dos óleos essenciais foram: coluna DB-5 (5% de fenila com 95% dimetilpolissiloxano), 30 m X 0,25 mm de diâmetro interno, espessura do filme de 0,25 µm. Fluxo de gás de arraste (He) foi de 1,8 mL.min⁻¹; a temperatura do injetor foi 290 °C; a temperatura da interface foi 290 °C; e a temperatura inicial da coluna foi de 100 °C, aumentando 6 °C.min⁻¹, até atingir 285 °C, permanecendo constante nesta temperatura por 28 minutos. A razão de split 1/27; volume injetado 1 µL de cada amostra dissolvida em hexano, na concentração de 10.000 µg.mL⁻¹. As condições do espectrômetro de massas foram, energia de impacto 70 eV; velocidade de varredura 1000; intervalo de varredura de 0,5 e registro da razão m/z de 30,00 a 600,00.

4.1.8. Análise e identificação do ácido kaurenico por RMN de ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro, Varian modelo Mercury 300, operando respectivamente a 300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna.

4.2. Ensaios para avaliação da atividade psicofarmacológica dos extratos das folhas e casca de *A. dolabripetala*

4.2.1. Animais experimentais

Foram utilizados, neste estudo, camundongos albinos (*Mus musculus*) machos com 12 semanas, pesando entre 30 e 40 g, obtidos no Biotério do Instituto Gonzalo Muniz (Fiocruz-

Salvador). Os tratamentos dos animais com o veículo (grupo controle), extrato, ou diferentes substâncias foram realizados em doses adequadas para a administração de um volume constante de 10 mL/kg. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h), com água e ração *ad libitum*, permanecendo no laboratório por um período de adaptação de pelo menos uma hora antes dos experimentos. Todos os experimentos foram desenvolvidos seguindo normas do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA-UESB).

O sacrifício dos animais ocorreu pelo método químico, preconizado, agentes farmacológicos não inalantes, como pentobarbital sódico, sendo o método de melhor escolha, não causando traumas aparentes ao animal (CCAC, 1984; OPS, 1968; Fiocruz, 1993; De Luca et al., 1996). Os animais foram embalados com filme plástico, etiquetados para descarte e acondicionados no freezer, - 20 C, sendo as carcaças dos mesmos, direcionadas para a coleta em recipientes especializados para lixo biológicos e encaminhados para incineração. Dos animais sacrificados após o final dos 14 dias de testes foram retirados o fígado, rins, baço para análise histológica.

4.2.2. Triagem farmacológica comportamental

Os animais utilizados foram pesados, marcados, divididos em grupos de 6 e deixados na sala de experimentação por algumas horas antes do teste, para sua adaptação ao ambiente. Os grupos foram divididos em experimental (extrato de casca e folha) e controle (6x6). Os respectivos extratos foram solubilizados e as soluções controle foram preparadas pouco tempo antes da administração, para evitar evaporação ou mesmo transformação dos componentes. Os tratamentos foram realizados por via oral (v.o.) usando-se seringa de gavagem, no volume padrão de 0,1 mL para cada 10 g de peso corporal. Os animais controle receberam igual volume de solução salina. Foram cronometrados os tempos de tratamento dos animais, registrando-se as alterações comportamentais identificadas, tomando como referência os camundongos do grupo controle. A dose de 300mg/kg/animal, foi estipulada baseado nos protocolos de triagem farmacológica comportamental, segundo (Almeida & Oliveira, 2006).

A anotação do comportamento animal foi realizada em intervalos compreendidos entre 0-30; aos 60; aos 120 e aos 240 minutos após os tratamentos e os sinais de alteração foram

registrados em ficha de protocolo experimental, onde foram detalhados os principais parâmetros sintomáticos de indução dos processos de estimulação ou depressão do sistema nervoso central, além de possíveis efeitos no sistema nervoso autônomo (Almeida & Oliveira, 2006) (**Anexo**). Estes registros foram qualitativos e expressos através de: (+) presente (+ +) forte (+ + +) intenso (-) diminuído e ausente (0). Ao final de cada dia de observação foram computados a quantidade de cruzes e ao final dos 14 dias foram computados o total de cruzes para cada sinal presente e sendo construído gráficos indicando os sinais mais proeminentes e presença de óbitos.

4.2.3. Labirinto em cruz elevado (*elevated-plus-maze*)

O labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos opostos e dois braços fechados por paredes laterais em forma de cruz elevados a 40 cm do chão (**Figura 15**). As paredes laterais dos braços fechados foram confeccionadas em madeira de acordo com os padrões (SILVA, 2011). Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central e cada um dos quatro braços possui 50 cm de comprimento por 10 cm de largura (LAPA et al. 2003)

Grupos de 6 animais receberam veículo (solução fisiológica), diazepam (2,5 mg/kg) e os extratos metanólico da folha e etanólico da casca de *A. dolabripelata* Raddi na dose de 300mg/kg em relação ao peso dos animais. Os extratos foram administrados por via oral (v.o.) por meio de uma seringa de gavagem e o diazepam foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) 60 minutos antes da observação. Os animais foram colocados individualmente no centro do aparelho voltado para o braço aberto e o seu comportamento foi registrado durante 5 minutos. Uma câmera foi acoplada a um suporte no teto sobre o labirinto (**Figura 15**) com intuito de registrar todo o comportamento dos animais e um programa computacional (MyCam[®]v1.1) gravou e armazenou estes comportamentos para análise (**Figura 16**). No final da avaliação de cada animal, o aparelho foi limpo com álcool a 5 % (v/v) (Carlini e Mendes, 2011; Ribeiro, 2010).



Figura 15. Foto labirinto em cruz elevado (A) e suporte para câmera de filmagem e registro do comportamento animal (B).

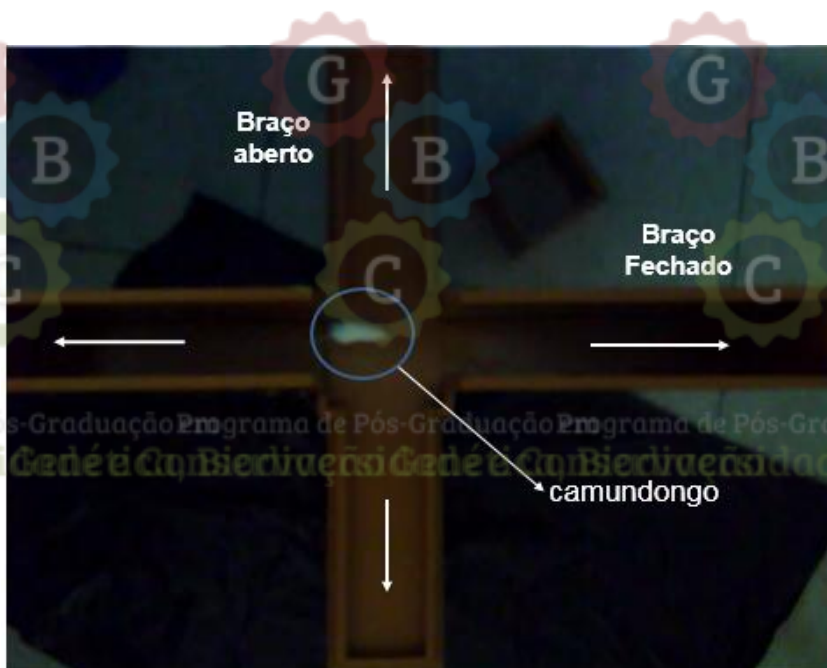
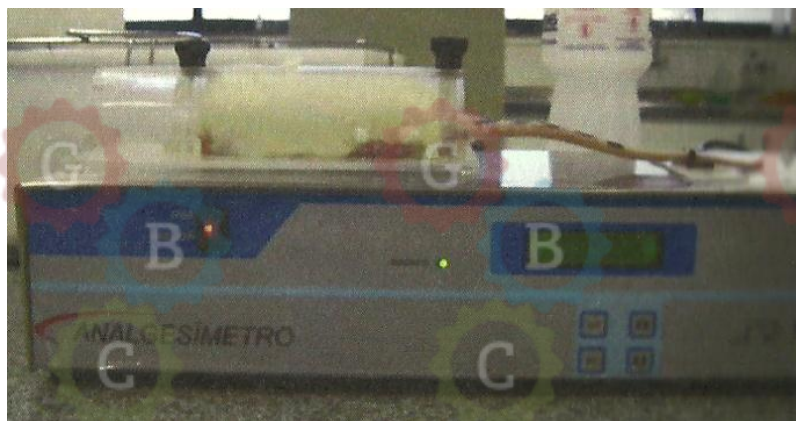


Figura 16. Foto do labirinto em cruz elevado em vista superior registrada pela câmera e armazenada no MyCam[®] v1.1 e arquivada para análise do comportamento animal. Os parâmetros observados na avaliação número de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo de latências (segundos) em ambos os braços.

4.2.4. Ensaio de analgesia central por estímulo térmico (*Tail flick*)

Os animais tratados com os extratos da folhas e casca de *A. dolabripetala* e com a solução salina foram submetidos a avaliação em triplicata no analgésímetro da marca Insight. Os animais foram colocados em um receptáculo de acrílico onde é possível deixar a cauda livre. Em seguida

a cauda é colocada sobre uma estrutura de metal sensível onde o equipamento promove um aquecimento rápido simulando uma agulhada, fazendo com que o animal retirasse a cauda do suporte. Assim que a cauda foi retirada o sensor fez a marcação do tempo em segundos e registrou a temperatura (°C) em que os animais retiraram a cauda. Estes dados foram lançados em uma planilha do próprio aparelho que transfere os dados para o Excel de onde foram realizadas as análises estatísticas. Alguns animais quando colocados nos receptáculos de acrílico, recolhiam a calda e não ficavam totalmente imóveis, portanto foi realizada a medição, posicionando o animal sobre as patas traseiras, mantendo desta forma a cauda do animal imóvel sobre a estrutura de metal sensível (**Figura 17**).



Fonte: Silva et al. 2015.

Figura 17. Analgesímetro para avaliação do potencial analgésico do extrato metanólico das folhas e extrato etanólico da casca de *A. dolabripetala*.

4.2.5. Análises estatísticas

Os resultados numéricos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m) e foram organizados e resumidos na forma de tabelas e gráficos. Para as variáveis consideradas dentro da distribuição normal, foi utilizada análise de variância (ANOVA) para verificar diferenças significativas entre os grupos. As análises foram feitas com auxílio do programa GraphPad Prims 5.0, Excel 2015[®] e o Bioestatics[®]. Nos casos em que foram detectadas diferenças significativas entre os grupos, foi utilizado o teste de contraste de Tukey. Para todos os grupos foram considerados estatisticamente significativos quando $P > 0,05$.

4.3 Análise histopatológica dos órgãos dos animais experimentais

Após o sacrifício dos animais, foram coletados fragmentos de pulmões, fígado, baço, cérebro, intestino, estômago, rins e coração. As amostras foram fixadas por imersão durante duas a três horas em para formaldeído. Após a fixação, o material foi colocado para desidratação em banhos de concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e três vezes 100%) durante uma hora para cada banho. Em seguida, foi submetido a uma mistura de álcool-xilol (1:1) por uma hora, diafanização em três banhos de xilol, de 40 minutos cada, e posteriormente, incluído em três banhos de parafina, de uma hora cada. As amostras foram então, emblocadas individualmente em parafina usando-se barras de Leuckhart. Os blocos foram cortados com espessura de cinco micrômetros em micrótomo Spencer 820 e os cortes colocados em estufa, por 24 h, para que aderissem às lâminas. Para coloração em HE (Hematoxilina/Eosina), as lâminas foram colocadas em uma sequência de banhos, de um minuto cada, em: xilol puro (três vezes) álcool/xilol (1:1), álcool etílico 100%, 90%, 80%, e 70%, Hematoxilina, água corrente, Eosina, álcool 70%, 80%, 90%, álcool/xilol (1:1), xilol puro (três vezes) e montadas em meio Bálsamo do Canadá e lamínula. Posteriormente as lâminas foram analisadas e foto micrografadas.

5.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo fitoquímico de *Annona dolabripetala* Raddi

5.1.1. Avaliação preliminar dos constituintes químicos

A análise fitoquímica preliminar do EMADF e EEtADC não demonstraram reação positiva para acetogeninas, alcalóides e flavonóides, o que pode indicar a ausência destes compostos ou presença em baixas concentrações nos extratos.

5.1.2. Análise dos óleos essenciais das folhas

No cromatograma das folhas frescas (**Figura 18**), foram observados e identificados 72 picos no total, mostrando uma diversidade de compostos voláteis para esta espécie (**Tabela 1**). Destes 72 compostos identificados, 43 (58%) são sesquiterpenos, 23 (32%) de monoterpenos e 6 (10%) referem-se a outras classes de compostos terpenoides (C₁₁, C₁₂ e C₁₄).

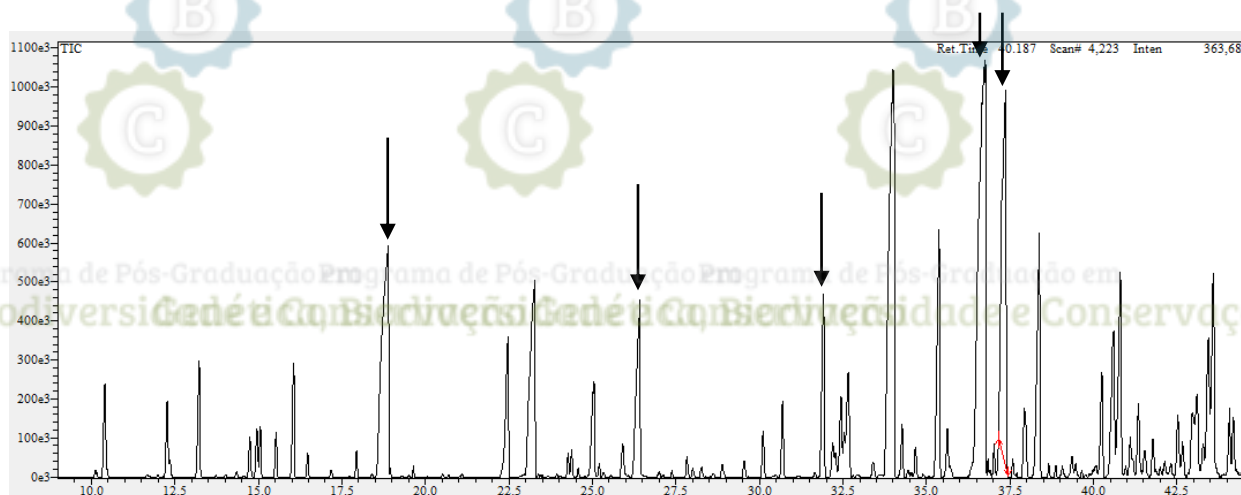


Figura 18. Cromatograma do óleo essencial das folhas de *A. dolabripetala* Raddi.

Nos óleos essenciais das folhas de *A. dolabripetala* foram identificados como compostos majoritários o linalol, geraniol, α -copaeno, aromadendreno e germacreno-D (**Figura 18**). Estes foram descritos também em outras espécies do gênero *Annona* (Maia et al. 2015).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial extraído das folhas frescas *A. dolabripetala*

Compostos	TR	Fórmula molecular	IK _{cal.}	I.R. _{lit.}
α -pineno	10,414	C ₁₀ H ₁₆	932	939
Sabineno	12,286	C ₁₀ H ₁₆	972	975
Mirceno	13,222	C ₁₀ H ₁₆	989	990
α -terpineno	14,351	C ₁₀ H ₁₆	1012	1017
<i>p</i> -cimeno	14,737	C ₁₀ H ₁₄	1020	1024
Limoneno	14,960	C ₁₀ H ₁₆	1025	1029
(<i>Z</i>)- β -ocimeno	15,539	C ₁₀ H ₁₆	1038	1037
(<i>E</i>)- β -ocimeno	16,059	C ₁₀ H ₁₆	1048	1050
<i>Gama</i> -terpineno	16,490	C ₁₀ H ₁₆	1057	1059
Cineol-(1,8)	15,049	C ₁₀ H ₁₈ O	1027	1031
<i>L</i> -linalool	18,900	C ₁₀ H ₁₈ O	1095	1096
Hidrato de <i>trans</i> -sabineno	18,926	C ₁₀ H ₁₈ O	1098	1098
<i>Cis-p</i> -ment-2- <i>en</i> -1-ol	19,649	C ₁₀ H ₁₈ O	1118	1121
α -terpineol	22,472	C ₁₀ H ₁₈ O	1175	1188
De hidro-carveol	23,274	C ₁₀ H ₁₈ O	1190	1193
Geraniol	25,903	C ₁₀ H ₁₈ O	1245	1252
Carvenona	26,408	C ₁₀ H ₁₆ O	1255	1258
<i>Trans</i> -carveol	24,581	C ₁₀ H ₁₆ O	1216	1216
Ascaridol	25,056	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	1227	1237
Óxido de <i>cis</i> -linalool (furanoide)	17,158	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	1070	1072
Óxido de <i>trans</i> -linalool (furanoide)	17,946	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	1084	1086
2(<i>E</i>)-acetato de octenol	24,269	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	1209	1209
(<i>Z</i>)-8-hidroxi-linalol	42,321	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	1619	1619
Prenil-hexanoato	28,265	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	1292	1292
2-etil-cromone	42,128	C ₁₁ H ₁₀ O ₂	1613	1614
2-acetil-naftaleno	42,004	C ₁₂ H ₁₀ O	1610	1609
Dill apiole	42,356	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	1620	1620
Ácido octanedioico dietil éster	40,963	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	1584	1585
Khusimone	41,787	C ₁₄ H ₂₀ O	1604	1604
δ -elemeno	30,122	C ₁₅ H ₂₄	1334	1338
α -cubeneno	30,683	C ₁₅ H ₂₄	1346	1351
α -copaeno	31,915	C ₁₅ H ₂₄	1373	1376
β -elemeno	32,164	C ₁₅ H ₂₄	1378	1390
α -gurjuneno	33,402	C ₁₅ H ₂₄	1404	1409
β -cedreno	33,996	C ₁₅ H ₂₄	1419	1420
β -gurjuneno	34,263	C ₁₅ H ₂₄	1426	1433
α -gualeno	34,664	C ₁₅ H ₂₄	1435	1439

TR: tempo de retenção. IK_{cal.}Índice de Kovats calculado. I.R._{lit.}Índice de retenção da literatura (Fonte: Adams, 2009)

Tabela 1. Composição química do óleo essencial extraído das folhas frescas *A. dolabripetala* (Continuação)

Compostos	TR	Fórmula molecular	IK _{cal.}	I.R. _{lit.}
<i>μ</i> -neo-claveno	35,392	C ₁₅ H ₂₄	1453	1454
<i>Alo</i> -aromadendreno	35,630	C ₁₅ H ₂₄	1458	1460
Germacreno-D	36,836	C ₁₅ H ₂₄	1486	1481
<i>β</i> -selineno	37,022	C ₁₅ H ₂₄	1490	1490
Valenceno	37,352	C ₁₅ H ₂₄	1496	1496
<i>α</i> -muuroleno	37,580	C ₁₅ H ₂₄	1501	1500
<i>β</i> -bisaboleno	37,699	C ₁₅ H ₂₄	1504	1505
Germacreno-A	37,935	C ₁₅ H ₂₄	1510	1509
<i>β</i> -sesquifelandreno	38,375	C ₁₅ H ₂₄	1521	1522
<i>Gama</i> -(<i>E</i>)-bisaboleno	38,671	C ₁₅ H ₂₄	1529	1531
<i>Trans</i> -cadinina-1-4-dieno	38,883	C ₁₅ H ₂₄	1534	1534
<i>Gama</i> -cadineno	39,069	C ₁₅ H ₂₄	1538	1538
Selina-3-7(11)-dieno	39,365	C ₁₅ H ₂₄	1546	1546
Germacreno-B	40,075	C ₁₅ H ₂₄	1563	1561
Elemol	39,475	C ₁₅ H ₂₆ O	1548	1549
Palustrol	40,244	C ₁₅ H ₂₆ O	1567	1568
Longiborneal (Juniperol)	41,535	C ₁₅ H ₂₆ O	1598	1599
<i>I</i> -epi-cubenol	42,667	C ₁₅ H ₂₆ O	1628	1628
<i>α</i> -epi-muurolol	43,095	C ₁₅ H ₂₆ O	1640	1642
<i>α</i> -muurolol (Torreyol)	43,271	C ₁₅ H ₂₆ O	1644	1646
<i>β</i> -eudesmol	43,441	C ₁₅ H ₂₆ O	1649	1650
<i>α</i> -eudesmol	43,582	C ₁₅ H ₂₆ O	1653	1653
<i>β</i> -epi-bisabolol	44,192	C ₁₅ H ₂₆ O	1669	1671
<i>α</i> -epi-bisabolol	44,737	C ₁₅ H ₂₆ O	1683	1684
Geranil isovalerato	41,864	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	1606	1607
14-hidroxi-(<i>Z</i>)-cariofileno	44,075	C ₁₅ H ₂₄ O	1666	1667
<i>Cis</i> -éter-cadineno	39,652	C ₁₅ H ₂₄ O	1553	1553
Espatuleno	40,616	C ₁₅ H ₂₄ O	1576	1578
Óxido de cariofileno	40,811	C ₁₅ H ₂₄ O	1581	1583
(8)-cendren-13-ol	44,937	C ₁₅ H ₂₄ O	1688	1689
Óxido de <i>β</i> -himachalene	42,210	C ₁₅ H ₂₄ O	1616	1616
Davanone	41,095	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	1587	1587
<i>Alo</i> -cedrol	41,178	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	1589	1589
Gossonorol	42,960	C ₁₅ H ₂₂ O	1636	1637

TR: tempo de retenção. IK_{cal.}Índice de Kovats calculado. I.R._{lit.}Índice de retenção da literatura (Fonte: Adams, 2009)

Os compostos descritos para a espécie *A. dolabripetala* no presente, são listados na tabela 1, sendo identificados em estudos anteriores em outras espécies do gênero *Annona* (Andrade et al., 2001; Jirovetz et al., 1998a; Bello et al., 1998; Balbaa et al., 1977; Ekundayo e Oguntimein, 1986; Marta et al., 1997).

O Germacreno-*D*, espatulenol e (*E*)-cariofileno, presentes em óleo essencial das folhas de *Annona dolabripetala*, também são considerados por Costa et al., (2012, 2013) marcadores quimiotaxonômicos importantes da família *Annonaceae*. Enquanto que o α -pineno, biciclogermacreno e o espatulenol podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos do gênero (Costa et al., 2012). Alguns destes marcadores como o espatulenol, pode ser encontrado nos óleos essenciais de 4 dos principais gêneros de *Annonaceae*: *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria* e *Xylopi*a (Maia et al., 2015).

Compostos como o linalol e limoneno, encontrados na espécie *A. dolabripetala*, tem chamado atenção por apresentar ações anticonvulsivantes, além destes compostos, muitos derivados monoterpênicos tem demonstrado, atividade sobre o SNC, incluindo ações sedativas, antinociceptivas e antidepressivas (Perazzo et al., 2008; Leite et al., 2008). Segundo Passos et al., (2008) existe uma grande predisposição dos compostos terpenóides, encontrados em plantas da medicina popular apresentarem atividades sedativas, tranquilizantes e anticonvulsivantes. Além dos monoterpenos encontrado em *A. dolabripetala* os sesquiterpenos também podem exibir significativa ação no SNC (Ortiz et al., 1999; Datta et al., 2004).

Portanto, através do estudo fitoquímico dos constituintes voláteis da espécie *A. dolabripetala*, pôde-se constatar a presença de compostos terpenóides de forma abundante (sesquiterpenos e monoterpenos, **Figura 19**) metabólitos secundários estes que contribuem de forma importante, para o potencial psicofarmacológico desta espécie. Para o genero *Annona* são escassos os trabalhos envolvendo a avaliação de óleos essenciais e terpenoides sobre o SNC. Diniz et al., (2015) apresentou uma revisão das atividades psicofarmacológicas deste gênero, contudo nenhum trabalho com óleos essenciais é citado. Apesar disso, algumas espécies da família *Annonaceae*, como a *Dennetia tripetata*, tem demonstrado atividade hipnótica, ansiolítica e anti-epiléptica nos óleos essenciais extraído de suas folhas (Oyemitan et al., 2013; Oyemitan et al., 2015).

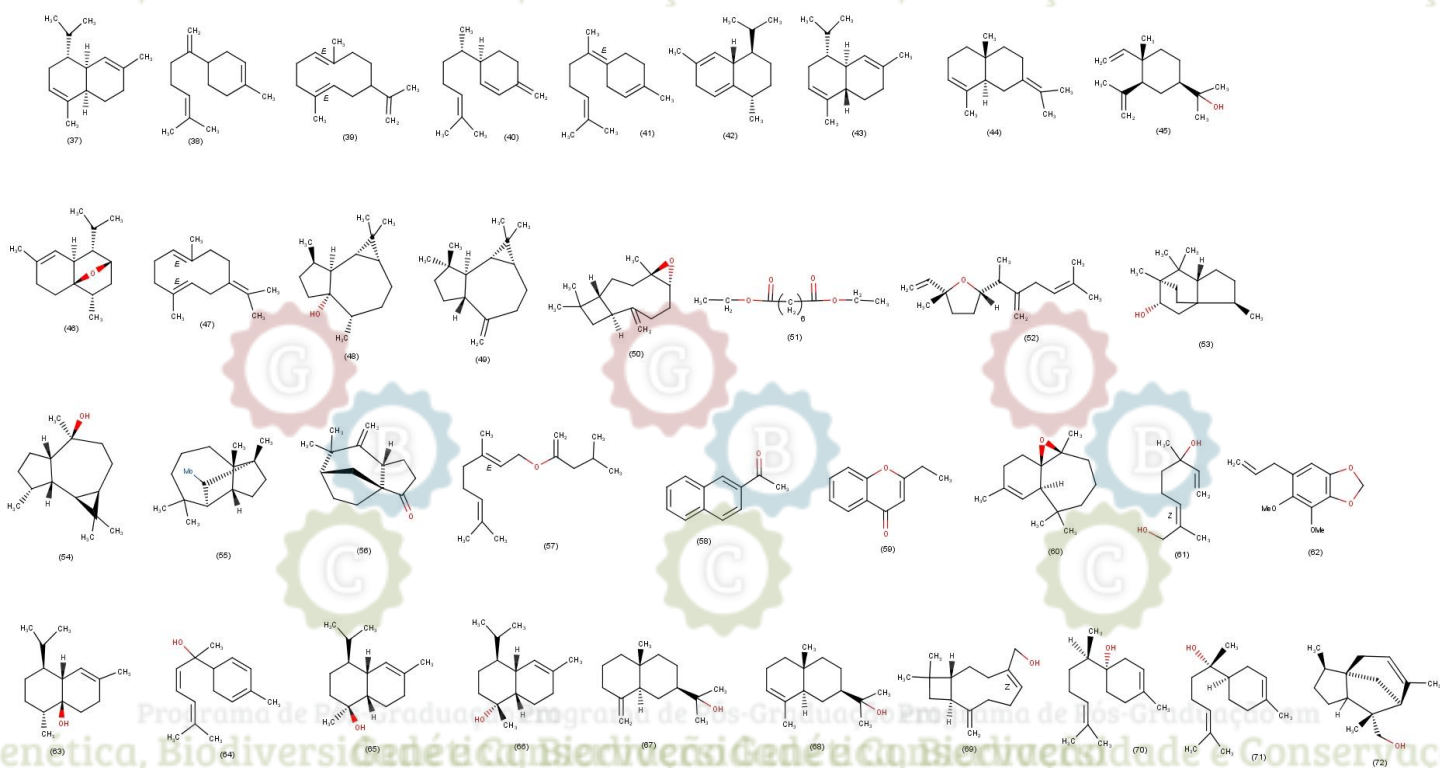


Figura 20. Constituintes químicos encontrados no óleo essencial de *Annona dolabripetala* Raddi. (37) α -muuroleno, (38) β -bisaboleno, (39) Germacreno-A, (40) β -Sesquifelandreno, (41) (*E*)- γ -bisaboleno, (42) *Trans*-cadinina-1-4-dieno, (43) α -cadineno, (44) Selina-3-7(11)-dieno, (45) Elemol, (46) *Cis*-éter-cadineno, (47) Germacreno-B, (48) Palustrol, (49) Espatuleno, (50) Óxido de cariofileno, (51) Ácido octanedioico-dietil-éster, (52) Davanone, (53) *Alo*-cedrol, (54) Viridiflorol, (55) Longiborneol, (56) Khusimone, (57) Geranil isovalerato, (58) 2-acetil-naftaleno, (59) 2-etil-cromone, (60) óxido de β -himachalene, (61) (*Z*)-8-hidroxi-linalool, (62) Dill apiole, (63) *I-epi*-cubebol, (64) Gossonorol, (65) α -*epi*-muurolol, (66) α -muurolol, (67) β -eudesmol, (68) α -eudesmol, (69) 14-hidroxi-(*Z*)-cariofileno, (70) β -*epi*-bisabolol, (71) α -*epi*-bisabolol e (72) (8)-Cedren-13-ol. Fonte: Dados do autor.

5.1.3. Identificação do ácido kaurenóico do extrato hexânico da casca

O composto foi isolado de 676 mg do extrato hexânico da casca de *A. dolabripetala*, através cromatografia em coluna de vidro usando sílica gel como fase estacionária. Das 24 frações obtidas, a fração 02 foi selecionada em virtude da formação de um ponto isolado na cromatoplaça (CCD) após ser submetida a um gradiente com solventes de polaridades distintas (Hexano/acetato/metanol), depois da evaporação do solvente a fração apresentou formação de cristais no recipiente. A partir desta fração foi obtida uma sub-fração chamada de HCAD2.2 que após a lavagem com hexano gelado, resultou na obtenção de um sólido branco (26 mg, 3,8%). Este sólido foi submetido a uma análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e posteriormente, análise por RMN, para sua identificação.

O cromatograma (**Figura 20**), obtido por CG-EM, deste sólido mostra a presença de um único pico, o que sugere um alto grau de pureza do constituinte. O espectro de massas (**Figura 21**), obtido por impacto de elétrons (IE), mostra o pico do íon molecular M^+ em $m/z = 302$, compatível com a fórmula $C_{20}H_{30}O_2$ ($MM = 302 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), de um provável diterpeno. A comparação deste espectro de massas com aqueles da biblioteca (WILEY7), revelou uma similaridade de 84% com o espectro de massas do ácido kaurenóico (**Figura 22**).

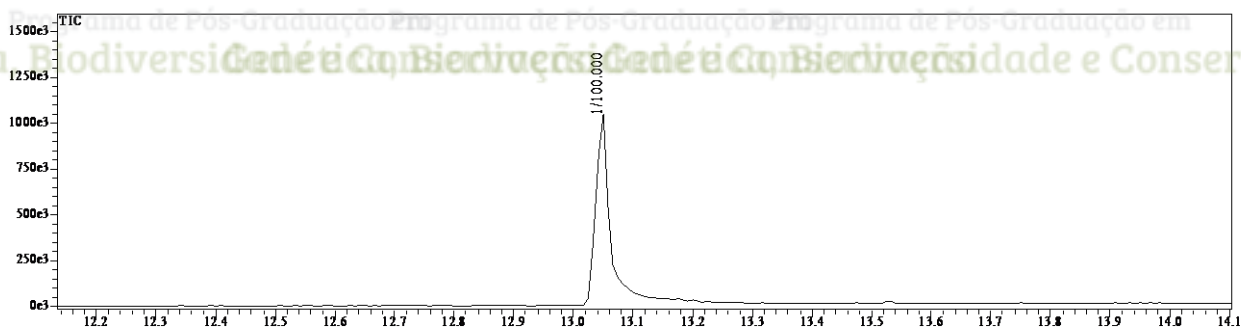
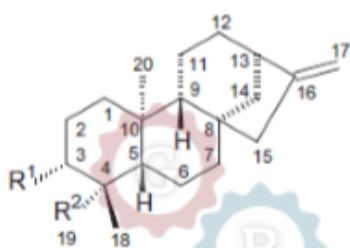


Figura 21. Cromatograma do ácido kaurenóico obtida do extrato hexânico da casca de *A. dolabripetala*.



Figura 22. Espectro de massas (IE), obtido pelo CG/EM do ácido kaurenoico.



R¹: H, R²: COOH (Fonte: Dutra et al. 2014).

Figura 23. Fórmula estrutural do ácido kaur-16-en-19-oico.

Para identificação inequívoca desta substância, foi realizada uma comparação dos dados obtidos por ¹³C RMN (**Figuras 23**) e ¹H RMN (**Figuras 24**) com aqueles descritos por Guillopé et al., (2013) para o ácido kaurenoico (**Tabela 2**). Demonstrando uma alta similaridade entre os mesmos, a qual permitiu confirmar a presença deste composto na casca de *A. dolabripetala*.

O ácido kaurenoico é encontrado de forma relativamente abundante nas cascas de outras espécies do gênero *Annona* tais como: *A. cherimolia*, *A. glabra*, *A. squamosa*, *A. reticulata*, *A. senegalensis* e *A. vepretorum* (Guillopé et al., 2013; Oliveira et al., 2002; Chavan et al., 2011; Chavan et al., 2012; Okoye et al., 2013; Dutra et al., 2014). Este composto, faz parte de uma classe de diterpenos do tipo *ent*-kaureno e pode ser identificado em várias famílias de plantas de interesse medicinal que incluem as Astareaceae, Annonaceae, Lamiaceae Fabaceae, Rutaceae dentre outras (Cavalcanti et al., 2006; García et al., 2007; Ruiz et al., 2008; Cavalcanti et al., 2010; Miyashita et al., 2010; Batista et al. 2010; Mestres, et al., 2011; Silva et al., 2012).

Tabela 3. Comparação dos dados de RMN (CDCl_3 , 300 MHz) do ácido kaurenico da casca de *A. dolabripetala* com os dados da literatura

Posição	δ_{H} Literatura*	δ_{H} amostra	δ_{C}	δ_{C} Literatura*
1	Ha 0,81 Hb 1,99	Ha 0,82 Hb 1,99	184,8/184,7	184,5
2	Ha 1,87 Hb 1,41	Ha 1,86 Hb 1,41	156,0	155,9
3	Ha 1,01 Hb 2,31	Ha 1,04 2,30	103,1	103,0
4			57,2	57,0
5	1,05	1,05	55,3	55,1
6	1,83	1,11	49,1	48,9
7	Ha 1,44 Hb 1,51	Ha 1,46 Hb 1,51	44,4	44,2
8			44,0	43,8
9	1,07	1,07	43,9	43,7
10			41,4	41,3
11	1,57	1,57	40,8	40,7
12	Ha 1,47 Hb 1,62	Ha 1,49 Hb 1,62	39,8	39,7
13	2,64	2,64	39,8	39,7
14	Ha 1,14 Hb 1,99	Ha 1,12 Hb 1,91	37,9	37,8
15			33,3	33,1
16			29,1	29,0
17	Ha 4,74 Hb 4,80	Ha 4,74 Hb 4,80	22,0	21,8
18	1,24 s	1,24	19,2	19,1
19			18,6	18,4
20	0,95 s	0,93	15,7	15,6

* Sinais de δ_{H} e δ_{C} do ácido *ent*-Kaur-16-en-19-oico segundo Guillopé et al. 2011

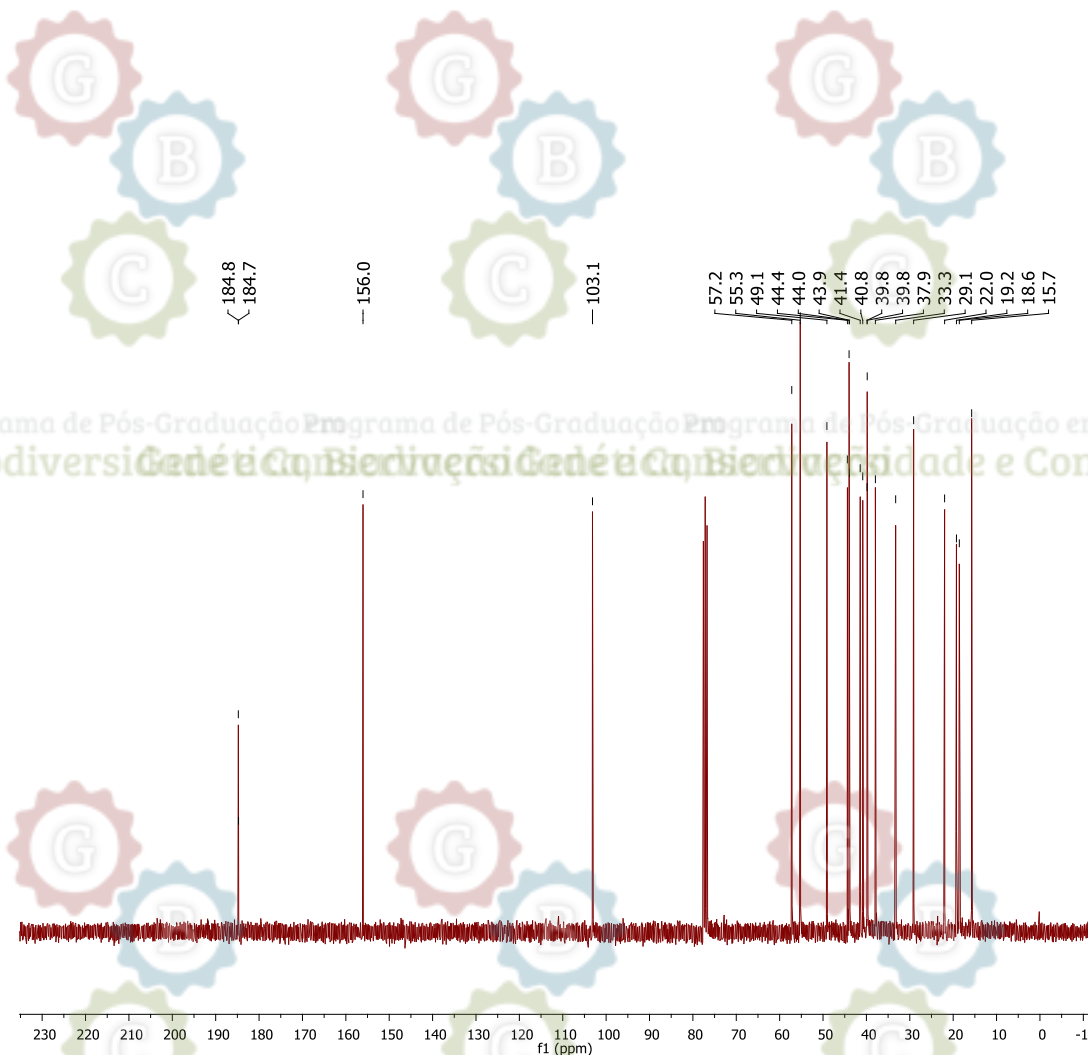


Figura 24. Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz, δ/ppm , CDCl_3) para o ácido *ent*-Kaur-16-en-19-oico isolado da casca de *A. dolabripetala*.

No gênero *Annona* esta classe de compostos diterpênicos é considerada, como marcador quimiotaxonômico (Dutra et al., 2014) e apresenta um largo espectro de atividades biológicas tais como: anti-inflamatória, analgésica, anticâncer, imunomoduladora e ação sobre o sistema nervoso central (Ghisalbert, 1997; Okoye et al., 2013) entretanto, este é o primeiro registro da presença deste composto na casca de *A. dolabripetala*.

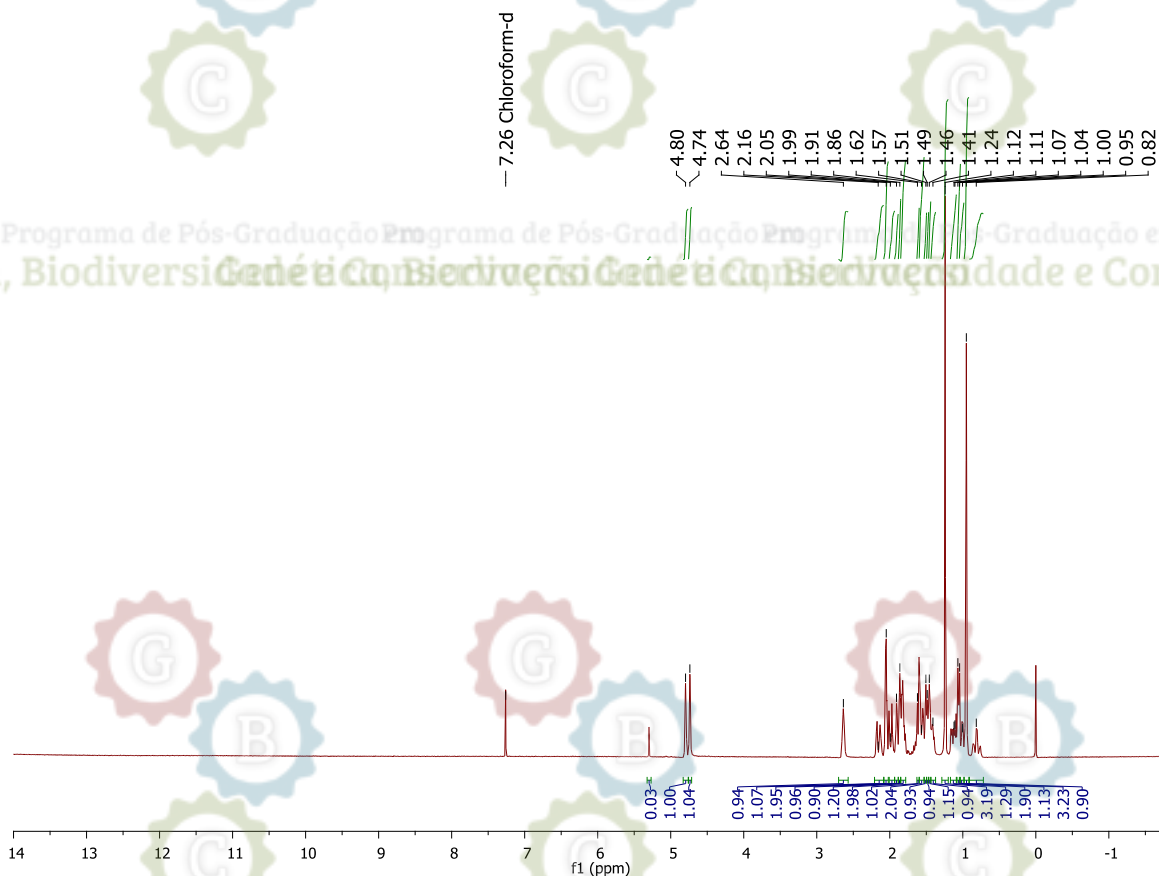


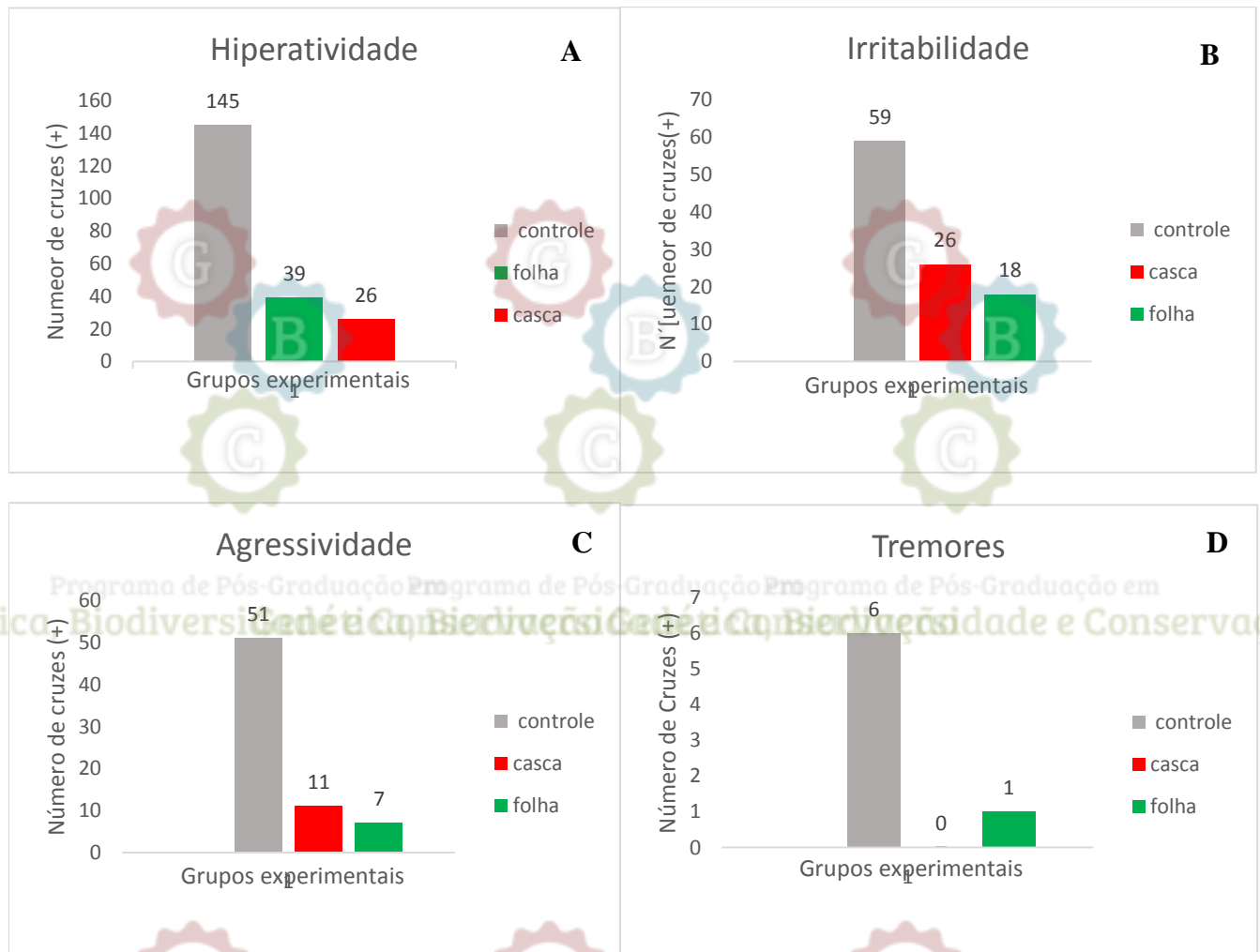
Figura 25. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, δ/ppm , CDCl_3) para o ácido *ent*-Kaur-16-en-19-oico isolado da casca de *A. dolabripetala*.

5.2. Análise dos ensaios psicofarmacológicos dos extratos de *A. dolabripetala*

5.2.1. Avaliação da Triagem farmacológica comportamental

A dose (300 mg/kg) testada na triagem farmacológica comportamental, foi escolhida baseada nos protocolos de triagem farmacológica segundo Almeida e Oliveira, (2006) e toxicidade aguda segundo Silveira e Almeida, (2006). O extratos de *A. dolabripetala* apresentaram sinais sugestivos de estimulação dos SNC tais como a hiperatividade (**Figura 26-A**), agressividade (**Figura 26-B**) e irritabilidade (**Figura 26-C**), contudo foram menores, quando comparados ao grupo controle (solução salina).

Segundo, Almeida e Oliveira (2006) os sinais observados acima para os extratos da folha e casca de *A. dolabripetala* podem estar relacionados com ação estimulante do produto natural psicoativo em estruturas encefálicas como a amígdala. Alguns autores, citam a presença de alterações ultra estruturais e teciduais de extratos de espécies do gênero *Annona* sobre o tecido cerebral de camundongos, especificamente na região do hipocampo (Cano-Europa et al., 2010) e da amígdala (González-Trujano et al., 2009).



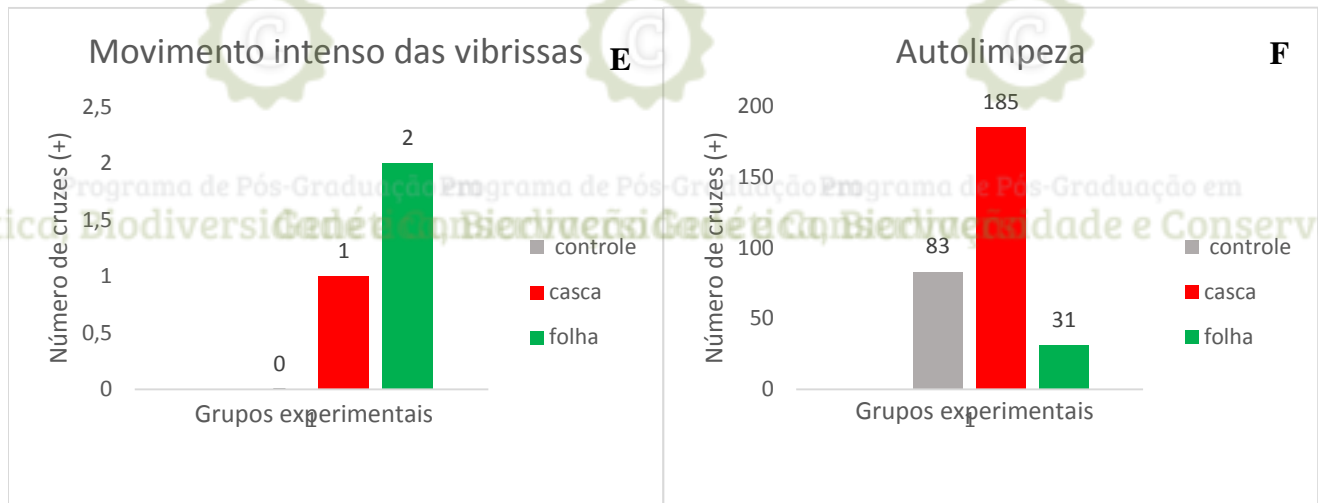


Figura 26. Triagem farmacológica comportamental com os extratos e controle (salina) de *A. dolabripetala*. A. hiperatividade, B. Irritabilidade, C. Agressividade, D. Tremores, E. Movimento das vibrissas, F. Coprofagia.

Outros sinais ligados a estimulação central foram observados para os extratos de *A. dolabripetala*, contudo foram sinais isolados, não sendo visualizados durante todo o período de avaliação comportamental. Os tremores compreendem a movimentação involuntária de todo o corpo ou parte dele. Este sinal esteve presente nos grupos tratados com solução salina e extrato da folha, contudo apresentaram uma pequena quantidade de cruzes (**Figura 26-D**). As vibrissas são pêlos característicos encontrados no focinho do animal e a movimentação intensa destas estruturas, representam um elevado nível de estimulação do SNC (Almeida e Oliveira, 2006). Este sinal esteve presente, nos grupos tratados com os extratos da folha e casca de *A. dolabripetala*, contudo apresentou uma pequena quantidade de cruzes (**Figura 26-E**).

A característica comportamental de autolimpeza nos camundongos, corresponde aos movimentos repetitivos das duas patas traseiras contra alguma parte do corpo como cabeça, pavilhão auricular e órgãos sexuais (Almeida e Oliveira, 2006). Este evento quando excessivo pode significar aumento da atividade motora ou ainda aumento da ansiólise. Neste ensaio observou-se que o extrato da casca se sobressai em relação ao grupo controle e extrato da folha, podendo indicar um efeito de ansiólise maior para o extrato da casca de *A. dolabripetala*, em detrimento dos outros grupos (**Figura 26-F**).

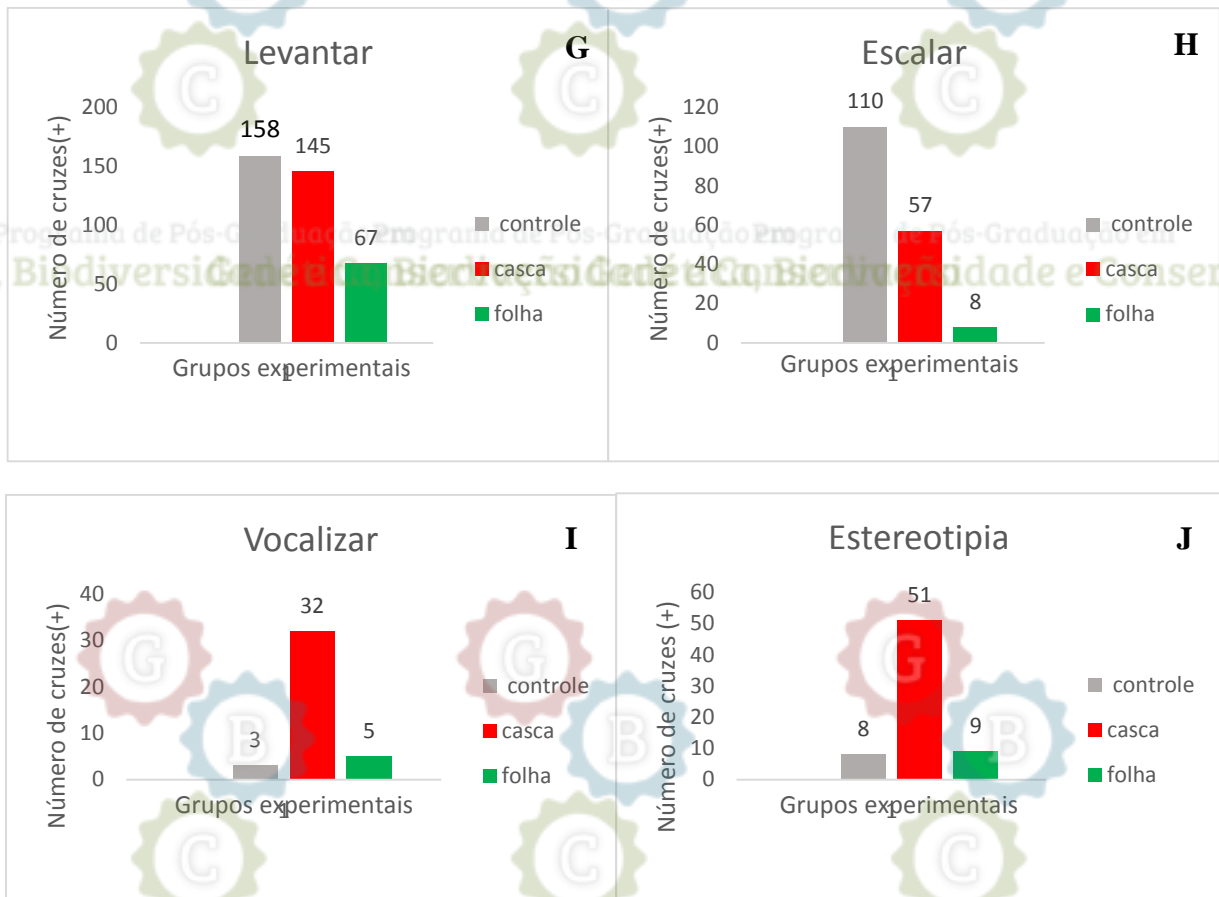


Figura 27. Triagem farmacológica comportamental com os extratos da folha, casca e controle (salina) de *A. dolabripetala*, mostrando os sinais de estimulação do SNC. **G.** Levantar, **H.** Escalar, **I.** Vocalizar **J.** Estereotipia.

O ato dos camundongos de levantar sobre as patas traseiras, foi observado nos três grupos experimentais, sendo maior para o grupo controle (**Figura 27-G**). A intensificação deste comportamento animal explorando o ambiente externo à caixa, é uma das formas de expressar o aumento da atividade motora (Almeida e Oliveira, 2006). No extrato da casca de *A. dolabripetala*, este efeito mais próximo ao grupo controle sendo os animais tratados com o extrato da folha aqueles que expressaram menos esta característica.

O comportamento exploratório de escalar as paredes laterais da caixa de experimento foi maior para o grupo controle (**Figura 27-H**). Em relação aos grupos experimentais, o extrato da casca obteve um maior efeito, o que pode estar relacionado a ação estimulante dos constituintes químicos sobre vias motoras e sobre a neurotransmissão dopaminérgica. A ação de agonistas

sobre o sistema dopaminérgico, bem como o bloqueio da síntese de catecolaminas podem induzir a este tipo de efeito (Brunton, 2012).

O ato de produzir sons também é um comportamento característico dos roedores, contudo se estes sons são emitidos de forma intensa podem ter significados distintos. Quando comparado os três grupos, observou-se que para o extrato da casca de *A. dolabripetala* obteve maior efeito e o grupo controle salina e extrato da folha foram praticamente similares (**Figura 27-I**). A emissão intensa e frequente de ruídos característicos, pelos camundongos expressa um estado de estimulação central decorrente da ação de drogas ou extratos de plantas medicinais (Almeida e Oliveira, 2006). Além deste efeito estimulatório a vocalização também pode indicar um efeito nociceptivo (dor), os extratos de espécies do gênero *Annona*, tal como a *A. dolabripetala*, apresentam uma diversidade de compostos químicos (Leboeuf et al., 1982), que podem estar estimulando vias relacionadas aos mecanismos dolorosos (nocicepção). Um sinal característico da presença da estimulação dos receptores de dor (nociceptores) são expressos pela presença de contorções abdominais, contudo, em nenhum dos extratos avaliados foi observado este sinal nos camundongos.

O último sinal comportamental de estimulação do SNC observado na triagem dos extratos de *A. dolabripetala* foi a estereotipia. Este comportamento foi maior para extrato da casca, enquanto que o grupo controle e o extrato da folha foram praticamente similares (**Figura 27-J**). Este evento corresponde a repetição contínua de certos movimentos que não tem sentido, como por exemplo: cheirar, lambe, morder intensamente as barras da gaiola, introduzir persistentemente o focinho entre as grades da gaiola dentre outros. Os animais tratados com extrato da casca de *A. dolabripetala*, apresentaram comportamento de morder intensamente as barras, introduzir o focinho entre as grades e se pendurar sobre as grades da gaiola. Essa ocorrência indica uma intensa atividade estimulante no SNC, decorrente de uma ação do extrato em vias dopaminérgicas ou noradrenérgicas centrais (Almeida e Oliveira, 2006).

Em relação aos sinais depressores do SNC, o extrato da casca de *A. dolabripetala* se destaca por apresentar predominantemente todos os sinais indicativos de depressão central. A presença destes sinais indicam a diminuição da atividade cerebral nos animais que receberam este extrato. Estes sinais são descritos como: Ptose palpebral, sedação, anestesia, ataxia, analgesia, ambulação diminuída, resposta ao toque diminuída, perda do reflexo corneal e auricular (**Figura 28 e 29**).

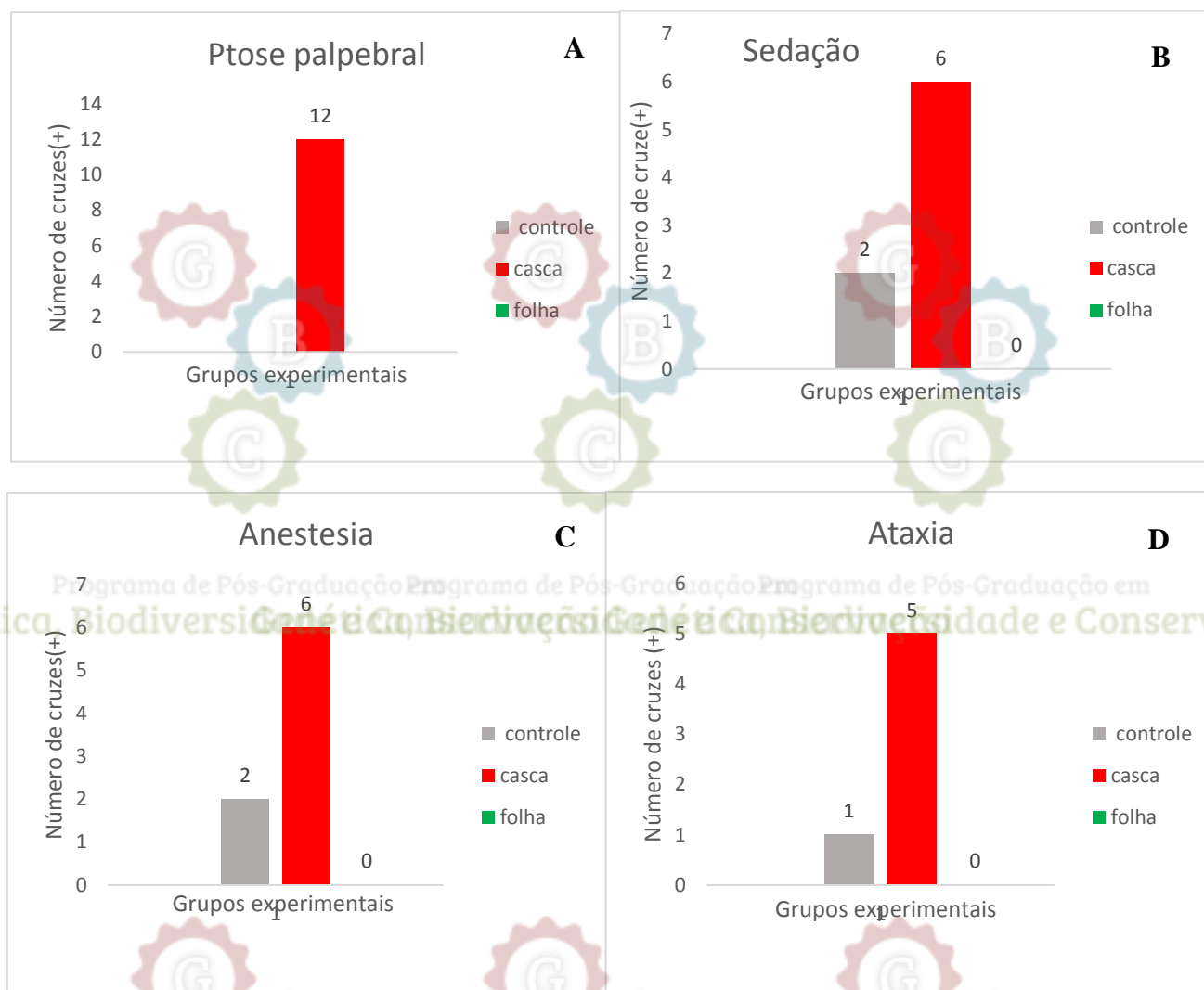
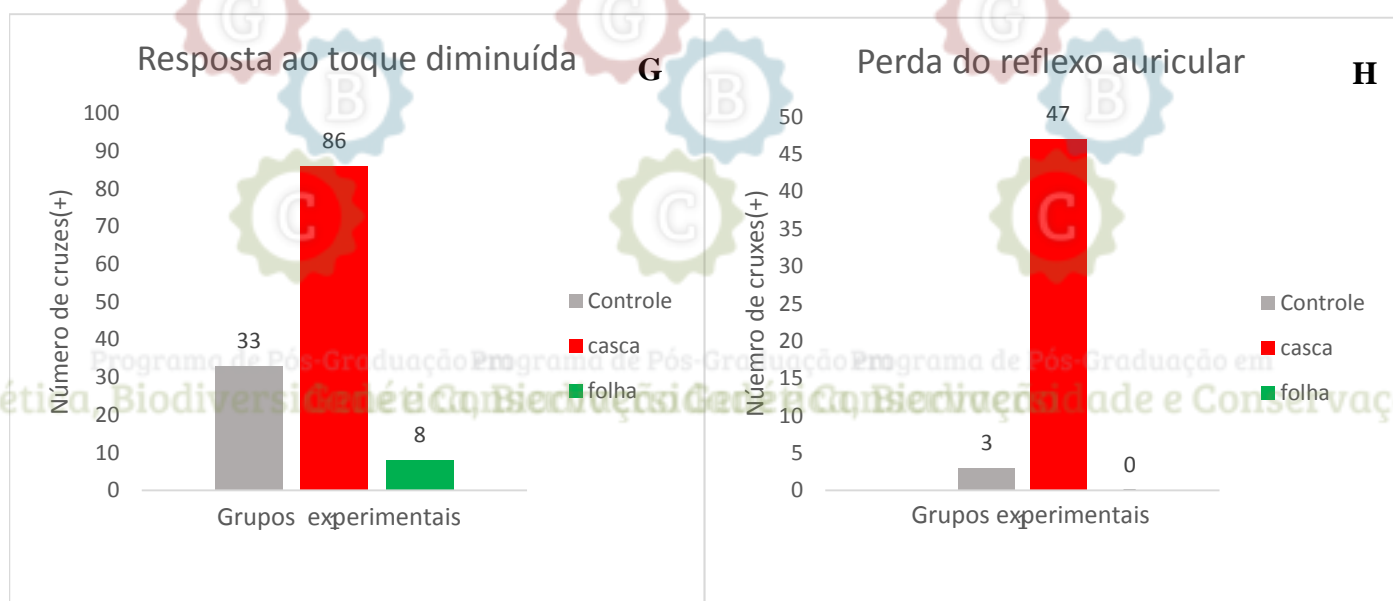
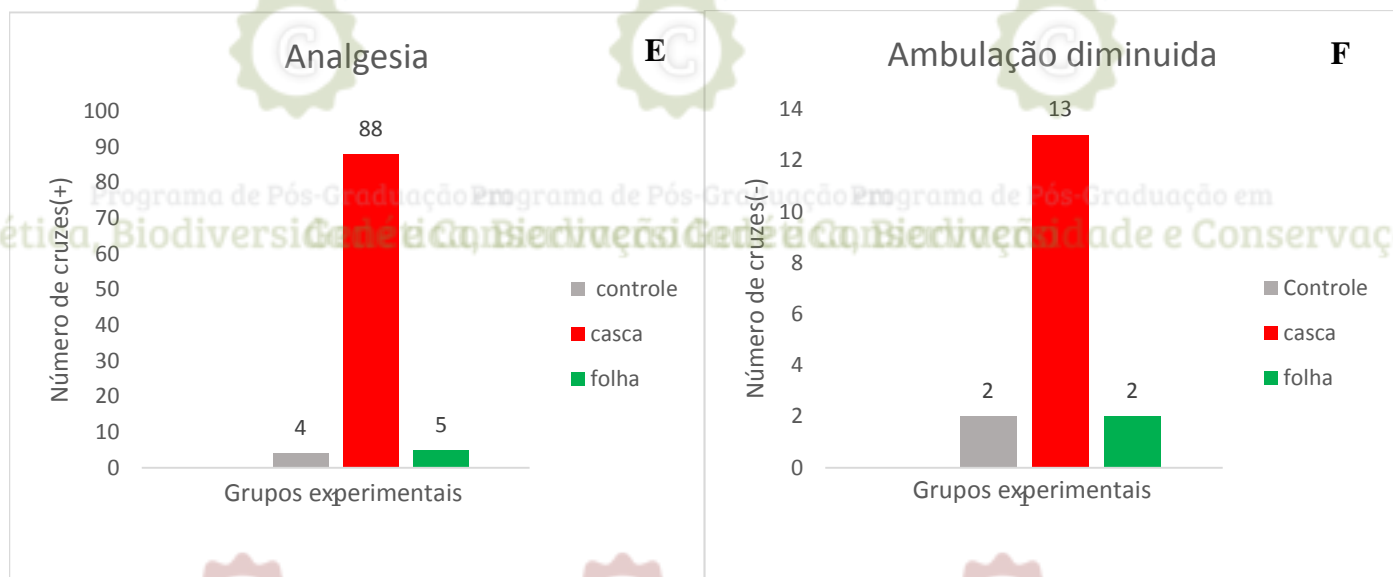


Figura 28. Sinais ligados a depressão no SNC dos extratos de *A. dolabripetala*. A. Ptose palpebral B. Sedação C. Anestesia D. Ataxia.



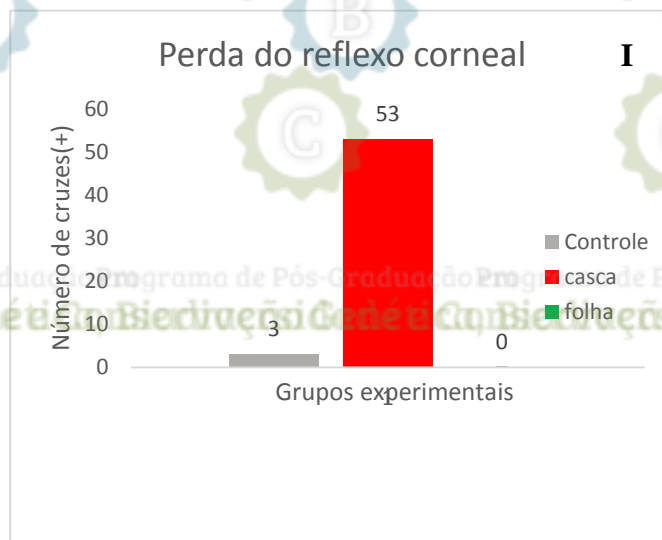
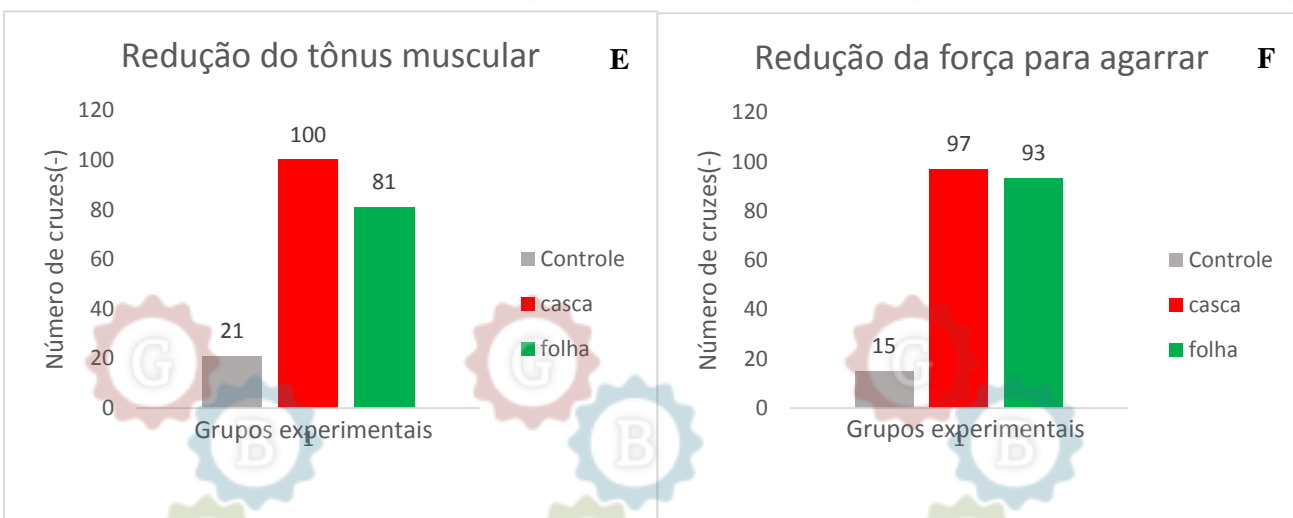
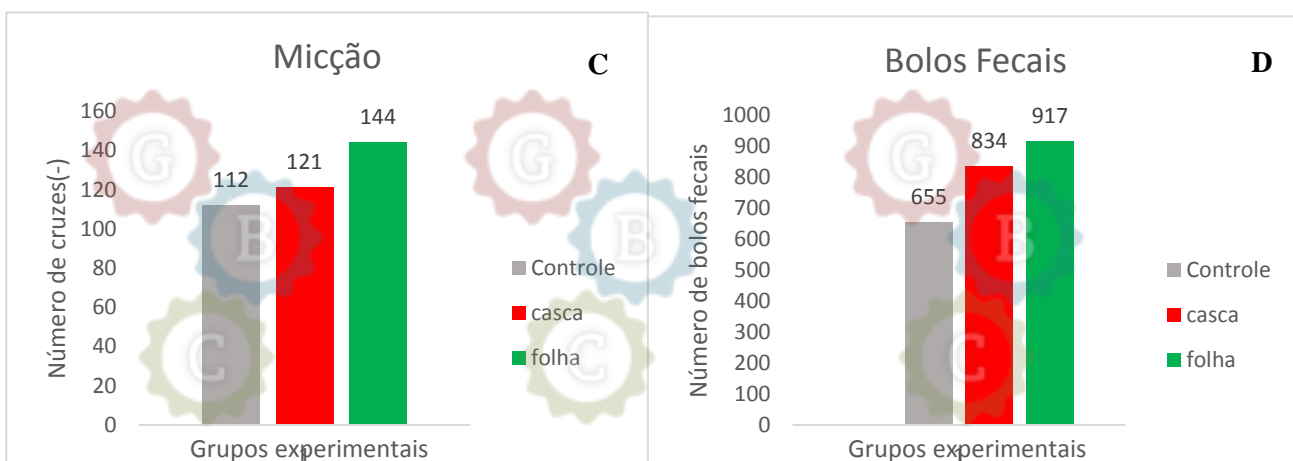
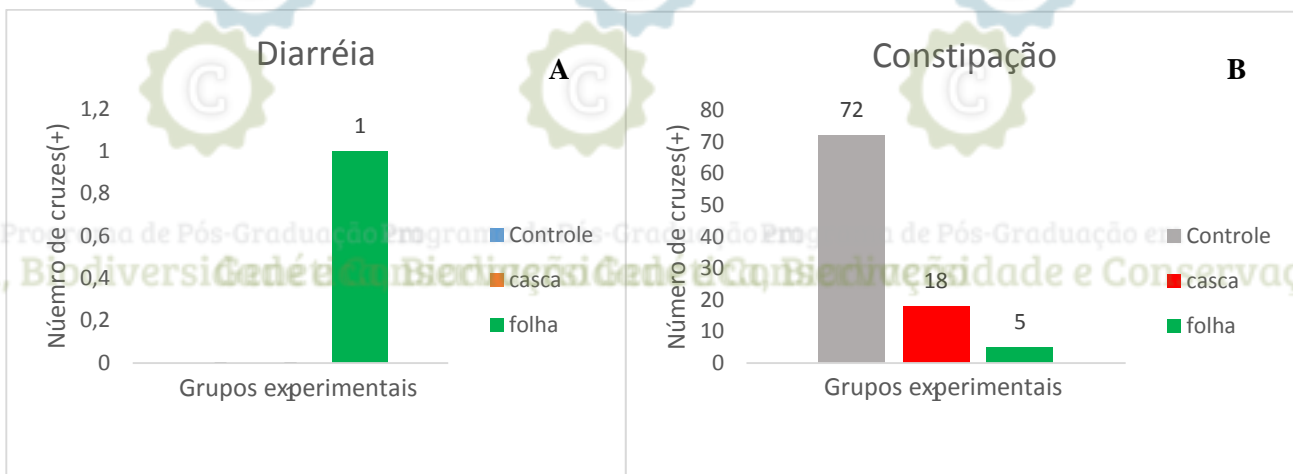


Figura 29. Sinais ligados a depressão no SNC dos extratos de *A. dolabripetala*. **E.** Analgesia **F.** Ambulação diminuída **G.** Resposta ao toque diminuída, **H.** Perda do reflexo corneal, **I.** Perda do reflexo auricular.

De todos os sinais depressores no SNC, observados para os extratos de *A. dolabripetala*, a analgesia (**Figura 29-E**) foi o mais proeminente. Isto sugere uma redução da resposta ao estímulo mecânico, exercido durante a avaliação deste evento, quando se submete uma pressão com uma pinça no terço inferior da cauda do animal (Almeida e Oliveira, 2006). Este efeito analgésico foi maior para extrato da casca do caule de *A. dolabripetala*, e também foi constatado nos extratos das cascas de outras espécies do gênero *Annona*, tanto em estudos entnofarmacológicos (Albuquerque et al., 2007; Ong e Kim, 2014), quanto em estudos experimentais (Singh et al., 2014).

O sinais de ambulação e resposta ao toque diminuídas (**Figura 29-F**, **Figura 29-G**) observados nos animais tratados com o extrato da casca de *A. dolabripetala*, podem indicar elevado estágio de depressão no SNC. Já a perda ou a diminuição dos reflexos auricular e corneal (**Figura 29-H**, **Figura 29-I**), observada durante todo o ensaio, podem indicar uma possível inibição de estruturas encefálicas (receptores sensoriais) que controlam estas atividades (Almeida e Oliveira, 2006).

A ação sobre sistema nervoso autônomo dos extratos de *A. dolabripetala* indicaram a presença de oito sinais comportamentais (**Figura 30**), dos quais se destacam, ação sobre o trato gastrointestinal (micção e defecação), sistema muscular (redução do tonus muscular, força para agarrar) e a piloereção.



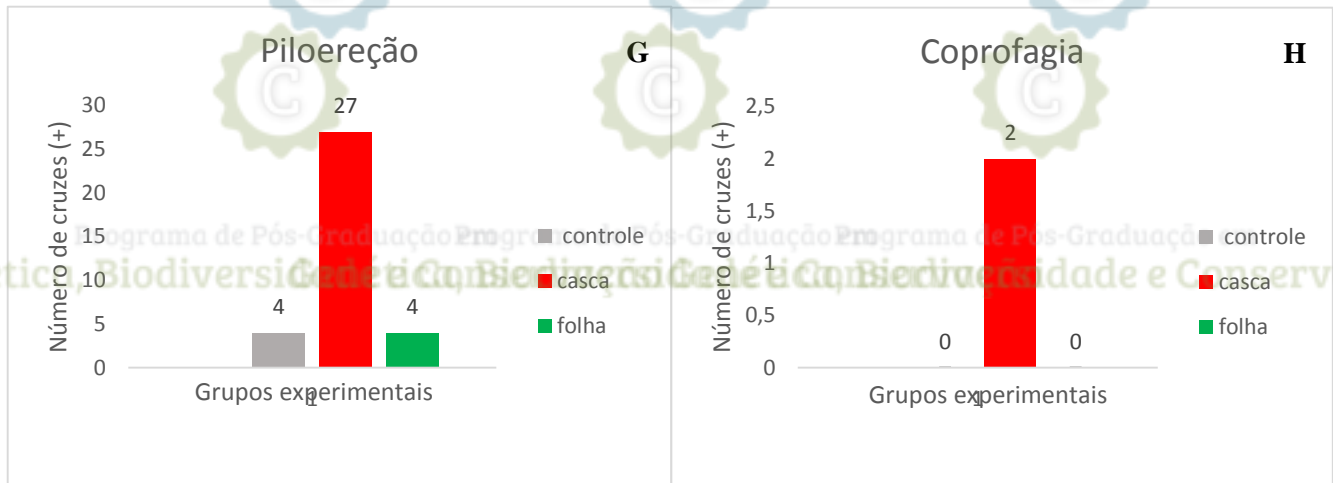


Figura 30. Efeitos sobre o sistema nervoso autônomo dos extratos de *A. dolabripetala*. **A.** Diarréia, **B.** Constipação **C.** Micção, **D.** Bolos fecais **E.** Redução do Tônus muscular, **F.** Redução da força para agarrar. **G.** Piloereção **H.** Coprofagia

O extrato da folha de *A. dolabripetala* estimulou os processos fisiológicos de micção e defecação, enquanto que o extrato da casca induziu durante todo o teste constipação, menor quantidade de bolos fecais e menor micção (**Figura 30-B, Figura 30-C, Figura 30-D**). Alguns trabalhos têm enfatizado a ação do extrato da casca do caule de *A. senegalensis* Pers. com propriedades antidiarreicas, mostrando que o extrato desta espécie diminuiu o tempo de transito gastrointestinal atenuando desta forma, a contratilidade da musculatura lisa intestinal (Suleiman et al., 2008). Estes indícios podem sinalizar que o extrato da casca de *A. dolabripetala*, tem ação similar a outra espécie de *Annona*, suscitando desta forma a investigação da atividade farmacológica sobre o trato gastrointestinal.

A diminuição do tonus muscular e da força para agarrar foram observados nos dois extratos, contudo o extrato da casca apresentou uma discreta diferença (**Figura 30-E, Figura 30-F**). O efeito de depressão sobre o SNC apresentada pelo extrato casca de *A. dolabripetala*, pode ter interferência direta nos sinais citados acima, já que a atividade de contração dos músculos esqueléticos depende do controle central. Jamkande e Wattamwar (2015) descreve a ação depressora moderada do extrato da casca de *A. reticulata* sobre o SNC, demonstrando uma redução significativa da atividade locomotora em animais experimentais.

O sinal de piloereção (**Figura 30-G**) foi maior no extrato da casca de *A. dolabripetala*, contudo foi similar no grupo controle e no extrato da folha (Almeida e Oliveira, 2006). Segundo,

Silveira e Almeida, (2006) o efeito de piloereção, pode ser indicativo da presença de toxicidade aguda no extrato avaliado.

Os sinais de ação no SNC foram apresentados em todos os intervalos de tempo, porém foram mais intensos e significativos na primeira hora após a administração. Como os extratos foram administrados de forma contínua durante os 14 dias de testes foi possível observar a manutenção da maioria dos comportamentos. Em virtude da quantidade de sinais proeminentes observados para os extratos de *A. dolabripetala*, a dose de 300 mg/kg foi mantida para os ensaios de labirinto em cruz elevado e para o ensaio de analgesia central.

A dose escolhida de 300 mg/kg não gerou óbito nos animais e através dela foi possível visualizar de forma marcante as ações distintas de cada extrato, levando em consideração que o extrato da casca se sobressaiu em termos de efeitos depressores no SNC. Estes comportamentos sugerem que os efeitos do extrato etanólico da casca e metanólico da folha de *A. dolabripetala* são de forma geral semelhantes as espécies do gênero *Annona* que apresentam atividade farmacológica sobre o SNC (Diniz et al., 2013; Jamkande e Wattamwar, 2015).

5.2.2. Avaliação da atividade ansiolítica

Os testes psicofarmacológicos como os extratos metanólico da folha e etanólico da casca de *A. dolabripetala*, demonstraram ação sobre o sistema nervoso central. O EMFAD apresentou um perfil ansiolítico estimulando um maior tempo (s) de permanência dos camundongos nos braços abertos (**Figura 31-A**), enquanto que o EEtCAD apresentou um perfil depressor, com maior tempo (s) de permanência dos animais nos braços fechados (**Figura 31-D**), ambos comparados com o diazepam (2,5 mg.kg⁻¹). Resultados semelhantes foram observados em outras espécies do gênero *Annona* que apresentam atividade sobre o sistema nervoso central, envolvendo ações: ansiolíticas e sedativas (Okoye et al., 2013; Diniz et al., 2013; Jamkandhe e Wattamwar et al., 2015).

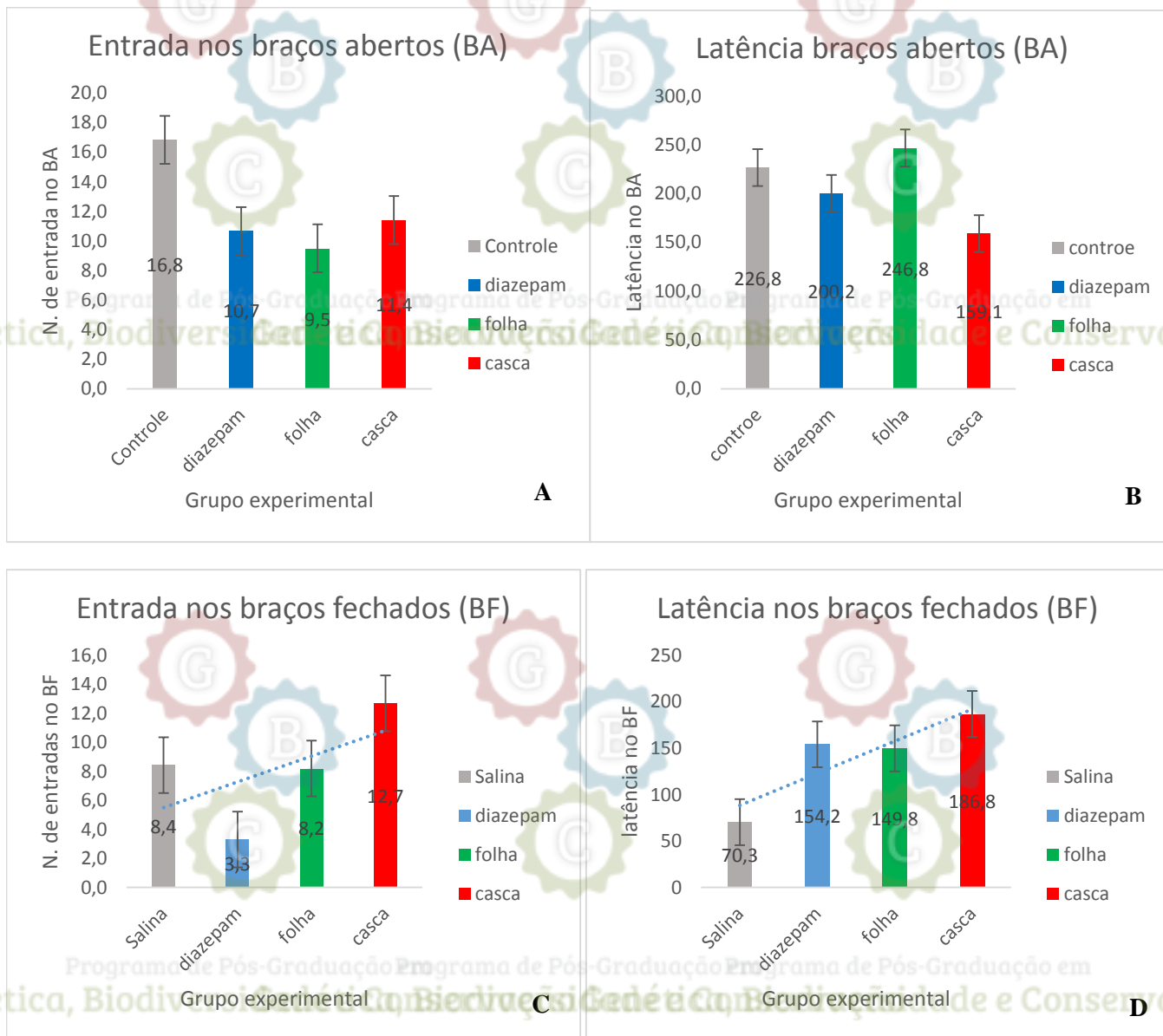


Figura 31. Análise do labirinto em cruz elevado para os extratos de *A. dolabripetala*. **A.** Entrada em braços abertos **B.** Latência em braços abertos, **C.** Entrada em braços fechados **D.** Latência em braços fechados

Na dose de 300 mg/kg dos extratos de *A. dolabripetala*, constatou-se que apesar do número de entradas nos braços abertos ser menor que o extrato da casca, a folha apresentou maior latência nos braços abertos, entre todos os grupos analisados. Quando comparado ao diazepam este extrato, obteve um valor próximo para o número de entradas (**Figura 31-A**), contudo o tempo gasto nos braços abertos do labirinto (**Figura 31-B**), foi superior mostrando uma possível ação ansiolítica. O diazepam faz parte de um grupo de fármacos conhecido como benzodiazepínicos, exibindo efeitos farmacológicos anticonvulsivantes, redução do tônus muscular, sedação e indução do sono (Brunton, 2012).

Trabalhos utilizando protocolos psicofarmacológicos (labirinto de cruz elevado) envolvendo espécies do gênero *Annona*, mostraram potencial ação ansiolítica para os extratos foliares de *A. muricata* (Oviedo et al., 2009), e o extrato foliar de *A. vepretorum* (Diniz et al., 2013). Em contrapartida, os extratos obtidos das cascas das raízes de *A. purpurea* e do caule de *A. senegalensis* demonstraram ação ansiolítica, sedativa e antiepilética (Rejón-Orantes et al., 2011; Okoye et al., 2013; Almamy et al., 2012). A espécie *A. dolabripetala* demonstrou ação psicofarmacológica tanto para o extrato da folha quanto para o extrato da casca, indicando uma potencial atividade a ser explorada com intuito de conhecer os mecanismos farmacológicos pelos quais estes extrato exercem suas ações.

Muitas destas respostas psicofarmacológicas, observadas para espécies para *A. dolabripetala*, estão relacionadas diretamente à diversidade na composição fitoquímica dos seus extratos. Na análise fitoquímica, não foram isolados compostos para o extrato metanólico da folha, contudo nos óleos essenciais das folhas foram encontrados uma diversidade de compostos terpenóides, tal como o linalol (López-Rubalcava et al., 2006; Souto-Maior et al., 2011; Gastón et al., 2016) e o limoneno (Oyemitan et al., 2015; De Almeida et al., 2014), com pronunciada atividade psicofarmacológica, envolvendo efeitos ansiolíticos e sedativos. Outros compostos podem ser encontrados nos extratos foliares de espécies do gênero *Annona*, sendo responsáveis também por suas ações psicofarmacológicas, tais como alcaloides, flavonoides e a palmitona (Rejón-Orantes et al., 2011; González-Trujano et al., 2006b; Cano-Europa et al., 2010; Grosso et al., 2013).

Para o extrato da casca de *A. dolabripetala* foi isolado, um diterpeno conhecido como ácido kaurenóico, apresentando segundo Okoye et al., 2013 atividade psicofarmacológica (anticonvulsivante). Este diterpeno, pode em parte, ser o responsável pela ação depressora do SNC, observado para o extrato da casca de *A. dolabripetala*. Ação no SNC desta molécula pode estar relacionada, também ao receptor farmacológico GABA_A, amplamente distribuídos no cérebro de mamíferos e alvo molecular para ação de fármacos antiepiléticos, ansiolíticos e hipnótico e sedativos (Sigel e Steinmann, 2012; Grosso et al., 2013). O extrato etanólico da casca dessa espécie exerceu ação depressora central (**Figura 31-C, Figura 31-D**), e sinais que indicam a redução da atividade motora dos camundongos, estes efeitos, também foram visualizados para o extrato metanólico da casca de *A. senegalensis* (Okoye et al., 2013).

Todos os sinais envolvidos na ação central para o extrato da folha e principalmente o extrato da casca (**Figura 31-D**) de *A. dolabripetala*, podem indicar, uma possível inibição do receptor GABA_A, e este poderia estar relacionada ao principal mecanismo de ação dos extratos. Segundo Lopez-Rubalcava et al., 2006, a inibição ou antagonismo deste receptor farmacológico, está relacionado ao mecanismo de ação dos fármacos benzodiazepínicos (Brunton, 2012), descrevendo desta forma, como um dos principais receptores envolvidos nas ações psicofarmacológicas dos extratos de espécies do gênero *Annona*.

Outros protocolos experimentais podem ser empregados afim de descrever de forma pormenorizada as ações centrais desta espécie e de que forma seus extratos interagem com o tecido cerebral. Sendo assim, este trabalho, configura-se como o primeiro registro da atividade psicofarmacológica dos extratos de *A. dolabripetala* Raddi do semiárido baiano.

5.2.3. Avaliação da atividade analgésica central

Na avaliação da triagem farmacológica comportamental, o extrato da casca de *A. dolabripetala*, indicou a um sinal sugestivo da presença de analgesia. Diante deste indicativo, os extratos da folha e da casca foram submetidos os ensaio de analgesia central através do protocolo de retirada de cauda em camundongos sendo utilizada a mesma dose (300 mg/kg) da triagem farmacológica comportamental.

ANOVA - Diferença entre as Médias

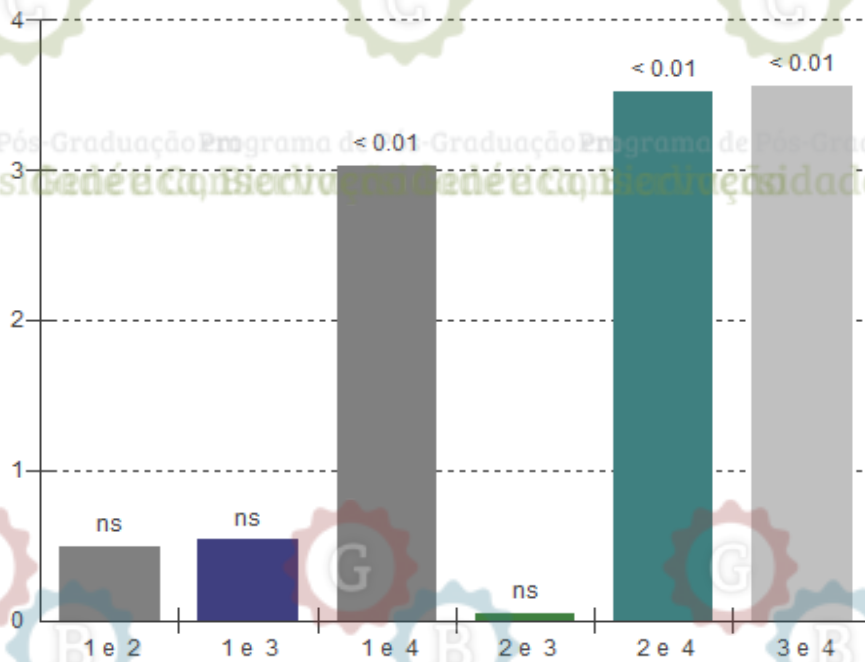


Figura 32. Ensaio de analgesia por estímulo térmico (*Tail flick*). Anova das médias dos tempos de latência da retirada de cauda de camundongos tratados com os extratos da folha (1), casca (2) de *A. dolabripetala* Raddi, controle salina (3) e morfina (4).

Os resultados foram expressos através das médias e desvio padrão e a comparação estatística entre os grupos foi feita através do teste de ANOVA, sendo o valor de $p < 0,05$ considerado significativo (**Figura 32**). Segundo a análise estatística em ANOVA, as diferenças entre o extrato da folha, da casca de *A. dolabripetala* e controle salina não foram significativas sendo obtidos valores de $p > 0,05$. Apesar da presença do sinal de analgesia na triagem farmacológica comportamental, a dose de 300 mg/kg do extrato da casca, não foi suficiente para induzir analgesia em camundongos, quando comparada a morfina (5mg/Kg, por via i.p.) que apresentou um valor de $p < 0,05$, sendo, portanto, significante para resposta analgésica central, quando comparada aos outros grupos experimentais.

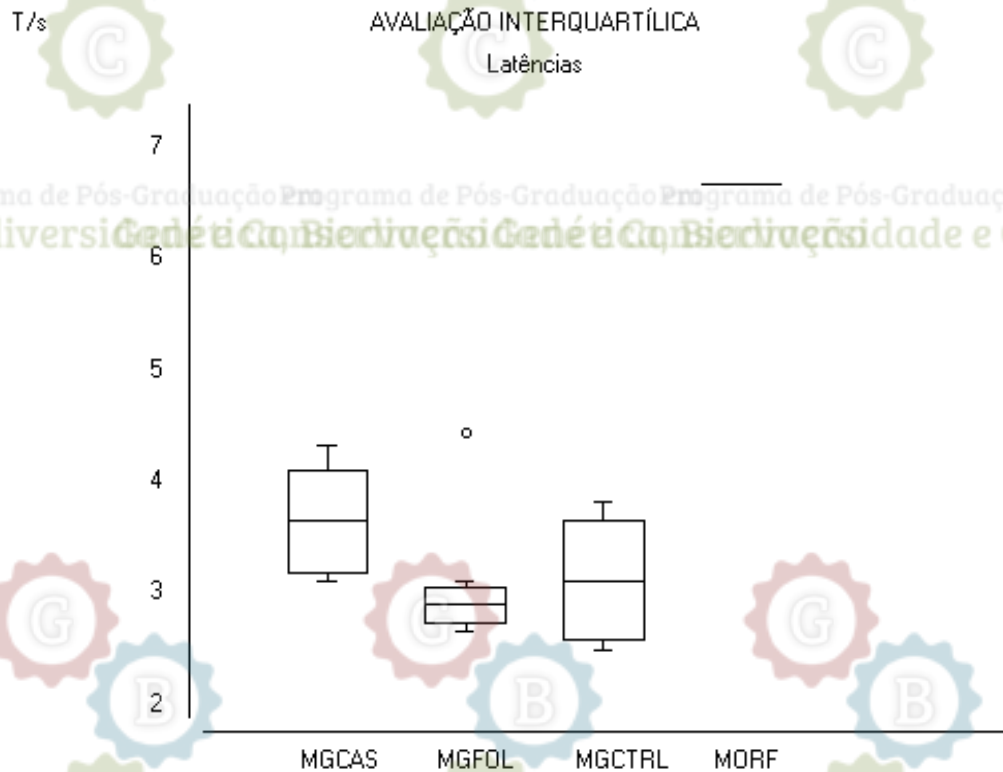


Figura 33. Ensaio de analgesia por estímulo térmico (*Tail flick*). Avaliação interquartílica das latências da retirada de cauda de camundongos tratados com os extratos da folha (MGFOL), casca (MGCAS) de *A. dolabripetala* Raddi, controle salina (MGCTRL) e morfina (MORF).

A análise interquartílica, utiliza uma variável de tendência central que é a mediana, muito aplicável para amostra com um pequeno número de indivíduos por grupo ($n < 30$). O valor da mediana para o extrato da casca se equipara ao maior valor de medida obtido no grupo controle salina, já o maior valor de mediana obtido para o grupo do extrato da folha se equipara à mediana do grupo controle salina. Estes dados indicam que não existe significância para a latência no ensaio de analgésica central entre estes três grupos experimentais (extrato da folha, casca e controle). Apesar destes resultados, o extrato da folha tem um menor erro entre as unidades de medida e apresenta valores mais uniformes (**Figura 33**).

A mediana da latência dos animais avaliados com a morfina foi superior a todos os grupos e seus valores foram uniformes, mostrando o comportamento esperado para um fármaco padrão de ação analgésica central. Desta forma, pode-se inferir que a dose 300 mg/kg dos extratos da folha e casca de *A. dolabripetala*, está muito abaixo e não foi suficiente para promover analgesia

central. Esta resposta pode estar em parte ligada a concentração baixa dos compostos presentes nestes extratos capazes de induzir analgesia, sendo necessário a utilização de doses maiores e o isolamento dos compostos, sendo avaliados de forma separada, para verificar quais deles têm maior potencial analgésico central (**Figura 33**).

Os extratos de *A. dolabripetala* são constituídos de uma mistura de compostos que podem estar agindo de maneira sinérgica, contribuindo em uma possível resposta analgésica, visualizada no teste de triagem farmacológica comportamental para o extrato da casca. As espécies do gênero *Annona* tem sido descritas como fonte uma grande quantidade de compostos químicos (Leboeuf et al., 1982) e que podem ser explorados quanto atividade analgésica e anti-inflamatória (Jamkande e Wattamwar, 2015).

O ácido kaurenico isolado para o extrato da casca de *A. dolabripetala* é uma molécula encontrada nos extratos das cascas de espécies de *Annona* e apresenta potencial ação analgésica e anti-inflamatória comprovadas (Jamkande e Wattamwar, 2015). Carballo et al., (2010) em estudos preliminares com os extratos de *A. diversifolia*, descreveu os flavonoides, alcaloides e principalmente os terpenoides, como compostos envolvidos na resposta analgésica. Este diterpeno identificado para o extrato da casca de *A. dolabripetala*, pode em partes, ser o responsável pela ação analgésica central visualizada na triagem farmacológica comportamental e suscita a investigação aprofundada desta resposta biológica, usando doses maiores do extrato da casca e outras metodologias que confirmem esta ação central.

Estudos entnofarmacológicos, mostram que o uso de plantas do gênero *Annona* na medicina tradicional para o alívio da dor é comum (Albuquerque, 2007) e envolve o emprego de suas cascas, raízes e folhas, em preparações medicinais (Chavan et al., 2012; Singh et al., 2014; Ong e Kim, 2014). Portanto, a espécie *A. dolabripetala* tem um potencial a ser explorado quanto a sua ação analgésica e anti-inflamatória propiciando desta forma novos conhecimentos, que auxiliem a sua utilização medicinal no tratamento e alívio da dor.

5.3 Análise histopatológica dos órgãos dos animais experimentais

Foram analisadas as laminais histológicas de fígado, baço, rim, dos grupos controle (CT), casca (CA) e folha (FL) (**Figura 34**). Não houve alterações morfológicas nos rins e baço de nenhum animal, e todos os grupos apresentaram morfologia compatível com a normalidade. No fígado, foram observadas discreta alteração nos grupos da casca e folha comparado ao controle (**Figura 34 A. folha, B. casca, C. controle**). Nos dois grupos experimentais, observa-se discreto a moderado aumento de volume dos hepatócitos (hipertrofia) localizados na região centro-lobular. Nessa área nota-se hepatócitos com citoplasma volumoso e ocorre redução da quantidade de núcleos por unidade de tecido. Os hepatócitos foram observados numa lente objetiva com aumento (10 vezes), além disso, foram visualizados: aumento do tamanho celular e alteração da relação núcleo-citoplasma, núcleo com aspectos menores e citoplasma pálido indicando hipertrofia regional. Essa hipertrofia pode estar relacionada ao aumento de organelas citoplasmáticas ligadas ao metabolismo hepático alterado (Greaves, 2007) (**Figura 34**).

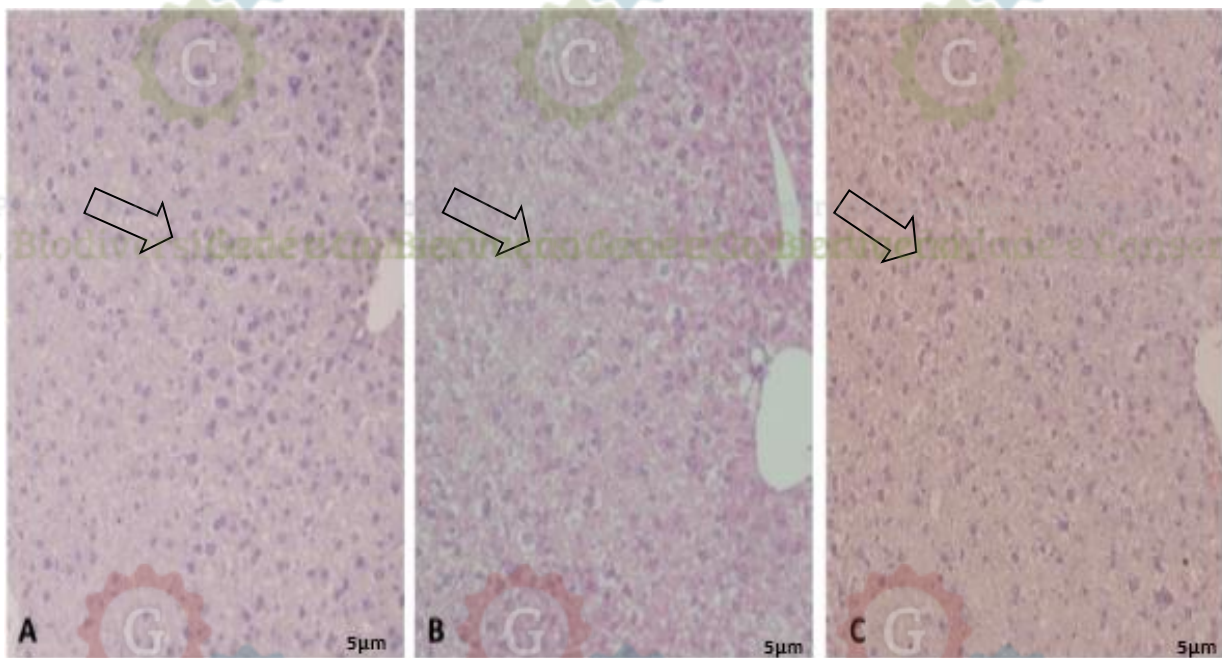


Figura 34. Fotomicrografia de fígado. H & E coloração, 10x. Fígado de ratos tratados com o extrato de folha (A) ou extrato da casca (B) de *A. dolabripetala* mostra a região centrolobular do lóbulo caracterizada por hipertrofia dos hepatócitos. Diminuição observado pelo número de núcleos por unidade de área e citoplasma com coloração pálida. Fígado de ratos não tratados (C) apresenta a arquitetura normal do órgão com ausência de alterações focais.

Na avaliação comportamental, os animais tratados com os extratos de *A. dolabripetala*, não foram a óbito e apenas o extrato da casca apresentou um sinal toxicidade aguda (piloereção), contudo não foram observadas alterações morfológicas teciduais significativas para os dois extratos que induzissem a morte dos hepatócitos. Estas alterações, podem estar relacionadas ao aumento do metabolismo celular hepático, bem como, um aumento do peso do fígado (Greaves, 2007). Existe um consenso entre os autores que o aumento em pelo menos 20% do órgão tem relação direta com alterações histológicas dos hepatócitos (Elcombe et al., 2012). Neste trabalho não foi avaliado o peso do fígado nos animais, mas a histologia sugere a ocorrência de hipertrofia hepatocelular regional. A hipertrofia das células poderia ser o resultado da proliferação de organelas subcelulares tais como: retículo endoplasmático e/ou peroxissomos (Hall et al., 2012).

Os extratos de *A. dolabripetala* na dose de 300 mg.kg⁻¹, mostraram ser seguros para avaliar alterações comportamentais e farmacológicas, mas não induziram lesões significativas e permanentes que levassem a morte dos hepatócitos e dos camundongos. Okoye et al., (2012) descreve para os extratos aquosos de *A. senegalensis* na dose de 400 mg.kg⁻¹ alterações morfológicas significativas e que podem induzir tanto a perda de função do órgão de forma aguda, quanto ao óbito dos animais, dentre elas podemos destacar: aumento dos espaços sinusais, trato portal inflamado nos diferentes lóbulos hepáticos demonstrando degeneração e necrose dos hepatócitos.

As alterações observadas no parênquima hepático, quando submetido ao contato com os extratos da folha e casca de *A. dolabripetala* podem estar relacionadas a processos adaptativos ou hepatoprotetores. Offor et al., (2015) avaliando os efeitos agudos durante 14 dias, do extrato etanólico das folhas de *A. muricata* nas doses de 200, 400 e 600mg, sobre enzimas hepáticas em animais experimentais, constatou uma diminuição significativa nas atividades da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP). Em comparação com o grupo controle, o extrato etanólico apresentou um possível efeito hepatoprotetor, no parênquima hepático dos animais tratados.

A presença de hipertrofia hepática dos animais tratados com os extratos de *A. dolabripetala*, pode sugerir também ação de caráter toxicológico. Outros estudos são necessários para determinar a causa da hipertrofia dos hepatócitos e elucidar os efeitos dos extratos de *A. dolabripetala* na função hepática, como por exemplo, o uso de corantes especiais para detectar glicogênio e análise de patologia clínica com enzimas marcadoras de lesão hepática (Enulat et al.,

2010), tais como: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP) podendo proporcionar dados valiosos para os efeitos dos extratos sobre a função do fígado.

A análise da histologia renal contribuiu para verificar que o uso do extrato de *A. dolabripetala*, de forma aguda não alterou a morfologia deste órgão. Segundo Diniz 2015, parâmetros bioquímicos tais como AST/ALT (função hepática), creatinina (função renal) e o peso do fígado não foram alterados após administração de 1g/kg/animal do extrato foliar de *A. vepretorum*, em um protocolo de toxicidade aguda durante 14 dias. Marcadores bioquímicos de função renal e hepática devem ser investigados para avaliar o potencial toxicológico da espécie *A. dolabripetala*, sendo o primeiro registro de avaliação histológica dos extratos da folha e da casca.



6.0 CONCLUSÕES

Em virtude de pequena quantidade de dados encontrados na literatura sobre a espécie *A. dolabripetala*, este trabalho contribuiu agregando valor ao potencial da biodiversidade das espécies medicinais do município de Jequié- BA e do semiárido baiano. Esta planta demonstrou, atividade psicofarmacologia (ansiolítica e depressora). Os primeiros registros de possível ação de toxicidade tecidual para fígado, configuram-se como dados novos e preliminares. Além disso, este é o primeiro registro da presença do ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico no extrato da casca desta espécie, sendo mais uma fonte para extração e isolamento deste composto diterpênico, que apresenta muitas atividades biológicas. Novos estudos devêm ser realizados para aprofundar o conhecimento do potencial fitoquímico, psicofarmacológico, toxicológico e medicinal quanto ao uso popular desta espécie.

7.0 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir deste trabalho são visualizadas perspectivas de novas análises no aprofundamento fitoquímico, farmacológico, toxicológico e farmacodinâmico dos compostos isolados das folhas e casca de *Annona dolabripetala*, as quais são apresentadas a seguir:

- Explorar a fitoquímica desta espécie, avançando no isolamento e identificação de outros compostos químicos presentes nos extratos da folha e casca.
- Testar outras doses do extrato da folha e casca, com intuito de obter novos dados sobre a caracterização farmacológica e toxicológica.
- Avaliar os compostos isolados (folha e casca) através de testes *in silico* (triagem virtual e docking molecular) onde pode-se prever os alvos potenciais no sistema nervoso central, tal como o GABA-A principal receptor envolvido de ansiedade e depressão.
- Estimular a conservação desta espécie na localidade onde foi coletada e através do plantio e propagação, em virtude do alto potencial de cobertura vegetal em áreas degradadas pela ação humana.

8.0. REFERÊNCIAS

Adams, RP. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA.

ADZU, B.; AMOS, S.; ADAMU, M.; GAMANIEL, K. 2003. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the metanol extract of *Annona senegalensis* root bark. Journal of Natural Remedies, vol. 3, n.1, p. 63-67.

ALBUQUERQUE, UP.; MEDEIROS, PM.; ALMEIDA, AL.; MONTEIRO, JM.; NETO, EMFL.; MELO, JG.; SANTOS, JP. 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. Journal of Ethnopharmacology, vol.114, n. 3, p. 325-354.

ALMAMY, K.; RICHARD, SW.; FRANCK, D.; OLIVIER, C.; PIERRE, GI. 2012. Anticonvulsivant effects of stem bark extract of *Annona senegalensis* Pers. Molecular and Clinical Pharmacology, v.3, n.1, p. 62-72.

ALMEIDA, RN. 2006. Psicofarmacologia: fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

ALMEIDA, RN. & OLIVEIRA, TML. 2006. Triagem farmacológica comportamental. In: Psicofarmacologia fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p133-134.

ALMEIDA, MMB.; SOUSA, PHM.; ARRIAGA, AMC.; PRADO, GMP.; MAGALHÃES, CEC.; MAIA, GA.; LEMOS, TLG. 2011. Bioactive compounds and antioxidant Activity of Fresh exotic fruits from northeastern Brazil. Food Research Internacional, vol.44, p. 2155-2159.

ALMEIDA, JRGS.; ARAÚJO, CS.; PESSOA, CO.; COSTA, MP.; PACHECO, AGM. 2014. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). Revista Brasileira de Fruticultura, vol.36, no.spe1, p. 258-264.

ANDRADE, EHA.; OLIVEIRA, J.; ZOGHBI, MGB. 2007. Volatiles of *Anaxagorea dolichocarpa* Spreng. & Sandw. and *Annona densicoma* Mart. growing wild in the state of Pará, Brazil. Flavour and Fragrance Journal, vol. 22, p.158.

ANDRADE, EHA.; ZOGHBI, MDGB.; MAIA, GS.; FABRICIUS, H.; MARX, F. 2001 Chemical characterization of the fruit of *Annona squamosa* L. occurring in the amazon. Journal of Food Composition and Analysis, vol. 14, n. 2, p. 227-232.

ARAÚJO, CS. 2013. Estudo fitoquímico e atividade biológica *in vitro* de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). Recife: Universidade Federal do Vale do São Francisco. Dissertação de mestrado em Recurso Naturais do Semiárido. p. 33.

BALBAA, SI. ; HAGGAG, MY. ; TAHA, KF. 1977. Study of volatile oil content of the leaves of *Annona squamosa* growing in Egypt. Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 18, p.18.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology, vol. 46, p. 446–475.

BARRETO, FS.; MOURA, AF.; ARAUJO, RM.; SANTOS, CC.; WILKE, DV.; MORAES, MO. 2015. Potencial antitumoral de compostos obtidos de plantas da família Annonaceae. In: Annonaceae: Tópicos selecionados. ALMEIDA, JRGS.; JÚNIOR, RGO.; OLIVEIRA, AP. (organizadores). Editora CRV, Curitiba. p.428-446.

BATISTA, B.; GARCIA, PA.; CASTRO, A.; CORRAL, JM.; FELICIANO, AS.; OLIVEIRA, AB. 2010. Iso-Kauranoic acid from *Wedelia paludosa*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, vol. 82, n. 4, p. 823-831.

BELLO, A.; RODRIGUEZ, ML.; CASTINCIRAS, N.; URQUIOLA, A.; ROSADO, A.; PINO, JA. 1998. Chemical composition of the leaf oil of *Annona elliptica* R.E. fires grown in western Cuba. Journal of Essential Oil Research, vol. 10, n. 6, p. 703-704.

BLUNDEN G.; PATEL AV.; ARMSTRONG NJ.; GORHAM, J. 2001. Betaine distribution in the Malvaceae. Phytochemistry, v.58, p. 451– 454.

BOURNE, RK.; EQBE, PC. 1979. A preliminary study of the sedative effects of *Annona muricata* (sour soup). The West Indian Medical Journal. vol.28, n. 2, p. 106-110.

BRUSCHI, P.; MORGANTI, M.; MANCINI, M.; SIGNORINI, MA. 2011. Traditional healers and lay people: A qualitative and quantitative approach to local knowledge on medicinal plants in Muda (Mozambique). Journal of Ethnopharmacology, vol.138, p.543-563.

BRUNTON, LL. 2012. As Bases Farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 12 ed. Porto Alegre: AMGH.

CAMPOS, FG.; BARON, D.; MARQUES, MQM.; FERREIRA, G.; BOARRO, CSF. 2014. Characterization of the chemical composition of the essential oils from *Annona emarginata*

(Schltdl.) H. Rainer “terra-fria” and *Annona squamosa* L. Revista Brasileira de Fruticultura, vol.36, p. 202.

CANO-EUROPA, E.; GONZALEZ-TRUJANO, ME.; REYES-RAMIREZ, A.; HERNANDEZ-GARCIA, A.; BLAS-VALDIVIA, V.; ORTIZ-BUTRON, R. 2010. Palmitone prevents pentylenetetrazole-caused neuronal damage in the CA3 hippocampal region of prepubertal rats. Neuroscience Letters. vol. 470, p.111–114.

CARBALLO, AI.; MARTÍNEZ, AL.; GONZÁLEZ-TRUJANO, E.; PELLICER, F., VENTURA-MARTÍNEZ, R., DÍAZ-REVAL, MI., LÓPEZ-MUÑOZ, FJ. 2010. Antinociceptive activity of *Annona diversifolia* Saff. Leaf extracts and palmitone as bioactive compound, Pharmacology, Biochemistry and Behavior. vol. 95, p.6- 12.

CARLINI, EA. & MENDES, FR. Protocolos em psicofarmacologia experimental. 2011. Um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais. São Paulo: FAP-UNIFESF.

CASTILLO-SANCHÉZ, LH.; JIMÉNEZ-OSORNIO, JJ.; DELGADO-HERRERA, MA. 2010. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae Families used as biological control of insects. Tropical and Subtropical Agroecosystems, vol.12, p. 445-462.

CAVALCANTI, BC.; COSTA-LOTUFO, LV.; MORAES, MO.; BURBANO, RR.; SILVEIRA, ER.; CUNHA, KMA.; RAO.; VSN.; MOURA, DJ.; ROSA, RM.; HENRIQUES, JAP.; PESSOA, C. 2006. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. Food and Chemical Toxicology, vol.44, p.388–392.

CAVALCANTI, BC.; FERREIRA, JRO.; MOURAB, DJ.; ROSAC, RM.; FURTADOB, GV.; BURBANOD, RR.; SILVEIRA, ER.; LIMA, MAS.; CAMARA, CAG.; SAFFIB, J.; HENRIQUES, JAP.; RAO, VSN.; COSTA-LOTUFO, LV.; MORAES, MO.; PESSOA, C. 2010. Structure–mutagenicity relationship of kaurenoic acid from *Xylopiia sericeae* (Annonaceae). Mutation Research. vol.701, n. 1, p.53–163.

CCAC. 1984. Canadian Council on Animal Care. Guide of the Care use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care: Ottawa, 208p.

CHAVAN, MJ.; KOLHE, DR.; WAKTE, PS.; SHINDE, DB. 2012. Analgesic and Anti-inflammatory activity of kaur-16-en-19-oic from *Annona reticulata* L. Bark. Phytoterapy Research, vol. 26, p. 273-276.

CHAVAN, MJ.; WAKTE, PS.; SHINDE, DB. 2010. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark, Phytomedicine, vol.17, p.149-151.

CHAVAN, MJ. ; WAKTE, PS.; SHINDE, DB. 2011. Analgesic and anti-inflammatory activities of 18-acetoxy-ent-kaur-16-ene from *Annona squamosa* L. bark. Inflammopharmacology. vol.19, p.111-115.

CHELENE, IS. 2014. Dinâmica de comunidade arbórea em um fragmento da Mata Atlântica em Luminárias, Sul de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil. Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras. Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais. 120 p

COSTA, EV.; DUTRA, LM.; JESUS, HC.; NOGUEIRA, PC.; MORAES, VR.; SALVADOR, MJ.; CAVALCANTI, SC.; SANTOS, RL.; PRATA, AP. 2011. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial and larvicidal activities of the essential oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). Natural Product Communications, vol.6, p. 907.

COSTA, EV.; DUTRA, LM.; NOGUEIRA, PC.; MORAES, VR.; SALVADOR, MJ.; RIBEIRO, LH.; GADELHA, FR. 2012. Essential oil from the leaves of *Annona vepretorum*. Natural Product Communications. vol.7, p. 265.

COSTA, EV.; DUTRA, LM.; MORAES, VR.; SALVADOR, MJ.; RIBEIRO, LH.; GADELHA, FR.; CARVALHO, JE. 2013. Chemical composition of the essential oils of *Annona pickelii* and *Annona salzmannii* (Annonaceae), and their antitumoral and trypanocidal activities. Natural Product Research, vol.27, p.997.

COSTA, MB. 2014. Sucessão ecológica pós-fogo em fragmentos de Mata Atlântica sobre tabuleiros costeiros no sudoeste do Brasil. Espírito Santo. Brasil. Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo. Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Tropical. 47p.

COUTINHO, MAS.; MUZITANO, MF.; COSTA, SS. 2009. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. Revista Virtual de Química, vol.1, n.3, p.24.

CORTES, D.; MORENO, L.; PÁRRAGA, J.; GALÁN, A.; CABEDO, N. 2014. Nuevos fármacos inspirados en Annonaceas. Revista Brasileira de Fruticultura. vol.36, no.especial, p. 022-031.

COROL, DI.; RAVEL, C.; RAKSEGI, M.; BEDO, Z.; CHARMET, G.; BEALE, MH.; SHEWRY, PR.; WARD, JL. 2012. Effects of genotype and environment on the contents of betaine, choline, and trigoneline in cereal grains. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.60, n.21, p.5471–5481.

DATTA, BK.; DATTA, SK.; CHOWDHURY, MM.; KHAN, TH.; KUNDU, JK.; RASHID, MA.; NAHAR, L.; SARKER SD. 2004. Analgesic, antiinflammatory and CNS depressant activities of sesquiterpenes and a flavonoid glycoside from *Polygonum viscosum*. Pharmazie, vol.59, p.222-225.

DE ALMEIDA AA.; DE CARVALHO RB.; SILVA OA.; DE SOUSA DP.; DE FREITAS RM. 2014. Potential antioxidant and anxiolytic effects of (+)-limonene epoxide in mice after marble-burying test. Pharmacology Biochemistry Behavior, vol.118, p.69-78.

DE LUCCA RR.; ALEXANDRE, SR.; MARQUES, T.; SOUZA, NL.; MERUSSE, JL.; NEVES SP. Manual de técnicas em Bioterismo. São Paulo: Winner Graph, 1996. 259p.

DINIZ, TC.; ARAÚJO, CS.; SILVA, JC.; OLIVEIRA-JÚNIOR, RG.; LIMA-SARAIVA, SRG.; QUINTAS-JÚNIOR, LQ.; NUNES, XP.; ALMEIDA, JRGS. 2013. Phytochemical screening and central nervous system effects of ethanolic extract of *Annona vepretorum* (Annonaceae) in mice. Journal of medicinal Plants Research, vol.7, n.37, p.2729-2735.

DINIZ, TC.; JÚNIOR, RGO.; FREITAS, RM.; MACHADO, KC.; NUNES, XP.; ALMEIDA, JRGS. 2015. Espécies de *Annonaceae* com atividade sobre o sistema nervoso central. Annonaceae: Tópicos selecionados. In: Almeida, JRGS.; Júnior, RGO.; Oliveira, AP.(eds.), 1 ed., CRV, Curitiba, p. 504-526.

DUTRA, SM.; SALIMENA, FRG.; NETO, LM. 2012. Annonaceae na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. Rodriguésia. vol.63, n.4, 785-793.

DUTRA, LM.; BOMFIM, L.; ROCHA, SLA.; NEPEL, A.; SOARES, AB.; COSTA, EV.; BEZERRA, DP. 2014. *ent*-Kaurane diterpenes from the stem bark of *Annona vepretorum*

(Annonaceae) and cytotoxic evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. vol.24, p.3315-3320.

ELCOMBE, CR.; DHRITIMAN, D.; WOLF, CR.; SCHEER, N.; PLUMME, SM. 2010. Liver mRNA and miRNA profiling of phenobarbital (PB)-treated PXR/CAR double-out and humanized mice provides insight into the mechanism(s) of PB-mediated mouse carcinogenesis. *The Toxicologist CD – An Official Journal of the Society of Toxicology*, 114, abstract id 2156.

ELHAWARY, SS.; EL TANTAWY, ME.; RABEH, MA.; FAWAZ, NE. 2013. DNA fingerprint, chemical composition, antitumor and antimicrobial activities of the essential oils and extractives of four *Annona* species from Egypt. *Journal of Natural Science Research*, vol.3, p. 59.

EKUNDAYO, O.; OGUNTIMEIN, B. 1986. Composition of the essential oils of *Annona senegalensis* var. *senegalensis*. *Planta Médica*, vol. 52, n. 3, p. 202-204.

ENNULAT, D.; WALKER, D.; CLEMO, F.; MAGID-SLAV, M.; LEDIEU, D.; GRAHAM, M.; BOTTS, S.; BOONE, L. 2010. Effects of hepatic drugs-metabolizing enzyme induction on clinical pathology parameters in animals and man. *Toxicology Pathology*. vol.38, p.810-828.

FERREIRA, MBC; HIDALGO, MPL.; CAUMO, W. 2006. Fármacos opióides In: *Farmacologia Clínica: Fundamentos da terapêutica racional*. Fuchs, D.; Wannmacher, L.; Ferreira, MBC. 3 ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.360.

FIOCRUZ. Fundação Oswald Cruz. Departamento de Biotérios/Bio-Manguinhos. Manual de técnicas em Animais. Andrade MCR. A utilização de símios do gênero *Callithrix* como modelo experimental. 2006. Disponível em URL: <http://www.cobea.org.br/artigo4.htm>. Acessado: 14 janeiro 2016.

FIRDOUS, AB.; SHARMILA, G.; BALAKRISHNAN, S.; RAJASINGH, P.; SUGANYA, S.; SRINIVASAN, N.; ARUNAKARAN, J. 2014. Quercetin, a natural dietary flavonoid, acts as a chemopreventive agent against prostate cancer in an *in vivo* model by inhibiting the EGFR signaling pathway. *Food & Function*, v.5, p.2632.

GARCIA, PA.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; BATISTA, R. 2007. Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. *Molecules*, vol.12, p. 455–483.

GASTÓN, MS.; CID MP.; VÁZQUEZ, AM.; DECARLINI, MF.; DEMMEL, GI.; ROSSI, LI.; AIMAR, ML.; SALVATIERRA NA. 2016. Sedative effect of central administration of *Coriandrum sativum* essential oil and its major component linalool in neonatal chicks. *Pharmaceutical Biology*, vol. 25, p.1-8.

GHISALBERTI, EL. 1997. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia*, vol.68, p.303-325.

GREAVES, P., 2007. Liver and pancreas. In: *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies*, 3rd ed. Elsevier, London, UK, p. 457-504.

GUILLOPÉ, R.; ESCOBAR-KHONDIKER, M.; GUÉRINEAU, V.; LAPRÉVOTE, O.; HOGLINGER, G.U.; CHAMPY, P. 2011. Kaurenoic Acid from Pulp of *Annona Cherimolia* in regard to Annonaceae-induced Parkinson. *Phytoterapy Research*, vol.25, p. 1861-1864.

GONZÁLEZ-TRUJANO, ME.; TAPIA, E.; LÓPEZ-MERAZ, L.; NAVARRETE, A.; REYES-RAMIREZ, A.; MARTÍNEZ, A. 2006a. Anticonvulsant Effect of *Annona diversifolia* Saff. and Palmitone on Penicillin-induced Convulsive Activity. A Behavioral and EEG Study in Rats. *Epilepsia*, vol. 47, n. 11, p. 1810-1817.

GONZÁLEZ-TRUJANO, ME.; MARTÍNEZ, AL.; REYES-RAMIREZ, A.; REYES-TREJO, B.; NAVARRETE, A. 2006b. Palmitone isolated from *Annona diversifolia* induces an anxiolytic-like affects in mice. *Planta Médica*, vol.72, p. 703-707.

GONZÁLEZ-TRUJANO, ME.; NAVARRETE, A.; REYES, B.; HONG, E. 1998. Some Pharmacological effects of the Ethanol extract of leaves of *Annona diversifolia* on the Central Nervous System in mice. *Phytoterapy Research*, vol. 12, p. 600-602.=

GONZÁLEZ-TRUJANO, ME.; LÓPEZ-MERAZ, L., REYES-RAMIREZ, A., AGUILLÓN, M., MARTÍNEZ, A. 2009. Effects of repeat administration of *Annona diversifolia* Saff. (Ilama) extracts and palmitone on rat amygdala kindling. *Epilepsy & Behavior*, vol. 16, p.590-595.

GONZÁLEZ-TRUJANO, ME., NAVARRETE, A., REYES, B., CEDILLO-PORTUGAL, E. HONG, E. 2001. Anticonvulsant Properties and Bio-Guided Isolation of Palmitone from Leaves of *Annona diversifolia*. *Planta Médica*, vol.67, p.136-141.

GROSSO, C.; VALENTÃO, P.; FERRERES, F.; ANDRADE, PB. 2013. The use of flavonoids in central nervous system disorders. *Current Medicinal Chemistry*, vol. 20, n. 37, p. 4694-4719.

GRUNDMANN, O.; NAKAJIMA, JI.; KAMATA, K.; SEO, S.; BUTTERWECK, V. 2009. Keampferol from the leaves of *Apocynum venetum* possesses anxiolytic activities in the elevated plus maze test in mice. *Phytomedicine*, vol. 16, p. 295-302.

HALL, AP.; ELCOMBE, CR; FOSTER, JR.; HARADA, T.; KAUFMANN, W.; KNIPPEL, A.; KUTTLER, K.; MALARKEY, DE.; MARONPOT, RR.; NISHIKAWA, A.; NOLTE, T.; SCHULTE, A.; STRAUSS, V.; YORK, MJ. 2012. Liver Hypertrophy: A Review of Adaptive (Adverse and Non-adverse) Changes—Conclusions from the 3rd. International ESTP Expert Workshop. *Toxicologic Pathology*. vol.00, p. 1-24.

HASRAT, JA.; BRUYNE, T.; BACKER, JP.; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A., 1997. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT1A receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (Lead) products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. vol.49, p.1145-1149.

HERRERA-RUIZ, M.; ROMÁN-RAMOS R.; ZAMILPA, A.; TORTORIELLO, J.; JIMÉNEZ-FERRER, JE. 2008. Flavonoids from *Tilia americana* with anxiolytic activity in plus-maze test. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 118 n. 2, p.312-7.

HEYDE, H. 1985. In: *Surinaamse planten als volksmedicijn*. Ed. R.F.L. Mungra and E.K., Madarine.

JAMKHANDE, PG. & WATTAMWAR, AS. 2015. *Annona reticulata* Linn. (Bullock's heart): Plant profile, phytochemistry and pharmacological proprieties. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, vol.5, p.144-152.

JAMKHANDE, PG.; WATTAMWAR, AS.; PEKAMWAR, SS.; CHANDAK, PG. 2014. Antioxidant, antimicrobial activity and *in silico* PASS prediction of *Annona reticulata* Linn. Root extract. *Journal of Basic and Applied Sciences*, n. 3, p. 140-148.

JIROVETZ, L; BUCHBAUER, G; SHAFI, PM.; SAIDUTTY, A. 1998a. Analysis of the essential oils leaves and roots on *Annona reticulata* from South-Indian. *Ernaehrung* (Vienna), vol. 22, n. 1, p. 9-10.

JUNIOR, RGO.; RABÊLO, SV.; ARAÚJO, CS.; SILVA, JC.; DINIZ, TC.; ALMEIDA, JRGS. 2014. Prospecção tecnológica do gênero *Annona* (Annonaceae). *Revista GEINTEC*, vol. 4, n.2 p.850-858.

LAPA, AJ.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, MTR.; CASTRO, MS.; LIMA, TCM. 2003. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Florianópolis: Lagoa, p.60

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, PK.; MUKERJEE, B.; MUKERJEE, R. 1980. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*. vol.21, n.12, p. 2783-2813.

LEITE MP.; FASSIN JRJ.; BAZILONI, EMF.; ALMEIDA, RN.; MATTEI, R.; LEITE, JR. 2008. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. *Journal Brasileiro de Farmacognosia*, vol.18, p.661-666.

LIAW, C.-C.; WU, T.-Y.; CHANG, F.-R.; WU, Y.-C. 2010. Historic perspectives on Annonaceous acetogenins from the chemical bench to preclinical trials. *Planta Médica*, vol. 76, n. 13, p. 1390-1404.

LOPES, JC. & MELLO-SILVA, R. 2014. Diversidade e Caracterização das Annonaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol. 36, no. Especial, p. 125-131.

LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; PINA-MEDINA, B.; ESTRADA-REYES, R.; HEINZE, G.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. 2006. Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sciences*, vol. 78, p. 730-737.

KIM, DH.; SON, JK.; WOO, MH. 2010. Annomocherin, Annonacin and Annomontacin: a novel and two known bioactive mono-tetrahydrofuran Annonaceae acetogenins from *Annona cherimola* seeds. *Archives of Pharmacal Research*, vol. 24, n.4, p.300-306.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. 2014. Potencial Inseticida de Plantas da Família Annonaceae. *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol.36, no.especial1, p. 225-242.

MAAS, PJM. Neotropical Annonaceae. In: MILLIKEN, W.; KLITGARD, B.; BACARAT, A. **Neotropikey**: interactive key and information resources for flowering plants of the neotropics. 2016. Disponível em: <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Annonaceae.htm>>. Acesso em: 29 Maio. 2016.

MAAS, P., LOBÃO, A., RAINER, H. Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110241>>. Acesso em: 29 Maio. 2016.

MACEDO, GEL. 2007. Composição florística e estrutura do componente arbóreo-lianescente de um trecho de floresta estacional semidecidual no município de Jequié, Bahia, Brasil. Recife-Pernambuco: Universidade Federal do Rural de Pernambuco. Tese de doutorado. p. 64.

MACHADO, ART.; LAGE, GA.; MEDEIROS, FS.; SOUZA FILHO, JD.; PIMENTA, LPS. 2013. Quantitative analysis of trigonelline in some *Annona* species by proton NMR spectroscopy. Natural Products and Bioprospecting vol. 3, p.158–160.

MAIA, JG.; ANDRADE, EHA.; OLIVEIRA, J. 2015. Volatile compounds of Annonaceae species in the Brazilian Amazon In: Annonaceae: Tópicos selecionados. ALMEIDA, JRGS., JÚNIOR, RGO.; OLIVEIRA, A.P. (organizadores). EDITORA CRV, Curitiba. p.142

MARQUES, LSG. & NEVES, PBO. 2013. A eficácia da ingestão de flavonoides na prevenção de neoplasias: uma revisão. Estudos, vol.40, n.4, p.585.

MARTA, A.; ARRIAGA, C.; IRACEMA, M.; MACHADO, L.; CRAVEIRO, AA.; DOURADO, RCM. 1997. Volatile constituents of *Annona squamosa* L. roots. Rivista Italiana EPPOS: pubblicazione técnico-científica, vol. 5, p. 535-538.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; ESTRADA-REYES, R.; ESCALONA, AGA.; VELÁZQUEZ, IL.; MARTÍNEZ-MOTA L.; HEINZEE, JMG. 2012. Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice. Journal of Ethnopharmacology, vol. 139, p. 164-170.

MATTEI, R., FRANCA, CIF. 2006. Testes Gerais para confirmar a ação central. In: Psicofarmacologia fundamentos práticos. Almeida, RN. Guanabara Koogan, p.139.

MELLO-SILVA, R.; LOPES, JC.; PIRANI, JR. 2012. Flora da serra do cipó, Minas Gerais: Annonaceae. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, São Paulo. vol.30, n.1, p. 37-56.

MESTRES, JP.; USUBILLAGA, A.; DIAZ, L.; LARROQUE, M.; VIAN, L.; MARTI-MESTRES, G. 2011. Assessment of in vitro dermal absorption of the kaurenoic acid from *Coespeletia moriziana* extracts. Fitoterapia, vol.82, p.585–590.

MIYASHITA, H.; NISHIDA, M.; OKAWA, M.; NOHARA, T.; YOSHIMITSU, H. 2010. Four new *ent*-Kaurane diterpenes from the fruits of *Annona cherimola*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin vol. 58, n. 5, p. 765-768.

MORAES, AM.; CUNHA, GM.; AZEVEDO, MAM. 2014. Composição florística de reservas particulares do patrimônio natural no município de Espera Feliz, Minas Gerais. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia, vol.10, n. 18, p. 3201-3224.

NUNES, CR.; BERNARDES, NR.; GLÓRIA, LL.; OLIVEIRA, DB. 2012. Flavonoides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas. Vértices. vol.14, n.1, p.39-57.

OFFOR, CE.; UKO, AU.; ALUM, PC.; UGWU, O.; AGBAFOR, KN. 2015. Effect of Ethanol Leaf-Extract of *Annona Muricata* on Liver Enzymes of Albino Rats. Journal of Nursing and Health Science, vol. 4, n. 5, p. 99-103.

OLIVEIRA, VB.; YAMADA, LT.; FAGG, CW.; BRANDÃO, MGL. 2012. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. Food Research International vol. 48, p.170-179.

OLIVEIRA, BH.; SANT'ANA, AEG.; BASTOS, DZL. 2002. Determination of the Diterpenoid Kaurenoic acid in *Annona glabra* by HPLC. Phytomedical Analysis. vol.13, 368-371.

OKOYE, TC.; AKAH, PA.; OMEJE, EO.; OKOYE, FBC.; NWORU, CS. 2013. Anticonvulsant effect of kaurenoic acid isolated from the root bark of *Annona senegalensis*. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, vol. 109, p.38-43.

OKOYE, TC.; AKAH, PA.; EZIKE, AC.; OKOYE, MO.; ONYETO, CA.; NDUKWU, F.; OHAEGBULAM, E.; IKELE, L. 2012. Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of *Annona senegalensis* root bark extracts. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. vol.5, p. 277-282.

ONG, HG. & KIM, YD. 2014. Quantitative the botanical study of the medicinal plants used by the Negrito indigenous group in Guimaras island Philippines. Journal of Ethnopharmacology, vol.157, p.228-242.

OPS. 1968. Organización Panamericana de la Salud. Animales de laboratorio: guía para instalaciones y cuidado de animales de laboratorio. Washington: OPS, 81p.

ORTIZ, JG.; NIEVES-NATAL, J.; CHAVEZ, P. 1999. Effects of *Valeriana officinalis* extracts on [3H] flunitrazepam binding, synaptosomal [3H] GABA uptake, and hippocampal [3H] GABA release. *Neurochemical Research*, vol.24, p. 1373-1378.

OVIEDO, V.; GARCÍA, M.; DIAZ, C.; MARDER, M.; COSTA, M.; RÍNCÓN, J.; SÁNCHEZ, C.; GUERRERO, M. 2009. Extracto y fracción alcaloidal de *Annona muricata* con actividad del tipo ansiolítica en ratones. *Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas*, vol. 38, n.1, p. 105-120.

OYEMITAN, IA.; ELUSIYAN, CA.; AKANMU, MA.; OLUGBADE, TA. 2013. Hypnotic, anticonvulsive and anxiolytic effects of 1-nitro-2-phenylethane isolated from essential oil of *Dennettia tripetata* in mice. *Phytomedicine*, vol. 20, p. 1315-1322.

OYEMITAN IA.; OLAYERA, OA.; ALABI, A.; ABASS, LA.; ELUSIYAN, CA.; OYEDEJI, AO.; AKANMU, MA. 2015. Psychoneuropharmacological activities and chemical composition of essential oil of fresh fruits of *Piper guineense* (Piperaceae) in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 166, 240-9.

PASSOS, SC.; ARBO, MD.; RATES, SMK.; VON POSER, GL. 2009. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. vol.19, n.1A, p.140-149.

PEDRO, N.; CAUTIN, B.; MELGUIZO, A.; VICENTE, F.; GENILLOUD, O.; FERNANDO, P.; TORMO, JR. 2012. Mitochondrial complex I inhibitors, acetogenins, induce HepG2 cell death through the induction of the complete apoptotic mitochondrial pathway. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol.45, p.153-164.

PERAZZO, FF.; LIMA, LM.; MAISTRO, EL.; CARVALHO, JE.; REHDER, VLG.; CARVALHO, JCT. 2008. Effect of *Artemisia annua* L. leaves essential oil and ethanol extract on behavioral assays. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol.18, p.686-689.

PERVIZ, S.; KHAN, H.; PERVAIZ, A. 2016. Plant Alkaloids as an Emerging Therapeutic Alternative for the Treatment of Depression. *Frontiers in Pharmacology*. vol.7, n. 28, p. 1-7.

RABÊLO, SV. 2014. Revisão de alcalóides do gênero *Annona*, estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de atemoia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*). Petrolina, Pernambuco.

Brasil. Universidade do Vale do São Francisco. Dissertação de mestrado do Programa de Pós graduação em recursos naturais do semiárido. p.52.

REJÓN-ORANTES, JC.; GONZALEZ-ESQUINCA, AR.; MORA, MP.; ROLDAN, GR.; CORTES, D. 2011. Annomontine, an alkaloid isolated from *Annona purpurea*, has anxiolytic-like effects in the Elevated Plus-Maze. *Planta Médica*, vol. 77, p. 322-327.

RIBEIRO, CAS. 2010. Bateria seqüencial de procedimentos para avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva em camundongo. Botucatu, Dissertação de mestrado, UNESP, 58 p.

RÍOS, JL.; RECIO, MC.; ESCANDELL, JM.; ANDÚJAR, I. 2009. Inhibitor of transcription factors by Plant-derived compounds and their implications in inflammation and cancer. *Current Pharmaceutical Design*, vol. 15, p. 1212-1237.

ROSSI, BW. 2014. Traços reprodutivos, Padrões de Montagem e Sucessão Florestal na Floresta Atlântica. Curitiba. Paraná. Brasil. Paraná: Universidade Federal do Paraná. Dissertação de Mestrado em Botânica, 137p.

RUIZ, Y.; RODRIGUES, J.; ARVELO, F.; USUBILLAGA, A.; MONSALVE, M.; DIEZ, N.; GALINDO-CASTRO, I. 2008. Cytotoxic and apoptosis-inducing effect on ent-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzi*. *Phytochemistry*, vol.69, p.432-438.

SANTOS, DYAC. & SALATINO, MLF. 2008. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*, vol. 55, p.567-573.

SERNA, DMO. & CARDONA, RO. 2006. Bioactividad de la familia *Annonaceae*. *Revista Universidad de Caldas*, Diciembre- Enero, p. 135 – 155.

SIEBRA, CA.; NARDIN, JM.; FLORÃO, A.; ROCHA, FH.; BASTOS, DZ.; OLIVEIRA, BH.; WEFFORT-SANTOS, AM. 2009. Potencial anti-inflamatorio de *Annona glabra*, Annonaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol.19, n. 1A, p. 82-88.

SIGEL, E. & STEINMANN, ME. 2012. Structure, Function and modulation of GABAA receptor. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, p.40224-40231.

SILVA, JC.; QUINTAS, JSS.; COSTA, EV.; ALMEIDA, JRGS.; JÚNIOR, LJQ. 2015. Espécies de Annonaceae com perfil Analgésico. In: Annonaceae: Tópicos selecionados. ALMEIDA, JRGS.; JÚNIOR, RGO.; OLIVEIRA, AP. (organizadores). EDITORA CRV, Curitiba. p.466

SILVA, CF. 2011. Condições de alojamento: Influência no comportamento, na neurogênese do hipocampo e no efeito de drogas padrão em camundongos Swiss adultos. Florianópolis: Tese de doutorado, UFSC, 111 p.

SILVA, ML.; SILVA, JRT; PRADO, WA. 2013. Analgesic induced by 2-or 100 Hz electroacupuncture in the rat tail-flick test depends on the anterior pretectal nucleus. Life Science, vol.93, 742-745.

SILVA, DM.; COSTA, EV.; NOGUEIRA, PCL.; MORAES VRS.; CAVALCANTI, SCH.; SALVADOR, MJ.; RIBEIRO, LHG.; GADELHA, FR.; BARISON, A. 2012. *Ent*-kaurane diterpenoids and other constituents from the stem of *Xylopia laevigata* (Annonaceae). Química Nova, vol. 35, No. 8, 1570-1576.

SILVEIRA, RC. & ALMEIDA, RN. 2006. Toxicidade aguda. In: Psicofarmacologia fundamentos práticos. Organizado por Reinaldo Nóbrega de Almeida – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 127.

SINGH, TP.; SINGH, RK.; MALIK, P. 2014. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Annona squamosa* Linn bark. Journal of Scientific and Innovative Research, vol.3, n.1, p. 60-64.

SOUSA, FCF.; MELO, CTV.; CITÓ, MCO.; FÉLIX, FHC.; VASCONCELOS, SMM.; FONTELES, MMF.; BARBOSA FILHO, JM.; VIANA, GSB. 2008. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 18, n. 4, p. 642-654.

SOUSA, OV.; Del-VECHIO-VIEIRA, G.; PINHO, JJG.; YAMAMOTO, CH.; ALVES, MS. 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the Ethanol extract of *Annona muricata* L. Leaves in Models. International Journal of Molecular Sciences, vol.11, p.2067-2078.

SOUSA, OV.; Del-VECHIO-VIEIRA, G.; ALVES, MS.; PINHO, JJG.; YAMAMOTO, CH.; KAPLAN, MAC. 2012. Pharmacological effects of two polar fractions from *Annona coriacea* Mart. in animal models. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, vol.6, n.13, p.948-955.

SOUTO-MAIOR, FN.; CARVALHO, FL.; MORAIS, LCSL.; NETTO, SM.; SOUSA, DP.; ALMEIDA, RN. 2011. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, vol.100 p.259–263.

SULEIMAN, MM.; DZENDA, T.; SANI, CA. 2008. Antidiarrheal Activity of the metanol stem-bark extract on *Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, vol.116, p.125-130.

UMEZU, T.; SAKATA, A.; ITO, H. 2001. Ambulation-promoting effect of peppermint oil and identification of its active constituents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol.69, n.3, 383-390.

VISSIENNON, C.; NIEBER, K.; KELBER, O.; BUTTERWECK, V. 2012. Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin--are they prodrugs? *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol.23, n.7, p. 733-40.

WAGNER, H. & BLADT, S. 1996. *Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas*. 2nd ed. New York: Springer.

WANNMACHER, L. 2006 Capítulo 47. Fármacos usados nos Distúrbios afetivos In: *Farmacologia Clínica: Fundamentos da terapêutica racional*. Danni Fuchs, Lenita Wannmacher, Maria Beatriz Cardoso Ferreira. 3 ed. – Rio de janeiro: Guanabara Koogan. p.545.

WILKENS, M.; ALARCÓN, A.; URZÚA, A.; MENDONZA, L. 2002. Characterization of bactericidal Activity of the Natural diterpene kaurenoic Acid. *Planta Médica*, vol.68, p.452-454.

ZHOU, J.; CHAN, L.; ZHOU, S. 2012. Trigoneline: A plant alkaloid with Therapeutic potencial for Diabetes and Central Nervous System Disease. *Current Medicinal Chemistry*, vol.19, p. 3523-3531.

ANEXOS



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB
 Autorizada pelo Decreto Estadual nº 7344 de 27.05.98
 Comitê de Ética No Uso de Animais - CEUA / UESB

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

Concordância do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA

O Protocolo 74/2014 referente ao projeto "Caracterização fitoquímica e psicofarmacológica dos extratos de *Annona dolabripetala*" sob responsabilidade do Prof. Wagner Rodrigues de Assis Soares – DS (Campus de Jequié) foi **APROVADO** e liberado para condução pelo pesquisador e equipe, conforme determinação da reunião ocorrida em 03/06/2013 e reiterada pela reunião de 02/12/2013.

Lembramos ao pesquisador que:

- O responsável pelo projeto ou protocolo encaminhará à CEUA, ao final do estudo, um relatório de uso de animais. O relatório deverá conter informações básicas acerca do projeto ou protocolo de acordo com o roteiro publicado em conjunto com a RN nº 4 do CONCEA.
- No caso da necessidade da continuidade dos projetos ou protocolos usando animais para fins científicos ou didáticos é obrigatório o envio do Relatório à CEUA acrescido da justificativa.
- Para os casos da continuidade de projetos ou protocolos, após a análise do relatório e de esclarecimentos adicionais, se necessário, a CEUA pode deferir, suspender, ou requerer modificação das mesmas, dentro de suas atribuições.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

Itapetinga, 8 de Dezembro de 2014.

Sônia Martins Teodoro
 Dr.ª Sônia Martins Teodoro
 Coordenadora CEUA/UESB

Comitê de Ética No Uso de Animais - CEUA / UESB (Rodovia BR 415, Km 03, SN Itapetinga - BA CEP: 45709-000)

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

Protocolo experimental da triagem farmacológica comportamental

PRODUTO: _____ DOSE: _____ DATA: ____/____/____

VIA DO TRATAMENTO: _____ ANIMAL/SEXO/IDADE: _____

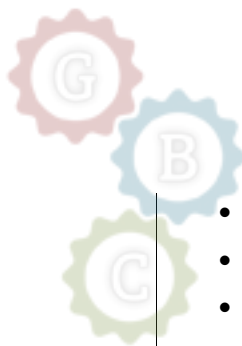
RESPONSÁVEL PELO EXPERIMENTO: _____

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30'	60'	120'	180'	240'
1. SNC					
a) Estimulante					
Agressividade					
Ambulação aumentada					
Andar em círculo					
Autolimpeza					
Bocejo					
Contorções abdominais					
Convulsões					
Escalar					
Estereotípias					
Irritabilidade					
Levantar					
Movimentação intensa das vibrissas					
Pedalar					
Sacudir a cabeça					
Saltos					
Tremores					
Vocalização					
b) Depressores					
Abdução das patas do trem posterior					
Ambulação diminuída					
Analgésia					
Anestesia					
Ataxia					
Catatonias					
Cauda de Straub					
Hipnose					
Perda do reflexo auricular					
Perda do reflexo corneal					
Ptose palpebral					
Reflexo de endireitamento					
Resposta ao toque diminuída					
Sedação					
2. SNA					
Cianose					
Constipação					
Defecação					
Diarréia					
Força para agarrar					
Lacrimamento					
Micoção					
Piloereção					
Respiração					
Salivação					
Tônus muscular					
3. Mortes					
Obs.:					

Ficha. Protocolo experimental de triagem farmacológica comportamental. Fonte: Almeida e Oliveira, (2006).

Tabela 4. Principais sinais e sintomas comportamentais indicativos da ação sobre o sistema nervoso central

Lista de comportamentos indicativos de efeito no SNC	Significado da resposta farmacológica
Efeitos estimulantes	<ul style="list-style-type: none"> • Agressividade • Ambulação aumentada • Andar em círculo • Autolimpeza • Bocejo • Contorções abdominais • Convulsões • Escalar • Estereotipia • Irritabilidade • Levantar • Movimentação intensa das vibrissas • Pedalar • Sacudir a cabeça • Saltos • Tremores • Vocalização
Efeitos depressores	<ul style="list-style-type: none"> • Abdução das patas do trem posterior • Ambulação diminuída • Analgesia/ antinocicepção • Anestesia • Ataxia ou incoordenação motora • Catatonia • Cauda de Straub • Hipnose • Perda do reflexo auricular • Perda do reflexo corneal • Ptose palpebral • Reflexo de endireitamento • Respostas ao toque diminuída • Sedação
Efeitos autonômicos	<ul style="list-style-type: none"> • Cianose • Constipação



- Defecação
- Diarréia
- Força para agarrar
- Lacrimejamento
- Micção
- Piloereção
- Respiração
- Salivação
- Tônus muscular

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Principais sinais clínicos nos testes de triagem farmacológica comportamental. Fonte: Almeida & Oliveira, 2006.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Tabela 5. Compostos voláteis descrito para as espécies do gênero *Annona*

componente	Espécie	Referência
Acetato de Borneol (5)	<i>Annona atemoya</i> <i>cv.african pride</i> ; <i>Annona squamosa</i>	Wyllie et al., 1987 Oliveros-Belardo, 1977 Andrade et al., 2001
Acetato de linalol (52)	<i>Annona muricata</i> ; <i>Annona squamosa</i>	Jirovetz et al., 1998 Balbaa et al., 1977
Borneol (4)	<i>Annona squamosa</i>	Marta et al., 1997 Balbaa et al., 1977
Calareno (16)	<i>Annona muricata</i>	Jirovetz et al., 1998
Cariofileno (22)	<i>Annona senegalensis</i> <i>var.senegalensis</i>	Ekundayo; Oguntimein, 1986
Carvona (21)	<i>Annona squamosa</i>	Marta et al., 1997 Balbaa et al., 1977
Cis-Ocimeno (69)	<i>Annona reticulata</i>	Bartley, 1987
Elemol (35)	<i>Annona elliptica</i> ; <i>Annona reticulata</i>	Bello et al., 1998 Jirovetz et al., 1998
Espatuleno (81)	<i>Annona atemoya</i> <i>cv.african pride</i> ; <i>Annona reticulata</i>	Wyllie et al., 1987 Jirovetz et al., 1998
Farnesol (41)	<i>Annona squamosa</i>	Balbaa et al., 1977
Geraniol (42)	<i>Annona senegalensis</i> <i>var.senegalensis</i> ; <i>Annona squamosa</i>	Ekundayo; Oguntimein, 1986 Balbaa et al., 1977
Germacreno D (43)	<i>Annona atemoya</i> <i>cv.african pride</i> ; <i>Annona reticulata</i> ; <i>Annona squamosa</i>	Wyllie et al., 1987 Bartley, 1987 Andrade et al., 2001
Linalol (51)	<i>Annona elliptica</i> ; <i>Annona muricata</i> ; <i>Annona reticulata</i> ; <i>Annona senegalensis</i> <i>var.senegalensis</i> ; <i>Annona squamosa</i>	Bello et al., 1998 Jirovetz et al., 1998 Bartley, 1987 Ekundayo; oguntimein, 1986 Andrade et al., 2001 Balbaa et al., 1977
Mirceno (66)	<i>Annona atemoya</i> <i>cv.african pride</i> ; <i>Annona elliptica</i> ; <i>Annona reticulata</i> ; <i>Annona senegalensis</i> <i>var.senegalensis</i> ; <i>Annona squamosa</i>	Wyllie et al., 1987 Bello et al., 1998 Bartley, 1987 Ekundayo; Oguntimein, 1986 Balbaa et al., 1977 Andrade et al., 2001
p-Cimeno (31)	<i>Annona elliptica</i> ; <i>Annona reticulata</i>	Bello et al., 1998 Bartley, 1987
Sabineno (78)	<i>Annona elliptica</i> ;	Bello et al., 1998

Safrole (79)
Terpinen-4-ol (85)

Terpinoleno (89)
trans-Ocimeno (70)

r-Terpineno (87)

α -Bergamoteno (1)

α -Copaeno (27)

α -Elemeno (33)

α -epi-Muurolol (65)

α -Eudesmol (36)

α -Humuleno (47)

α -Pineno (75)

α -Terpineno (86)

α -Terpineol (88)

α -Tujeno (90)

β -Cariofileno (23)

β -cis-Ocimeno

β -Elemeno (34)

Annona senegalensis
var. senegalensis

Annona elliptica

Annona elliptica;
Annona senegalensis
var. senegalensis

Annona elliptica
Annona reticulata;
Annona squamosa

Annona elliptica;
Annona squamosa

Annona reticulata

Annona reticulata

Annona senegalensis
var. senegalensis

Annona elliptica

Annona reticulata
Annona elliptica;
Annona reticulata;
Annona squamosa

Annona atemoya
cv. african pride;
Annona elliptica;
Annona muricata;
Annona reticulata;
Annona squamosa

Annona elliptica;
Annona senegalensis
var. senegalensis;

Annona elliptica;
Annona muricata;
Annona squamosa

Annona elliptica

Annona muricata;
Annona reticulata;
Annona squamosa

Annona elliptica

Annona elliptica;
Annona reticulata

Ekundayo; Oguntimein,
1986

Bello et al., 1998

Bello et al., 1998

Ekundayo; Oguntimein,
1986

Bello et al., 1998

Bartley, 1987

Oliveros-Belardo, 1977

Bello et al., 1998

Balbaa et al., 1977

Jirovetz et al., 1998

Jirovetz et al., 1998
Bartley, 1987

Ekundayo; Oguntimein,
1986

Bello et al., 1998

Jirovetz et al., 1998

Bello et al., 1998

Bartley, 1987

Marta et al., 1997

Wyllie et al., 1987

Bello et al., 1998

Jirovetz et al., 1998

Bartley, 1987

Oliveros-Belardo, 1977

Rai; Muthana, 1954

Andrade et al., 2001

Balbaa et al., 1977

Marta et al., 1997

Bello et al., 1998

Ekundayo; Oguntimein,
1986

Bello et al., 1998

Jirovetz et al., 1998

Andrade et al., 2001

Bello et al., 1998

Jirovetz et al., 1998

Jirovetz et al., 1998

Bartley, 1987

Marta et al., 1997

Joy; Rao, 1997

Rai; Muthana, 1954

Bello et al., 1998

Bello et al., 1998

Bartley, 1987

β -Eudesmol (37)

β -felandreno (74)

β -Pineno (76)

Annona elliptica

Annona elliptica

Annona atemoya
cv.african pride;
Annona muricata;
Annona reticulata;
Annona senegalensis
var.senegalensis;
Annona squamosa

Bello et al., 1998

Bello et al., 1998

Wyllie et al., 1987

Jirovetz et al., 1998

Bartley, 1987

Ekundayo; Oguntimein,
1986

Oliveros-Belardo, 1977

Balbaa et al., 1977

Marta et al., 1997

β -trans-Ocimeno

Annona atemoya
cv.african pride;
Annona squamosa

Wyllie et al., 1987

Andrade et al., 2001

γ -Cadineno (13)

δ -Cadineno (12)

Annona elliptica

Annona atemoya
cv.african pride;
Annona elliptica;
Annona reticulata

Bello et al., 1998

Wyllie et al., 1987

Bello et al., 1998

Jirovetz et al., 1998

Bartley, 1987

Fonte: ARAÚJO, 2013.