



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**PADRONIZAÇÃO DE FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM
FLAVONOIDES C-HETEROSÍDEOS DE *Cecropia pachystachya*
Trécul E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA FITOTERÁPICO
MICROESTRUTURADO COM POTENCIAL AÇÃO TIPO-
ANTIDEPRESSIVA**

Caroline Flach Ortmann

Florianópolis
2017

Caroline Flach Ortmann

**PADRONIZAÇÃO DE FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM
FLAVONOIDES C-HETEROSÍDEOS DE *Cecropia pachystachya*
Trécul E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA FITOTERÁPICO
MICROESTRUTURADO COM POTENCIAL AÇÃO TIPO-
ANTIDEPRESSIVA**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Título de Doutora em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto

Coorientador^a: Prof^a. Dr^a. Angela Machado de Campos

Florianópolis
2017

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

Ortmann, Caroline Flach
PADRONIZAÇÃO DE FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM
FLAVONOIDES C-HETEROSÍDEOS DE *Cecropia pachystachya*
Trécul E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA FITOTERÁPICO
MICROESTRUTURADO COM POTENCIAL AÇÃO TIPO
ANTIDEPRESSIVA / Caroline Flach Ortmann ;
orientador, Flávio Henrique Reginatto,
coorientador, Angela Machado de Campos, 2017.
180 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Cecropia pachystachya*. 3.
Flavonoides C-heterosídeos. 4. Atividade tipo
antidepressiva. 5. microparticulas. I. Reginatto,
Flávio Henrique . II. Machado de Campos, Angela .
III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

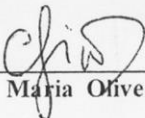
**“PADRONIZAÇÃO DE FRAÇÃO ENRIQUECIDA
EM FLAVONOIDES C-HETEROSÍDEOS DE
Cecropia pachystachya Trécul E
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA
FITOTERÁPICO MICROESTRUTURADO COM
POTENCIAL AÇÃO TIPO-ANTIDEPRESSIVA”**

POR

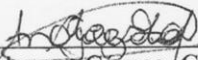
Caroline Flach Ortmann

Tese julgada e aprovada em sua
forma final pelo(a) Orientador(a) e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores
Doutores:

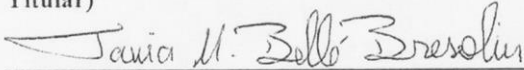
Banca Examinadora:



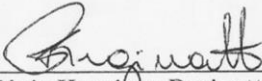
Prof(a). Dr(a). Cláudia Maria Oliveira Simões (UFSC – Membro
Titular)



Prof(a). Dr(a). Andressa Corneo Gazola (UNIBAVE – Membro
Titular)



Prof(a). Dr(a). Tania Mari Bellé Bresolin (UNIVALE – Membro
Titular)



Prof(a). Dr(a). Flávio Henrique Reginatto (UFSC – Orientador)

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 04 de agosto de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade da vida e de viver.

Ao meu orientador, Professor Flávio Reginatto, a quem dedico essa Tese, pelos ensinamentos durante esses 10 anos de orientação. Agradeço pela paciência, pelo aprendizado e pelas lições de caráter e postura profissional que sempre demonstrou ao seu grupo de pesquisa. Agradeço pela amizade, pela parceria e por respeitar também minhas decisões. Muito obrigada por tudo chefe! Tens minha admiração!

À minha coorientadora, Professora Angela Machado de Campos, agradeço, em especial, a paciência em me ensinar e orientar para o mundo da tecnologia. Agradeço por ter compartilhado de seu tempo, seus conhecimentos, e também pela amizade e momentos de descontração, muito obrigada!

Agradeço aos professores do PPGFar por todos os ensinamentos.

À CAPES pelo auxílio financeiro que permitiu a realização desse doutorado.

Agradeço aos meus colegas e amigos que tive o prazer de conhecer durante todo o período de pós-graduação, com os quais aprendi muito: Geison, Carlos, Taty, Manu, Silvana, André. Aos meus amigos e fiéis companheiros até o final dessa jornada: Si, Lari e Vitor muito obrigada por tudo! Mari e Talitha-Maria, obrigada à parceria e companheirismo, vocês me ensinaram muito! Agradeço a aluna de iniciação científica Pâmela, e à querida Claudinha, pela companhia e amizade.

Agradeço a minha família, por me apoiar, incentivar e auxiliar para o término dessa etapa. Agradeço a minha mãe Solange por todo apoio incondicional, a minha irmã Bruna, que partilhou dessa trajetória diariamente, e ao querido Carlão. Agradeço ao meu pai Valmir, a Janice e ao meu irmãozinho Rudolfo pelo incentivo. Agradeço as minhas tias Flávia e Ângela, e a minha querida avó Alcília. Amo vocês!

Às minhas queridas amigas, que tanto me ouviram e partilharam dessa trajetória, o meu muito obrigada: Nay, Thais, Lara, Li, Tami e Fê.

Ao meu parceiro, meu noivo Eduardo, agradeço por tudo! Principalmente pela paciência, por me compreender, e compartilhar de todos os desafios. Contigo fica mais fácil!

Usarei uma frase emprestada do Prof. Pedro Petrovick, escrita como dedicatória na contracapa do livro de Farmacognosia: “Encontrar parceiros facilita encontrar o sucesso nos seus objetivos”.

Dessa forma agradeço de coração a todos aqui mencionados.

RESUMO

Ao longo dos anos, as plantas medicinais forneceram novas entidades químicas com suposto perfil antidepressivo. Considerando a necessidade de novos agentes terapêuticos para tratamento de distúrbios do SNC, pesquisas recentes têm evidenciado o potencial dos flavonoides no tratamento dessas enfermidades. Neste contexto, insere-se *Cecropia pachystachya*, que apresentou atividade tipo-antidepressiva *in vivo* a partir da administração do extrato aquoso de suas folhas. Esta planta contém majoritariamente compostos fenólicos, especialmente flavonoides. Esse trabalho teve como objetivo a padronização química de uma fração enriquecida em flavonoides C-heterosídeos de *C. pachystachya* (FEF-Cp), e a investigação do seu potencial tipo-antidepressivo *in vivo*. Ainda como parte dos objetivos, foi previsto o desenvolvimento de micropartículas contendo a FEF-Cp para liberação modificada dos flavonoides. A FEF-Cp apresentou teor de flavonoides totais cerca de três vezes superior ao extrato hidroetanólico ($118,53 \pm 2,50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ expressos em isoorientina) determinado por CLAE/DAD. O perfil de flavonoides da FEF-Cp foi caracterizado por CLAE/EM/EM tendo sido possível detectar 15 flavonoides glicosídicos diferentes, dentre os quais diversos isômeros. A presença de flavonoides do tipo O-glicosil-C-glicosilflavonoides foi sugerida, sendo também relatado o flavonoide vitexina para *C. pachystachya*. Os estudos de estabilidade demonstraram que os flavonoides da FEF-Cp foram resistentes à degradação em condições de refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; 30 dias) e de estabilidade acelerada ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR), já em condições de estresse ($80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; 30 dias) o teor de flavonoides totais permaneceu estável durante cinco dias. FEF-Cp apresentou efeito tipo-antidepressivo *in vivo* no tratamento agudo nas doses de 100 e 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, sendo também capaz de reverter o efeito do modelo do estresse crônico moderado na dose de 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Esse potencial tipo-antidepressivo foi atribuído a capacidade da FEF-Cp de atuar no balanço oxidativo apresentando perfil neuroprotetor em diferentes regiões cerebrais. Micropartículas (MCP) de Eudragit RS100 contendo os flavonoides da FEF-Cp foram preparadas pelo método de dupla emulsão (a/o/a) seguida de evaporação do solvente. O sistema MCP₁-NaCl apresentou eficiência de encapsulação de $69,03 \pm 1,14\%$ e teor de flavonoides de $1,22 \pm 0,06 \text{ mg}/100 \text{ g}$ de micropartículas, além de perfil de liberação lento e contínuo. Por fim, a FEF-Cp apresentou atividade tipo-antidepressiva *in vivo* que foi possivelmente atribuída às propriedades antioxidantes e neuroprotetoras de seus flavonoides C-heterosídeos, ainda, foi desenvolvido um sistema microparticulado contendo a FEF-Cp (MCP₁-NaCl) que apresentou propriedades físico-químicas consideradas satisfatórias visando a liberação controlada dos flavonoides.

Palavras-chave: *Cecropia pachystachya*, flavonoides C-heterosídeos, atividade tipo-antidepressiva, micropartículas.

ABSTRACT

Over the years, medicinal herbs have provided new chemical entities with antidepressant profile. The search of new therapeutic agents of CNS disorders remains relevant, in this context, recent research has evidenced the potential of flavonoids for the treatment of depression. *Cecropia pachystachya* aqueous leaves extract has mainly phenolic compounds, especially flavonoids, which presented antidepressant-like activity. The aim of this work was to develop and standardize the chemical profile of an enriched flavonoid fraction of *C. pachystachya* (EFF-*Cp*), and to investigate its antidepressant-like potential *in vivo*. Moreover, it was also aimed the development of polymeric microparticles containing EFF-*Cp* for controlled release of flavonoids. EFF-*Cp* presented total flavonoid content higher than the hydroethanolic extract ($118.53 \pm 2.50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ expressed in isoorientin) determined by HPLC/DAD. The LC/QTOF analysis showed the presence of 15 different glycosidic flavonoids, among which several isomers. It was suggested the presence of *O*-glycosyl-*C*-glycosylflavonoids, and reported the flavonoid vitexin for *C. pachystachya*. The stability studies showed that EFF-*Cp* flavonoids were resistant to degradation under refrigeration conditions ($4 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 days) and accelerated stability ($40 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and $75 \pm 5\% \text{ RH}$). However, under stress conditions ($80 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 30 days) the total flavonoid content remained stable for 5 days. EFF-*Cp* presented antidepressant-like effect (100 and $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) in *in vivo* acute protocol. In addition, EFF-*Cp* ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) was able to reverse the effect of the chronic mild stress protocol. EFF-*Cp* antidepressant-like effect was associated to its antioxidant properties due its ability to act mainly in the oxidative balance and neuroprotection of different brain regions. Microparticles of Eudragit RS100 containing the flavonoids of EFF-*Cp* (MCP₁ and MCP₁-NaCl) were prepared by double-emulsion (a/o/a) solvent evaporation. MCP₁-NaCl showed encapsulation efficiency of $69.03 \pm 1.14\%$ and flavonoid load of $1.22 \pm 0.06 \text{ mg}/100 \text{ g}$ of microparticles, and a slow and continuous release profile. In conclusion, EFF-*Cp* presented *in vivo* antidepressant-like effect that was probably associated by the antioxidant and neuroprotective properties of its flavonoids. Moreover, microparticles containing EFF-*Cp* were developed (MCP₁-NaCl) which presented satisfactory physicochemical properties aiming controlled release of its flavonoids.

Keywords: *Cecropia pachystachya*, *C*-glycosylflavonoids, antidepressant-like activity, microparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Folha de <i>Cecropia pachystachya</i> , à esquerda face adaxial e a direita face abaxial.....	34
Figura 2: Núcleo fundamental dos flavonoides e principais subclasses.....	41
Figura 3: Representações químicas das agliconas e radicais C-heterosídeos que compõe a classe dos flavonoides C-heterosídeos.....	42
Figura 4: Estrutura química dos di-C-glicosilflavonoides vicenina-2 e lucenina-2 e das respectivas agliconas.....	44
Figura 5: Estruturas químicas de fármacos antidepressivos amplamente utilizados na prática clínica.....	48
Figura 6: Fatores que influenciam as propriedades das micropartículas.....	56
Figura 7: Representação da preparação de micropartículas por dupla emulsão seguida de evaporação do solvente.....	59
Figura 8: Representação da difusão e evaporação do solvente no método de emulsão/evaporação na preparação de micropartículas.....	60
Figura 9: Fluxograma representativo do fracionamento e obtenção da FEF-Cp.....	80
Figura 10: Perfil cromatográfico do extrato bruto de <i>Cecropia pachystachya</i> (EB-Cp).....	84
Figura 11: Perfil cromatográfico da fração butanólica (FrBuOH-Cp) e do resíduo aquoso de <i>Cecropia pachystachya</i>	84
Figura 12: Perfil cromatográfico da fração enriquecida em flavonoides C-heterosídeos de <i>Cecropia pachystachya</i> (FEF-Cp) e da fração residual aquosa resultantes do processo de extração com Amberlite XAD-16.....	85
Figura 13: Cromatograma da FEF-Cp após a reação de hidrólise ácida (HCl 0,1 N).....	87
Figura 14: Aspecto visual da FEF-Cp ao final do experimento de estabilidade estresse (80 °C) e no tempo zero do experimento..	88
Figura 15: Cromatograma da FEF-Cp após 30 dias de exposição à temperatura de 80 °C do experimento de estabilidade estresse.....	88
Figura 16: Teor de flavonoides totais e de isoorientina em FEF-Cp durante o experimento de estabilidade estresse (80 °C).....	89
Figura 17: Teor de flavonoides totais durante o estudo em condições de refrigeração (4 °C) da FEF-Cp na forma de pó.....	90
Figura 18: Teor de flavonoides totais durante o estudo em condições de refrigeração (4 °C) da FEF-Cp na forma de solução.	90

Figura 19: Perfil cromatográfico da FEF- <i>Cp</i> no experimento de estabilidade acelerada (40 °C ± 2 °C e 75% ± 5% UR).....	92
Figura 20: Teor de flavonoides totais da FEF- <i>Cp</i> durante o experimento de estabilidade acelerada (40 °C ± 2 °C e 75% ± 5% UR).....	93
Figura 21: Micrografias obtidas em MEV para as formulações MCP ₁ e MCP ₁ -NaCl.....	153
Figura 22: Perfil de liberação dos sistemas MCP ₁ e MCP ₁ -NaCl em meio pH 7,4.....	154
Figura 23: Micrografias obtidas em MEV para as formulações MCP ₁ e MCP ₁ -NaCl após o estudo de liberação em pH 7,4.....	157

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Atividades farmacológicas descritas para <i>C. pachystachya</i>	35
Quadro 2: Esteroides e terpenos relatados para <i>C. pachystachya</i>	37
Quadro 3: Compostos fenólicos relatados para <i>C. pachystachya</i>	38
Quadro 4: Modelos animais usualmente utilizados para avaliação de fármacos com potencial antidepressivo.....	52
Quadro 5: Métodos para microencapsulação de ativos hidrofílicos.....	58
Quadro 6: Propriedades dos solventes usualmente utilizados na metodologia de emulsão seguida de evaporação do solvente.....	62
Quadro 7: Formulações preparadas a partir do estudo preliminar de formulação.....	140
Quadro 8: Formulações preparadas a partir do estudo de formulação.....	141
Quadro 9: Formulações preparadas a partir do estudo de formulação para avaliação da influência da temperatura de evaporação/ extração do solvente.....	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados do estudo preliminar de formulação.....	147
Tabela 2: Caracterização dos sistemas microparticulados.....	149
Tabela 3: Granulometria das micropartículas.....	151
Tabela 4: Teor de flavonoides totais nos intervalos de liberação em meio pH 1,2 para os sistemas MCP ₁ e MCP ₁ -NaCl.....	154

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Determinação do rendimento das formulações.....	128
Equação 2: Determinação da distribuição granulométrica das micropartículas.....	129
Equação 3: Determinação da eficiência de encapsulação da formulação.....	130
Equação 4: Determinação do teor de flavonoides totais associado a formulação.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHE	Barreira hematoencefálica
CAT	Enzima catalase
CLAE/DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos
CLAE/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de espectrometro de massas
CLUE/EM/EM	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao detector de espectrometro de massas QTof
EA- <i>Cp</i>	Extrato aquoso de <i>Cecropia pachystachya</i>
EB- <i>Cp</i>	Extrato hidroetanólico de <i>Cecropia pachystachya</i>
ECM	Estresse crônico moderado
EE	Eficiência de encapsulação
FEF- <i>Cp</i>	Fração enriquecida em flavonoides <i>C</i> -heterosídeos de <i>Cecropia pachystachya</i>
FrBuOH- <i>Cp</i>	Fração butanólica de <i>Cecropia pachystachya</i>
GPx	Enzima glutationa peroxidase
IRNS	Inibidores seletivos da recaptção da noradrenaliza e serotonina
IRN	Inibidores seletivos da recaptção da noradrenalina
ISRS	Inibidores seletivos da recaptção da serotonina
MCP	Micropartículas
MCP ₁	Micropartículas de Eudragit RS100 contendo os flavonoides da FEF- <i>Cp</i>
MCP ₁ -NaCl	Micropartículas de Eudragit RS100 contendo os flavonoides da FEF- <i>Cp</i> preparadas com influência da pressão osmótica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PVA	Álcool polivinílico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SOD	Enzima superóxido dismutase
SNC	Sistema Nervoso Central
SLM	Sistema de Liberação Modificada
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TDM	Transtorno depressivo maior
TRD	Depressão resistente ao tratamento
Tr	Tempo de retenção

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	27
CAPÍTULO 1 – Revisão bibliográfica: <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul, Flavonoides, Aspectos neurofarmacológicos da depressão e Tecnologia de sistemas microparticulados para liberação de ativos.....	33
1.1 <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul.....	33
1.1.1 Aspectos biológicos.....	34
1.1.2 Composição química.....	36
1.2 FLAVONOIDES.....	40
1.2.1 Características químicas.....	40
1.2.2 Flavonoides C-heterosídeos.....	41
1.3 ASPECTOS NEUROFARMACOLÓGICOS.....	45
1.3.1 Neurobiologia da Depressão.....	45
1.3.2 Tratamento da Depressão.....	47
1.3.2.1 Potencial neurofarmacológico das plantas medicinais...	49
1.3.2.2 Modelos animais para pesquisa de alternativas terapêuticas.....	50
1.4 TECNOLOGIA DE SISTEMAS MICROPARTICULADOS PARA LIBERAÇÃO DE ATIVOS.....	53
1.4.1 Aspectos gerais na preparação de sistemas microparticulados.....	56
1.4.1.1 Metodologias.....	57
1.4.1.2 Materiais.....	60
REFERÊNCIAS.....	63
CAPÍTULO 2 – Investigação fitoquímica, estudos de estabilidade e avaliação da atividade tipo-antidepressiva de <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul.....	77
2.1 INTRODUÇÃO.....	77
2.2 OBJETIVOS.....	78
2.2.1 Objetivo geral.....	78
2.2.2 Objetivos específicos.....	78
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
2.3.1 Materiais.....	79
2.3.2 Caracterização da material prima vegetal.....	79
2.3.3 Desenvolvimento de uma fração enriquecida em flavonoides C-heterosídeos (FEF-Cp).....	79

2.3.4	Análise do perfil químico da FEF-Cp por CLAE/DAD.....	79
2.3.5	Estudos de estabilidade da FEF-Cp.....	81
2.3.5.1	Estudo de estresse: Temperatura.....	82
2.3.5.2	Estudo em condições de refrigeração.....	82
2.3.5.3	Estudo de Estabilidade Acelerada	82
2.3.6	Análise estatística.....	83
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
2.4.1	Análise química do processo de obtenção da FEF-Cp....	83
2.4.2	Avaliação da estabilidade da FEF-Cp.....	87
2.4.2.1	Estudo da estresse: Temperatura.....	87
2.4.2.2	Estudo em condições de refrigeração.....	89
2.4.2.3	Estudo de Estabilidade Acelerada.....	91
2.4.3	Publicação: Perfil químico, estudos preliminares de estabilidade e efeito agudo da administração da FEF-Cp em ratos.....	94
2.4.4	Publicação: Avaliação do efeito tipo-antidepressivo e neuroprotetor da FEF-Cp em modelo de estresse crônico moderado.....	108
2.5	DISCUSSÃO GERAL.....	124
	REFERÊNCIAS.....	129
CAPÍTULO 3 – Desenvolvimento e caracterização de sistema fitoterápico microestruturado contendo a fração enriquecida em flavonoides C-heterosídeos de <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul.....		
		137
3.1	INTRODUÇÃO.....	137
3.2	OBJETIVOS.....	137
3.2.1	Objetivo geral.....	137
3.2.2	Objetvos específicos.....	137
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	138
3.3.1	Materiais.....	138
3.3.2	Métodos.....	139
3.3.2.1	Estudos preliminares de formulação.....	139
3.3.2.2	Preparação dos sistemas microparticulados.....	140
3.3.2.2.1	<i>Influência da pressão osmótica sobre a eficiência de encapsulação.....</i>	142
3.3.2.3	Caracterização das formulações.....	142
3.3.2.3.1	<i>Determinação do rendimento das formulações.....</i>	142

3.3.2.3.2 <i>Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica</i>	143
3.3.2.3.3 <i>Morfologia das partículas</i>	143
3.3.2.3.4 <i>Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e teor de flavonoides totais nos sistemas microparticulados</i>	143
3.3.2.3.5 <i>Estudo de liberação dos sistemas microparticulados</i>	144
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	145
3.4.1 Estudo preliminar de formulação	145
3.4.2 Preparação e caracterização dos sistemas microparticulados	148
3.4.2.1 Preparação do sistema microparticulado.....	148
3.4.2.2 Influência da pressão osmótica sobre a eficiência de encapsulação.....	150
3.4.2.3 Caracterização dos sistemas microparticulados.....	151
3.4.2.3.1 <i>Avaliação do tamanho e morfologia das micropartículas</i>	151
3.4.2.3.2 <i>Estudo de liberação dos sistemas microparticulados</i>	154
3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	157
REFERÊNCIAS.....	159
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	167
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	173
REFERÊNCIAS.....	175

APRESENTAÇÃO

A biodiversidade brasileira é uma fonte promissora de inúmeras oportunidades para a inovação, especialmente na área de fármacos e medicamentos. A exploração desses recursos naturais é uma estratégia válida na pesquisa de moléculas ativas para o desenvolvimento de novos fármacos, principalmente se considerarmos que produtos derivados de plantas medicinais forneceram a base para o desenvolvimento da farmacoterapia moderna (NEWMANN; CRAGG, 2007; CRAGG; NEWMANN, 2013; NEWMANN; CRAGG, 2016). Como exemplo, podem ser citados os fármacos ácido salicílico, atropina, efedrina, morfina, digoxina, taxol, vincristina e vinblastina, os quais são de amplo uso na prática clínica, e que evidenciam a importância dos produtos naturais como fonte de pesquisa para novas alternativas terapêuticas (VERPOORTE, 2000; GILANI; RAHMAN, 2005; PATWARDHAN, 2005; CHATTOPADHYAY; NAIK, 2007).

Nas últimas décadas, a depressão tem sido reconhecida como um importante problema de saúde pública (MESSAOUDI et al., 2008; DEAN, KESHAVAN, 2017). O transtorno depressivo maior (TDM) exerce profundo impacto na qualidade de vida dos indivíduos e agrega relevantes efeitos socioeconômicos (PAPAKOSTAS; IONESCU, 2015), ocupando o terceiro lugar entre as principais causas médicas de todo o mundo (WHO, 2008; BRAKOWSKI et al., 2017). Outro fato a ser destacado é que uma grande parcela dos medicamentos atualmente disponíveis para tratamento de distúrbios no SNC possuem efeitos colaterais indesejáveis, como hipotensão e sedação, além de potencial para dependência e abuso (FAVA; KENDLER, 2000; NESTLER, et al., 2002; BROWN et al., 2007; COVINGTON III; VIALOU; NESTLER, 2010; BAHRAMSOLTANI et al., 2015). Ainda nesse contexto, Lobo e colaboradores em 2012 relataram que nenhuma nova classe de medicamentos antidepressivos foi introduzida no mercado em mais de 50 anos (LOBO; NESTLER; COVINGTON, 2012). Dessa forma, a busca de compostos com ação no SNC para o tratamento da depressão continua atual e relevante (PAPAKOSTAS; IONESCU, 2015; KASTER et al., 2016).

Diversos compostos oriundos de plantas medicinais têm demonstrado potencial para pesquisa de novas alternativas para o tratamento da depressão (BAHRAMSOLTANI et al., 2015). Plantas medicinais já são utilizadas para tratamento dessa patologia (EL-ALFY; ABOURASHED; MATSUMOTO, 2012), incluindo plantas que apresentam composição rica em flavonoides, como as espécies de

Passiflora, as quais apresentam evidências científicas que confirmam esse potencial (PETRY et al., 2001; SENA et al., 2009; GAZOLA et al., 2015).

Os flavonoides são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, prevenindo o estresse oxidativo, que é considerado uma das causas de distúrbios que envolvem o sistema nervoso central (SNC) (GROSSO et al., 2013). Pesquisas recentes relataram o potencial dos flavonoides para tratamento de patologias do SNC (MESSAOUDI et al., 2008; JÄGER; SAABY, 2011; WASOWSKI; MARDER, 2012), especialmente considerando os flavonoides do tipo flavona C-glicosídeo (LIU et al., 2015; LIANG et al., 2016; WANG et al., 2016).

Cecropia pachystachya Trécul, espécie de estudo da presente tese, apresenta distribuição na região sul do Brasil, sendo popularmente conhecida como embaúba-prateada (BERG; ROSSELI, 2005). Os extratos aquosos de suas folhas, contém majoritariamente compostos fenólicos, especificamente ácidos fenólicos e flavonoides glicosilados, que frequentemente são relacionados como possíveis responsáveis pelas atividades farmacológicas descritas para essas espécies (VELAZQUEZ et al., 2003; CONSOLINI et al., 2005; CONSOLINI et al., 2006; SCHINELLA et al., 2008; ARAGÃO et al., 2010).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou atividade tipo-antidepressiva para o extrato aquoso de *C. pachystachya* (GAZAL et al., 2014). A partir dessa observação, um dos objetivos desta tese é ampliar o conhecimento acerca da composição química de *C. pachystachya* e investigar o potencial de uma fração rica em flavonoides dessa espécie em modelos de patologias do SNC.

Outro tópico investigado no presente trabalho contempla O desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, sub-área da tecnologia farmacêutica aplicada a matrizes vegetais. Nesse contexto, a microencapsulação fornece alternativas para manutenção da estabilidade, melhora da biodisponibilidade e modulação da liberação no tempo e local desejado (PAULO; SANTOS, 2017). A incorporação de ativos oriundos de plantas medicinais em microesferas atribui diversas vantagens, já tendo sido relatada para alguns metabólitos secundários como rutina, camptotecina, quercetina, e extrato de *Cynara scolymus*, por exemplo (SARAF, 2010; ONWULATA, 2012; GUPTA et al., 2015). Adicionalmente, o tratamento de doenças crônicas, como a depressão, pode ser beneficiado com a possibilidade de modular a liberação do ativo (CASOLARO; 2015).

Dentro desse contexto, os capítulos a seguir irão descrever a investigação química de *C. pachystachya*, com ênfase em flavonoides C-

heterosídeos e seu potencial antidepressivo *in vivo*. Ainda, estudos de formulação contemplando a microencapsulação dos flavonoides de *C. pachystachya* serão abordados com o objetivo de modular a liberação desses compostos.

A partir dos aspectos citados, o capítulo 1 apresenta a revisão da literatura englobando os temas abordados nessa tese, contendo dados da literatura para *Cecropia pachystachya* tais como a descrição da espécie, sua composição química e potencial farmacológico. Ainda, foram abordados aspectos sobre os flavonoides, especialmente os tipo C-heterosídeos. A neurobiologia da depressão e a investigação da atividade tipo-antidepressiva foram brevemente discutidas. Finalizando, foram abordados tópicos que envolvem a tecnologia de sistemas microparticulados para liberação de ativos.

O capítulo 2 contempla o preparo e a caracterização química de uma fração enriquecida em flavonoides C-heterosídeos de *C. pachystachya* (FEF-*Cp*). A padronização da FEF-*Cp* foi apresentada e discutida, tendo sido também avaliado seu potencial no sistema nervoso central. A FEF-*Cp* foi avaliada quanto ao seu potencial tipo-antidepressivo *in vivo* no tratamento agudo e em modelo de estresse crônico moderado.

O trabalho finaliza no capítulo 3 que irá abordar o desenvolvimento de micropartículas contendo a fração enriquecida em flavonoides C-heterosídeos de *C. pachystachya* visando à obtenção de um sistema de liberação controlada com potencial emprego no tratamento da depressão.

Por fim, foram apresentadas considerações finais contemplando os resultados obtidos nesta tese e as conclusões gerais.

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Cecropia pachystachya Trécul

Flavonoides

Aspectos neurofarmacológicos da depressão

Tecnologia de sistemas microparticulados para liberação de ativos

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Cecropia pachystachya* Trécul

O gênero *Cecropia* apresenta cerca de 75 espécies, caracterizadas como árvores pioneiras de clareiras ou beiras de mata, que vivem preferencialmente nas partes úmidas ou semi-úmidas da região neotropical (BERG; ROSSELI, 2005; ROMANIUC-NETO; GAGLIOTI; GUIDO, 2009). Primeiramente descrito na família Moraceae, as espécies desse gênero sofreram diversas reclassificações, as quais passaram desde a criação de uma nova família - Cecropiaceae - por volta dos anos 70 (BERG, 1978), até serem finalmente classificadas na família Urticaceae de acordo com suas características morfológicas e filogenéticas (SYTSMA et al., 2002).

As espécies de *Cecropia* são árvores de médio a grande porte, com folhas largas e lobadas, cuja coloração e textura diferem de acordo com a espécie. Possuem troncos ocos e segmentados, que acabam por conferir alguns de seus nomes populares, como embaúba ou ambay, derivadas da palavra tupi “ambaíba”, que significa “tronco oco” (PIO CORRÊA, 1978; BERG; ROSSELLI, 2005). No Brasil, diversas espécies estão distribuídas desde a região norte, abrangendo a Floresta Amazônica, até as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (BERG; ROSSELI, 2005).

Dentre as espécies de ocorrência no país, destaca-se *Cecropia pachystachya* Trécul, a qual é popularmente conhecida como embaúba-prateada (Figura 1) (PIO CORRÊA, 1978). As árvores dessa espécie apresentam cerca de 5 a 8 metros de altura e lâminas de 20-40 centímetros de diâmetro. *C. pachystachya* é uma espécie amplamente distribuída no Brasil, desde o limite sul da Bacia Amazônica, até a região central e leste do país, estendendo-se até o Paraguai e norte da Argentina. Ocorre em áreas florestadas, desde a restinga até o cerrado, sendo característica de bordas de mata (ROMANIUC-NETO; GAGLIOTI; GUIDO, 2009).

Figura 1: Folha de *Cecropia pachystachya*, à esquerda face adaxial e a direita face abaxial.



Fonte: Flora digital - coleção de imagens de plantas dos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina – Fotógrafo Márcio Verdi (2010).

As folhas de *C. pachystachya* são utilizadas na medicina popular na forma de chá para tratamento de problemas respiratórios como tosse, asma e como expectorante. São encontrados também relatos de uso para o tratamento de doenças do fígado, dores de cabeça, como diurético e fortificante do coração (CONSOLINI; MIGLIORI, 2005; COSTA et al., 2011).

1.1.1 Aspectos biológicos

O gênero *Cecropia* é amplamente utilizado na medicina tradicional sendo que as espécies *C. glaziovii*, *C. obtusifolia*, e a espécie em estudo no presente trabalho *C. pachystachya* são as que apresentam maior número de trabalhos na literatura. As mais recentes investigações pré-clínicas de *C. pachystachya* encontram-se sumarizadas no quadro abaixo (Quadro 1).

Quadro 1: Atividades farmacológicas descritas para *Cecropia pachystachya*.

Extrato e/ou composto bioativo	Atividade biológica	Referência
Extrato em hexano/ β -sitosterol	Anti-inflamatória (<i>in vivo</i>)	HIKAWCVUK et al., 1998
Extrato em etanol/ β -sitosterol e ácido tormêntico	Anti-malárica (<i>in vivo</i>)	UCHOA, 2004
Extrato aquoso	Anti-hipertensiva (<i>in vivo</i>)	CONSOLINI; MIGLIORI, 2005
Extrato aquoso	Cardiotônica (<i>ex vivo</i>) Sedativa (<i>in vivo</i>)	CONSOLINI et al., 2006
Extrato em diclorometano/ ácido pomólico	Anti-inflamatória (<i>in vivo</i>)	SCHINELLA et al., 2008
Extrato em metanol	Antioxidante (<i>in vitro</i>)	VELÁZQUEZ et al., 2003; ARAGÃO et al., 2010
Extrato etanólico e fração acetato de etila	Anti-leishmania (<i>in vitro</i>)	CRUZ et al., 2013
Flavonoides C-glicosídeos	<i>Antifouling</i>	BRANGO-VANEGAS et al., 2014
Fração aquosa a partir de extrato etanólico	Tratamento de lesão crônica renal (<i>in vivo</i>)	MAQUIAVELI et al., 2014
Extrato aquoso	Redução da lesão renal (<i>in vivo</i>)	MAQUIAVELI et al., 2014
Extrato em metanol	Anti-inflamatória tópica (<i>in vivo</i>)	PACHECO et al., 2014
Extrato aquoso	Tipo-antidepressiva (<i>in vivo</i>)	GAZAL et al., 2014
Extrato aquoso	Preventiva em transtorno-bipolar	GAZAL et al., 2015
Géis contendo extrato acetato de etila	Cicatrizante (<i>in vivo</i>)	DUQUE et al., 2016

O efeito de *C. pachystachya* no SNC foi estudado por Gazal e colaboradores (2014; 2015). A atividade tipo-antidepressiva foi observada para o extrato aquoso de *C. pachystachya* (EA-Cp) nas doses

de 400 e 200 mg.kg⁻¹ em modelo de estresse crônico variado (GAZAL et al., 2014). Nesse trabalho, foi relatada a presença de ácido clorogênico e dos flavonoides isoorientina, orientina e isovitexina como compostos majoritários do extrato avaliado. Adicionalmente, parâmetros de estresse oxidativo neurocerebral também foram estudados, tendo sido observado o efeito de prevenção da homeostase bioquímica e do dano oxidativo. Este efeito foi demonstrado nos parâmetros de peroxidação lipídica e na redução do teor total de sulfidrilas e da enzima glutatona peroxidase – no hipocampo e no córtex pré-frontal provocados pelo protocolo de estresse utilizado. Em um outro trabalho (GAZAL et al., 2015), o EA-Cp também apresentou ação preventiva em desordens bipolares por meio da redução do dano oxidativo. Foi observado que o pré-tratamento durante 14 dias com o EA-Cp (200 e 400 mg.kg⁻¹) apresentou efeito preventivo similar ao tratamento com cloreto de lítio (45 mg.kg⁻¹).

A atividade genotóxica do extrato aquoso de *C. pachystachya* foi observada em tecidos cerebrais de camundongos, mas não foi observado potencial mutagênico na medula óssea. Além disso, foi inferido que os compostos presentes no extrato aquoso podem ultrapassar a barreira hemato-encefálica e agir no SNC. Entretanto, cabe destacar que esse estudo foi realizado com doses de 500 – 2000 mg.kg⁻¹, não sendo testadas doses menores (MENDONÇA et al., 2016).

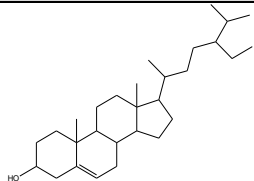
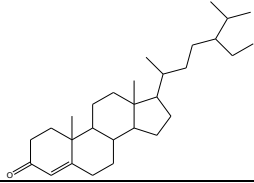
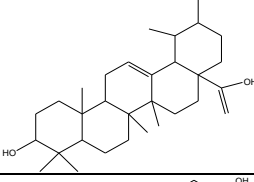
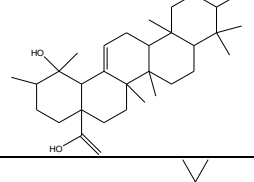
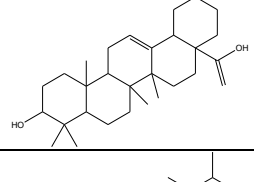
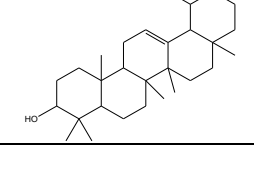
Esses últimos estudos foram realizados por nosso grupo de pesquisa em parceria com pesquisadores de outras IES, e forneceram base científica para a continuidade da investigação do potencial de *C. pachystachya* no SNC.

1.1.2 Composição química

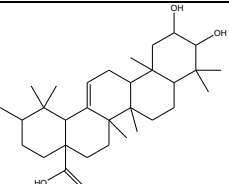
Os metabólitos secundários já descritos para *C. pachystachya* incluem terpenos e esteroides (Quadro 2), e diversas classes de compostos fenólicos (Quadro 3) tais como ácidos fenólicos, flavonoides, catequinas e procianidinas (COSTA et al., 2011). Os quadros abaixo apresentam os compostos relatados para a espécie e algumas de suas características químicas.

Quadro 2: Esteroides e terpenos relatados para *Cecropia pachystachya*.

(continua)

Classe ESTEROIDES E TERPENOS	Fórmula molecular	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Fórmula estrutural
β-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414,715	
Sitostenona	C ₂₉ H ₄₈ O	412,69082	
Ácido ursólico	C ₃₀ H ₅₀ O ₃	458,725	
Ácido pomólico	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472,69972	
Ácido oleanólico	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456,70032	
α-amirina	C ₃₀ H ₅₀ O	426,7174	

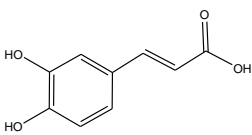
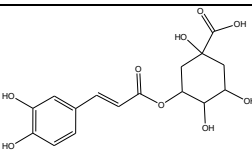
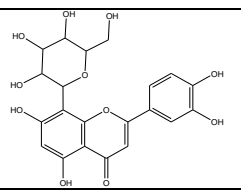
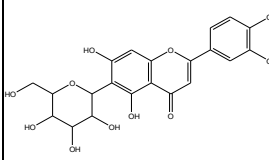
(conclusão)

Ácido tormêntico	$C_{30}H_{48}O_5$	488,69912	
---------------------	-------------------	-----------	---

Fonte: Adaptado de COSTA e colaboradores (2011).

Quadro 3: Compostos fenólicos relatados para *Cecropia pachystachya*.

(continua)

Classe COMPOSTOS FENÓLICOS	Composto	Fórmula molecular/ Massa molecular ($g \cdot mol^{-1}$)	UV máximo (nm)	Fórmula estrutural
Ácidos fenólicos	Ácido cafeico	$C_9H_8O_4$ 180,15742	265 325 442	
	Ácido clorogênico	$C_{16}H_{18}O_9$ 354,30872	265 325	
Flavonoides	Orientina	$C_{21}H_{20}O_{11}$ 448,3769	255 267 293(ombro) 346	
	Isoorientina	$C_{21}H_{20}O_{11}$ 448,3769	242(ombro) 255 271 349	

(conclusão)

	Isovitexina	$C_{21}H_{20}O_{10}$ 432,3775	271 336	
	Isoquercitrina	$C_{21}H_{20}O_{12}$ 464,3763	254 362	
Procianidinas	(+)- Catequina	$C_{15}H_{14}O_6$ 290,26806	280	
	(+)- Epicatequina	$C_{15}H_{14}O_6$ 290,26806	280	
	Procianidina B2	$C_{30}H_{26}O_{12}$ 578,52024	280	
	Procianidina C1	$C_{45}H_{38}O_{18}$ 866,77242	280	

Fonte: Adaptado de COSTA e colaboradores (2011).

Como descrito anteriormente, *C. pachystachya* apresenta diversas classes de compostos fenólicos que são frequentemente associados às atividades farmacológicas descritas para esta espécie. Considerando os flavonoides como compostos majoritários do extrato aquoso de suas folhas (COSTA, et al., 2011), os próximos tópicos irão compreender uma contextualização sobre essa classe de metabólitos secundários bem como seu potencial farmacológico no sistema nervoso central.

1.2 FLAVONOIDES

Presentes quase universalmente em folhas verdes, os flavonoides apresentam como principal função no vegetal a proteção contra a radiação ultravioleta. A resistência dos vegetais a esta radiação, que apresenta baixo comprimento de onda (UV-B: 280-315 nm), é relacionada à presença desses compostos que atuam como filtros de raios UV, conferindo proteção aos tecidos fotossintéticos (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Amplamente distribuídos em frutas, vegetais, sementes e bebidas, como o vinho e chá, os flavonoides estão presentes na alimentação humana há mais de quatro milhões de anos (HAVSTEEN, 2002). Diversos autores descrevem essa classe de compostos como principal fonte de metabólitos nutracêuticos em plantas (GROTEWOLD, 2006). Como característica de compostos fenólicos, os flavonoides atuam como potentes agentes antioxidantes e quelantes de metais, sendo este potencial frequentemente associado às atividades biológicas relatadas para estes compostos (HEIM et al., 2002).

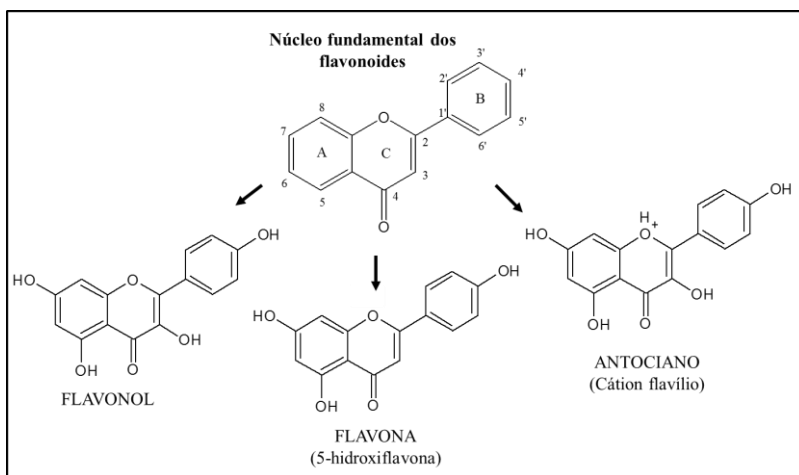
1.2.1 Características químicas

Os flavonoides são compostos derivados dos fenilpropanoides, os quais são conhecidos como unidades formadoras de compostos fenólicos de maior complexidade. A biossíntese nos vegetais ocorre a partir da condensação de duas rotas metabólicas, a do ácido chiquímico e da acetil-CoA, onde, respectivamente, há uma conjugação entre a molécula de 4-cumaril-CoA com três moléculas de malonil-CoA, originando a chalcona, principal composto intermediário da via de biossíntese dos flavonoides subsequentes (HARBONE; MABRY, 1982; ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTO, 2017; ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

O núcleo fundamental dos flavonoides é constituído por 15 átomos de carbono que são distribuídos em três anéis A, C e B do tipo C₆-C₃-C₆

respectivamente (Figura 2), sendo que as diferenças no estado de oxidação do anel C caracterizam as principais classes de flavonoides. A variabilidade estrutural entre estes compostos deve-se à estruturação dos anéis das agliconas, referente principalmente ao seu estado de oxidação/redução, ao seu padrão e posição dos radicais hidroxila, e também às diferenças entre os substituintes dos grupamentos hidroxila (ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTO, 2017; HAVSTEEN, 2002; GROTEWOLD, 2006).

Figura 2: Núcleo fundamental dos flavonoides e principais subclasses.



Fonte: Adaptado de Zuanazzi, Montanha e Zucolotto (2017).

Os flavonoides são geralmente solúveis em água, e apresentam-se normalmente oxigenados e frequentemente conjugados a moléculas de açúcar (heterosídeos). Essa ligação entre o núcleo fundamental, denominado genina ou aglicona, e os açúcares, pode ocorrer por meio de uma hidroxila, originando os flavonoides tipo *O*-heterosídeos ou diretamente ao carbono do esqueleto básico, gerando os flavonoides tipo *C*-heterosídeos (HARBONE; MABRY, 1982; LIU, 2004).

1.2.1 Flavonoides *C*-heterosídeos

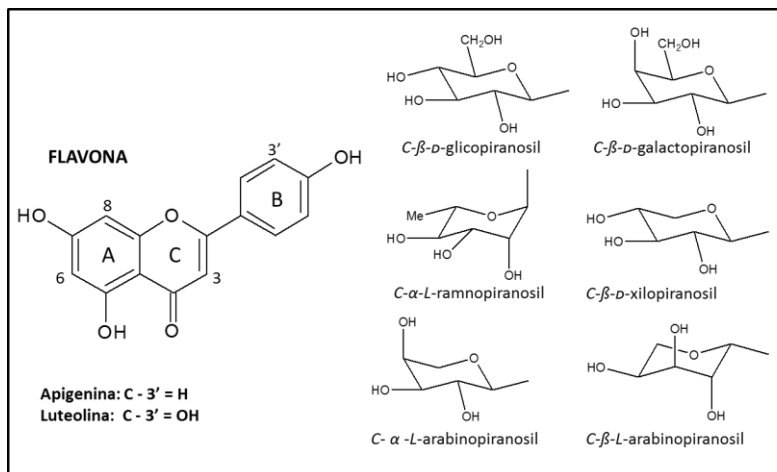
A primeira descoberta destes compostos ocorreu no século XIX com a scoparina em 1851, vitexina em 1898 e saponarina em 1906. Na maioria dos casos, os flavonoides *C*-heterosídeos coexistem com os flavonoides *O*-heterosídeos, e são necessárias técnicas cromatográficas e

espectroscópicas específicas que auxiliem na caracterização destes compostos (CHOPIN; BOUILLANT, 1975; TALHI; SILVA, 2012).

Em função de diferenças biogenéticas e estruturais que as diferem de outros flavonoides, os compostos *C*-heterosídeos de núcleo flavona são mais abundantes na natureza em relação às demais classes, como flavanonas, flavonóis, chalconas, antocianinas, proantocianinas e isoflavonas por exemplo. Nos flavonoides *C*-heterosídeos a ligação do radical heterosídeo ocorre diretamente no carbono anomérico da aglicona, geralmente na posição C-6 ou C-8 do anel A (Figura 3), o que resulta em maior estabilidade química e resistência à hidrólise (TALHI; SILVA, 2012).

O radical heterosídeo é frequentemente constituído de monossacarídeos, embora dissacarídeos e polissacarídeos também sejam relatados, os quais estão comumente associados à classe dos *O*-glicosil-*C*-glicosilflavonoides. A unidade do açúcar pode ocorrer de diferentes formas (Figura 3), como em cadeias de pentose e/ou hexose, anéis de furanose e/ou piranose, com anômeros α ou β e configurações dextrógira (*D*) ou levógira (*L*). Além disso, são encontrados também grupamentos acila ligados à molécula de açúcar e/ou diretamente à aglicona, sendo que estes últimos constituem a classe dos *O*-acil-*C*-glicosilflavonoides (TALHI; SILVA, 2012).

Figura 3: Representações químicas das agliconas e radicais *C*- heterosídeos que compõe a classe dos flavonoides *C*- heterosídeos.



Fonte: Adaptado de Chopin & Dellamonica (1988).

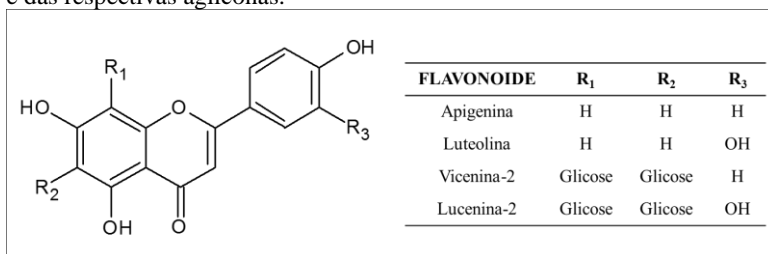
Os flavonoides *C*-heterosídeos naturais podem ser divididos em dois grandes grupos: agliconas não-hidrolisáveis (mono e di-*C*-glicosilflavonoides) e seus derivados hidrolisáveis (*O*-glicosídeos e *O*-acil derivados). Dentre estes estão quatro grupos bem definidos: os mono-*C*-glicosilflavonoides, di-*C*-glicosilflavonoides, *O*-glicosil-*C*-glicosilflavonoides e *O*-acil-*C*-glicosilflavonoides (HARBORNE; MABRY, 1982; ANDERSEN, MARKHAM; 2006).

Considerando a maior ocorrência de flavonas glicosiladas, as informações a seguir serão direcionadas para os derivados desta aglicona.

As flavonas monoglicosiladas representam importante esqueleto químico e têm sido exploradas devido ao seu potencial biológico tanto de suas moléculas naturais quanto de derivados sintéticos e semissintéticos (TALHI; SILVA, 2012; SINGH; KAUR; SILAKARI, 2014). Duas agliconas são comumente encontradas nessa classe, apigenina (4',5,7-trihidroxi-flavona) e luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxi-flavona) (Figura 3), as quais associadas a radicais glicosídeos nas posições C-8 ou C-6 formam os isômeros de posição vitexina/isovitexina e orientina/isorientina, respectivamente, que contribuem para a composição química de diversas espécies vegetais (TALHI; SILVA, 2012).

Os di-*C*-glicosilflavonoides apresentam duas unidades de açúcar ligadas à aglicona, normalmente nas posições C-6 e C-8, e, assim como nas monoglicosilflavonas, as agliconas apigenina e luteolina são as flavonas predominantemente encontradas. Os flavonoides vicenina-2 e lucenina-2, que apresentam o resíduo glicopiranosídeo, são descritos com frequência entre as espécies vegetais (Figura 4). Outros heterosídeos também podem ser citados, como o arabinopiranosídeo que ocorre juntamente como o glicopiranosídeo nas posições C-6 e C-8 da apigenina formando três isômeros de posição, o isoschaftosídeo, schaftosídeo e neoschaftosídeo, assim como os derivados da luteolina, isocarlinosídeo, carlinosídeo e neocarlinosídeo (TALHI; SILVA, 2012).

Figura 4: Estrutura química dos di-*C*-glicosilflavonoides vicenina-2 e lucenina-2 e das respectivas agliconas.



Fonte: Adaptado de Zuanazzi, Montanha e Zucolotto (2017).

No entanto, os flavonoides *C*-glicosídeos são mais frequentemente encontrados na natureza como *O*-glicosil-*C*-glicosilflavonoides (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Contemplando as duas classes anteriormente discutidas, estes compostos apresentam pelo menos uma substituição *O*-glicosídica nas hidroxilas fenólicas da aglicona e/ou ligadas às hidroxilas do radical *C*-glicosídico. Na última década foram descritas sete novas flavonas pertencentes a esta classe, sendo diversos derivados da apigenina substituídos por novos radicais polissacarídicos (TALHI; SILVA, 2012).

Compreendendo as três classes previamente descritas, os *O*-acil-*C*-glicosilflavonoides apresentam um grupamento acila conjugado ao flavonoide *C*-glicosídeo em qualquer posição. Os grupamentos acetila são comumente encontrados em derivados das flavonas e diversos estudos indicam a presença de ésteres de acetila ligados aos resíduos glicosídicos da *C*-glicosilflavona (TALHI; SILVA, 2012).

A identificação dos flavonoides *C*-glicosídeos tem sido aperfeiçoada com o avanço da tecnologia analítica, especialmente na determinação da estrutura e orientação (rotâmeros) dos carboidratos. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) destaca-se como uma relevante ferramenta para separação de misturas complexas desses compostos em extratos vegetais. Entretanto, a literatura carece de maiores informações relativas a esses compostos, visto que a maior parte dos trabalhos utiliza apenas a identificação baseada na espectroscopia de ultravioleta, enquanto resíduos de açúcares e grupamentos acila não podem ser identificados por essa metodologia. Os avanços da cromatografia líquida acoplada à detecção por espectrometria de massas (CLAE/EM) têm constituído ferramenta indispensável na resolução de ambiguidades estruturais, embora para resolução de estruturas complexas métodos espectroscópicos mais sofisticados são necessários. Atualmente a

ressonância magnética nuclear (RMN) de uma e duas dimensões (1D/2D) é uma ferramenta decisiva para determinação final da estrutura química destes compostos (KITE et al., 2006; TALHI; SILVA, 2012).

1.3 ASPECTOS NEUROFARMACOLÓGICOS

1.3.1 Neurobiologia da depressão

Os transtornos de humor estão entre as formas mais prevalentes de doenças mentais. A depressão, em especial, já foi descrita há diversos milênios, pelo termo melancolia – em grego “bílis negra” – e sua primeira descrição documental foi feita por Hippocrates, cerca de 400 a.C. (NESTLER; BARROT; et al., 2002). O transtorno depressivo maior (TDM), de acordo com a Associação Americana de Psiquiatria, é caracterizado como uma doença complexa, multifatorial e heterogênea que afeta cerca de 120 milhões de pessoas no mundo (KESSLER; BROMET, 2013). Dados de 2010 classificaram o TDM como a segunda causa de incapacidade no mundo, correspondendo a 8,2% dos anos vividos com essa morbidade (CZÉH et al., 2016).

A depressão compreende uma síndrome heterogênea de doenças com diferentes causas e fisiopatologias. O critério diagnóstico é baseado em diversos sintomas, tais como irritação, humor deprimido, baixa autoestima, pensamento de culpa/ desesperança/ inutilidade, diminuição ou perda de apetite e atenção, insônia, fadiga, pensamentos suicidas, entre outros, que perduram por mais de duas semanas levando à perturbação do cotidiano (NESTLER; BARROT; et al., 2002). Nesse contexto, o papel do estresse merece destaque. A depressão é frequentemente associada a uma desordem relativa ao estresse, e existe evidência que episódios de depressão ocorrem no contexto de situações de estresse. Entretanto, o estresse por si não é suficiente para causar a doença, que deve ser considerada uma interação entre pré-disposição genética e fatores ambientais. Por fim, é importante destacar que apesar do tema ser extensivamente estudado, o processo neurobiológico que leva à depressão ainda não é completamente compreendido (CZEH et al., 2016).

As principais limitações que envolvem a elucidação dos mecanismos neurobiológicos precisos da depressão residem na sua natureza complexa, heterogenicidade, e também na associação com outras comorbidades psiquiátricas (KRISHNAN; NESTLER, 2008). Evidências crescentes sugerem que os transtornos de humor estariam associados a distúrbios no circuito de recompensa do cérebro. Esse circuito é responsável por orientar a atenção, o consumo de recompensas naturais e garantir a

sobrevivência. Alterações estruturais e funcionais nesse circuito estariam relacionadas a deficiências comportamentais, como os distúrbios de humor (RUSSO; NESTLER, 2013).

A regulação das emoções é coordenada por diversas regiões cerebrais, e diferentemente de outros distúrbios neuropsiquiátricos, como as doenças de Parkinson, Huntington, Alzheimer e a esclerose lateral amiotrófica, onde as lesões patológicas são identificadas em regiões específicas do SNC, não foi possível, até o momento, identificá-las no TDM. Nesse sentido, o conhecimento das funções dessas regiões cerebrais em condições normais permite inferir quais aspectos podem estar relacionados à depressão. O neocórtex e o hipocampo podem mediar aspectos cognitivos, como deficiências de memória e sentimentos de desesperança, culpa e suicídio. O estriado (especialmente o estriado ventral ou o núcleo *accumbens*) e a amígdala são importantes na memória emocional e podem mediar a anedonia, ansiedade e a desmotivação que predominam em muitos pacientes. A região do hipotálamo foi relacionada aos sintomas neurovegetativos, como a perda de apetite, energia, sono e atividades prazerosas (NESTLER et al., 2002).

As estruturas cerebrais mais estudadas no TDM compreendem o núcleo *accumbens*, hipocampo, amígdala basolateral e córtex pré-frontal. De modo geral, alterações estruturais e metabólicas foram identificadas no sistema de recompensa em transtornos de humor. Contudo, considerando a heterogeneidade da doença, os resultados reportados na literatura são frequentemente confrontados no sentido de que, para cada achado positivo, relatos opostos ou nulos são descritos, enfatizando a atenção o cuidado que deve ser tomada na interpretação desses estudos (RUSSO; NESTLER, 2013).

Apesar de extensa literatura em diversos aspectos dos transtornos de humor, a fisiopatologia do TDM permanece imprecisa e ainda não existem marcadores bioquímicos específicos para monitoramento clínico diário dos pacientes (STRAWBRIDGE; YOUNG; CLEARE, 2017). Evidências clínicas sugerem que uma parcela dos pacientes com TDM apresenta características semelhantes às de doenças inflamatórias crônicas, incluindo marcadores neuroinflamatórios (KUNUGI; HORI; OGAWA, 2015). Ainda, a inflamação e o estresse oxidativo parecem influenciar significativamente na neuroprogressão da doença, devido à observação de níveis elevados desses biomarcadores em pacientes deprimidos (BAKUNINA; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2015).

O cérebro apresenta grande vulnerabilidade ao estresse oxidativo, devido à sua elevada utilização de oxigênio e consequente geração de radicais livres, mas com modestas defesas antioxidantes. Nesse contexto,

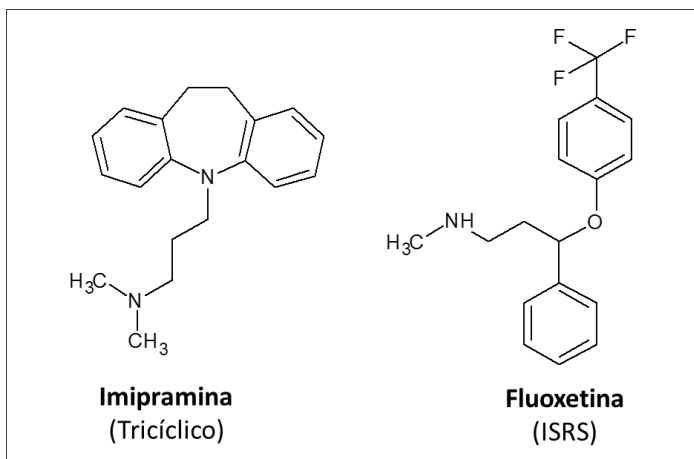
os mecanismos de estresse oxidativo encontram-se envolvidos na patogênese das doenças psiquiátricas. A constituição do tecido cerebral rica em lipídios fornece substratos para a oxidação, além do potencial de redução de certos neurotransmissores. Além disso, a presença de metais, como ferro e cobre, com potencial redox, contribuem para o desequilíbrio oxidativo (NG et al., 2008). Desse modo, deficiências nos níveis sanguíneos das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), e produtos da peroxidação lipídica mais elevados já foram relatados em indivíduos com esta patologia (OZCAN et al., 2004; NG et al., 2008; MORETTI et al., 2012).

1.3.2 Tratamento da Depressão

O tratamento da depressão foi revolucionado há cerca de 60 anos com a descoberta dos antidepressivos tricíclicos (imipramina) (Figura 5) e dos inibidores da monoamina oxidase (iproniazida). A descoberta de que a depressão poderia ser tratada com esses fármacos fornecia um dos primeiros indicativos sobre os tipos de modificações químicas no cérebro que regulam os sintomas depressivos. Com o avanço dos estudos, foi sendo demonstrado que esses fármacos causavam o aumento na concentração extracelular de serotonina e noradrenalina na fenda sináptica, em função do bloqueio da recaptação ou por inibição da monoamina oxidase, principal enzima metabolizadora desses dois neurotransmissores, respectivamente (NESTLER; BARROT; et al., 2002).

Estas descobertas conduziram ao desenvolvimento dos antidepressivos de segunda geração, como os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) (Figura 5), os inibidores da recaptação de noradrenalina (IRN) e os inibidores de ambos (IRNS), os quais são amplamente utilizados (CZÉH et al., 2016). A hipótese mais aceita sobre a neuropatologia do TDM é a do desequilíbrio de monoaminas, que enfatiza o papel do distúrbio da neurotransmissão de monoaminas na fenda sináptica. Contudo, quase todos os antidepressivos disponíveis atualmente possuem o mesmo mecanismo de ação dos antidepressivos tricíclicos, baseados em descobertas casuais que ocorreram há mais de meio século (CZÉH et al., 2016), fato que gera a mesma eficácia que os fármacos mais antigos (NESTLER; BARROT; et al., 2002).

Figura 5: Estruturas químicas de fármacos antidepressivos amplamente utilizados na prática clínica.



Fonte: Adaptado de Rang & Dale (2007)

Apesar das diversas terapias antidepressivas estarem disponíveis para o tratamento da depressão maior, apenas cerca de um terço dos pacientes com TDM atinge remissão da doença, mesmo quando recebem tratamento antidepressivo ideal de acordo com as diretrizes de consenso (STRAWBRIDGE; YOUNG; CLEARE, 2017). Ainda, para cerca de dois terços dos pacientes, os tratamentos atualmente disponíveis não funcionam de forma eficiente, sendo considerados "pacientes resistentes ao tratamento". A depressão resistente ao tratamento (TRD) é definida como a falha na resposta de um ou mais tratamentos antidepressivos padronizados nos parâmetros de dose e duração (PAPAKOSTAS; IONESCU, 2015). Neste contexto, o TRD está associado ao aumento do comprometimento funcional, morbimortalidade, e episódios recorrentes ou crônicos em longo prazo. Para este grupo de pacientes, terapias inovadoras são especialmente essenciais (PAPAKOSTAS; IONESCU, 2015; STRAWBRIDGE; YOUNG; CLEARE, 2017).

Os tratamentos atualmente disponíveis apresentam eficácia e tolerabilidade limitadas, que incluem diversos inconvenientes como retardo no início da ação terapêutica, e efeitos colaterais, que diminuem a adesão do paciente (PAPAKOSTAS; IONESCU, 2015). Além disso, são observados efeitos adversos anticolinérgicos, interações fármaco-fármaco e fármaco-alimento (POTDAR; KIBILE, 2011). Considerando o transtorno depressivo como uma das doenças de maior prevalência e

custo, a necessidade da busca de novas e eficientes alternativas terapêuticas é um tema atual e relevante (EL-ALFY; ABOURASHED; MATSUMOTO, 2012).

1.3.2.1 Potencial neurofarmacológico de plantas medicinais

As plantas medicinais têm sido utilizadas para tratamento de diversos distúrbios psicológicos ao longo do tempo, mas somente nas últimas décadas seu papel foi melhor estabelecido, como por exemplo, por meio do surgimento de evidências clínicas para os fitoterápicos a base da erva-de-são-joão (*Hypericum perforatum*) e kava-kava (*Piper methysticum*) (SARRIS, 2007). Nesse contexto, o trabalho de revisão de El-Alfy, Abourashed e Matsumoto (2012) descreve diversas espécies, que encontram-se em estudos clínicos para tratamento de depressão leve a moderada, como o açafrão (*Crocus sativus*), rodióla (*Rhodiola rosea*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), echium (*Echium amoenum*), e a fórmula chinesa *banxia houpu* que contém cinco plantas *Pinellia ternata*, *Poria cocos*, *Magnolia officinalis*, *Perilla frutescens* e *Zingiber officinale*.

Entre as diversas plantas consideradas ativas, um bom número delas contém alcaloides, compostos conhecidos por interagirem fortemente com receptores no SNC. No entanto, considerando pesquisas mais recentes, fica evidente que os flavonoides podem também desempenhar um papel importante no sistema de enzimas e de receptores em nível cerebral, exercendo diversas atividades no SNC (MESSAOUDI et al., 2008; JÄGER; SAABY, 2011; WASOWSKI; MARDER, 2012).

A atividade tipo antidepressiva, investigada em modelos animais, foi atribuída aos flavonoides presentes em diversas espécies vegetais, como os flavonoides *O*-glicosídeos liquiritina e isoliquiritina (*Glycyrrhiza uralensis*) (WANG et al., 2008; ZHAO et al., 2008) e o flavonoide *C*-glicosídeo isoorientina (*Passiflora edulis* variedade *flavicarpa*) (SENA, 2009). Estudos também evidenciaram atividade neuroprotetora relacionada aos flavonoides presentes na dieta humana, advindos de frutas e vegetais (YOU DIM et al., 2004). Adicionalmente, estes compostos foram indicados como sendo os possíveis responsáveis pelas atividades sedativas de diversas espécies como *Valleriana wallichii*, *V. officinalis* (FERNÁNDEZ et al., 2005), e para o gênero *Passiflora* (PETRY et al., 2001; SENA et al., 2009; GAZOLA et al., 2015).

Os produtos naturais representam uma fonte viável e ainda pouco explorada para a pesquisa de novos agentes terapêuticos, especialmente considerando enfermidades do SNC (EL-ALFY; ABOURASHED;

MATSUMOTO, 2012). Como exemplo pode-se citar os relatos da atividade neurofarmacológica de três espécies de *Cecropia*.

O extrato aquoso das folhas de *C. obtusifolia* apresentou efeitos depressores e analgésicos em camundongos, tendo sido observada diminuição na capacidade exploratória e evasiva, além de promover incoordenação motora e efeito relaxante muscular (PÉREZ-GUERRERO et al., 2001). O extrato aquoso de *C. glaziovii* não demonstrou efeitos ansiolíticos em ratos após tratamento agudo. Esta atividade somente foi observada após tratamento sub-crônico, sendo a fração butanólica 10 vezes mais ativa do que o extrato aquoso (ROCHA et al., 2002). Em outro estudo dos mesmos autores, foi observada a atividade tipo-antidepressiva, e os ensaios biomonitorados *ex vivo* e *in vitro* mostraram que este efeito estaria relacionado com o bloqueio da recaptação de monoaminas, especialmente noradrenalina, sendo os compostos catequina, procianidina B2 e procianidina B3 relatados como os mais ativos (ROCHA et al., 2007).

Especificamente para a espécie em estudo desta tese, *C. pachystachya*, trabalhos na literatura descrevem efeitos no SNC para o extrato aquoso de suas folhas. Consolini e colaboradores (2006) observaram efeito sedativo em camundongos que não foi antagonizado após administração de flumazenil. Mais recentemente, Gazal e colaboradores (2015) relataram o efeito preventivo de transtornos bipolares em ratos, sendo que o extrato aquoso avaliado atuou principalmente na redução do episódio de relapso e no dano oxidativo associado à fase de mania do transtorno bipolar.

Por fim, cabe destacar que em um trabalho realizado em parceria com nosso grupo de pesquisa foi detectado efeito tipo-antidepressivo do extrato aquoso de *C. pachystachya* (GAZAL et al., 2014), conforme previamente mencionado.

1.3.2.2 Modelos animais para pesquisa de alternativas terapêuticas

Os modelos *in vivo* para estudo da depressão incluem desde manipulações genéticas até agentes estressores ambientais, ou ainda a combinação de ambos, visando produzir fenótipos animais que simulem os sintomas de pacientes deprimidos. Esses modelos são utilizados para estudar os mecanismos biológicos que compreendem tais sintomas especialmente para investigar novas estratégias de tratamento (NESTLER; GOULD; et al., 2002).

A utilização dos modelos *in vivo* permite a investigação dos circuitos neurais assim como das vias moleculares e celulares em um ambiente

controlado (WANG et al., 2017). Os protocolos descritos são estabelecidos com base em três conceitos básicos: validade aparente (fenótipo semelhante ao dos seres humanos que apresentam a doença), validade de construto (processos que resultam na patologia humana são abordados no modelo) e validade preditiva (sensibilidade à intervenções farmacológicas e não-farmacológicas efetivas em humanos) (NESTLER; HYMAN, 2010).

Os métodos para avaliação de mudanças comportamentais são fundamentais em modelos de depressão, sendo avaliados aspectos cognitivos e emocionais, como comportamento de desespero, desesperança, sintomas de ansiedade e anedonia (WANG et al., 2017). Os modelos usualmente utilizados para avaliação de fármacos com potencial antidepressivo são relatados no quadro 4.

Quadro 4: Modelos animais usualmente utilizados para avaliação de fármacos com potencial antidepressivo.

Modelo animal	Sintoma simulado do TDM	Vantagens	Desvantagens
Teste do nado forçado	Desespero	Fácil; baixo custo; simples para triagem de fármacos.	Validade baixa; alta variabilidade dependente de fatores (temperatura e profundidade da água, tamanho do cilindro) resultados influenciados por dificuldades motoras.
Teste de suspensão pela pata	Desespero	Baixo custo; simples para triagem de fármacos.	Utilizado somente para camundongos; resultados influenciados por dificuldades motoras.
Teste do campo aberto	Ansiedade. Atividade motora e de locomoção.	Fácil; baixo custo; simples para triagem de fármacos.	Não é específico para depressão, somente ansiedade.
Teste de preferência à sacarose	Anedonia	Baixo custo; simples para triagem de fármacos.	As metodologias de pesagem e medida podem variar entre protocolos.
Bulbectomia olfatória	Anedonia. Redução dos níveis de serotonina no cérebro.	Apresenta diversas alterações neurobiológicas para investigação dos mecanismos dos antidepressivos.	Irreversível; requer extração cirúrgica do bulbo olfatório.
Estresse crônico moderado	Anedonia. Diminuição da sensibilidade aos estímulos de recompensa.	Altamente validado; alterações fenotípicas (comportamentais e fisiológicas) ao longo do protocolo; recomendado para triagem de fármacos.	Protocolo longo e complexo.

Fonte: Adaptado de Wang e colaboradores (2017).

Entre os modelos que envolvem protocolos de estresse, o modelo do estresse crônico moderado (ECM) é extensivamente validado e realista, baseado em um sintoma do TDM, a anedonia (em humanos) e o comportamento tipo-anedônico (em animais). O ECM envolve exposição dos animais a uma série de agentes estressores moderados - privação de água/comida, interrupção do ciclo claro-escuro, isolamento social, entre outros - de modo imprevisível, durante o período de 10 dias até oito semanas (HILL et al., 2012). O paradigma do estresse induz efeitos de longa duração nos parâmetros comportamentais, neuroquímicos, neuroimunes e neuroendócrinos, que se assemelham às disfunções observadas em pacientes deprimidos. Ainda, cabe destacar que o comportamento tipo-anedônico e o déficit no mecanismo de recompensa podem ser revertidos por tratamento antidepressivo crônico, mas não agudo (CZÉH et al., 2016).

1.4 TECNOLOGIA DE SISTEMAS MICROPARTICULADOS PARA LIBERAÇÃO DE ATIVOS

A tecnologia de microencapsulação é explorada em diversas áreas, como nas indústrias têxtil, de alimentos e eletrônica, por exemplo. Entretanto, o setor farmacêutico representa 68% de sua aplicação (PAULO; SANTOS, 2017).

Caracterizadas por serem sistemas micrométricos (1-1000 μm), as micropartículas são capazes de promover uma liberação sustentada, modificada ou controlada de um composto bioativo (FREITAS, MERKLE; GANDER, 2005). Esses sistemas são extensamente investigados no âmbito da administração por via oral (KUMAR et al., 2006; BUILDERS et al., 2008; SANTOS, 2012; SUKSAMRAN et al., 2013).

A microencapsulação pode exercer papel de proteção a compostos lábeis, antes e depois da administração, ou ainda até atingirem sua ação farmacológica, sendo que características específicas destes sistemas podem ser adaptadas com o objetivo de diminuir o efeito que o trânsito intestinal exerce sobre estas, podendo permitir a redução da frequência de doses. Estes sistemas apresentam como grande vantagem a versatilidade na liberação do ativo, oferecendo alternativas para modulação da taxa de liberação, liberação precisa de baixas doses de fármacos potentes, e até redução da concentração do fármaco em outros locais que não os órgãos ou tecidos alvo (BERKLAND et al., 2002; SILVA et al., 2003).

Outros aspectos a serem considerados se referem às modificações das características morfológicas. A redução no tamanho de partícula

promove o aumento da área de superfície do sistema, aumentando sua reatividade com membranas biológicas (AULTON; TAYLOR, 2013). Nesse sentido, partículas menores apresentam maior retenção no trato gastrointestinal, sendo que tamanhos inferiores a 50 μm são considerados ideais para interação com as mucosas gastrointestinais (GOTO et al., 2006).

De acordo com a sua constituição, os sistemas microestruturados podem ser classificados em microesferas, sistemas matriciais nos quais o fármaco se encontra uniformemente disperso e/ou dissolvido numa rede polimérica, e microcápsulas, sistemas reservatório constituídos por um núcleo rodeado por uma membrana ou revestimento. Em uma comparação direta entre os sistemas unitários e as microestruturas, essas podem permitir uma rápida e uniforme distribuição pelo trato gastrointestinal, menor variação na biodisponibilidade e no risco de toxicidade, além da possibilidade de ajuste de dose (SILVA et al., 2003).

Atualmente, a microencapsulação é utilizada no setor farmacêutico para o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada (SLM), com os objetivos de introduzir no mercado produtos inovadores que buscam adequar o ativo para a via de administração, modular a liberação para o local específico e prolongar o tempo de meia-vida, fatores que contribuem para maior adesão do paciente. Para o SLM ser considerado eficiente, o mesmo deve permitir que o ativo alcance e permaneça no local alvo no período desejado (PAULO; SANTOS, 2017). Nesse sentido, certos aspectos devem ser considerados no preparo de sistema microestruturados, como (i) eficiência de encapsulação, (ii) estabilidade do ativo durante o preparo e armazenamento (iii) fácil administração na via escolhida, (iv) liberação controlada que alcance níveis terapêuticos e mínimos efeitos colaterais (TRAN; BENOIT; VENIER-JULIENNE, 2011).

A determinação do tamanho de partícula exerce influência na distribuição do ativo dentro da microestrutura e, conseqüentemente, no perfil de liberação. Em microesferas pequenas (10 – 20 μm) geralmente o fármaco se apresenta homogêneamente distribuído, e nessas partículas são visualizados perfis de liberação mais rápidos devido à maior área superficial (KLOSE et al., 2006). Por outro lado, em partículas de tamanho superior a 40 μm , os fármacos hidrofílicos apresentam a tendência de se distribuir próximo à superfície, já os ativos lipofílicos se deslocam em direção ao núcleo do sistema. Considerando o perfil de liberação nas micropartículas de núcleos maiores, uma liberação mais lenta é observada devido ao maior tamanho da via de difusão dentro da partícula e à diminuição do gradiente de concentração do ativo, e como

estágio final, a degradação da matriz microestruturada também contribui para modulação do perfil de liberação (TRAN; BENOIT; VENIER-JULIENNE, 2011).

De modo geral, a solubilidade do ativo exerce influência no perfil de liberação do sistema. Ativos lipofílicos apresentam liberação frequentemente condicionada à erosão do sistema, levando ao maior controle da taxa de liberação. Porém, para fármacos com características hidrofílicas, mecanismos de difusão são usualmente observados. Nesse contexto, é comum que formulações contendo ativos hidrofílicos apresentem efeito tipo *burst*, sendo visualizada uma liberação inicial rápida em um curto período de tempo, previamente à liberação controlada do sistema (MADERUELO; ZARZUELO; LANA, 2011).

A metodologia geralmente utilizada para microencapsulação tem como base a emulsificação, na qual gotículas de solvente orgânico contendo o polímero e ativo solubilizados formam microesferas a partir da eliminação do solvente. Embora nesse método seja relatada a obtenção de elevada eficiência de encapsulação para moléculas lipofílicas, a encapsulação de ativos hidrofílicos se configura um desafio, considerando que o ativo tende a difundir da fase polimérica para a fase externa previamente à solidificação da micropartícula, levando à baixa eficiência de encapsulação (RAMAZANI et al., 2016).

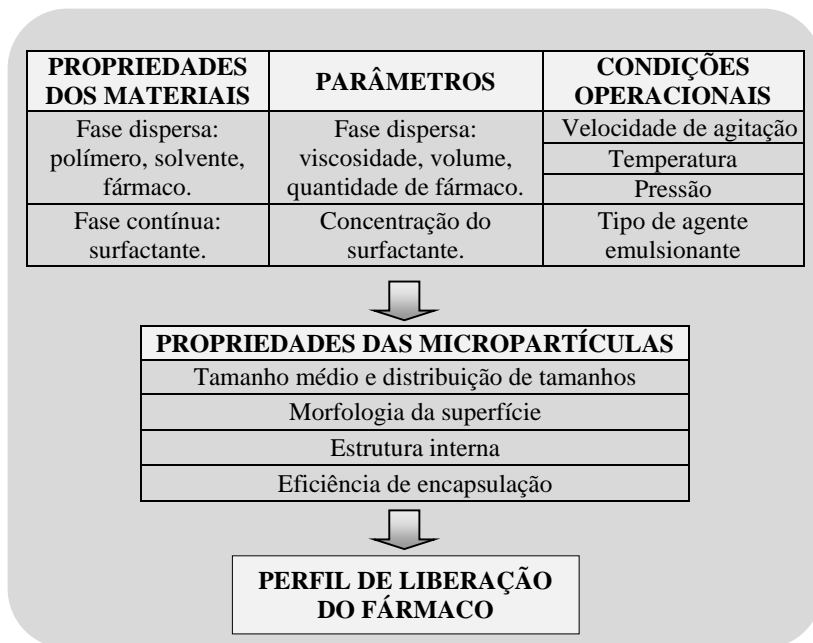
Diferentes estratégias podem ser aplicadas para diminuir o efluxo dos fármacos hidrofílicos para a fase aquosa externa. No sistema de dupla emulsão (a/o/a) por exemplo, a estabilização da emulsão primária (a/o) é um fator importante para encapsulação do ativo, e pode ser aumentada com a adição de tensoativos como o PVA. Entretanto, esses agentes emulsionantes também podem contribuir para o aumento da solubilidade do ativo, contribuindo no efluxo do mesmo para a fase aquosa externa. O aumento da pressão osmótica do sistema pela adição de diferentes sais como NaCl, NaBr, NaSCN, NaClO₄, Na₂SO₄, na fase aquosa externa também é relatado na literatura (RAMAZANI et al., 2016).

Santos (2012), ao avaliar o efeito do aumento progressivo da pressão osmótica sobre as características de microesferas de PLGA contendo extrato padronizado de *Cecropia glaziovii*, observou a formação de micropartículas de superfície lisa e compacta com pouca porosidade, além de redução do tamanho comparado ao sistema sem adição de NaCl na fase aquosa externa da emulsão. Foi descrito também o aumento da eficiência de encapsulação, e maior controle de liberação *in vitro*.

1.4.1 Aspectos gerais na preparação de sistemas microparticulados

Diversos aspectos podem afetar as propriedades físicas das micropartículas, especialmente a natureza dos materiais, parâmetros utilizados no preparo dos sistemas e condições de operação. Os principais fatores são apresentados na figura 6.

Figura 6: Fatores que influenciam as propriedades das micropartículas.



Fonte: Adaptado de Li e colaboradores (2008).

O tamanho e a distribuição de tamanho das micropartículas também são diretamente influenciados pelo tipo de polímero, solvente e técnica utilizada. De modo geral, para todos os processos envolvendo polímeros pré-formados, o estágio inicial é estabelecido pela formação da gota da emulsão que define o tamanho e a distribuição de tamanhos das micropartículas resultantes (TRAN; BENOIT; VENIER-JULIENNE, 2011). Diversos processos são utilizados para formação da gota, como homogeneização, sistema rotor-estator (Ultraturrax[®]), ultrassom e atomização por aspersão (*Spray-Dryer*), por exemplo (FREITAS, MERKLE; GANDER, 2005; LI; ROUAUD; PONCELET, 2008).

Embora essas metodologias sejam relativamente fáceis, a formação das gotas pode ocorrer de forma aleatória levando a uma ampla distribuição de tamanhos. Por isso, o controle da formação da gota é importante para obtenção de um sistema microparticulado monodisperso (TRAN; BENOIT; VENIER-JULIENNE, 2011).

Nesse trabalho, a técnica de dupla emulsão seguida de extração do solvente foi selecionada para encapsulação da FEF-*Cp*, e dessa forma, os seguintes tópicos abordarão maiores detalhes no contexto dessas metodologias.

1.4.1.1 Metodologias

A escolha da técnica para microencapsulação deve levar em consideração as características físico-químicas do ativo, como a solubilidade e estabilidade. Para preparação dos sistemas micrométricos são descritas diversas técnicas, de escala laboratorial a industrial, que são baseadas em modificações de três metodologias básicas: a coacervação fundamentada na separação de fases, secagem por aspersão (*spray-drying*) e extração/evaporação do solvente (FREITAS, MERKLE; GANDER, 2005; DALMORO et al., 2012).

A técnica de emulsão seguida de evaporação do solvente tem sido amplamente descrita (IQBAL et al., 2015). A escolha do método para obtenção de uma encapsulação eficiente é condicionada à solubilidade do ativo. Fármacos hidrofóbicos ou pouco solúveis em água são frequentemente encapsulados via emulsão simples (o/a), que consiste em quatro etapas: (i) dissolução do ativo e do polímero no solvente orgânico; (ii) emulsificação da fase orgânica, denominada de fase dispersa, na fase aquosa, denominada fase contínua; (iii) extração do solvente da fase dispersa pela fase contínua, e em seguida de evaporação do solvente, levando à transformação das gotas dispersas em partículas sólidas; e por fim, (iv) recuperação e secagem das microesferas para eliminação de solventes residuais (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008).

Entretanto, o método anteriormente descrito não é adequado para ativos hidrofílicos, considerando principalmente que a baixa solubilidade em solventes orgânicos e/ou possibilidade de difusão do ativo para a fase contínua durante o processo de emulsificação, resulta em uma baixa eficiência de encapsulação do sistema. Para ativos de caráter hidrofílico são descritas quatro alternativas apresentadas no quadro 5 (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008).

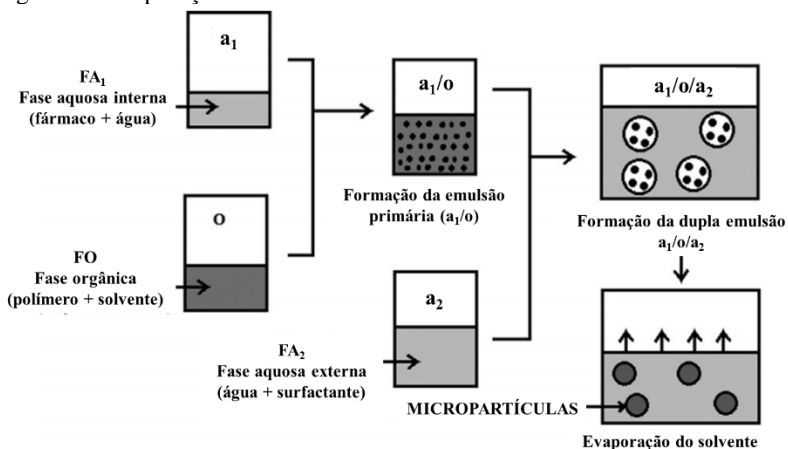
Quadro 5: Métodos para microencapsulação de ativos hidrofílicos.

MÉTODO	PRINCÍPIO
Emulsão simples (o/a) método de dispersão	O ativo na forma sólida é disperso em solução contendo polímero e solvente orgânico.
Emulsão simples (o/a) com adição de co-solvente	Adição de um segundo solvente orgânico para solubilização do ativo.
Emulsão simples (o/o)	A fase aquosa é substituída por uma fase oleosa, como óleo mineral.
Dupla emulsão (a/o/a)	A solução aquosa contendo o ativo é emulsionada na fase orgânica (a/o), e essa emulsão primária é redispersa em uma segunda fase aquosa formando a dupla emulsão (a/o/a).

Fonte: Adaptado de Li e colaboradores (2008).

O método de dupla emulsão apresenta grande capacidade de encapsulação de ativos hidrofílicos, incluindo proteínas e peptídeos. Essa metodologia apresenta como vantagens a possibilidade de controle dos parâmetros do processo e a capacidade de reprodução a partir de ferramentas simples. Na dupla emulsão (a/o/a), a fase aquosa interna é separada da externa por uma camada oleosa (GIRI et al., 2013). A figura 7 ilustra o preparo de micropartículas por dupla emulsão seguida de evaporação do solvente.

Figura 7: Representação da preparação de micropartículas por dupla emulsão seguida de evaporação do solvente.

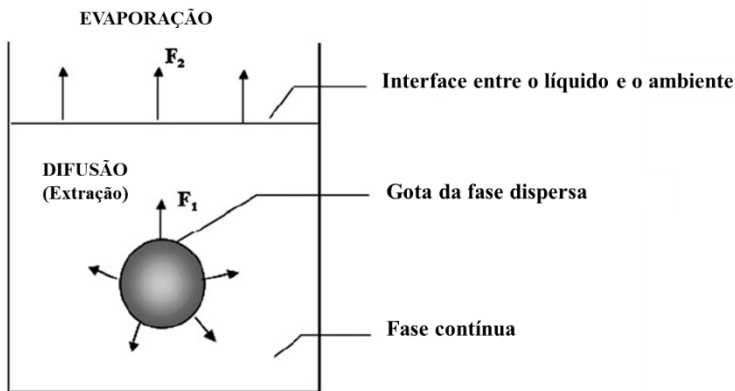


A fase aquosa interna contendo o ativo dissolvido ou suspenso (FA_1) é emulsionada na fase orgânica contendo o polímero dissolvido (FO) formando a emulsão primária (a_1/o). A emulsão primária é redispersa em uma segunda fase aquosa, denominada fase aquosa externa (FA_2), contendo agente emulsificante para formar a dupla emulsão ($a_1/o/a_2$). A remoção do solvente orgânico leva à solidificação das micropartículas.

Fonte: Adaptado de Giri e colaboradores (2013).

A etapa de evaporação do solvente segue dois processos de transferência de massa (Figura 8). Na primeira, ocorre a difusão do solvente contido nas gotas da fase dispersa para a fase contínua (F_1), e em seguida o solvente difunde na fase contínua e evapora para o ambiente (F_2). A solidificação das micropartículas ocorre simultaneamente à evaporação do solvente (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008).

Figura 8: Representação da difusão e evaporação do solvente no método de emulsão/evaporação na preparação de micropartículas.



Fonte: Adaptado de Li e colaboradores (2008).

Após a solidificação, as micropartículas podem ser separadas por filtração ou centrifugação, e devem ser realizados procedimentos de lavagem para retirada de resíduos de tensoativo. Finalmente, as micropartículas podem ser submetidas à secagem por liofilização, por exemplo (GIRI et al., 2013).

1.4.1.2 Materiais

Tendo em vista os diversos aspectos demonstrados na figura 6, a escolha das metodologias assim como dos materiais a serem utilizados na preparação dos sistemas micrométricos deve ser investigada. Na fase dispersa, a escolha do polímero deve considerar o perfil de liberação desejado, que é essencialmente determinado pelas propriedades físicas do polímero (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008). Além disso, a via de administração, e a quantidade de polímero por dose a ser administrada, também devem ser observadas (WHISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008).

Para preparação de micropartículas no âmbito farmacêutico diversos polímeros são utilizados (GIRI et al., 2013; IQBAL et al., 2015). Entre os polímeros mais utilizados podem ser citados o PLA (ácido polilático) que apresenta boas propriedades mecânicas e biocompatibilidade (IQBAL et al., 2015); o PLGA (homopolímeros do ácido lático e do ácido glicólico), amplamente utilizado por ser aceito pelas agências regulatórias dos EUA e da Comunidade Européia para uso humano (WHISCHKE;

SCHWENDEMAN, 2008); o PCL (policaprolactona) apresenta característica biodegradável e biocompatível (IBBAL et al., 2015); os copolímeros do ácido metacrílico e dos ésteres acrilatos; além de diferentes polissacarídeos, tais como celulose e seus derivados, os alginatos e as quitosanas (VASCONCELLOS; GOULART; BEPPU, 2011; KEMALA; BUDIANTO; SOEGIYONO, 2012).

Considerando a classe dos acrilatos, o Eudragit® RS 100 é caracterizado como um copolímero de poli(etilacrilato, metil-metacrilato e cloreto de etil metacrilato de trimetil amônio) com grupamentos amônia quaternários presentes na forma de sal que terminam por conferir maior permeabilidade (Evonik Nutrition & Care GmbH, 2015; PATRA et al., 2017). Esse polímero apresenta a capacidade de intumescer em pH fisiológico, apesar de ser insolúvel (TRAPANI et al., 2007).

De modo geral, os polimetacrilatos são utilizados como agentes formadores de filme para revestimento de cápsulas e comprimidos. Entretanto, diversas aplicações têm sido estudadas para esses polímeros considerando suas propriedades para mascaramento de sabor, aumento da permeação na pele, no epitélio intestinal e córnea, aumento da dissolução e biodisponibilidade, além de possibilidade de modificar a liberação de ativos (PATRA et al., 2017). Cabe ainda ressaltar que esse polímero vem sendo amplamente utilizado para encapsulação de fármacos visando administração por via oral (TRAPANI et al., 2007; CRUZ et al., 2010; ALHNAN; BASIT, 2011; KLEEMANN et al., 2017). Além das características a ele conferidas, outro fator a ser considerado é o baixo custo do Eudragit® em comparação a outros polímeros, como por exemplo, o PLGA.

Com relação às características do solvente, alguns critérios devem ser obedecidos, especialmente na técnica de microencapsulação por evaporação do solvente, como: dissolver adequadamente o polímero, apresentar baixa solubilidade na fase contínua, ser altamente volátil com baixo ponto de ebulição, e possuir baixa toxicidade (FREITAS et al., 2005; GIRI et al., 2013). As propriedades dos solventes frequentemente utilizados nessa técnica estão listados no quadro 6.

Quadro 6: Propriedades dos solventes usualmente utilizados na metodologia de emulsão seguida de evaporação do solvente.

SOLVENTE	PROPRIEDADES		VANTAGENS E DESVANTAGENS
	Temperatura de ebulição	Solubilidade em água	
Clorofórmio	61 °C	8 g/L	Baixa solubilidade em água; maior toxicidade em relação ao diclorometano.
Diclorometano	39,7 °C	20 g/L	Solubilização de diversos polímeros; quase imiscível em água; altamente volátil; alta toxicidade.
Acetato de etila	77 °C	90 g/L	Baixa toxicidade; parcialmente solúvel em água.
Formiato de etila	54 °C	105 g/L	Baixa toxicidade; parcialmente solúvel em água.

Fonte: Adaptado de Li e colaboradores (2008).

Os agentes surfactantes, ou tensoativos, são utilizados para dispersão entre as fases imiscíveis e como estabilizantes. Esses agentes reduzem a tensão superficial da fase contínua, evitam a coalescência e a aglomeração das gotículas, contribuindo para estabilização da emulsão. Os tensoativos mais frequentemente utilizados em sistemas de dupla emulsão incluem o álcool polivinílico (PVA), Tween 80 e Span 80 (IQBAL et al., 2015). No entanto, o PVA é o tensoativo mais utilizado, devido a suas propriedades hidrofílicas e biocompatíveis, assim como boa resistência mecânica, e estabilidade em temperatura e pH (LI et al., 2008; IQBAL et al., 2015).

REFERÊNCIAS

- ALHNAN, M. A.; BASIT, A. W. Engineering polymer blend microparticles: An investigation into the influence of polymer blend distribution and interaction. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1-2, p. 30-36, 2011
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. M. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006
- ARAGÃO, D. M. O.; GUARIZE, L.; LANINI, J.; DA COSTA, J. C.; GARCIA, R. M. G.; SCIO, E. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 629-633, 2010
- AULTON, M. E.; TAYLOR, K. **Aulton's Pharmaceutics**. 4^a ed. 908 p. Churchill Livingstone, 2013
- BAKUNINA, N.; PARIANTE, C. M.; ZUNSZAIN, P. A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, v. 144, n. 3, p. 365-373, 2015
- BERG, C.C.; ROSSELLI, P.F. **Cecropia**. New York: Flora Neotropica / The New York Botanical Garden, 2005
- BRANGO-VANEGAS, J.; COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; ARÉVALO-FERRO, C.; CASTELLANOS, L. Glycosylflavonoids from *Cecropia pachystachya* Trécul are quorum sensing inhibitors. **Phytomedicine**, v. 21, n. 5, p. 670-675, 2014
- BERKLAND, C.; KIM, K.; PACK, D. W. PLG Microsphere Size Controls Drug Release Rate Through Several Competing Factors. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 7, p. 1055-1062, 2003
- BUILDERS, P. F.; KUNLE, O. O.; OKPAKU, L. C.; BUILDERS, M. I.; ATTAMA, A. A.; ADIKWU, M. U. Preparation and evaluation of mucinated sodium alginate microparticles for oral delivery of insulin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 3, p. 777-783, 2008

CHOPIN, J.; BOUILLANT, M. L. **C-glycosylflavonoids**. In HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. *The Flavonoids*. 1 ed. Londres: Chapman and Hall Ltd, 1975.

CHOPIN, J. DELLAMONICA, G. **C-glycosylflavonoids**. In HARBORNE, J. B. *The flavonoids: Advances in Research since 1980*. 1 ed. Londres: Chapman and Hall Ltd, 1988.

CONSOLINI, A. E.; MIGLIORI, G. N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 417-422, 2005

CONSOLINI, A. E.; RAGONE, M. I.; MIGLIORI, G. N.; CONFORTI, P.; VOLONTÉ, M. G. Cardiostimulant and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 90-96, 2006

COSTA, G. M.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. **Natural product communications**, v. 6, n. 6, p. 913-920, 2011

CRUZ, E. D. M.; DA SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. D. C.; ALVES, E. S. S.; LUCON JR, J. F.; REIS, M. B. G. D.; TOLEDO, C. E. M. D.; CRUZ, F. G.; VANNIER-SANTOS, M. A. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**, v. 89, n. 0, p. 71-77, 2013

CRUZ, L.; ASSUMPÇÃO, E.; ANDRADE, S. F.; CONRADO, D. J.; KULKAMP, I. C.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Gastroresistant microparticles containing sodium alendronate prevent the bone loss in ovariectomized rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 5, p. 441-447, 2010

CZÉH, B.; FUCHS, E.; WIBORG, O.; SIMON, M. Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 293-310, 2016

DALMORO, A.; BARBA, A. A.; LAMBERTI, G.; D'AMORE, M. Intensifying the microencapsulation process: Ultrasonic atomization as

aninnovative approach. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 471–477, 2012

DUQUE, A. P.; PINTO, N. De C.; MENDES, R. De F.; DA SILVA, J. M.; ARAGÃO, D. M.; CASTAÑON, M. C.; SCIO, E. In vivo wound healing activity of gels containing *Cecropia pachystachya* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 128-138, 2016

EL-ALFY, A.T.; ABOURASHED, E. A.; MATSUMOTO, R. R. Nature against depression. **Current Medicinal Chemistry**; v, 19, n. 14, p.2229-2241, 2012

Evonik Nutrition & Care GmbH, EUDRAGIT® RL 100, EUDRAGIT® RL PO, EUDRAGIT® RS 100 and EUDRAGIT® RS PO **Technical Information**, 2015.

FERNÁNDEZ, S. P.; WASOWSKI, C.; PALADINI, A. C.; MARDER, M. Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. **European Journal of Pharmacology**, v. 512, n. 2-3, p. 189-198, 2005

FLORA DIGITAL. coleção de imagens de plantas dos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Disponível em: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php?pag=buscar_mini.php

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 2, p. 313-332, 2005

GAZAL, M.; KAUFMANN, F. N.; ACOSTA, B. A.; OLIVEIRA, P. S.; VALENTE, M. R.; ORTMANN, C. F.; STURBELLE, R.; LENCINA, C. L.; STEFANELLO, F. M.; KASTER, M. P.; REGINATTO, F. H.; GHISLENI, G. Preventive Effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. **Neurochemical Research**, 2015

GAZAL, M.; ORTMANN, C. F.; MARTINS, F. A.; STRECK, E. L.; QUEVEDO, J.; DE CAMPOS, A. M.; STEFANELLO, F. M.; KASTER, M. P.; GHISLENI, G.; REGINATTO, F. H.; LENCINA, C. L.

Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. **Brain Research Bulletin**, v. 108, n. 0, p. 10-17, 2014

GAZOLA, A. C.; COSTA, G. M.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, F. A.; REGINATTO, F. H.; LIMA, T. C. M.; SCHENKEL, E. P. Involvement of GABAergic pathway in the sedative activity of apigenin, the main flavonoid from *Passiflora quadrangularis* pericarp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 158-163, 2015

GIRI, T. K.; CHOUDHARY, C.; AJAZUDDIN, A. A.; BADWAIK, H.; TRIPATHI, D. K. Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 125–141, 2013

GOTO, T.; MORISHITA, M.; KAVIMANDAN, N. J.; TAKAYAMA, K.; PEPPAS, N. A. Gastrointestinal Transit and Mucoadhesive Characteristics of Complexation Hydrogels in Rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 2, p. 462-469, 2006

GROTEWOLD, E. (ed.) **The science of flavonoids**. Nova York: Springer, 2006

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. **The flavonoids: Advances in Research**. 1 ed. Londres: Chapman and Hall Ltd, 1982.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002

HIKAWCZUK, V.J.; SAAD, J. R.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A. O.; GIORDANO, O. S. Anti-inflammatory activity of compounds isolated

from *Cecropia pachystachya*. **Anales de la Asociación Química Argentina**, 86, 167-170, 1998

HILL, M. N.; HELLEMANS, K. G. C.; VERMA, P.; GORZALKA, B. B.; WEINBERG, J. Neurobiology of chronic mild stress: Parallels to major depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 9, p. 2085-2117, 2012

IQBAL, M.; ZAFAR, N.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 173-190, 2015

JÄGER, A. K.; SAABY, L. Flavonoids and the CNS. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1471-1485, 2011

KEMALA, T.; BUDIANTO, E.; SOEGIYONO, B. Preparation and characterization of microspheres based on blend of poly(lactic acid) and poly(ϵ -caprolactone) with poly(vinyl alcohol) as emulsifier. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 103-108, 2012

KESSLER, R. C.; BROMET, E. J. The epidemiology of depression across cultures. **Annual Review of Public Health**, v. 34, p. 119-138, 2013

KLEEMANN, C. R.; SANTOS, T. C.; TAVARES, L.; PIZZOLATTI, M. G.; CAMPOS, A. M. Development and Characterization of Synthetic Chalcones-Loaded Eudragit RS 100 Microparticles for Oral Delivery. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 6, p. 1074-1080, 2017

KITE, G. C.; PORTER, E. A.; DENISON, F. C.; GRAYER, R. J.; VEITCH, N. C.; BUTLER, I.; SIMMONDS, M. S. J. Data-directed scan sequence for the general assignment of C-glycosylflavone O-glycosides in plant extracts by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, n. 1-2, p. 123-131, 2006

KLOSE, D.; SIEPMANN, F.; ELKHARRAZ, K.; KRENZLIN, S.; SIEPMANN J. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, n. 2, p. 198-206, 2006

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008

KUMAR, A.; LAHIRI, S. S.; SINGH, H. Development of PEGDMA: MAA based hydrogel microparticles for oral insulin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, n. 1-2, p. 117-124, 2006

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 26-39, 2008

MAQUIAVELI, C. C.; DA SILVA, E. R.; ROSA, L. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; LUCON JÚNIOR, J. F.; SILVA, C. G. A.; CASARINI, D. E.; RONCHI, F. A.; COIMBRA, T. M. Cecropia pachystachya extract attenuated the renal lesion in 5/6 nephrectomized rats by reducing inflammation and renal arginase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, n. PART A, p. 49-57, 2014

MESSAOUDI, M.; BISSON, J. F.; NEJDI, A.; ROZAN, P.; JAVELOT, H. Antidepressant-like effects of a cocoa polyphenolic extract in Wistar-Unilever rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 11, n. 6, p. 269-276, 2008

MENDONÇA, E. D.; DA SILVA, J.; DOS SANTOS, M. S.; CARVALHO, P.; PAPKE, D. K.; ORTMANN, C. F.; PICADA, J. N.; REGINATTO, F. H.; FERRAZ, F. B. A. Genotoxic, mutagenic and antigenotoxic effects of Cecropia pachystachya Trécul aqueous extract using in vivo and in vitro assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 4, n. 193, p. 214-220, 2016

MORETTI, M.; COLLA, A.; DE OLIVEIRA BALEN, G.; DOS SANTOS, D. B.; BUDNI, J.; DE FREITAS, A. E.; FARINA, M.; SEVERO RODRIGUES, A. L. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 3, p. 331-340, 2012

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002

NESTLER, E.J., HYMAN, S.E. Animal models of Neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**. v. 13, n. 10, p. 1161-1169, 2010

NESTLER, E. J.; GOULD, E.; MANJI, H. Preclinical models: Status of basic research in depression. **Biological Psychiatry**, v. 52, n. 6, p. 503-528, 2002

NG, F.; BERK, M.; DEAN, O.; BUSH, A. I. Oxidative stress in psychiatric disorders: Evidence base and therapeutic implications. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 6, p. 851-876, 2008

OZCAN, M. E.; GULEC, M.; OZEROL, E.; POLAT, R.; AKYOL, O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 19, n. 2, p. 89-95, 2004

PACHECO, N. R; PINTO, N. C. C.; SILVA, J. M.; MENDES, R. F.; COSTA, J. C.; ARAGÃO, D. M. O.; CASTAÑON, M. C. M. N.; SCIO, E. Cecropia pachystachya: A Species with Expressive In Vivo Topical Anti-Inflammatory and In Vitro Antioxidant Effects. **BioMedical Research International**; p. 1-10, 2014

PAPAKOSTAS, G. I., IONESCU, D. F. Towards new mechanisms: an update on therapeutics for treatment-resistant major depressive disorder. **Molecular Psychiatry**, p. 1–9, 2015

PAULO, F.; SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Material Science & Engineering C**, v. 1, n. 77, p. 1327-1340, 2017

PATRA, C. N., PRIYA, R., SWAIN, S., KUMAR, J. G., PANIGRAHI, K. C., GHOSE, D. Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Future Journal of Pharmaceutical sciences**, 2017, doi: 10.1016/j.fjps.2017.02.001.

PÉREZ-GUERRERO, C.; HERRERA, M. A. D.; ORTIZ, R.; ALVAREZ DE SOTOMAYOR, M. A.; FERNÁNDEZ, M. A. A. A pharmacological

study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 279-284, 2001

PETRY, R. D.; REGINATTO, F.; DE-PARIS, F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J. B.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; ORTEGA, G. G.; SCHENKEL, E. P. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytoterapy Research**, v. 15, p. 162–164, 2001

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 200-212, 1978

POTDAR, V.H.; KIBILE, S. J. Evaluation of antidepressant-like effect of *Citrus maxima* leaves in animal models of depression. **Iranian Journal Basic Medical Sciences**. v. 14, p. 478–483, 2011

RANG, H.P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **FARMACOLOGIA**, 6^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2007

ROCHA, F. F.; LAPA, A. J.; DE LIMA, T. C. M. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glaziovii* Sneth in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 1–2, p. 183-190, 2002

ROMANIUC-NETO, S.; GAGLIOTI, A. L.; GUIDO, B. M. O. *Urticaceae* Juss. do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Hoehnea** 36(1): 193-205, 2009

RUSSO; S. J.; NESTLER, E. J. The brain reward circuitry in mood disorders. **Nature Reviews in Neuroscience**, v.14, p. 609-625, 2013

SARRIS, J. Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: A systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 8, p. 703-716, 2007

SANTOS, T. C. **Microesferas contendo extrato padronizado de *Cecropia glaziovii* para o tratamento da hipertensão arterial**. 2012. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis

SANTOS, T. C. **Desenvolvimento e caracterização de sistema fitoterápico nanoestruturado de *cecropia glaziovii* snethl para o**

tratamento do herpes labial. 2016. Tese de Doutorado - Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis

SENA, L. M.; ZUCOLOTTI, S. M.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; DE LIMA, T. C. Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis* flavicarpa degener: putative involvement of C-glycosylflavonoids. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 8, p. 967-975, 2009

SINGH, M.; KAUR, M.; SILAKARI, O. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 84, p. 206-239, 2014

SCHINELLA, G.; AQUILA, S.; DADE, M.; GINER, R.; DEL CARMEN RECIO, M.; SPEGAZZINI, E.; DE BUSCHIAZZO, P.; TOURNIER, H.; RÍOS, J. L. Anti-Inflammatory and Apoptotic Activities of Pomolic Acid Isolated from *Cecropia pachystachya*. **Planta Med**, v. 74, n. EFirst, p. 215-220, 17.03.2008 2008

SENA, L. M. **Atividade neurofarmacológica do pericarpo dos frutos de *passiflora edulis* variedade flavicarpa degener (maracujá) em camundongos: envolvimento de flavonoides c-glicosídeos.** Florianópolis: Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, 2009, 164p. (Tese de Doutorado).

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 1-20, 2003

SYTSMA, K. J.; MORAWTZ, J.; PIRES, J. C.; NEPOKROEFF, M.; CONTI, E.; ZJHRA, M.; HALL, J. C.; CHASE, M. W. Urticalean rosids: circumscription, rosid ancestry, and phylogenetics based on *RBCL*, *TRNL-F*, and *NDHF* sequences. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 1531-1546, 2002

STRAWBRIDGE, R., YOUNG, A. H., CLEARE; A. J. Biomarkers for depression: recent insights, current challenges and future prospects. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.13, p.1245-1262, 2017

SUKSAMRAN, T.; NGAWHIRUNPAT, T.; ROJANARATA, T.; SAJOMSANG, W.; PITAKSUTEEPONG, T.; OPANASOPIT, P. Methylated N-(4-N,Ndimethylaminocinnamyl) chitosan-coated electrospray OVA-loaded microparticles for oral vaccination. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 448, n. 1, p. 19- 27, 2013.

TALHI, O.; SILVA, A. M. S. Advances in C-glycosylflavonoid research. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 859-896, 2012

TRAN, V-T.; BENOIT, J-P.; VENIER-JULIENNE, M-C. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, n. 1-2, 4, p. 1-11, 2011

TRAPANI, A. LAQUINTANA, V.; DENORA, N.; LOPEDOTA, A.; CUTRIGNELLI, A.; FRANCO, M.; TRAPANI, G.; LISO, G. Eudragit RS 100 microparticles containing 2hydroxypropyl- β -cyclodextrin and glutathione: Physicochemical characterization, drug release and transport studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 1, p. 64-74, 2007

UCHOA, V. T. **Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações das espécies *Cecropia pachystachya* Trécul. (Cecropiaceae) e *Ximения americana* L. (Olacaceae) e o estudo fitoquímico das *C. pachystachya* guiado pelo bioensaio antimalárico in vivo.** MSc Thesis, Federal University of Alagoas, Recife, Brazil. 2004

VASCONCELLOS, F. C.; GOULART, G. A. S.; BEPPU, M. M. Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications. **Powder Technology**, v. 205, n. 1- 3, p. 65-70, 2011

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO, P.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1-2, p. 91-97, 2003

WASOWSKI, C.; MARDER, M. Flavonoids as GABAA receptor ligands: the whole story? **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 4, p. 24-49, 2012

WANG, W.; HU, X.; ZHAO, Z.; LIU, P.; HU, Y.; ZHOU, J.; ZHOU, D.; WANG, Z.; GUO, D.; GUO, H. Antidepressant-like effects of liquiritin and isoliquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in the forced swimming test and tail suspension test in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 5, p. 1179-1184, 2008

WANG, S.; YU, Y.; FENG, Y.; ZOU, F.; ZHANG, X.; HUANG, J.; ZHANG, Y.; ZHENG, X.; HUANG, X. F.; ZHU, Y.; LIU, Y. Protective effect of the orientin on noise-induced cognitive impairments in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 1, n. 296, p. 290-300, 2016

WHISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 298–327, 2008

YODIM, K. A.; QAISER, M. Z.; BEGLEY, D. J.; RICE-EVANS, C. A.; ABBOTT, N. J. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 5, p. 592-604, 2004

ZHAO, Z.; WANG, W.; GUO, H.; ZHOU, D. Antidepressant-like effect of liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in chronic variable stress induced depression model rats. **Behavioural Brain Research**, v. 194, n. 1, p. 108-113, 2008

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, S. M. **Flavonoides**. In SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed 2017.

Capítulo 2

Investigação fitoquímica, estudos de estabilidade e avaliação da atividade tipo-antidepressiva de *Cecropia pachystachya*

CAPÍTULO 2 – Investigação fitoquímica, estudos de estabilidade e avaliação da atividade tipo-antidepressiva de *Cecropia pachystachya* Trécul

2.1 INTRODUÇÃO

Espécies de *Cecropia* (*C. glaziovii* e *C. pachystachya*) são os objetivos de estudo do nosso grupo de pesquisa há mais de 10 anos. Nesse período foram realizadas investigações considerando o perfil químico dos extratos aquosos e ensaios do potencial farmacológico (SILVA et al., 2010; COSTA et al., 2011; PETRONILHO et al., 2011; BRANGOVANEGAS et al., 2014; COSTA et al., 2014; GAZAL et al., 2015; MÜLLER et al., 2016; SANTOS et al., 2016; SANTOS et al., 2017). Com base nesses trabalhos, é possível afirmar que *C. pachystachya* apresenta composição química mais rica em flavonoides do ponto de vista qualitativo e quantitativo em relação à *C. glaziovii*.

Sob o ponto de vista da constituição química, o extrato aquoso de *C. pachystachya* (EA-*Cp*) apresenta como compostos majoritários ácido clorogênico e o flavonoide C-glicosídeo isoorientina. Também foram descritos os flavonoides orientina, isovitexina e isoquercitrina (COSTA et al., 2011).

Os flavonoides são conhecidos por suas propriedades antioxidantes prevenindo o estresse oxidativo, que é considerado uma das causas dos distúrbios que envolvem o SNC (GROSSO et al., 2013). Pesquisas recentes relataram o potencial farmacológico dos flavonoides em patologias do SNC (MESSAOUDI et al., 2008; JÄGER; SAABY, 2011; WASOWSKI; MARDER, 2012), especialmente considerando os flavonoides do tipo flavona C-glicosídeo (LIU et al., 2015; LIANG et al., 2016; WANG et al., 2016).

Adicionalmente, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa em parceria com pesquisadores da UNESC e da UFPEL demonstraram o potencial do EA-*Cp* no SNC (GAZAL et al., 2014; 2015). Nesse trabalho, foi observada atividade tipo-antidepressiva do EA-*Cp* nas doses de 200 e 400 mg.kg⁻¹, em modelo animal de estresse crônico variado. Os resultados indicaram que esse efeito estaria associado ao potencial neuroprotetor dos constituintes fenólicos presentes no EA-*Cp*, especialmente os flavonoides C-heterosídeos. Nesse mesmo trabalho, parâmetros de estresse oxidativo neurocerebral também foram avaliados, tendo sido observado efeitos preventivos na homeostase bioquímica e nos danos oxidativos. Tais efeitos foram demonstrados por meio da avaliação de parâmetros da peroxidação lipídica – prevenção do aumento de TBARS, e da redução

do teor total de sulfidrilas e da enzima glutationala peroxidase – no hipocampo e no córtex pré-frontal (GAZAL et al., 2014).

Considerando que, (i) nosso grupo de pesquisa desenvolveu frações enriquecidas em flavonoides *C*-heterosídeos a partir de folhas de *C. glaziovii* e *C. pachystachya* (COSTA et al., 2011), (ii) que sob o ponto de vista tecnológico estas frações apresentam vantagens em relação aos extratos de origem, (iii) que o maior teor dos constituintes majoritários pode permitir uma redução na dose necessária para garantir a efetividade terapêutica, e (iv) para destas frações foi detectada uma atividade tipo-antidepressiva (GAZAL et al., 2014), o presente capítulo descreve o desenvolvimento e a caracterização química detalhada de uma fração enriquecida em flavonoides *C*-heterosídeos de *C. pachystachya* (FEF-*Cp*) e a avaliação do seu potencial antidepressivo em dois modelos animais.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar uma fração enriquecida em flavonoides *C*-heterosídeos de *Cecropia pachystachya* e avaliar a atividade tipo-antidepressiva *in vivo*.

2.2.2 Objetivos específicos

- Padronizar o desenvolvimento de uma fração enriquecida em flavonoides *C*-glicosídeos (FEF-*Cp*).
- Caracterizar quimicamente a FEF-*Cp* em relação ao perfil qualitativo e quantitativo por HPLC/DAD e LC/QTOF.
- Realizar experimentos para avaliação da estabilidade da FEF-*Cp* considerando estudos de estresse e de estabilidade acelerada.
- Avaliar o efeito agudo da administração da FEF-*Cp* em ratos frente aos parâmetros comportamentais, inflamatórios e de estresse oxidativo.
- Avaliar o efeito da FEF-*Cp* no comportamento tipo-antidepressivo de ratos submetidos ao modelo de estresse

crônico moderado, e frente aos parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético cerebral.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Materiais

A resina de troca iônica Amberlite® XAD-16 e os padrões analíticos de isoorientina (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-6-glucoside, ≥ 98.0), orientina (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-8-glucoside, $\geq 98.0\%$) e isovitexina (4',5,7-trihydroxyflavone-6-glucoside, ≥ 98.0) foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA). Acetonitrila grau HPLC (TEDIA®, Brasil). Ácido acético, álcool *n*-butílico, álcool metílico e outras substâncias e solventes utilizados foram de grau analítico. A água ultrapura foi obtida pelo sistema de filtração MilliQ (Millipore®, EUA).

2.3.2 Caracterização da matéria-prima vegetal

Folhas de *Cecropia pachystachya* Trécul foram coletadas no município de Torres, Estado do Rio Grande do Sul. O material testemunho está depositado no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN 150025).

Após a coleta, as folhas foram secas em estufa de ar circulante (35 – 40 °C) durante três dias, e posteriormente moídas em moinho de facas (MACMONT®) com malha de 3 mm. A droga vegetal foi acondicionada em sacos de papel pardo de duas camadas e armazenada ao abrigo da luz e da umidade. A avaliação do teor de umidade da matéria-prima vegetal foi realizada pela técnica da perda por dessecação (BRASIL, 2010).

2.3.3 Desenvolvimento de uma fração enriquecida em flavonoides C-heterosídeos (FEF-Cp)

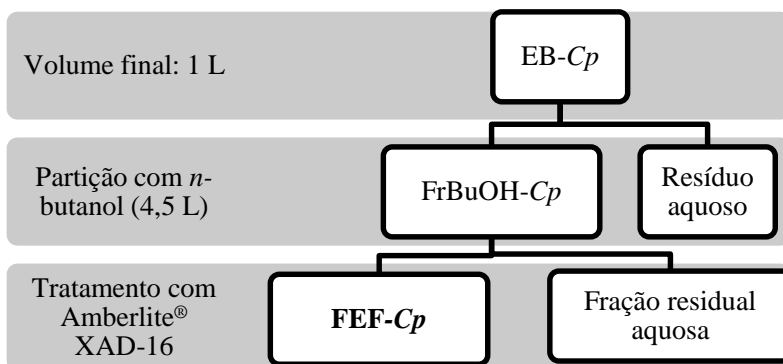
Considerando a necessidade de obtenção de quantidade suficiente de material para os estudos *in vivo* e tecnológicos, o desenvolvimento da fração enriquecida foi adaptada e otimizada a partir de Costa et al. (2011).

Para isso a metodologia de extração foi realizada por turbolização (Ultra-Turrax T25 basic IKA®) utilizando etanol 20% como líquido extrator na proporção de 5% (m/v), velocidade de agitação de 9500 rpm, durante o período de 5 minutos. Cada processo extrativo foi realizado duas vezes (1,5 L de EtOH 20% – 75 g de planta) totalizando um volume final de 3 L de extrato bruto hidroalcoólico (EB-Cp). Em seguida, o EB-

Cp foi ultracentrifugado (4000 rpm), filtrado, desalcoolizado em evaporador rotatório a 40 °C até volume final de 1 L.

O EB-*Cp* concentrado (1 L) foi submetido então à extração líquido-líquido com *n*-butanol (9 x 500 mL) resultando em 4,5 L de fração *n*-butanólica (FrBuOH-*Cp*). Após a remoção do solvente em evaporador rotatório, a FrBuOH-*Cp* foi ressuspensa em água e tratada com resina Amberlite® XAD-16, na proporção de 1:20:200 (FrBuOH-*Cp*:resina:água; m/m/V) durante 1 hora sob agitação magnética. Em sequência, a resina foi filtrada e os compostos adsorvidos extraídos com metanol (1:200; FrBuOH-*Cp*:metanol; m/V) durante 30 minutos para obtenção da fração enriquecida em flavonoides *C*-heterosídeos (FEF-*Cp*). O metanol foi eliminado em evaporador rotatório, e a secagem final da FEF-*Cp* foi realizada por liofilização. O fluxograma deste procedimento resumido está demonstrado na Figura 9.

Figura 9: Fluxograma representativo do fracionamento e obtenção da FEF-*Cp*.



2.3.4 Análise do perfil químico da FEF-*Cp* por CLAE/DAD

O perfil cromatográfico qualitativo e o teor de flavonoides totais foi determinado por CLAE/DAD de acordo com metodologia previamente descrita e validada por Costa et al. (2011). Foi realizada uma co-validação do método analítico, utilizando o padrão analítico externo de isoorientina para construção da curva de calibração. A linearidade do método compreendeu as concentrações de 0,585 – 500 µg/mL, sendo utilizada para quantificação a equação: $y = 19523x - 64494$ ($r = 0,9997$). Os limites

de detecção e quantificação foram de 0,292 e 0,585 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Para realização das análises foi utilizado cromatógrafo PerkinElmer Série 200 equipado com detector de arranjo de diodos, bomba quaternária, desgaseificador e autoamostrador. Os dados foram processados no software Chromera[®] (Version 3.2.0.4847). Como fase estacionária foi utilizada uma coluna Brownlee[®] Choice C-18 (150 \times 4,6 mm i.d.; 5 μm) e como fase móvel um gradiente combinado de acetonitrila (A) e solução aquosa de ácido acético 1% (pH = 3) (B) nas seguintes condições: 0-30 minutos gradiente linear de A-B (5:95 v/v) para A-B (20:80 v/v); 30-40 minutos, isocrático A-B (20:80), com fluxo constante de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 10 μL . A fase móvel foi preparada diariamente e desgaseificada através de sonicação antes da utilização. Os cromatogramas foram adquiridos no comprimento de onda de 340 nm enquanto os espectros de UV foram monitorados na faixa de 200 – 400 nm. A identificação dos picos foi realizada por meio de co-injeção com padrões analíticos de referência (Sigma-Aldrich[®]).

A quantificação de flavonoides totais foi obtida por metodologia de padrão externo, utilizando isoorientina como substância de referência. O teor foi determinado por meio da soma das áreas dos picos observados a 340 nm e identificados pelo padrão espectrofotométrico - obtido a partir do detector de arranjo de diodos - característico para flavonoides, sendo o teor calculado a partir da curva analítica do padrão de isoorientina. O teor de flavonoides totais foi expresso em miligramas de isoorientina por grama de FEF-*Cp* (mg isoorientina.g FEF-*Cp*⁻¹).

2.3.5 Estudos de estabilidade da FEF-*Cp*

As metodologias para os testes de estabilidade foram baseadas na legislação brasileira- RDC N^o45 de 2012 e também no guia para conduzir experimentos de estresse elaborado por Singh e Bakshi (2000).

As amostras foram analisadas em relação às características organolépticas, através de inspeção visual quanto ao seu aspecto geral. Foram realizadas análises qualitativas e quantitativas por CLAE, utilizando metodologia descrita por Costa e colaboradores, 2011 (item 2.3.4).

2.3.5.1 Estudo de estresse: Temperatura

A FEF-*Cp* foi submetida ao experimento de degradação por estresse em estufa com temperatura controlada de 80 °C (± 2 °C) durante 30 dias. O pó de FEF-*Cp* foi acondicionado em 18 frascos, contendo 10 mg cada. Foram realizadas coletas por meio de retirada de um frasco da estufa de cada triplicata nos tempos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias. Após a coleta, as amostras foram solubilizadas em água ultrapura na concentração de 2 mg.mL⁻¹, filtradas com membrana PVDF (fluoreto de polivinilideno) com diâmetro de poro de 0,45 µm, e analisadas por CLAE/DAD.

2.3.5.2 Estudo em condições de refrigeração

A influência do armazenamento sob condições de refrigeração foi avaliada para a amostra na forma de pó e de solução aquosa durante o período de 30 dias. Para isto, soluções aquosas de FEF-*Cp* (2,0 mg.mL⁻¹), e do pó de FEF-*Cp* foram acondicionadas em 18 frascos fechados, em geladeira a 4 °C (± 2 °C). A temperatura foi controlada com auxílio de termo-higrômetro. Foram realizadas coletas nos tempos de: 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias.

Após a coleta, as amostras em solução foram diluídas até concentração final de 1 mg.mL⁻¹, enquanto as amostras em pó foram solubilizadas em água ultrapura na concentração de 1 mg.mL⁻¹. As amostras foram filtradas com membrana PVDF (fluoreto de polivinilideno) com diâmetro de poro de 0,45 µm, e analisadas por CLAE/DAD.

2.3.5.3 Estudo de Estabilidade Acelerada

A FEF-*Cp* foi submetida durante o período de seis meses ao experimento de estabilidade acelerada em condições de temperatura de 40 °C (± 2 °C) e umidade relativa de 75% (± 5 %), conforme preconizado na RDC 45 para insumos farmacêuticos ativos com condições de armazenamento de até 30 °C (BRASIL, 2012). Para isso, frascos abertos contendo cerca de 20 mg da FEF-*Cp* foram armazenados em um recipiente fechado contendo solução aquosa saturada de NaCl (36,6 g NaCl – 100 g H₂O) e colocados em estufa a 40 °C.

Durante o período do experimento a temperatura e a umidade foram controladas com a utilização de termo-higrômetro. Foram realizadas coletas mensais, em triplicata, nos períodos de 30, 60, 90, 120, 150 e 180

dias. Posteriormente, as amostras foram colocadas em liofilizador para eliminar a umidade obtida durante o experimento. O teor de flavonoides totais foi determinado por CLAE/DAD.

Adicionalmente, as amostras da FEF-*Cp* submetidas aos experimentos de estabilidade também foram avaliadas quanto à formação das agliconas apigenina e luteolina empregando os mesmos parâmetros anteriormente descritos, exceto a composição da fase móvel, a qual obedeceu às seguintes condições: 0-20 minutos gradiente linear de A-B (15:85 v/v) para A-B (35:65 v/v); 20-25 minutos, isocrático A-B (35:65 v/v), com fluxo constante de 1,2 mL/min.

2.3.6 Análise estatística

Os teores de flavonoides totais observados durante o experimento de estabilidade acelerada foram analisados por ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Dunnett. Diferenças significativas foram consideradas com valor de $P < 0,05$.

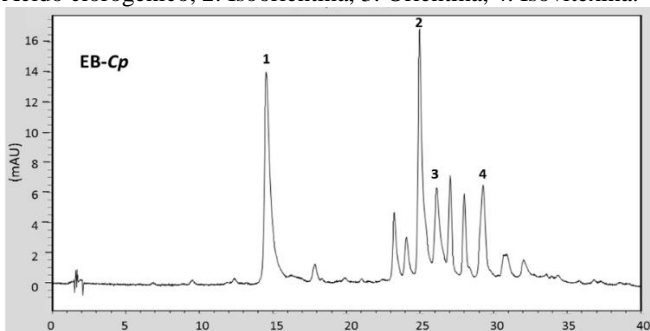
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Análise química do processo de obtenção da FEF-*Cp*

A matéria prima vegetal moída apresentou um teor de umidade de 9,82 % ($\pm 0,69$) encontrando-se dentro dos padrões de qualidade preconizado pela Farmacopeia Brasileira de 8 - 14% (BRASIL, 2010).

O obtenção do extrato bruto foi adaptada a partir de Santos (2016) sendo realizada por turboextração (Ultraturrax[®]), utilizando como líquido extrato etanol 20% (v/v) em uma proporção droga vegetal:solvente de 5% (m:V). Essas condições foram estabelecidas no intuito de reduzir o tempo de preparação e garantir reprodutibilidade, agregando vantagens tecnológicas em relação ao extrato por infusão (COSTA et al., 2011), mas sem modificar o perfil químico anteriormente obtido. O perfil cromatográfico apresentou como compostos majoritários o ácido clorogênico, e os flavonoides isoorientina, orientina e isovitexina (Figura 10).

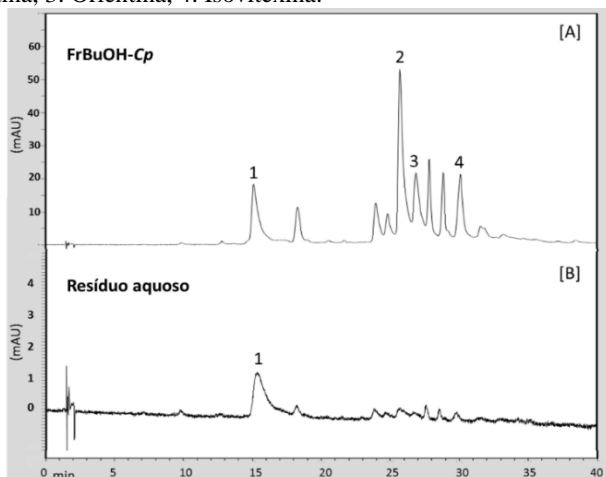
Figura 10: Perfil cromatográfico do extrato bruto de *Cecropia pachystachya* (EB-Cp). 1. Ácido clorogênico, 2. Isoorientina, 3. Orientina, 4. Isovitexina.



Para condições cromatográficas ver item 2.3.4

Para concentração dos compostos fenólicos, especialmente dos flavonoides presentes no EB-Cp, foi realizado um processo de partição com *n*-butanol (ZUCOLOTTO et al., 2011). O EB-Cp foi submetido a sucessivas extrações líquido-líquido com *n*-butanol visando concentrar de maneira exaustiva os flavonoides *C*-heterosídeos. Os cromatogramas da figura 11 demonstram o perfil da FrBuOH-Cp e do resíduo aquoso, resultante do processo de partição.

Figura 11: Perfil cromatográfico da fração butanólica (FrBuOH-Cp) [A] e do resíduo aquoso [B] de *Cecropia pachystachya*. 1. Ácido clorogênico, 2. Isoorientina, 3. Orientina, 4. Isovitexina.

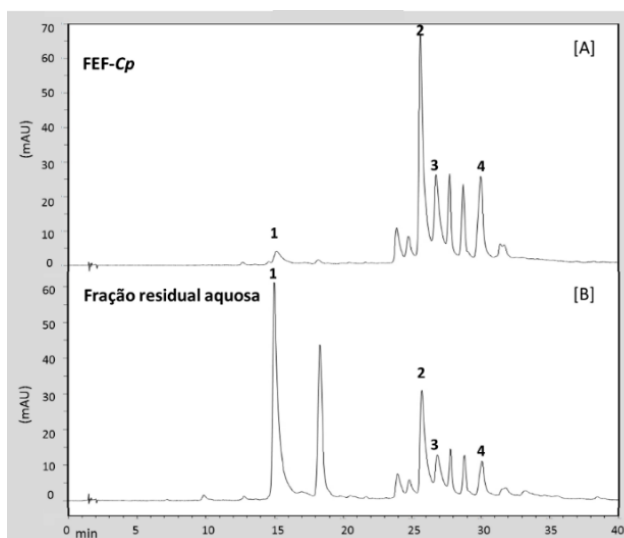


Para condições cromatográficas ver item 2.3.4

Como é possível observar, as sucessivas extrações com *n*-butanol foram efetivas em permitir a obtenção de um perfil de extrato-enriquecido, para a FrBuOH-*Cp* (Figura 6A). Além disso, o processo se mostrou exaustivo, pois no resíduo aquoso obtido foi detectada apenas a presença de ácido clorogênico, e visualizado somente traços de flavonoides (Tr 22,9 – 30,5 minutos) (Figura 6B).

Após a partição, o solvente da FrBuOH-*Cp* foi eliminado em evaporador rotatório e a FrBuOH-*Cp* retomada em água para realização da extração dos flavonoides com resina polimérica Amberlite® XAD-16. Essas resinas são utilizadas para extrair compostos fenólicos em extratos vegetais ricos em compostos polares (TOMÁS-BARBERÁN et al., 1992; LI; CHASE, 2009; COSTA et al., 2011). A figura 2 demonstra os cromatogramas da fração enriquecida em flavonoides *C*-heterosídeos de *Cecropia pachystachya* codificada como FEF-*Cp* (Figura 12A) e da fração residual aquosa (Figura 12B), resultante do processo de extração com Amberlite® XAD-16.

Figura 12: Perfil cromatográfico da fração enriquecida em flavonoides *C*-heterosídeos de *Cecropia pachystachya* (FEF-*Cp*) [A] e da fração residual aquosa [B] resultantes do processo de extração com Amberlite XAD-16. 1. Ácido clorogênico, 2. Isoorientina, 3. Orientina, 4. Isovitexina.



Para condições cromatográficas ver item 2.3.4

Os cromatogramas apresentados nas figuras 10 – 12 evidenciaram que o processo de purificação a partir do extrato bruto hidroetanólico (EB-*Cp*) até a obtenção final do perfil enriquecido em flavonoides de FEF-*Cp* foi efetivo. A FEF-*Cp* apresenta como compostos majoritários os flavonoides isoorientina (Tr 25,6 min), seguido de orientina (Tr 26,9 min) e isovitexina (Tr 30,1 min), por sua vez, o ácido clorogênico (Tr 15,2 min), majoritário no EB-*Cp* foi visualizado em maior concentração na fração residual aquosa, não sendo adsorvido pela resina. Além disso, foi possível obter uma fração enriquecida em cerca de três vezes o teor de flavonoides totais em relação ao EB-*Cp* (Tabela 1).

Tabela 1: Teor de isoorientina e flavonoides totais no extrato bruto (EB-*Cp*) e fração enriquecida em flavonoides *C*-heterosídeos (FEF-*Cp*) de *Cecropia pachystachya*.

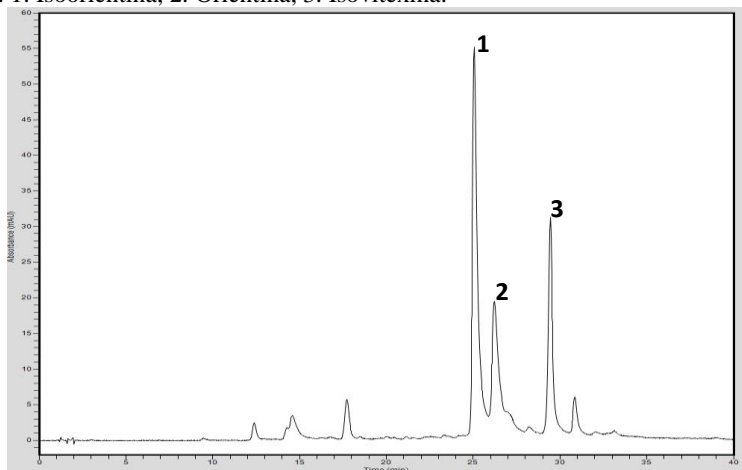
Amostra	Teor*	
	Isoorientina	Flavonoides totais
EB- <i>Cp</i>	16,60 ± 0,32	44,82 ± 0,45
FEF- <i>Cp</i>	43,46 ± 0,88	118,53 ± 2,50

*Teor expresso em mg.g⁻¹; n = 3

Considerando a extensa variedade de conjugação de moléculas de açúcar ao núcleo fundamental dos flavonoides descrita na literatura, e reportada no capítulo 1 (item 1.2.1), a FEF-*Cp* foi submetida a reação de hidrólise ácida (HCl 0,1N – sob refluxo) com o objetivo de verificar quais compostos seriam suscetíveis à degradação nessa condição. De acordo com a literatura clássica de flavonoides (HARBORNE; MABRY, 1982; CHOPIN; DELLAMONICA, 1988), a ligação do heterosídeo diretamente à aglicona por meio da ligação C-C confere resistência à hidrólise, e, nesse sentido, a reação de hidrólise forneceria informações a respeito da ligação glicosídica.

O cromatograma da figura 13 demonstra o perfil qualitativo da FEF-*Cp* após a reação de hidrólise. Como observado, os três flavonoides majoritários, isoorientina (1), orientina (2) e isovitexina (3), não apresentaram sensibilidade em relação à condição de hidrólise confirmando a resistência dos flavonoides *C*-heterosídeos à degradação ácida. Entretanto, os demais picos foram degradados indicando a possível presença de ligações *O*-glicosídicas, sugerindo a ocorrência de compostos do tipo *O*-glicosil- e/ou *O*-glicosil-*C*-glicosil- flavonoides, ou ainda de *O*-acil-*C*-glicosilflavonoides.

Figura 13: Cromatograma da FEF-Cp após a reação de hidrólise ácida (HCl 0,1 N). 1. Isoorientina, 2. Orientina, 3. Isovitexina.



No intuito de explorar e caracterizar quimicamente o perfil qualitativo dos flavonoides que compõem a FEF-Cp, foram realizadas análises por cromatografia de ultra eficiência acoplada ao detector de espectrômetro de massas (LC/QTOF). Os resultados dessa caracterização estão descritos no artigo publicado no periódico *Biomedical Chromatography* e encontra-se apresentado no item 2.4.3.

2.4.2 Avaliação da estabilidade da FEF-Cp

2.4.2.1 Estudo de estresse: Temperatura

Condições de estresse por meio de temperatura de 80 °C foram aplicadas na amostra em forma de pó, visando observar a resistência dos flavonoides a situações de temperatura. Após 30 dias de acondicionamento em estufa, as amostras se apresentaram mais escuras em relação à coloração original (Figura 14).

Figura 14: Aspecto visual da FEF-*Cp* ao final do experimento de estabilidade estresse (80 °C) (esquerda) e no tempo zero do experimento (direita).



O perfil qualitativo de flavonoides (Figura 14) não apresentou alterações significativas, não sendo observada formação de produtos de degradação. A possível degradação dos flavonoides levando à formação das agliconas (luteolina e apigenina) também foi monitorada por CLAE, mas não foram observados picos relativos a esses compostos. Contudo, essa condição de temperatura parece influenciar no teor de flavonoides totais (Figura 15). Foi observada uma diminuição gradativa do teor de flavonoides totais nos primeiros 10 dias de experimento, de aproximadamente 4% no 5º dia, e 12% no 10º dia. No entanto, as análises posteriores (10 - 30 dias) demonstraram que esse teor permaneceu com pequenas alterações, sendo observado no final do experimento um teor 12,13% menor quando comparado ao tempo zero.

Figura 15: Cromatograma da FEF-*Cp* após 30 dias de exposição à temperatura de 80 °C do experimento de estabilidade estresse.

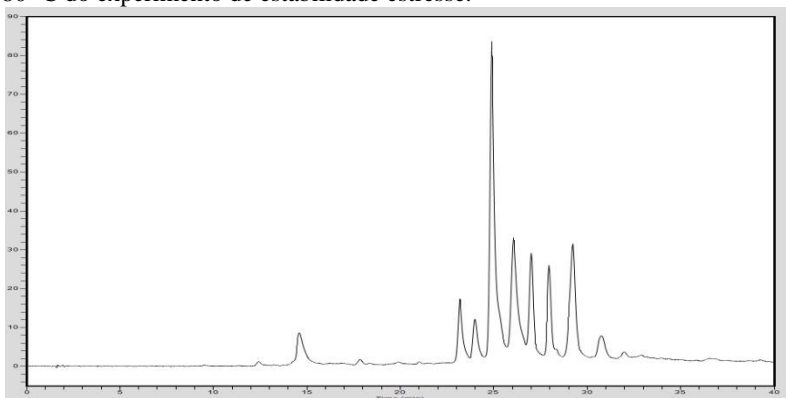
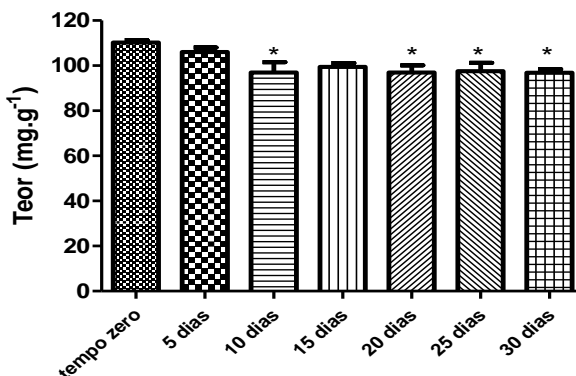


Figura 16: Teor de flavonoides totais e de isoorientina em FEF-*Cp* durante o experimento de estabilidade estresse (80 °C).

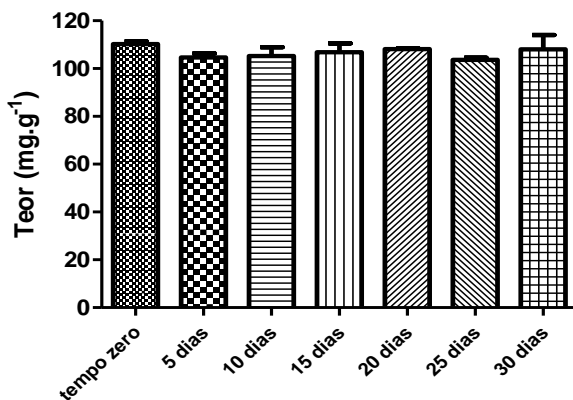


Barras representam a média \pm erro padrão (n = 3). *p < 0,05 em relação ao tempo zero, de acordo com a ANOVA de uma via e pós-teste de Dunnet

2.4.2.2 Estudo em condições de refrigeração

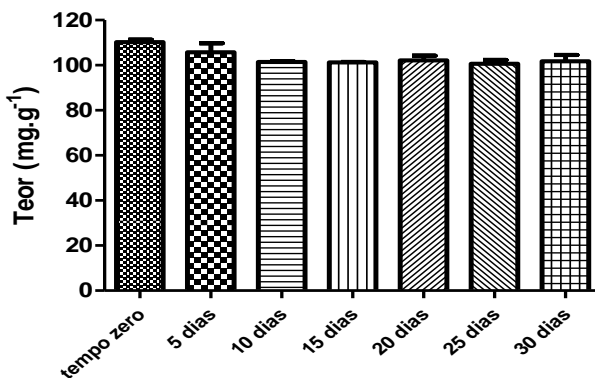
FEF-*Cp* também foi avaliada em condições de temperatura de refrigeração (4 °C) na forma de pó e de solução aquosa. Não foram observadas alterações em relação às características físicas das amostras durante os 30 dias de experimento. O perfil qualitativo não apresentou alterações, não sendo observada formação de produtos de degradação, e tampouco das agliconas (apigenina e luteolina). Considerando o teor de flavonoides totais, não foram observadas alterações significativas durante todo o experimento para FEF-*Cp* em pó e em solução (Figura 17 e 18).

Figura 17: Teor de flavonoides totais durante o estudo em condições de refrigeração (4 °C) da FEF-*Cp* na forma de pó.



Barras representam a média \pm erro padrão (n = 3). *p < 0,05 em relação ao tempo zero, de acordo com a ANOVA de uma via e pós-teste de Dunnet

Figura 18: Teor de flavonoides totais durante o estudo em condições de refrigeração (4 °C) da FEF-*Cp* na forma de solução.



Barras representam a média \pm erro padrão (n = 3). *p < 0,05 em relação ao tempo zero, de acordo com a ANOVA de uma via e pós-teste de Dunnet

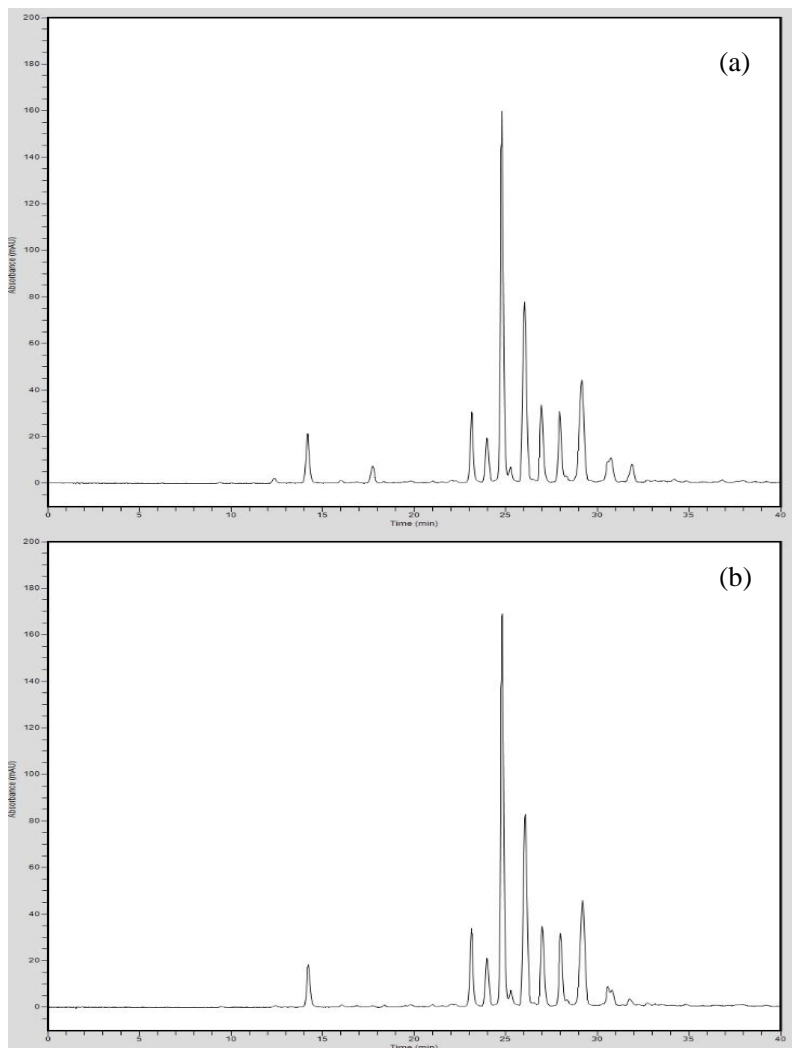
2.4.2.3 Estudo de Estabilidade Acelerada

A avaliação da estabilidade dos flavonoides presentes na FEF-Cp foi realizada por meio do estudo de estabilidade acelerada. Este estudo tem por objetivo acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um insumo farmacêutico ativo ou de um produto farmacêutico, sob condições forçadas de armazenamento. Segundo a legislação, este tipo de estudo demonstra empiricamente e com grande probabilidade de acerto o que ocorreria no produto farmacêutico quando este é submetido a condições normais de armazenamento por longo período de tempo (BRASIL, 2005; BRASIL, 2012).

Para isso, o planeta foi subdividido em zonas com diferentes especificações de temperatura e umidade, para possibilitar a comercialização dos produtos em zonas climáticas distintas (BOTT; OLIVEIRA, 2007). O Brasil internalizou as condições estabelecidas para zona IV pela OMS, característica de região quente e úmida, com temperatura de 30 °C (± 2 °C) e 75% (± 5 %) de umidade relativa (BRASIL, 2005). A partir disso, foram estabelecidas as condições climáticas para realização dos estudos de estabilidade acelerada (40 °C ± 2 °C e 75% UR ± 5 % UR) para insumos farmacêuticos ativos com condição de armazenamento de até 30 °C (BRASIL, 2012).

Para realização do estudo de estabilidade acelerada da FEF-Cp as amostras permaneceram durante seis meses em condição de temperatura de 40 °C (± 2 °C) e umidade relativa de 75% (± 5 %). O perfil de flavonoides foi analisado a cada 30 dias por CLAE/DAD, sendo monitorado o perfil qualitativo e o teor de flavonoides totais. A figura 18 demonstra o cromatograma do tempo zero do experimento (Figura 19A) e ao final do 6^o mês (Figura 19B).

Figura 19: Perfil cromatográfico da FEF-*Cp* no experimento de estabilidade acelerada ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR). (a) tempo zero; (b) 6^o mês.



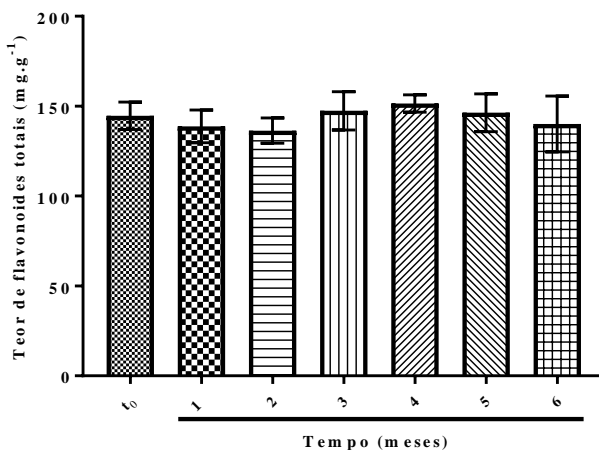
Para condições cromatográficas ver item 2.3.4

O perfil de flavonoides não foi alterado durante todo experimento de estabilidade, sendo que ao final do experimento (Figura 18B) não foi observado desaparecimento de picos correspondentes aos flavonoides (Tr

de 22,9 – 32,5 minutos). Também não foram visualizadas a formação das agliconas apigenina e luteolina, e de produtos de degradação com perfil espectrofotométrico característico de flavonoides.

Considerando o perfil quantitativo preliminar (tempo zero) da FEF-*Cp* é possível afirmar que não foram observadas alterações significativas no teor de flavonoides totais durante todo o estudo de estabilidade (Figura 20).

Figura 20: Teor de flavonoides totais da FEF-*Cp* durante o experimento de estabilidade acelerada ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR).



Barras representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnet. $P < 0,05$ versus t_0 foi considerado significativo.

Conforme previamente abordado nesta tese, os flavonoides *C*-glicosídeos diferem dos *O*-glicosídeos em relação à ligação da molécula do açúcar ser diretamente ao carbono anomérico do núcleo fundamental do flavonoide, geralmente na posição C-6 ou C-8 do anel A (Figura 2), gerando maior resistência a hidrólise (TALHI; SILVA, 2012). Na natureza, a ligação *C*-glicosídica é principalmente encontrada em flavonoides de núcleo flavona (PLAZA et al., 2014).

De modo geral, existem poucas informações acerca do efeito da glicosilação na estabilidade de flavonoides, no entanto, o número de moléculas glicosídicas e de grupamentos hidroxila parece exercer influencia na estabilidade dessas moléculas (PLAZA et al., 2014). No entanto, estudos sobre a estabilidade dos flavonoides do tipo *C*-

glicosídeos são ainda mais raros na literatura. Em um desses poucos estudos (XIAO et al., 2016) flavonoides tipo C-glicosídeos são descritos como mais resistentes em relação aos O-glicosídeos, assim como suas respectivas agliconas.

Segundo a legislação vigente, a estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto, como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005; BRASIL, 2012). Especificamente para formulações baseadas em extratos vegetais, os testes de estabilidade possuem destacada relevância, principalmente para a determinação das condições de estocagem de extratos ou medicamentos e garantia do tempo de validade dos mesmos, pois devido à alta complexidade química, as formulações fitoterápicas possuem uma maior tendência a alterações físicas e químicas (KOPLEMAN et al., 2001; SINGH; KUMAR, 2006).

A partir dos resultados observados no estudo de estabilidade acelerada da FEF-*Cp*, foi possível verificar que os flavonoides C-heterosídeos, principalmente, isoorientina, orientina e isovitexina foram estáveis nas condições climáticas de armazenamento utilizadas. Esse perfil de estabilidade atribui diversas vantagens tecnológicas para essa preparação fitoterápica, além de fornecer informações relevantes acerca do comportamento de flavonoides do tipo C-heterosídeos em condições controladas de temperatura e umidade.




















2.4.3 Publicação: Perfil químico, estudos preliminares de estabilidade e efeito agudo da administração da FEF-*Cp* em ratos

Os resultados da caracterização química dos flavonoides da FEF-*Cp* e a avaliação *in vivo* do potencial efeito tipo-antidepressivo foram descritos no artigo intitulado: LC/QTOF profile and preliminary stability studies of an enriched flavonoid fraction of *Cecropia pachystachya* Trécul leaves with potential antidepressant-like activity, publicado na revista Biomedical Chromatography.

Os experimentos *in vivo* para avaliação do comportamento após administração aguda da FEF-*Cp* em ratos, e os parâmetros neuroinflamatórios e de estresse oxidativo foram realizados em parceria os grupos de pesquisa coordenados pelos professores João Quevedo, Felipe Dal-Pizzol, Emílio Streck da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e professora Fabícia Petronilho da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL).

RESEARCH ARTICLE

LC/QTOF profile and preliminary stability studies of an enriched flavonoid fraction of *Cecropia pachystachya* Trécul leaves with potential antidepressant-like activity

Caroline Flach Ortmann¹  | Helena Mendes Abelaira²  | Gislaine Zilli Réus²  | Zuleide Maria Ignácio²  | Vitor Clasen Chaves¹  | Talitha Caldas dos Santos¹  | Pâmela de Carvalho¹  | Anelise Scussel Carlessi²  | Lívia Bruchchen² | Lucinea G. Danielski³  | Simone Gonçalves Cardoso¹  | Angela Machado de Campos¹  | Fabricia Petronilho³  | Joyce Rebelo⁵  | Meline Oliveira dos Santos Morais⁵  | Francieli Vuolo⁶  | Felipe Dal-Pizzol⁶  | Emilio Luiz Streck⁵  | João Quevedo^{2,4}  | Flávio Henrique Reginatto¹ 

¹ Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

² Laboratório de Neurociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brazil

³ Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, Santa Catarina, Brazil

⁴ Center for Translational Psychiatry, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, The University of Texas Medical School at Houston, Houston, Texas, USA

⁵ Laboratório de Bioenergética, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brazil

⁶ Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brazil

Correspondence

Flávio Henrique Reginatto, Laboratório de Farmacognosia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 88040-900, Brazil.
 Email: flavio.reginatto@ufsc.br

Funding information

National Institute for Translational Medicine (INCT-TM); Center of Excellence in Applied Neurosciences of Santa Catarina (NENASC); CNPq (UQ, FDP, GZR and FHR); FAPESC (UQ, FDP and FHR); Instituto Cerebro e Mente; UNESC (UQ and FDP); Department of Psychiatry and Behavioral Sciences

Abstract

There is increasing interest in natural antioxidants that are candidates for the prevention of brain damage occurring in major depressive disorders. *Cecropia pachystachya* is a tropical tree species of Central and South America and a rich source of polyphenols, particularly flavonoids. The aim of this study was to characterize the flavonoid profile of an enriched flavonoid fraction of *C. pachystachya* (EFF-Cp) and evaluate the antidepressant-like effects of its acute administration in behavior, cytokine levels, oxidative stress and energy metabolism parameters. The EFF-Cp chemical characterization was performed by HPLC/DAD and LC/QTOF. The antidepressant-like effects were performed by the forced swimming test, splash test and open field test. EFF-Cp revealed 15 flavonoids, including seven new glycosyl flavonoids for *C. pachystachya*. Quantitatively, EFF-Cp showed isoorientin (43.46 mg/g), orientin (23.42 mg/g) and isovitexin (17.45 mg/g) as major C-glycosyl flavonoids. In addition, EFF-Cp at doses 50 and 100 mg/kg reduced the immobility time in the forced swimming test, without changing the locomotor activity and grooming time.

Abbreviations: CAT, catalase; EFF-Cp, enriched C-glycosyl flavonoids fraction of *Cecropia pachystachya*; FST, forced swimming test; IL, interleukin; MDD, major depressive disorder; NAc, nucleus accumbens; PFC, prefrontal cortex; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; TNF- α , tumor necrosis factor

[†]These authors equally contributed to this work.

In addition, EFF-Cp was able to prevent the oxidative damage in some brain areas. In conclusion, the results of this study suggest that EFF-Cp exerts antidepressant-like effects with its antioxidant properties.

KEYWORDS

Cecropia pachystachya, C-glycosyl flavonoids, isorientin, major depressive disorder, oxidative stress

1 | INTRODUCTION

Cecropia pachystachya Trécul (Urticaceae) is a fast growing tropical tree species of Central and South America and is commonly known as embaúba, umbaúba, imbaúba, embaúva and embaúba-prateada (Costa, Schenkel, et al., 2011). Their leaves have been used in folk medicine as a diuretic, for the treatment of asthma, cough, hypertension, diabetes and inflammation (Lorenzi & Matos, 2012). Concerning the chemical composition, the aqueous extract of *C. pachystachya* leaves is described as a rich source of polyphenols, particularly C-glycosyl flavonoids as isorientin, orientin and isovitexin (Costa, Ortmann, et al., 2011).

The flavonoids are secondary metabolites widespread in medicinal plants that have antioxidant (Rudnicki et al., 2007), anti-inflammatory (Pacheco et al., 2014; Zucolotto et al., 2009) and central nervous system properties (Sena, Zucolotto, Reginatto, Schenkel, & De Lima, 2009). These compounds are the main subgroup of phenolics and have shown antioxidant and radical scavenging properties that are suggested as suitable complementary and alternative medicines for the management of different ailments, including degenerative diseases. This group of secondary metabolites has been widely studied for their antidepressant-like effects (Bahramololani, Farzaei, Farahani, & Rahimi, 2015). Further, Singh, Kaur, and Silakari (2014) described the flavones as a high potential source of new therapeutic agents. In this context, the glycosylated flavonoids, particularly C-glycosyl flavonoids, are metabolites of pharmaceutical interest due to their extensive biological applications (Talhi & Silva, 2012).

Despite the common occurrence and extensive research of depression, its pathophysiology is still not fully understood (Czarny et al., 2015). Currently, studies on the disease have focused on its molecular aspects. Emerging evidence suggests a significant role for mitochondrial dysfunction, oxidative stress and inflammation as the main contributors to the neuronal damage that is observed in major depressive disorder (MDD) (Bakunina, Pariante, & Zunszain, 2015; Morris & Berk, 2015). On the other hand, antidepressants might decrease inflammatory and oxidative damage and improve mitochondrial dysfunction in animal models of depression (Réus, Abelaira, et al., 2015; Réus, Carlessi, et al., 2015) and in depressed patients (Behr, Moreira, & Frey, 2012; Lee et al., 2013). Furthermore, current antidepressants have major shortcomings that include slow onset of action, poor efficacy and unwanted side effects, the search for new and improved antidepressants is still relevant (El-Alfy, Abourashed, & Matsumoto, 2012).

There is increasing interest in the natural antioxidants contained in medicinal plants, which are candidates for the prevention of brain damage that occur in MDD (Dwyer, Whitten, & Hawrelak, 2011). Our research group has been investigating the potential of *C. pachystachya* extracts and fractions in the central nervous system. Its crude extract, which contains phenolic constituents, particularly flavonoids as major

compounds, had protective effects upon brain damage (Gazal et al., 2015, 2014). These results led us to further development of an enriched C-glycosyl flavonoids fraction of *C. pachystachya* (EFF-Cp) that recently was described with antidepressant-like behavior in a chronic mild stress protocol (Ortmann et al., 2016).

Therefore, considering the importance of finding new chemical entities and the increasing interest in natural sources to pharmaceutical development, the present study aimed to characterize the chemical profile and stability of the flavonoids in EFF-Cp and evaluate its effects in acute protocols on depressive behavior and in biochemical parameters in the brains of adult rats.

2 | EXPERIMENTAL

2.1 | Enriched C-glycosyl flavonoids fraction of *Cecropia pachystachya* preparation

C. pachystachya leaves were collected in Torres, RS, Brazil. A voucher specimen (ICN 150025) was deposited in the Herbarium of Universidade Federal do Rio Grande do Sul. To obtain the crude extract (CE-Cp), the plant material was dried under air flow $\leq 35^{\circ}\text{C}$, powdered and extracted by Ultra-Turrax® T25 with ethanol 20% (1: 20, v/v; 6407.11 g; 5 min). EFF-Cp was prepared as previously reported (Ortmann et al., 2016). CE-Cp was partitioned with *n*-butanol, dried under reduced pressure and stirred with Amberlite® XAD-16. Then, the resin was stirred again with methanol yielding the EFF-Cp.

2.2 | Chromatographic procedures

Acetic acid (analytical grade), formic acid (analytical grade) and acetonitrile (HPLC grade) were provided by Tedia® (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Water was purified in Milli-Q system (Millipore®, Bedford, USA). All solutions used in HPLC and LC/QTOF were filtered through a 0.45 and 0.22 μm membrane, respectively, before use. Chlorogenic acid (3-O-caffeoylquinic acid, $\geq 98.0\%$) isovitexin (4',5,7-tetrahydroxyflavone-6-glucoside, $\geq 98.0\%$), isorientin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-6- β -glucoside, $\geq 98.0\%$) and orientin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-8-glucoside, $\geq 98.0\%$) were purchased from Sigma-Aldrich® Co. (St. Louis, MO, USA).

2.3 | Chromatographic analysis by HPLC/DAD and LC/QTOF

The HPLC (PerkinElmer Series 200, Photodiode Array Detector) analyses of CE-Cp and EFF-Cp were performed as previously described and validated methodology for quantification of phenolic compounds from *Cecropia* leaves (Costa, Ortmann, et al., 2011). The separation was performed on a Perkin Elmer Brownlee Choice C18 column

(150 mm × 4.6 mm i.d.; 5 μm) (Shelton, CT, USA) and a gradient of solvent A (acetonitrile) and solvent B (acetic acid 1%, adjusted to pH 3.0) as follows: 5–20% A (0–30 min) and isocratic 20% A (30–40 min) as the mobile phase, with constant flow at 1.0 mL/min. Chromatograms were recorded at 340 nm while the ultraviolet (UV) spectra were monitored over a range of 200–450 nm, and validation procedure was performed in accordance with ICH guidelines (2005). Quantification of individual flavonoids was determined based on an analytical curve of reference standards. The total flavonoid content was determined by an external standard method, using isoorientin, as the reference. The content was measured by adding up the areas at $\lambda = 340$ nm of all the peaks identified by UV/DAD spectra as being flavonoids (retention time: 22.9–32.5 min), as already shown by Ortmann et al. (2016). The corresponding concentration of total flavonoids was expressed based on the analytical curve of isoorientin.

Chemical investigation of EFF-Cp flavonoids was performed by LC/QTOF with Waters® Acquity UPLC equipment (Milford, MA, USA) coupled to a high-resolution mass spectrometer (Xevo G2-S QTOF model) (Milford, MA, USA) and an electrospray ionization probe. MassLynx v.4.1 software was used for data acquisition and processing. The mass spectrometer parameters were adjusted based on the analysis of the reference standard isoorientin and were set as follows: ionization mode, electrospray positive and negative ion; capillary voltage, 4.0 kV; source block temperature, 80°C; desolvation temperature, 500°C; nebulizer nitrogen flow rate, 80 L/h; desolvation nitrogen gas flow, 800 L/h; and cone voltage, 40 V. The MS/MS analysis was performed in positive mode using an energy ramp (10–30 eV) with argon as collision gas. The spectra were recorded by scanning the mass range from m/z 100 to 1000 with a scan time of 0.5 s. Chromatographic separation was performed using a Kinetex/Phenomenex C18 (100 mm × 2.1 mm; 1.7 μm) (Torrance, CA, USA) column at 40°C, and acetonitrile (A) and formic acid 0.1% (B) programmed as a linear change from 8 to 14% (A) during 20 min as the mobile phase was used with constant flow at 0.3 mL/min.

2.4 | Stability tests

Preliminary stability evaluation of EFF-Cp was developed based on the guidance for stress studies described by Singh and Bakshi (2000) and on reflection paper of herbal medicinal products stability and quality (EMA – European Medicines Agency, 2010; 2011). EFF-Cp was evaluated at two different temperatures for 30 days: 80°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) (stress parameter), and 4°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) (refrigerated conditions). For the thermal stress parameter, powdered EFF-Cp was packed in bottles containing 10 mg each and submitted to a conventional oven at 80°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). For the refrigerated conditions EFF-Cp was employed in powdered (10 mg, packed in bottles) and aqueous solution (2 mg/mL, packed in sealed bottles). The samples were periodically collected on days 5, 10, 15, 20, 25 and 30 in triplicate, and evaluated by HPLC/DAD. Additionally, the hydrolysis stress test was performed to evaluate the behavior of different flavonoid classes in the presence of acidic medium. EFF-Cp was diluted in HCl (0.1 N) and submitted to a reflux (100°C) for 1 h. The flavonoids profile was evaluated by HPLC/DAD and LC/QTOF.

2.5 | Animals and experimental design

Male adult Wistar rats (60 days old) were obtained from the Universidade do Extremo Sul Catarinense. The rats were maintained

with food and water ad libitum, on a 12 h light/dark cycle. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Usage of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior recommendations, and with approval by the local Ethics Committee (041–2014–1). The rats were divided into five groups (each $n = 12$): (1) saline (control group); (2) imipramine 30 mg/kg (positive control group); (3) EFF-Cp 25 mg/kg; (4) EFF-Cp 50 mg/kg; and (5) EFF-Cp 100 mg/kg. A dose of EFF-Cp was administered orally while saline and imipramine were given intraperitoneally. Behavioral tests (first open-field, then splash test and forced swimming test [FST]) were evaluated 1 h after administration. The rats were killed by decapitation and the brains were immediately removed. The prefrontal cortex (PFC), hippocampus, amygdala and nucleus accumbens (NAc) were isolated by dissection based on histological distinctions described by Paxinos and Watson (1986).

2.6 | Behavioral tests

2.6.1 | Open-field test

This apparatus consists of a brown plywood box (45 × 60 cm) surrounded by wooden walls with a glass front. The floor is divided into nine rectangles (15 × 20 cm). Animals were placed on the left rear quadrant and left to explore the area. The numbers of horizontal (crossings) and vertical (rearings) activities performed by each rat was recorded during 5 min.

2.6.2 | Splash test

The splash test was conducted according to Isingrini et al. (2010). The test consists of squirting a 10% sucrose solution on the rat dorsal coat in its home cage. The time spent grooming in the open-field apparatus was recorded (5 min) as an index of self-care and motivational behavior (Willner, 2005).

2.6.3 | Forced swimming test

The FST was conducted according to previous reports (Detke, Rickels, & Lucki, 1995; Garcia, Comim, Valvassori, Réus, Andreazza, et al., 2008; Garcia, Comim, Valvassori, Réus, Barbosa, et al., 2008). The tank (80 × 30 cm of transparent Plexiglas) was filled with water (22–23°C) to 40 cm of depth. Rats without treatment were placed in the water for 15 min for a pre-test session. Twenty-four hours later, rats were treated with EFF-Cp, imipramine or saline and 60 min after were placed in the water for the test session (5 min). The immobility times were recorded in seconds.

2.7 | Inflammatory parameters

The serum was diluted in extraction solution containing phosphate-buffered saline. Brain cytokines (interleukin [IL]-1 β , IL-10 and tumor necrosis factor [TNF]- α) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's recommendations.

Myeloperoxidase activity, as an index of neutrophil infiltrate, was measured spectrophotometrically as the change in absorbance at 650 nm and 37°C. Data were expressed as mU per mg of protein.

2.8 | Oxidative stress parameters

2.8.1 | Measurement of nitrite/nitrate concentration

Total nitrite concentration was measured using the Griess reaction, and absorbance was recorded in a spectrophotometer at 550 nm (Green et al., 1982). Data were expressed as nmol of nitrite/nitrate concentration per mg of protein.

2.8.2 | Thiobarbituric acid reactive species formation

Lipid peroxidation was measured by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Esterbauer & Cheeseman, 1990). The optical density of each solution was measured in a spectrophotometer at 535 nm. Data were expressed as nmol of malondialdehyde equivalents per mg of protein.

2.8.3 | Carbonyl protein formation

Protein carbonyl content was measured in brain homogenates using 2,4-dinitrophenylhydrazine in a spectrophotometric assay (Levine, Williams, Stadtman, & Shacter, 1994; Levine et al., 1990). Absorbance was recorded in a spectrophotometer at 370 nm and protein carbonyl levels were expressed as nmol of carbonyl per mg of protein.

2.8.4 | Superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase (SOD) activity was performed based on its ability to inhibit spontaneously the oxidation of adrenaline to adrenochrome (Bannister & Calabrese, 1987). One unit of SOD produces approximately 50% of auto-oxidation of adrenaline. Results were expressed as units/mg of protein.

2.8.5 | Catalase activity

The catalase (CAT) activity was measured by the method that employs hydrogen peroxide (H_2O_2) to generate H_2O and O_2 (Aebi, 1984). A standard curve was established using purified CAT (Sigma-Aldrich) under identical conditions.

2.8.6 | Respiratory chain enzyme activities

NADH dehydrogenase (complex I) was evaluated using the method described by Cassina and Radi (1996) relating to the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at 420 nm. The activity of succinate: cytochrome c oxidoreductase (complexes II and II-III) was determined according to the method of Fischer et al. (1995), measured by cytochrome c reduction from succinate. The activity of cytochrome c oxidase (complex IV) was assayed according to the method described by Rustin, Munnich, and Rötig (2002). The

activities of the mitochondrial respiratory chain complexes were described as nmol/min per mgr protein.

2.8.7 | Protein determination

All biochemical measurements were normalized to the protein content with bovine albumin as standard (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951).

2.9 | Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Differences were determined by one-way ANOVA followed by Dunnett post-hoc test to stability experiment and Tukey post-hoc test to *in vivo* experimental groups; $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Chemical characterization of enriched C-glycosyl flavonoids fraction of *Cecropia pachystachya*

The evaluation of the chromatographic profile of CE-Cp and EFF-Cp by HPLC/DAD methodology was performed as previously developed by our research group (Costa, Ortmann, et al., 2011). The HPLC/DAD chromatograms (data not shown) of both samples showed similar chemical profiles concerning C-the glycosyl flavonoids composition, i.e. isoorientin, orientin and isovitexin are the main flavonoids. However, chlorogenic acid, which is one of the main compounds in CE-Cp, was in a minority in EFF-Cp. The content of the major compounds was shown in Table 1. EFF-Cp showed total flavonoid content around three times higher compared to CE-Cp.

LC-QTOF analyses were performed to find out the molar mass of EFF-Cp flavonoids observed by HPLC/DAD and to obtain detailed structural information about minor compounds not yet identified. The chromatogram obtained (Figure 1), showed minority compounds that were probably co-eluted in separation by HPLC/DAD (Ortmann et al., 2016). The major flavonoids were observed in peaks 6 and 7 as isoorientin and its isomer orientin, and isovitexin (peak 10). In addition, we detected seven new flavonoids for *C. pachystachya* (peaks 4, 5, 8, 9, 11, 12, 13 and 14) on the positive ion mode in ESI-MS/MS, and their spectra were compared with the MassBank database (<http://www.massbank.jp>). The MS analyses were performed in positive mode, and the negative mode was carried out to confirm the observed ions. The spectral characteristics of the chromatogram peaks are summarized in Table 2.

The previously related compounds, i.e. chlorogenic acid, isoorientin, orientin and isovitexin of *C. pachystachya* (Costa, Ortmann,

TABLE 1 Quantification of individual compounds and total flavonoids content of crude extract (CE-Cp) and enriched flavonoid fraction (EFF-Cp) of *Cecropia pachystachya*

	Chlorogenic acid*	Isoorientin*	Orientin*	Isovitexin*	Total flavonoids [†]
CE-Cp	24.68 \pm 0.95	16.60 \pm 0.32	8.63 \pm 0.56	6.89 \pm 1.09	44.82 \pm 0.45
EFF-Cp	7.14 \pm 0.68	43.46 \pm 0.88	23.42 \pm 0.92	17.45 \pm 0.75	118.53 \pm 2.50

*Expressed as mg/g of CE-Cp/EFF-Cp \pm SD (n = 3).

[†]Expressed as mg isoorientin per g of CE-Cp/EFF-Cp \pm SD (n = 3).

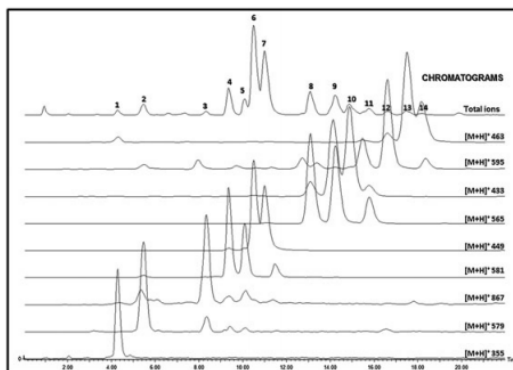


FIGURE 1 LC/QTOF fingerprint and extracted ions of enriched flavonoid fraction of *Cecropia pachystachya* (EFF-Cp)

TABLE 2 Phenolic compounds identified in EFF-Cp by LC-QTOF

Compound	Retention time (min)	λ_{max} (nm)	Molecular formula	$[M - H]^-/m/z$ (error - Ppm)	$[M + H]^+/m/z$ (error - ppm)	Main fragments $[M + H]^+/m/z$
(1) Chlorogenic acid*	4.30	239 324	$C_{16}H_{18}O_9$	353.1035 (-3.7)	355.1047 (5.0)	163
(2) Procyanidin B ₂ *	5.48	230 279	$C_{30}H_{34}O_{12}$	577.1514 (1.6)	579.1526 (4.0)	409; 287; 127
(3) Suggestive of procyanidin C	8.29	278	$C_{26}H_{28}O_{10}$	865.2135 (-1.2)	867.2152 (1.8)	579; 287; 127
(4) Suggestive of luteolin-C-hexoside-O-pentoside	9.34	261 _{sh} , 270 345	$C_{26}H_{28}O_{15}$	579.1513 (2.2)	581.1522 (2.8)	449; 353; 329; 299
(5) Suggestive of luteolin-C-hexoside-O-pentoside	10.08	262 _{sh} , 271 345	$C_{26}H_{28}O_{15}$	579.1489 (-1.9)	581.1509 (0.5)	449; 353; 329; 299
(6) Isoorientin*	10.49	255 _{sh} , 269 345	$C_{21}H_{26}O_{11}$	447.1072 (-1.1)	449.1090 (1.1)	395; 353; 329; 299
(7) Orientin*	10.99	253 _{sh} , 267 345	$C_{21}H_{26}O_{11}$	447.1070 (-2.2)	449.1088 (0.4)	395; 353; 329; 299
(8) Suggestive of luteolin-C-hexoside-O-pentoside	11.37	262 _{sh} , 270 344	$C_{26}H_{28}O_{15}$	579.1488 (-1.2)	581.1502 (-0.7)	449; 353; 329; 299
(9) Suggestive of apigenin-C-hexoside-O-pentoside	13.06	270 337	$C_{26}H_{28}O_{14}$	563.1531 (-0.5)	565.1553 (-0.7)	433; 337; 313; 283
(10) Vitexin*	14.11	269 337	$C_{21}H_{26}O_{10}$	431.1098 (-6.0)	433.1111 (-5.5)	337; 313; 283
(11) Suggestive of apigenin-C-hexoside-O-pentoside	14.24	270 337	$C_{26}H_{28}O_{14}$	563.1541 (-2.8)	565.1559 (0.2)	433; 337; 313; 283
(12) Isovitexin*	14.85	269 337	$C_{21}H_{26}O_{10}$	431.1119 (4.6)	433.1137 (0.5)	337; 313; 283
(13) flavonoid unidentified	15.49	271 344	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1655 (1.7)	595.1675 (2.0)	367; 343; 313
(14) Suggestive of apigenin-C-hexoside-O-pentoside	15.76	269 344	$C_{26}H_{28}O_{14}$	563.1540 (-1.8)	565.1556 (-0.4)	433; 337; 313; 283
(15) flavonoid unidentified	16.68	271 344	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1638 (2.9)	595.1653 (-1.7)	367; 343; 313
(16) Suggestive of diosmetin-C-hexoside	17.49	252 _{sh} , 270 344	$C_{22}H_{22}O_{11}$	461.1192 (2.8)	463.1212 (-6.0)	409; 367; 343; 313
(17) Suggestive of diosmetin-C-hexoside	18.23	252 _{sh} , 270 344	$C_{22}H_{22}O_{11}$	461.1232 (-1.3)	463.1256 (3.5)	409; 367; 343; 313
(18) flavonoid unidentified	18.37	-	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1641 (-0.8)	595.1653 (-1.7)	367; 343; 313

*Identification confirmed based on analytical standard compound fragmentation.

^{sh}shoulder.

et al., 2011), displayed the exact molecular mass and were described as compounds 1, 6, 7 and 12, respectively, in Table 2. Compounds 2 and 3 were suggested to be the procyanidin class, as this class of secondary

metabolites had been reported for the *Cecropia* species (Lacaille-Dubois, Franck, & Wagner, 2001). Compound 2 presented $[M + H]^+$ ion at m/z 579.1526, which corresponds to a procyanidin dimer such

as procyanidin type B, which was confirmed as procyanidin B2 with the analytical reference standard. Furthermore, compound 3 presented $[M+H]^+$ ion at m/z 867 typical of a procyanidin trimer such as procyanidin type C (De Rosso, Panighè, Vedova, Gardiman, & Flamini, 2015).

Considering the flavonoid composition, the LC-QTOF analysis showed that EFF-Cp is a rich matrix of glycosylated flavonoids, particularly C-glycosylated, as it was possible to observe 15 different flavonoids and as far as we are aware, 10 flavonoids among these were not yet related for *C. pachystachya*. Moreover, the already described flavonoids observed $[M+H]^+$ 433 m/z at two retention times (14.11 and 14.85 min). Compound 10 (retention time 14.11 min) has a fragmentation pattern similar to isovitexin (compound 12) suggesting its position isomer is vitexin. Both these compounds were confirmed with analytical standard fragmentation. Vitexin is a minority compound in EFF-Cp and was only observed by the protonated molecule extraction (Figure 1). This is the first report of vitexin in *C. pachystachya*.

It was not possible to determine the exact chemical structure of flavonoids related in Table 2 as compounds 4, 5, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17 and 18; however, considering the fragmentation data, spectroscopic UV pattern, stability experiments, the other flavonoids derived from *C. pachystachya* secondary metabolism as well as the data from the literature, it was possible to suggest some flavonoid derivatives. Compounds 4, 5 and 8 presented $[M+H]^+$ m/z 581 and the same fragmentation pattern, suggesting the presence of isomers in the sample. Furthermore, $[M+H]^+$ m/z 449 represented a loss of 132 mass units corresponding to a pentose sugar, that is probably attached via the O-pentosyl group based on the results of the hydrolysis experiment. Considering the other fragments and the maximum wavelength (λ_{max}) characteristics of the luteolin (242_{sh}, 253, 267, 291_{sh}, 349 nm) nucleus (Mabry, Markham, & Thomas, 1970) it was possible to suggest that these isomers are probably derived from the C-glycosyl flavonoids isoorientin/orientin (448 mass units), associated to a O-glycosyl-C-

glycosyl flavonoids subclass of flavonoids. These molecular structures were considered taking into account the known compounds originated from the secondary metabolism of this plant.

In the same context, another three isomers were observed in the sample, the compounds 9, 11 and 14 with $[M+H]^+$ m/z 565 and a similar fragmentation pattern. In addition, $[M+H]^+$ m/z 433 corresponds to a loss of 132 mass units probably related to a pentose sugar. The hydrolysis experiment showed the total degradation of these compounds, leading to assume the occurrence of O-glycosyl-C-glycosyl flavonoids in the EFF-Cp. These compounds are probably derived from the C-glycosyl flavonoids isovitexin/vitexin (432 mass units) also taking into account the maximum wavelength (λ_{max}) characteristics of the apigenin nucleus (267, 296_{sh}, 336 nm) (Mabry *et al.*, 1970).

Compounds 13, 15 and 18 presented $[M+H]^+$ m/z 595 and the same fragmentation pattern as the isomers. However, it was not possible to suggest the structure of these flavonoids. Finally, another two isomers were observed with $[M+H]^+$ m/z 463 (compounds 16 and 17). Considering the fragmentation pattern and UV_{max} of these compounds, we suggested a diosmetin nucleus with a C-hexoside attached corroborating with the study by Abad-García, Garmón-Lobato, Berrueta, Gallo, and Vicente (2008).

The chemical stability of EFF-Cp flavonoids was observed at two different temperatures and in hydrolysis conditions. The refrigerated temperature ($4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) was employed to observe EFF-Cp stability under a storage condition. EFF-Cp did not show significant content alterations during all experiments in powdered and in aqueous solution (Figure 2B and C; see Supporting information). These are relevant stability data, particularly to the pharmaceutical technology field, suggesting that is possible to store EFF-Cp for 1 month without significant flavonoid content alterations.

The thermal stress was investigated to observe the effect of an elevated temperature on the stability of EFF-Cp flavonoids. After

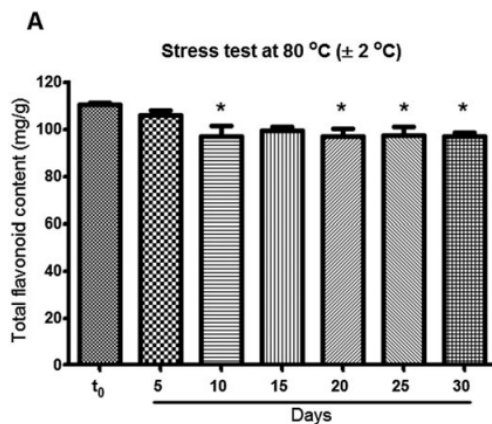


FIGURE 2 EFF-Cp total flavonoid content during stability experiments in stress test (a). Bars represent means \pm SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$ vs. t_0 ; according to one-way ANOVA followed by Dunnett post-hoc test. For refrigerated conditions using powdered (B) and aqueous solution (C) see Supporting information

30 days of EFF-Cp exposition at 80°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) it was not observed qualitative alterations of flavonoids profile by HPLC/DAD. On the other hand, a significant ($P = 0.0207$; Figure 2A) alteration was observed on the 10th day of the experiment as indicated in the quantitative profile (Figure 2A) corresponding to a loss of 12% of total flavonoid content in relation to zero time of the experiment (t_0). However, further analysis showed minor alterations (about 0.1%) among the total flavonoid content on the 10th day, until the end of the experiment (30th day). Accordingly with the guideline on quality of herbal medicinal products of European Medicines Agency (EMA, 2011), a herbal medicinal product that contains constituents of known therapeutic activity, the variation in marker content during the proposed shelf-life should not exceed $\pm 5\%$ of the declared assay value, or $\pm 10\%$ in the case of the unknown active compounds. Taking into account that C-glycosyl flavonoids of EFF-Cp are the active compounds and considering the results of the stress thermal test, EFF-Cp showed stability for 5 days at 80°C.

As another parameter of the stress test, the hydrolysis reaction was performed to observe the resistance of EFF-Cp flavonoids under a forced degradation condition. The analysis by HPLC/DAD and LC/QTOF (data not shown) displays the presence of the known C-glycosyl flavonoids (isorientin and isovitexin, and its isomers) and a minor compound with $[M+H]^+ m/z$ 463, not yet identified, but with a suggested structure of a C-glycosyl flavonoid (dismetin-C-hexoside). The other flavonoids described in Table 2 were not observed. Considering the quantitative profile evaluated by HPLC/DAD the increase of the C-glycosyl flavonoid content in 15%, 21% and 37% was observed in isorientin, orientin and isovitexin, respectively. These results corroborates with the structures proposed to compounds 4, 5, 8 and 9, 11, 14 as being O-glycosyl-C-glycosyl flavonoid class, with luteolin and apigenin nucleus, respectively. Considering that these compounds were susceptible to degradation by the acidic hydrolysis condition, and the increase on the content of the EFF-Cp major flavonoids observed, these results reinforce the proposed molecular structures as being flavonoids derived from the major C-glycosyl flavonoids of EFF-Cp.

However, considering the flavonoid quantification after the hydrolysis stress test, it was observed that the presence of 70% ($\pm 1.78\%$) of total flavonoid content demonstrates the resistance of these compounds, in particular to C-glycosyl flavonoids. The carbon-carbon linkage of C-glycosyl flavonoids differ from O-glycosyl flavonoids by having their glycosyl moiety attached to the anomeric

carbon directly to the flavonoid backbone, usually at the C6 or C8 positions of the A ring, resulting in higher resistance to hydrolysis and hence in its biological activities (Talhi & Silva, 2012).

Therefore, considering the chemical characterization, EFF-Cp presented 11% of the total flavonoid content, which comprises mostly flavonoids that were stable under different stability conditions. These results led us to reinforce the quantification of EFF-Cp based on isorientin, the major C-glycosyl flavonoid, and to assume that the active compounds of EFF-Cp probably arise from the synergic effect of its C-glycosyl flavonoid composition, as the detected O-pentosyl-C-glycosyl flavonoids that could undergo degradation to C-glycosyl flavonoids after *in vivo* oral administration. (Zhang, Tie, Bao, & Wu, 2007).

3.2 | Effects of the acute administration of enriched C-glycosyl flavonoids fraction of *Cecropia pachystachya* and imipramine on behavioral tests

To confirm if the EFF-Cp analyzed by LC/QTOF has antidepressant activity, as previously described (Ortmann et al., 2016), an acute antidepressant activity assay was also performed. The effects of the acute administration of EFF-Cp and imipramine on the immobility time are illustrated in Figure 3(A). As expected, decreased immobility time was observed for EFF-Cp at doses 50 and 100 mg/kg and imipramine at a dose of 30 mg/kg compared to saline ($F_{(4-20)} = 7.420$; $P < 0.001$; Figure 3). Interestingly, in the open-field test, acute treatments with EFF-Cp or imipramine did not modify the number of crossings ($F_{(4-50)} = 5.017$; $P = 0.05$) and rearings ($F_{(4-50)} = 5.116$; $P = 0.05$; data not shown), compared with saline. Nevertheless, in the splash test, acute treatment with EFF-Cp or imipramine did not show any statistical difference for grooming time ($F_{(4-50)} = 2.862$; $P = 0.05$; data not shown), compared to saline.

Studies have shown that *C. pachystachya* has anti-inflammatory, cardiotoxic, sedative and antioxidant properties (Aragão et al., 2013; Consolini, Ragone, Migliori, Conforti, & Volonté, 2006; Hlikawczuk, Saad, Guardia, Juarez, & Giordano, 1998). We have been determining the potential of *C. pachystachya* in the central nervous system as an antidepressant-like agent, by studying the effect of the crude extract at 200 and 400 mg/kg in mice submitted to chronic unpredictable stress (Gazal et al., 2014) and of EFF-Cp at 50 and 100 mg/kg in rats subjected to chronic mild stress (Ortmann et al., 2016). In fact, the

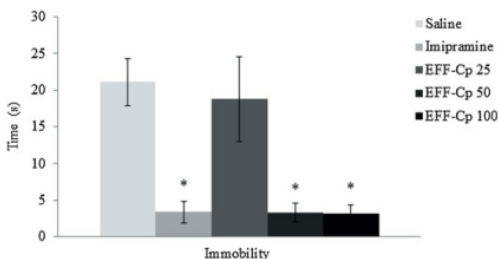


FIGURE 3 Effects of the acute administration of the enriched flavonoid fraction (EFF-Cp) of *C. pachystachya* and imipramine on the immobility time. Bars represent means \pm SEM ($n = 12$). * $P < 0.05$ vs. saline; according to one-way ANOVA followed by Tukey *post-hoc* test

achievement of an enriched flavonoid fraction allowed a reduction in the active dose, at four times, assigning technological advantages. In this work, we have featured the flavonoid content of EFF-Cp and observed its acute effect by decreasing the immobility time in FST.

The flavonoid activities in the central nervous system have been previously reported in the literature (Grosso, Valentão, Ferreres, & Andrade, 2013). Liang, Zhang, Su, Williams, and Li (2016) described the C-glycosyl flavones as a possibility of new lead candidates with a novel mechanism of action for the development of Alzheimer's disease. The antidepressant-like effects of C-glycosyl flavonoids were described for vitexin, underlying its monoaminergic mechanisms (Can, Demir-Özkay, & Üçel, 2013); and for orientin, with improvement of central oxidative stress, neurotransmission and neuroplasticity (Liu et al., 2015). Orientin also showed protective effects on noise-induced cognitive decline in mice, specifically by improving central oxidative stress and neurotransmission, and increased synapse-associated proteins (Wang et al., 2016). In this context, a recent review described that C-glycosyl flavonoids in most cases showed a higher antioxidant potential than their corresponding O-glycosyl flavonoids and aglycones, but they emphasize the lack of *in vivo* data on the biological benefits of C-glycosyl flavonoids (Xiao, Capanoglu, Jassbi, & Miron, 2016). Herein, we described the chemical flavonoid profile of EFF-Cp that presents isoorientin, as the major C-glycosyl flavonoid compound, that could be responsible for the decreased immobility time in the FST, isolated or in synergism with the C-glycosyl flavonoid composition.

3.3 | Effects of acute administration of enriched C-glycosyl flavonoids fraction of *Cecropia pachystachya* and imipramine on oxidative stress and inflammatory parameters

The effects of acute administration of EFF-Cp and imipramine on oxidative stress parameters are demonstrated in Figure 4. The acute administration with EFF-Cp in all doses decreased the carbonyl content levels in the hippocampus ($F_{(4-18)} = 13.511$; $P < 0.001$; Figure 4A) and NAC ($F_{(4-19)} = 7.999$; $P = 0.001$; Figure 4A), without changes in the PFC ($F_{(4-19)} = 3.540$; $P = 0.05$; Figure 4A) and amygdala ($F_{(4-21)} = 2.933$; $P = 0.052$; Figure 4A), compared to saline. Acute administration with EFF-Cp at the dose 100 mg/kg decreased the TBARS levels in the amygdala ($F_{(4-23)} = 4.393$; $P = 0.010$; Figure 4B), without alteration in the hippocampus ($F_{(4-24)} = 2.553$; $P = 0.071$; Figure 4B) and in the NAC ($F_{(4-24)} = 1.914$; $P = 0.147$; Figure 4B), compared to saline. None the less, acute administration of EFF-Cp at doses 25 and 100 mg/kg decreased the myeloperoxidase activity in the amygdala ($F_{(4-14)} = 7.953$; $P = 0.004$; Figure 4C), without modification in the PFC ($F_{(4-15)} = 3.075$; $P = 0.063$; Figure 4C), in the hippocampus ($F_{(4-14)} = 3.659$; $P = 0.05$; Figure 4C) and NAC ($F_{(4-14)} = 2.304$; $P = 0.130$; Figure 4C), compared to saline. Moreover, the acute administration with EFF-Cp at the dose 100 mg/kg decreased the nitrite/nitrate concentration in the amygdala ($F_{(4-25)} = 5.728$; $P = 0.003$; Figure 4D), while the administration of imipramine and EFF-Cp at the dose 100 mg/kg decreased the nitrite/nitrate concentration in the hippocampus ($F_{(4-24)} = 8.827$; $P < 0.001$; Figure 4D), without changing in the PFC ($F_{(4-23)} = 1.461$; $P = 0.253$; Figure 4D) and NAC ($F_{(4-24)} = 1.794$; $P = 0.170$; Figure 4D), compared with saline.

The effects of acute administration of EFF-Cp and imipramine showed no significant differences on SOD activity for any treatments in the PFC ($F_{(4-23)} = 3.084$; $P = 0.41$; data not shown), amygdala ($F_{(4-25)} = 1.830$; $P = 0.161$; data not shown), hippocampus ($F_{(4-24)} = 3.986$; $P = 0.015$; data not shown) and NAC ($F_{(4-24)} = 1.675$; $P = 0.195$; data not shown), compared to saline. Statistical analysis also did not show any differences on CAT activity for any treatments in the PFC ($F_{(4-23)} = 1.554$; $P = 0.227$; data not shown), amygdala ($F_{(4-25)} = 0.850$; $P = 0.510$; data not shown), hippocampus ($F_{(4-24)} = 1.909$; $P = 0.148$; data not shown) and NAC ($F_{(4-24)} = 0.998$; $P = 0.423$; data not shown), compared to saline.

Elevated levels of oxidative damage to lipids, proteins and DNA, as well as low levels of antioxidant compounds are regularly detected in the blood of depressed patients and in the brain of rats submitted to an animal model of depression (Luca et al., 2009, 2009; Maes, Galecki, Chang, & Berk, 2011). All of them have been correlated to the severity of depression (Bakunina et al., 2015; Yanik, Erel, & Kati, 2004). In this context, our results showed that acute administration of EFF-Cp prevented oxidative damage assessed by carbonyl, TBARS and nitrite/nitrate levels. However, our results did not show any alterations on SOD and CAT activity for all treatments in all brain structures. In accordance with our study, Gazal et al. (2014) demonstrated that chronic treatment with the aqueous extract of *C. pachystachya* reversed the increase in TBARS levels in the hippocampus of rats subjected to chronic mild stress, without changing the CAT and SOD activities. Moreover, the hydroethanolic extract of another *Cecropia* species, *C. glaziovii* Sneth, inhibited lipid peroxidation on the liver in post-injury treatment and enhanced the activity of hepatic enzymes (SOD/CAT) (Petronilho et al., 2012). Thus, our findings suggest that the antidepressant-like effects of a single dose of EFF-Cp on oxidative stress are mediated by the flavonoids, which are known by its antioxidant properties (Grosso et al., 2013). Interestingly, the major C-glycosyl flavonoids of EFF-Cp had a flavone nucleus, which has shown a positive effect on diseases related to oxidative stress, were considered an indispensable foundation for the development of new drugs (Singh et al., 2014).

Some clinical evidence supports the possible role of elevated nitrite/nitrate concentration in depression (Suzuki, Yagi, Nakaki, Kanba, & Asai, 2001; Suzuki, Yoshida, Shibuya, & Miyaoka, 2003), as nitric oxide synthase inhibitors display antidepressant-like action in different animal models of depression (Harkin, Connor, Walsh, St John, & Kelly, 2003; Yildiz, Erden, Ulak, Utkan, & Gacar, 2000). Finkel, Laghrissi-Thode, Pollock, and Rong (1996) have shown that a selective serotonin reuptake inhibitor, paroxetine, inhibited nitric oxide synthase activity in animals and humans. Thus, our results can suggest, at least in part, that the administration of EFF-Cp and imipramine could also exert its antidepressant effects by inhibiting nitrite/nitrate concentration and myeloperoxidase activity.

The effects of acute treatment of EFF-Cp and imipramine on cytokine levels did not reveal differences in IL-1 ($F_{(4-38)} = 1.536$; $P = 0.21$; data not shown), IL-6 ($F_{(4-38)} = 0.727$; $P = 0.58$; data not shown) and TNF- α levels ($F_{(4-38)} = 0.190$; $P = 0.94$; data not shown) for any treatments in serum. Several studies have suggested that immune dysregulation forms part of the pathophysiology of depression (Dantzer & Kelley, 2007; Kim et al., 2007; Leonard & Maes,

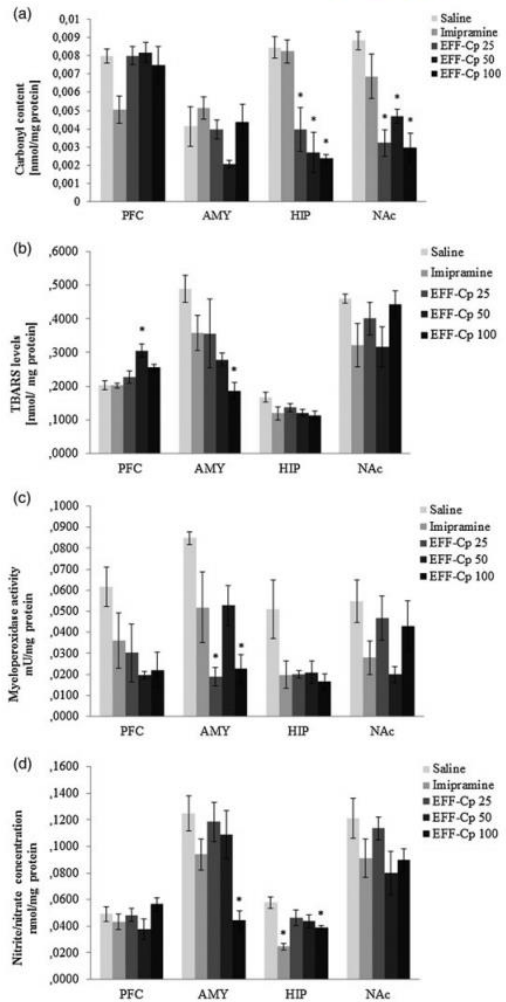


FIGURE 4 Effects of the acute administration of enriched flavonoid fraction (EFF-Cp) of *C. pachystachya* and imipramine on the carbonyl protein content levels (a), thiobarbituric acid reactive substance levels (b), myeloperoxidase activity (c), nitrite/nitrate concentration (d) in the prefrontal cortex (PFC), amygdala (AMY), hippocampus (HIP) and nucleus accumbens (NAc). Bars represent means \pm SEM ($n = 6$). * $P < 0.05$ vs. saline; according to one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test

2012). Interactions between antidepressant medications and inflammatory signaling pathways have been suggested in a recent review (McNamara & Lotrich, 2012), although with caution due to

inconsistent results. Therewith, our study did not show any differences in IL-1, IL-6 and TNF- α levels on serum after acute treatment with EFF-Cp and imipramine. In addition, Hannestad, DellaGioia, Ortiz,

Pittman, and Bhagwagar (2011) showed that the treatment for 5 days with citalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor, had no effect on TNF- α and IL-6 levels in human serum.

3.4 | Effects of acute administration of enriched C-glycosyl flavonoids fraction of *Cecropia pachystachya* and imipramine on energy metabolism

The effects of acute administration of EFF-Cp and imipramine on the mitochondrial respiratory chain, such as complex I, II and IV activities, are reported in Figure 4. The acute administration of EFF-Cp at 25 mg/kg decreased complex I activity in the PFC ($F_{(4-39)} = 6.973$; $P < 0.001$; Figure 5A), compared to saline. In amygdala, acute treatment with EFF-Cp at 25 and 100 mg/kg decreased

complex I activity ($F_{(4-39)} = 5.384$; $P = 0.002$; Figure 5A), compared to saline. However, in the hippocampus, acute administration of EFF-Cp at 25 mg/kg increased complex I activity ($F_{(4-39)} = 3.127$; $P = 0.027$; Figure 5A), compared to saline. In NAc, acute administration of EFF-Cp at 25 and 50 mg/kg also increased complex I activity ($F_{(4-39)} = 12.259$; $P < 0.001$; Figure 5A), compared to saline. Administration of EFF-Cp at 50 mg/kg increased complex II activity in NAc ($F_{(4-39)} = 7.799$; $P < 0.001$; Figure 5B), without changes in PFC ($F_{(4-39)} = 1.302$; $P = 0.288$; Figure 5B), amygdala ($F_{(4-39)} = 4.477$; $P = 0.005$; Figure 5B) and hippocampus ($F_{(4-39)} = 3.025$; $P = 0.030$; Figure 5B), compared to saline. In addition, there were no significant differences on complex II-III activity for any treatments in the PFC ($F_{(4-29)} = 1.547$; $P = 0.219$; data not shown), amygdala ($F_{(4-29)} = 3.133$; $P = 0.05$; data not shown), hippocampus ($F_{(4-29)} = 3.252$;

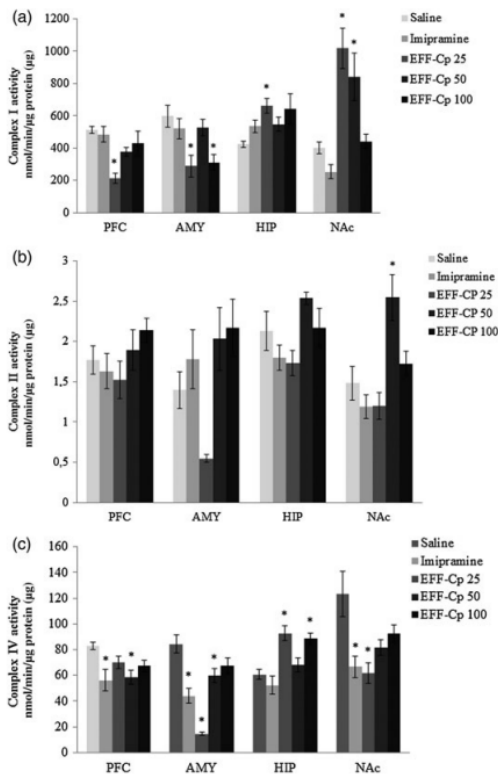


FIGURE 5 Effects of the acute administration of enriched flavonoid fraction (EFF-Cp) of *C. pachystachya* and imipramine on the complexes I (a), II (b), IV (c) activities in the prefrontal cortex (PFC), amygdala (AMY), hippocampus (HIP) and nucleus accumbens (NAc). Bars represent means \pm SEM ($n = 6$). * $P < 0.05$ vs. saline; according to one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test

$P = 0.05$; data not shown) and NAc ($F_{(4-29)} = 5.311$; $P = 0.05$; data not shown), compared to saline. Moreover, acute administration of imipramine and EFF-Cp at 50 mg/kg decreased complex IV activity in PFC ($F_{(4-24)} = 3.659$; $P = 0.022$; Figure 5C) compared to saline. In amygdala, acute administration of imipramine and EFF-Cp at 25 and 50 mg/kg decreased complex IV activity ($F_{(4-24)} = 22.992$; $P < 0.001$; Figure 5C), compared to saline. On the other hand, in the hippocampus acute administration of EFF-Cp at 25 and 100 mg/kg increased complex IV activity ($F_{(4-24)} = 10.149$; $P < 0.001$; Figure 5C), compared to saline. In NAc, acute administration of imipramine and EFF-Cp at 25 mg/kg decreased complex IV activity ($F_{(4-23)} = 5.415$; $P = 0.004$; Figure 5C), compared to saline.

Oxidative stress and concomitant mitochondrial dysfunction is evidenced in the brain and periphery of many patients with MDD diagnoses (Shao et al., 2008). In the present study, we showed that both imipramine and EFF-Cp altered respiratory chain complexes in the rat brain. However, these alterations are dependent on treatment, mitochondrial complex and brain area studied. Previous studies showed that the chronic mild stress protocol altered energy metabolism in the rat brain and chronic treatment with minocycline regulated these alterations in specific brain areas (Réus, Abelaira, et al., 2015). Abelaira et al. (2011) showed that acute and chronic treatment with lamotrigine prevented mitochondrial dysfunction by increasing complex II, II–III and IV activities in rat brain. Thus, different regions of the central nervous system can respond distinctly (Sullivan, Rabchevsky, Waldmeier, & Springer, 2005), and activities of enzymes involved in energy metabolism were analyzed in different brain regions, which in part represent different cell types, indicating heterogeneity in terms of physiological and metabolic characteristics (Sonnwald, Hertz, & Schousboe, 1998). However, the effects of single-dose EFF-Cp and imipramine on the mitochondrial respiratory chain could be protective in some complexes and brain areas, taking into account that there is a depression-related impairment of energy metabolism in the brain.

4 | CONCLUSION

Chemical analysis of the enriched flavonoid fraction of *C. pachystachya* leaves showed a rich matrix of C-glycosyl flavonoids, particularly luteolin and apigenin derivatives, that was able to produce antidepressant-like effects acting mainly on myeloperoxidase activity, nitrite/nitrate concentration and energy metabolism in acute protocol. Moreover, to the best of our knowledge, this is the first time that the presence of O-pentosyl-C-glycosyl flavonoids and vitexin has been related to *C. pachystachya*. The results of the EFF-Cp stress tests reinforced the strong stability of C-glycosyl flavonoids and corroborate with the hypothesis that the active compounds of EFF-Cp are the C-glycosyl flavonoids. In conclusion, our results suggest that a C-glycosyl flavonoid phytochemical matrix can exert antidepressant-like effects that could be related to its antioxidant properties.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor Dr. Louís Pergaud Sandjò for the collaboration in LC/QTOF analysis. Laboratory of Neurosciences (Brazil) is a center

within the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM) and a member of the Center of Excellence in Applied Neurosciences of Santa Catarina (NENASC). This research was supported by grants from CNPq (JQ, FDP, GZR and FHR), FAPESC (JQ, FDP and FHR), Instituto Cérebro e Mente, and UNESC (JQ and FDP). JQ, FHR, FDP and ELS are CNPq Research Fellows. C.F. ORTMANN is also grateful for CAPES for their research fellowship. Center for Translational Psychiatry (USA) is funded by Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, The University of Texas Medical School at Houston. The authors declared no conflict of interest.

REFERENCES

- Abad-García, B., Garmón-Lobato, S., Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (2008). New features on the fragmentation and differentiation of C-glycosidic flavone isomers by positive electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(12), 1834–1842.
- Abelaira, H. M., Réus, G. Z., Ribeiro, K. F., Zappellini, G., Ferreira, G. K., Gomes, L. M., ... Quevedo, J. (2011). Effects of acute and chronic treatment elicited by lamotrigine on behavior, energy metabolism, neurotrophins and signaling cascades in rats. *Neurochemistry International*, 59(8), 1163–1174.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Aragão, D. M., Lima, I. V., da Silva, J. M., Bellozi, P. M., da Costa, J. C., Cardoso, G. M., ... Scio, E. (2013). Anti-inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trécul. *Phytotherapy Research*, 27(6), 926–930.
- Bahramsoltani, R., Farzaei, M. H., Farahani, M. S., & Rahimi, R. (2015). Phytochemical constituents as future antidepressants: A comprehensive review. *Reviews in the Neurosciences*, 26(6), 699–719.
- Bakurina, N., Pariante, C. M., & Zunszain, P. A. (2015). Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. *Immunology*, 144, 365–373.
- Bannister, J. V., & Calabrese, L. (1987). Assays for superoxide dismutase. *Methods of Biochemical Analysis*, 32, 279–312.
- Behr, G. A., Moreira, J. C., & Frey, B. N. (2012). Preclinical and clinical evidence of antioxidant effects of antidepressant agents: Implications for the pathophysiology of major depressive disorder. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 609421.
- Can, Ö. D., DemirÖzkay, Ü., & Üçel, U. İ. (2013). Anti-depressant-like effect of vitexin in BALB/c mice and evidence for the involvement of monoaminergic mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, 699(1–3), 250–257.
- Cassina, A., & Radi, R. (1996). Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 328(2), 309–316.
- Consolini, A. E., Ragone, M. I., Migliori, G. N., Conforti, P., & Volonté, M. G. (2006). Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 90–96.
- Costa, G. M., Ortmann, C. F., Schenkel, E. P., & Reginatto, F. H. (2011). An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22, 1096–1002.
- Costa, G. M., Schenkel, E. P., & Reginatto, F. H. (2011). Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. *Natural Product Communications*, 6(6), 913–920.
- Czarny, P., Kwiatkowski, D., Kacperska, D., Kawczyńska, D., Talarowska, M., Orzechowska, A., ... Śliwiński, T. (2015). Elevated level of DNA damage and impaired repair of oxidative DNA damage in patients with recurrent depressive disorder. *Medical Science Monitor*, 21, 412–418.
- Dantzer, R., & Kelley, K. W. (2007). Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21, 153–160.

- De Rosso, M., Panighel, A., Vedova, A. D., Gardiman, M., & Flamini, R. (2015). Characterization of non-anthocyanic flavonoids in some hybrid red grape extracts potentially interesting for industrial uses. *Molecules*, 20(10), 18095–18106.
- Detke, M. J., Rickels, M., & Lucki, I. (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berlin)*, 121, 66–72.
- Dwyer, A. V., Whitten, D. L., & Hawrelak, J. A. (2011). Herbal medicines, other than St. John's Wort, in the treatment of depression: A systematic review. *Alternative Medicine Review*, 16, 40–49.
- El-Alfy, A. T., Abourashed, E. A., & Matsumoto, R. R. (2012). Nature against depression. *Current Medicinal Chemistry*, 19(14), 2229–2241.
- EMA - European Medicines Agency. (2010). Reflection paper on stability testing of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products. Retrieved from http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/11/WC500098816.pdf.
- EMA - European Medicines Agency. (2011). Guideline on quality of herbal medicinal products /traditional herbal medicinal products. Retrieved from http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/09/WC500113209.pdf.
- Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186, 407–421.
- Finkel, M. S., Laghrissi-Thode, F., Pollock, B. G., & Rong, J. (1996). Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. *Psychopharmacology Bulletin*, 32(4), 653–658.
- Fischer, J. C., Ruitenbeek, W., Berden, J. A., Trijbels, J. M., Veerkamp, J. H., Stadhouders, A. M., ... Janssen, A. J. (1995). Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinica Chimica Acta*, 153, 23–36.
- García, L. S., Comim, C. M., Valvassori, S. S., Réus, G. Z., Andreazza, A. C., Stertz, L., ... Quevedo, J. (2008). Chronic administration of ketamine elicits antidepressant-like effects in rats without affecting hippocampal brain-derived neurotrophic factor protein levels. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 103(6), 502–506.
- García, L. S., Comim, C. M., Valvassori, S. S., Réus, G. Z., Barbosa, L. M., Andreazza, A. C., ... Quevedo, J. (2008). Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 32, 140–144.
- Gazal, M., Kaufmann, F. N., Acosta, B. A., Oliveira, P. S., Valente, M. R., Ortman, C. F., ... Ghisleni, G. (2015). Preventive effect of *Cecropia pachystachya* against ketamine-induced manic behavior and oxidative stress in rats. *Neurochemical Research*, 40(7), 1421–1430.
- Gazal, M., Ortman, C. F., Martins, F. A., Streck, E. L., Quevedo, J. de Campos, A. M., ... Lencina, C. L. (2014). Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. *Brain Research Bulletin*, 108, 10–17.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126, 131–138.
- Grosso, C., Valentão, P., Ferreres, F., & Andrade, P. B. (2013). The use of flavonoids in central nervous system disorders. *Current Medicinal Chemistry*, 20(37), 4694–4719.
- Hannestad, J., DellaGioia, N., Ortiz, N., Pittman, B., & Bhagwagar, Z. (2011). Citalopram reduces endotoxin-induced fatigue. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(2), 256–259.
- Harkin, A., Connor, T. J., Walsh, M., St John, N., & Kelly, J. P. (2003). Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Neuropharmacology*, 44(5), 616–623.
- Hikawczuk, W., Saad, J., Guardia, T., Juarez, A., & Giordano, O. (1998). Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. *Anales de la Asociación Química Argentina*, 86, 167–170.
- ICH - International Conference on Harmonization. (2005). Validation of analytical procedures: Text and methodology • Q2 (R1). Retrieved from http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf.
- Isingrini, E., Camus, V., Le Guisquet, A. M., Pingaud, M., Devers, S., & Belzung, C. (2010). Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: A model of fluoxetine resistance in mice. *PLoS One*, 5(4), e10404.
- Kim, Y. K., Na, K. S., Shin, K. H., Jung, H. Y., Choi, S. H., & Kim, J. B. (2007). Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 31(5), 1044–1053.
- Lacaille-Dubois, M. A., Franck, U., & Wagner, H. (2001). Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 8, 47–52.
- Lee, S. Y., Lee, S. J., Han, C., Patkar, A. A., Masand, P. S., & Pae, C. U. (2013). Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: Targets for novel antidepressants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 46, 224–235.
- Leonard, B., & Maes, M. (2012). Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36, 764–785.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., ... Stadtman, E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186, 464–478.
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233, 344–357.
- Liang, Z., Zhang, B., Su, W. W., Williams, P. G., & Li, Q. X. (2016). C-glycosylflavones alleviate tau phosphorylation and amyloid neurotoxicity through GSK3 β inhibition. *ACS Chemical Neuroscience*, 7, 912–923.
- Liu, Y., Lan, N., Ren, J., Wu, Y., Wang, S. T., Huang, X. F., & Yu, Y. (2015). Orientin improves depression-like behavior and BDNF in chronic stressed mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59, 1130–1142.
- Lorenzi, H., & Matos, F. J. (2012). *Plantas Medicinas do Brasil*, 1st edition. In Nova Odessa. São Paulo, Brazil: InstitutoPlantarum.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Lucca, G., Comim, C. M., Valvassori, S. S., Réus, G. Z., Vuolo, F., Petronilho, F., ... Quevedo, J. (2009). Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochemistry International*, 54(5–6), 358–362.
- Lucca, G., Comim, C. M., Valvassori, S. S., Réus, G. Z., Vuolo, F., Petronilho, F., ... Quevedo, J. (2009). Increased oxidative stress in submitochondrial particles into the brain of rats submitted to the chronic mild stress paradigm. *Journal of Psychiatry Research*, 43(9), 864–869.
- Mabry, T. J., Markham, K. R., & Thomas, M. B. (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids*. New York: Springer-Verlag.
- Maes, M., Galecki, P., Chang, Y. S., & Berk, M. (2011). A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35(3), 676–692.
- McNamara, R. K., & Lotrich, F. E. (2012). Elevated immune-inflammatory signaling in mood disorders: A new therapeutic target? *Expert Review of Neurotherapeutics*, 12(9), 1143–1161.
- Morris, G., & Berk, M. (2015). The many roads to mitochondrial dysfunction in neuroimmune and neuropsychiatric disorders. *BMC Medicine*, 13, 68.
- Ortmann, C. F., Réus, G. Z., Ignacio, Z. M., Abelaira, H. M., Titus, S. E., de Carvalho, P., ... Reginatto, F. H. (2016). Enriched flavonoid fraction from *Cecropia pachystachya* Trécul leaves exerts antidepressant-like behavior and protects brain against oxidative stress in rats subjected to chronic mild stress. *Neurotoxicity Research*, 29(4), 469–483.

- Pacheco, N. R., Pinto, N. C., da Silva, J. M., Mendes, R. F., da Costa, J. C., Aragão, D. M., ... Scio, E. (2014). *Cecropia pachystachya*: A species with expressive in vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant effects. *BioMed Research International*, 301294.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The Rat Brain: stereotaxic coordinates* (2nd ed.). Sydney, Australia: Academic Press.
- Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Costa, G. M., Kappel, V. D., De Oliveira, S. Q., Fortunato, J., ... Reginatto, F. H. (2012). Hepatoprotective effects and HSV-1 activity of the hydroethanolic extract of *Cecropia Glaziovii* (embaúba-vermelha) against acyclovir-resistant strain. *Pharmaceutical Biology*, 50(7), 911–918.
- Réus, G. Z., Abelaira, H. M., Maciel, A. L., Dos Santos, M. A., Carlessi, A. S., Steckert, A. V., ... Quevedo, J. (2015). Mincocycline protects against oxidative damage and alters energy metabolism parameters in the brain of rats subjected to chronic mild stress. *Metabolic Brain Disease*, 30(2), 545–553.
- Réus, G. Z., Carlessi, A. S., Titus, S. E., Abelaira, H. M., Ignácio, Z. M., da Luz, J. R., ... Quevedo, J. (2015). A single dose of 5-ketamine induces long-term antidepressant effects and decreases oxidative stress in adulthood rats following maternal deprivation. *Developmental Neurobiology*, 75, 1268–1281.
- Rudnicki, M., Oliveira, M. R., Pereira, T. V., Reginatto, F., Dal-Pizzol, F., & Moreira, J. C. F. (2007). Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 45(4), 656–661.
- Rustin, P., Munnich, A., & Rötig, A. (2002). Succinate dehydrogenase and human diseases: New insights into a well-known enzyme. *European Journal of Human Genetics*, 10(5), 289–291.
- Sena, L. M., Zucolotto, S. M., Reginatto, F. H., Schenkel, E. P., & De Lima, T. (2009). Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis* Flavicarpa Degener: Putative involvement of C-glycosylflavonoids. *Experimental Biology and Medicine*, 234(8), 967–975.
- Shao, L., Martín, M. V., Watson, S. J., Schatzberg, A., Akil, H., Myers, R. M., ... Vawter, M. P. (2008). Mitochondrial involvement in psychiatric disorders. *Annals of Medicine*, 40(4), 281–295.
- Singh, S., & Bakshi, M. (2000). Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. *Pharmaceutical Technology On-Line*, 1–14.
- Singh, M., Kaur, M., & Silakari, O. (2014). Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 206–239.
- Sonnenwald, U., Hertz, L., & Schousboe, A. (1998). Mitochondrial heterogeneity in the brain at the cellular level. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 18(3), 231–237.
- Sullivan, P. G., Rabchevsky, A. G., Waldmeier, P. C., & Springer, J. E. (2005). Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: Cause or effect of neuronal cell death? *Journal of Neuroscience Research*, 79, 231–239.
- Suzuki, E., Yagi, G., Nakaki, T., Kanba, S., & Asai, M. (2001). Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *Journal of Affective Disorders*, 63(1–3), 221–224.
- Suzuki, E., Yoshida, Y., Shibuya, A., & Miyaoka, H. (2003). Nitric oxide involvement in depression during interferon-alpha therapy. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 6(4), 415–419.
- Talhi, O., & Silva, A. M. S. (2012). Advances in C-glycosylflavonoid research. *Current Organic Chemistry*, 16(7), 859–896.
- Wang, S., Yu, Y., Feng, Y., Zou, F., Zhang, X., Huang, J., ... Liu, Y. (2016). Protective effect of the orientin on noise-induced cognitive impairments in mice. *Behavioural Brain Research*, 296, 290–300.
- Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52(2), 90–110.
- Xiao, J., Capanoglu, E., Jassbi, A. R., & Miron, A. (2016). Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 529–545.
- Yanik, M., Erel, O., & Kati, M. (2004). The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. *Acta Neuropsychiatrica*, 16, 200–203.
- Yildiz, F., Erden, B. F., Ulak, G., Utkan, T., & Gacar, N. (2000). Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology (Berlin)*, 49, 41–44.
- Zhang, Y., Tie, X., Bao, B., & Wu, X. (2007). Metabolism of flavone C-glycosides and p-coumaric acid from antioxidant of bamboo leaves (AOB) in rats. *British Journal of Nutrition*, 97(3), 484–494.
- Zucolotto, S., Goulart, S., Montanher, A., Reginatto, F. H., Schenkel, E., & Frode, T. (2009). Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glycosylflavones from *Passiflora edulis*. *Planta Medica*, 1221–1226.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Ortmann CF, Abelaira HM, Réus GZ, et al. LC/QTOF profile and preliminary stability studies of an enriched flavonoid fraction of *Cecropia pachystachya* Trécul leaves with potential antidepressant-like activity. *Biomedical Chromatography*. 2017;e3982. <https://doi.org/10.1002/bmc.3982>

2.4.4 Publicação: Avaliação do efeito tipo-antidepressivo e neuroprotetor da FEF-Cp em modelo de estresse crônico moderado

Considerando o comportamento tipo-antidepressivo observado no tratamento agudo para as doses de 50 e 100 mg.kg⁻¹ de FEF-Cp descrito anteriormente, um novo experimento foi realizado para avaliação da atividade tipo-antidepressiva da FEF-Cp em animais submetidos ao modelo de estresse crônico moderado (ECM). Nesse modelo os animais foram submetidos a variados agentes estressores durante 40 dias, recebendo 7 dias de tratamento com a dose de 50 mg.kg⁻¹ de FEF-Cp a partir do 35º dia. Foram avaliados também parâmetros de estresse oxidativo e quanto ao metabolismo energético cerebral dos animais.

Esses experimentos foram realizados em parceria com os grupos de pesquisa coordenados pelos professores João Quevedo e Emílio Streck da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e professora Fabrícia Petronilho da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL).

Os resultados foram publicados no artigo intitulado: Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trécul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress, publicado na revista *Neurotoxicity Research*.

Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trécul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress

Caroline F. Ortmann¹ · Gislaïne Z. Réus² · Zuleide M. Ignácio² · Helena M. Abelaira² · Stephanie E. Titus³ · Pâmela de Carvalho¹ · Camila O. Arent² · Maria Augusta B. dos Santos² · Beatriz I. Matias² · Maryane M. Martins⁴ · Angela M. de Campos¹ · Fabricia Petronilho⁴ · Leticia J. Teixeira⁵ · Meline O. S. Morais⁵ · Emilio L. Streck⁵ · João Quevedo^{2,5} · Flávio H. Reginatto¹

Received: 28 August 2015 / Revised: 10 December 2015 / Accepted: 2 January 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract The purpose of this study was to assess the effect of an enriched *C*-glycosyl flavonoids fraction (EFF-*Cp*) from *Cecropia Pachystachya* leaves on behavior, mitochondrial chain function, and oxidative balance in the brain of rats subjected to chronic mild stress. Male Wistar rats were divided into experimental groups (saline/no stress, saline/stress, EFF-*Cp*/no stress, and EFF-*Cp*/stress). ECM groups were submitted to stress for 40 days. On the 35th ECM day, EFF-*Cp* (50 mg/kg) or saline was administrated and the treatments lasted until the 42nd day. On the 41st and 42nd days, the animals were submitted to the splash test and the forced swim test. After these behavioral tests, the enzymatic activity of mitochondrial chain complexes and oxidative stress were analyzed. EFF-*Cp* reversed the depressive-like behavior induced by ECM. It also reversed

the increase in thiobarbituric acid reactive species, myeloperoxidase activity, and nitrite/nitrate concentrations in some brain regions. The reduced activities of the antioxidants superoxide dismutase and catalase in some brain regions were also reversed by EFF-*Cp*. The most pronounced effect of EFF-*Cp* on mitochondrial complexes was an increase in complex IV activity in all studied regions. Thus, it can be concluded that EFF-*Cp* exerts an antidepressant-like effect and that oxidative balance may be an important physiological process underlying these effects.

Keywords *Cecropia pachystachya* Trécul · *C*-glycosyl flavonoids · Isoorientin · Oxidative stress · Energy metabolism · Chronic mild stress · Antidepressant · Major depressive disorder

✉ Gislaïne Z. Réus
gislaïnezilli@hotmail.com

- Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil
- Laboratório de Neurociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC 88806-000, Brazil
- Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Center for Translational Psychiatry, The University of Texas Medical School at Houston, Houston, TX, USA
- Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil
- Laboratório de Bioenergética, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

Introduction

Research in both humans and animals has confirmed that chronic stress can contribute to the pathophysiology of MDD (Calabrese et al. 2009; Amikishieva et al. 2011; Ignácio et al. 2014; Gazal et al. 2014; Garabadu et al. 2015). The complete pathogenesis of MDD and the mechanisms of action of antidepressants currently available are not yet fully understood (Leuchter et al. 2010). Studies show that depression is a heterogeneous disorder whose biological mechanisms are complex and interdependent. As a result, response to treatment across the general population is still quite inconsistent (Belmaker and Agam 2008). Among the many biological processes thought to be involved in the pathogenesis of MDD, some studies have highlighted changes in mitochondrial function, energy metabolism, and oxidative balance as important mechanisms underlying

MDD (Zhou et al. 2007; Jou et al. 2009; Gazal et al. 2014; Streck et al. 2014; Che et al. 2015; Garabadu et al. 2015). Moreover, the success of some classic antidepressants has been attributed to the changes in oxidative stress and inflammation (Rawdin et al. 2013).

Oxidative stress is defined as an imbalance in the production of reactive oxygen species (ROS) and the organism's antioxidant defenses ultimately resulting in injury to the organism (Fedorova et al. 2014). Oxidative stress triggers several biological changes to occur, such as modification of DNA, proteins and lipids, activation of various transcription factors, and increases in both pro- and anti-inflammatory cytokines (Birben et al. 2012). The brain is especially vulnerable to oxidative and nitrosative stress (O&NS) because it has a high metabolic rate (Maes et al. 2011) coupled with a high rate of oxygen consumption (Che et al. 2015) and lower average levels of antioxidants (Maes et al. 2011). In addition, the brain is highly vulnerable to lipid peroxidation due to the large amount of polyunsaturated fatty acids present in neuronal membranes (Valko et al. 2007).

Emerging evidence suggests a significant role for mitochondrial dysfunction and oxidative stress as contributors to MDD; patients show alterations in mitochondrial chain complexes and an increase in oxidative stress biomarkers through activation of inflammatory cells (Bakunina et al. 2015; Morris and Berk 2015). Antidepressants decrease inflammatory and oxidative damage and improve mitochondrial dysfunction in animal models of depression (Réus et al. 2015a, b) and in depressed patients (Behr et al. 2012; Lee et al. 2013).

Medicinal plants are commonly used to treat diseases due to their inherent antioxidant properties. In addition, studies have shown that the therapeutic antidepressant activity of many medicinal herbs can be attributed to their antioxidant activities (El-Alfy and Abourashed 2012). Among the many medicinal herbs analyzed in scientific research, *Cecropia pachystachya*, popularly known as embaúba (Berg and Rosselli 2005; Costa et al. 2011a), is a species that has an antidepressant-like effect (Gazal et al. 2014) and a high antioxidant power that is frequently attributed to its phenolic compound components (Pacheco et al. 2014), especially the C-glycosyl flavonoids (Rice-Evans, 2001; Talhi and Silva 2012). Three C-glycosyl flavonoids found in *C. pachystachya* leaves have already been identified: isoorientin, orientin, and isovitexin (Costa et al. 2011b). Moreover, it was noted that isoorientin, the major compound of the C-glycosyl flavonoids fraction (EFF-Cp), produces antioxidant effects through the scavenging of free radicals (Andrade-Cetto and Heinrich 2005; Nicasio-Torres et al. 2009; Chaillou and Nazareno 2006).

Studies have also shown that classical antidepressants activate oxidative defense mechanisms, such as oxidant reduction and induction of several antioxidant enzymes

(Zafir et al. 2009). Decreased antioxidant capacity has been associated with neurodegeneration, cell death, reduced neurogenesis, reduced neuronal plasticity, and increased autoimmune responses (Moylan et al. 2013). Classical antidepressants decrease inflammatory and oxidative damage and improve mitochondrial dysfunction in animal models of depression (Réus et al. 2015a, b) and in depressed patients (Behr et al. 2012; Lee et al. 2013). Thus, the aim of the present work was to examine the effect of an enriched C-glycosyl flavonoids fraction from *Cecropia pachystachya* leaves on depressive-like behavior and biochemical changes in energy metabolism and oxidative balance induced by chronic mild stress (CMS) in brain regions associated with MDD in rats.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

Acetic acid (*p.a.* grade) and acetonitrile (HPLC grade) were provided by Tedia® (Brazil). Water was purified in a Milli-Q system (Millipore®, Bedford, USA). All solutions used in HPLC were filtered through a 0.45 µm membrane before use. Isovitexin (4',5,7-tetrahydroxyflavone-6-glucoside, ≥98.0%), isoorientin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-6-glucoside, ≥98.0%), and orientin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-8-glucoside, ≥98.0%) were purchased from Sigma Aldrich® Co. (St. Louis, USA).

Plant Material, Extraction, and EFF-Cp Preparation

Leaves of *Cecropia pachystachya* Trécul were collected in Torres, RS, Brazil. A voucher specimen (ICN 150025) was deposited in the Herbarium of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. The plant material was dried under air flow ≤35 °C and powdered mechanically. The extraction was performed by Ultra-Turrax T25 basic IKA® with ethanol 20 % (5 % plant:solvent ratio, w/v; 9500 rpm; 5 min). This extract was partitioned with *n*-butanol, yielding the *n*-butanolic fraction that was dried under reduced pressure, and stirred with Amberlite® XAD-16 resin. Then, the resin was stirred again in the presence of methanol for 30 min yielding the enriched C-glycosyl flavonoid fraction (EFF-Cp).

EFF-Cp Chemical Characterization by High-Performance Liquid Chromatography

The analyses of EFF-Cp samples were performed as previously described (Costa et al. 2011b). Briefly, a PerkinElmer Series 200 HPLC, composed of a Photodiode Array

Detector, quaternary pump, autosampler, and online degasser were used. The data acquisition system was Chromera® software (Version 3.2.0.4847). The separation was achieved on a PerkinElmer Brownlee Choice C18 column (150 mm × 4.6 mm i.d.; 5 µm) and a gradient of solvent A (acetonitrile) and solvent B (acetic acid 1 %, adjusted to pH 3.0) as follows: 5–20 % A (0–30 min) and isocratic 20 % A (30–40 min) as the mobile phase. The flow rate was kept at 1.0 ml/min. Chromatograms were recorded at 340, while the UV spectra were monitored over a range of 200–450 nm. The peaks were characterized by comparing the retention time and UV spectra with the reference standards, and by the co-injection of the sample and authentic samples. The total flavonoid content was determined by an internal standard method, using isoorientin, the primary flavonoid, as reference. Isoorientin standard solution was prepared in different concentrations and the quantification was performed using a six-point regression curve ($r^2 > 0.9964$). All standard solutions were analyzed in triplicate. Total flavonoid content was measured by adding up the areas at $\lambda = 340$ nm of all the peaks identified by UV/DAD spectra as being flavonoids (Rt: 22.9 min – 32.5 min). Therefore, the corresponding concentration of total flavonoids was calculated and expressed based on the analytical curve of the primary flavonoid isoorientin.

Animals

Male adult Wistar rats (60-day old) were obtained from the UNESC (Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil) breeding colony. They were housed five per cage with food and water available ad libitum and were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 h). All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the National Institutes of Health (NIH), Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care and with approval by local Ethics Committee under protocol number 041-2014-1.

Chronic Mild Stress (CMS)

The CMS protocol was adapted from a procedure described by Gamaro et al. (2003). The animals were divided into two groups: control and stress. The control groups were kept undisturbed in their home cages during the 40 days of treatment receiving only ordinary daily care with daily supports of food and water. The 40-day CMS paradigm was used for the animals in the stressed group. Individual stressors and length of time applied each day were as follows: (i) 24 h food deprivation was applied on days 2, 7,

15, 21, and 30; (ii) 24 h water deprivation on days 1, 10, 20, and 33; (iii) 1–3 h restraint on days 9, 23, and 31; (iv) 1.5–2 h restraint at 4 °C on days 13, 26, and 34; (v) flashing light over a duration of 120–210 min on days 6, 14, 22, 28, 32, and 39; and (vi) isolation on days 3, 4, 5, 17, 18, 19, 24, 25, 36, and 37. Stressor stimuli were applied at different times every day, in order to minimize its predictability. Restraint was carried out by placing the animal in a 25 cm × 7 cm plastic tube and adjusting it with plaster tape on the outside until the animal was unable to move. There was a 1 cm hole at the far end for breathing. The exposure to flashing light was undertaken by placing the animal in a 60 cm × 60 cm × 25 cm plywood box divided into 16 cells of 15 cm × 15 cm × 25 cm with a front glass wall. A 40 W lamp, flashing at a frequency of 60 flashes/min, was used.

The animals were submitted to the behavioral tests 24 h after the last stressor. The rats were first evaluated in the open-field test and then immediately submitted to the splash test. After the splash test, the animals were evaluated in the forced swimming test (FST).

Treatment

The dose of EFF-*Cp* (50 mg/kg) was administered orally by gavage. The chosen dose was selected from a previous pilot study in which a dose–response curve was performed. Animals were divided into four groups: control/vehicle, control/EFF-*Cp*, CMS/vehicle, and CMS/EFF-*Cp*. Treatment began on the 35th day of CMS and lasted until the test day in the FST (42nd day). It was administered 60 min before testing in the open field and the FST.

Behavioral Tests

Open-Field Test

The rats were treated with EFF-*Cp* (50 mg/kg) or saline 60 min before the exposure to the open-field apparatus, in order to assess possible effects of drug treatment on spontaneous locomotor activity. Analysis of the rats spontaneous activity was carried out in an open-field apparatus, which is an arena 45 × 60 cm surrounded by 50 cm high walls made of brown plywood with a front-facing glass wall. The floor of the open field was divided into 9 rectangles (15 × 20 cm each) by black lines. Animals were gently placed on the left rear rectangle and left to explore the arena for 5 min. The number of horizontal (crossing) and vertical (rearing) activities performed by each rat during the 5-min observation period was counted by an expert observer.

Splash Test

This test was conducted as previously described (Isingrini et al. 2010; Mutlu et al. 2012). It consists of spraying a 10 % sucrose solution on the mouse in its home cage. The sucrose solution dirties the coat and induces a grooming behavior. After applying sucrose solution, the time spent grooming was recorded for a period of 5 min as an index of self-care and motivational behavior.

Forced Swimming Test

The forced swimming test was conducted according to the previous reports (Porsolt et al. 1977; Garcia et al. 2008). The test involves two individual exposures to a cylindrical tank filled with water in which the rats cannot touch the bottom of the tank or escape. The tank is made of transparent Plexiglas, 80 cm tall, 30 cm in diameter, and filled with water (22–23 °C) to a depth of 40 cm. On the 41st day, 1 h after the administration of the EFF-*Cp* or saline treatment, the rats were individually placed in the cylinder containing water for 15 min (pre-test session). On the 42nd day, the rats received their treatment, and after 1 h were again subjected to the forced swimming test for a 5-min session (test session), and the immobility time of rats was recorded in seconds by an expert observer (the researcher was blind to the experimental groups). After the behavioral tests, all rats were killed by decapitation and the skulls were immediately removed. The prefrontal cortex (PFC), hippocampus (HIP), amygdala (AMY), and nucleus accumbens (NAc) were quickly isolated by hand dissection using a magnifying glass and a thin brush. The dissection was based on the histological distinctions described by Paxinos and Watson (1986).

Tissue and Homogenate Preparation

The PFC, HIP, AMY, and NAc were homogenized (1:10, w/v) in SETH buffer, pH 7.4 (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base, and 50 IU/ml heparin). The homogenates were centrifuged at 800×g for 10 min at 4 °C and supernatants were kept at –70 °C until they were used for enzyme activity determination. The maximum period between homogenate preparation and enzyme analysis was always less than 5 days. Protein content was determined by the method described by Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as a standard.

Oxidative Stress Parameters

Myeloperoxidase (MPO) Activity

Neutrophil infiltrate in tissues was measured by MPO activity (De Young et al. 1989). Brain tissues were homogenized

(50 mg/ml) in 0.5 % hexadecyltrimethylammonium bromide and centrifuged at 15,000×g for 40 min. The suspension was then sonicated three times for 30 s. An aliquot of supernatant was mixed with a solution of 1.6 mM tetramethylbenzidine and 1 mM H₂O₂. Activity was measured spectrophotometrically as the change in absorbance at 650 nm at 37 °C. Data were expressed as mU per mg of protein.

Thiobarbituric Acid Reactive Species Formation (TBARS)

Lipid peroxidation was measured by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Esterbauer and Cheeseman 1990). After brain dissection, brain structures were washed with PBS, harvested, and lysed. Thiobarbituric reactive species, obtained by acid hydrolysis of 1,1,3,3-tetra-ethoxy-propane (TEP), was used as the standard for the quantification of TBARS. TBA 0.67 % was added to each tube and the tubes were vortexed. The reaction mixture was incubated at 90 °C for 20 min and the reaction was stopped by placing the samples on ice. The optical density of each solution was measured in a spectrophotometer at 535 nm. Data were expressed as nmol of malondialdehyde (MDA) equivalents per mg of protein.

Carbonyl Protein Formation

Protein carbonyl content was measured in brain homogenates using 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in a spectrophotometric assay (Levine et al. 1990). Briefly, sample tissues were sonicated in ice-cold homogenization buffer containing phosphatase and protease inhibitors (200 nM calyculin, 10 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate, and 1 µM microcystin-LR) and centrifuged at 1000×g for 15 min to sediment insoluble material. Three hundred microliter aliquots of the supernatant containing 0.7–1.5 mg of protein were treated with 300 µl of 10 mM DNPH, dissolved in 2 M HCl, and compared with 2 M HCl alone (reagent blank). Samples then were incubated for 1 h at room temperature in the dark and stirred every 10 min. Samples were precipitated with trichloroacetic acid (final concentration of 20 %) and centrifuged at 16,000×g at 4 °C for 15 min. The pellet was washed three times with 1 ml of ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v). Each time, the pellet was lightly vortexed and left exposed to the washing solution for 10 min before centrifugation (16,000×g for 5 min). The final pellet was dissolved in 1 ml of 6 M guanidine and 10 mM phosphate buffer–trifluoroacetic acid, pH 2.3, and the insoluble material was removed by centrifugation at 16,000×g for 5 min. Absorbance was recorded in a spectrophotometer at 370 nm for both DNPH-treated and HCl-treated samples. Protein carbonyl levels were expressed as nmol of carbonyl per mg of protein.

Superoxide Dismutase (SOD) Activity

Superoxide Dismutase (SOD) estimation was performed based on its ability to spontaneously inhibit oxidation of adrenaline to adrenochrome (Bannister and Calabrese 1987). A combination of 2.78 ml of sodium carbonate buffer (0.05 mM; pH 10.2), 100 μ l of EDTA (1.0 mM), and 20 μ l of the supernatant or sucrose (blank) were incubated at 30 °C for 45 min. Thereafter, the reaction was initiated by adding 100 μ l of adrenaline solution (9.0 mM). The change in the absorbance was recorded at 480 nm for 8 min. Temperature was maintained at 30 °C throughout the assay procedure. One unit of SOD produced approximately 50 % of auto-oxidation of adrenaline. Results were expressed as units/mg of protein.

Catalase (CAT) Activity

The CAT activity was measured by the method that employs hydrogen peroxide (H_2O_2) to generate H_2O and O_2 (Aebi 1984). Brain tissue was sonicated in 50 mmol/l phosphate buffer (pH 7.0), and the resulting suspension was centrifuged at 3000 $\times g$ for 10 min. The sample aliquot (20 μ l) was added to 980 μ l of the substrate mixture. The substrate mixture contained 0.3 ml of hydrogen peroxide in 50 ml of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0). Initial and final absorbencies were recorded at 240 nm after 1 and 6 min, respectively. A standard curve was established using purified catalase (Sigma, MO, USA) under identical conditions.

Nitrosative Stress*Measurement of Nitrite/Nitrate Concentration*

Total nitrite concentrations were measured using the Griess reaction, by adding 100 μ l of Griess reagent 0.1 % (w/v) naphthyl ethyl endi amide dihydrochloride in H_2O and 1 % (w/v) sulphanilamide in 5 % (v/v) concentrated H_3PO_4 , vol. [1:1] to the 100 μ l sample. Absorbance was recorded in a spectrophotometer at 550 nm (Green et al. 1982). Data were expressed as nmol of nitrite/nitrate concentration per mg of protein.

Energy Metabolism*Respiratory Chain Enzyme Activities*

NADH dehydrogenase (complex I) was evaluated using the method described by Cassina and Radi (1996) relating to the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at 420 nm. The activities of succinate-2,6-dichloroindophenol (DCIP) oxidoreductase (complex II) and succinate:cytochrome c oxidoreductase (complex II–III) were determined by the

method described by Fischer et al. (1995). Complex II activity was measured by following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-DCIP at 600 nm. Complex II–III activity was measured by cytochrome c reduction from succinate at 550 nm. The activity of cytochrome c oxidase (complex IV) was assayed according to the method described by Rustin et al. (1994) and measured by following the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome c at 550 nm with 580 nm as a reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). The reaction buffer contained 10 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.6 mM n-dodecyl-d maltoside, 2–4 lg homogenate protein, and the reaction was initiated with the addition of 0.7 lg reduced cytochrome c. The activity of complex IV was measured at 25 °C for 10 min. The activities of the mitochondrial respiratory chain complexes were calculated as $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg protein}^{-1}$.

Activity of Creatine Kinase Enzyme

The creatine kinase activity was measured in the brain homogenates pre-treated with 0.625 mM lauryl maltoside. The reaction mixture consisted of 60 mM Tris–HCl, pH 7.5, containing 7 mM phosphocreatine, 9 mM $MgSO_4$ and approximately 0.4–1.2 μ g protein in a final volume of 100 μ l. After 15 min of pre-incubation at 37 °C, the reaction was started by the addition of 3.2 mmol of ADP plus 0.8 mmol of reduced glutathione. The reaction was stopped after 10 min by the addition of 1 μ mol of p-hydroxymercuribenzoic acid. The creatine formed was estimated according to the colorimetric method of Hughes (1962). The color was developed by the addition of 100 μ l 2 % α -naphthol and 100 μ l 0.05 % diacetyl in a final volume of 1 ml and read spectrophotometrically after 20 min at 540 nm.

Statistical Analysis

The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 21.0 was utilized for statistical analyses. All data are presented as mean \pm S.E.M. Differences among experimental groups were determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for behavior and oxidative stress parameters. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results**Chemical Characterization of EFF-Cp by HPLC/PDA**

The phenolic characterization of the enriched C-glycosyl flavonoid fraction was performed as described by Costa

et al. (2011b). It was possible to identify the three major C-glycosyl flavonoids, isorientin (3), orientin (4), and isovitexin (7), in EFF-*Cp* by comparing their UV spectra and the retention times (HPLC) with standard references (Fig. 1). The peak purity of flavonoids was determined by overlapping the UV/DAD spectra in different regions of the same peak using the HPLC software. The identification of flavonoid peaks was based on the characteristic UV spectral pattern as shown in Fig. 1 (Band I, λ max around 300–350 nm and Band II, λ max around 230–280 nm). In addition, it was observed that unidentified compounds (1), (2), (5), and (6) presented a spectral pattern as apigenin nucleus, like isovitexin (7) (Fig. 1b). For total flavonoid content, the peaks areas that showed flavonoid UV spectra were pooled and expressed as isoorientin, the primary C-glycosyl flavonoid present in the EFF-*Cp* (Table 1).

Behavioral Tests

As depicted in Fig. 2a, CMS increased immobility time in the forced swimming test, producing a depressant-like effect in the animals which was significantly reduced in EFF-*Cp*-treated rats (Fig. 2a; $F = 5.72$; $p < 0.05$). Figure 2b shows the effects of CMS on the splash test. Although the number of grooming activities did not differ between control and stressed animals, EFF-*Cp* treatment did significantly increase the amount of grooming by animals subjected to stress (Fig. 2b; $F = 4.43$; $p < 0.05$). Figure 2c shows the effects of CMS and EFF-*Cp* on the locomotor activity evaluated in the open-field test. The locomotor activity was reduced in stressed animals, as measured by number of crossings (Fig. 2c; $F = 12.23$; $p < 0.01$) and rearings (Fig. 2c; $F = 6.60$; $p < 0.01$). EFF-*Cp* treatment did not change the locomotor activity when compared with saline treatment, indicating that the decreased immobility in the swimming test under EFF-*Cp* treatment was not related to modified locomotor activity.

Measurement of Oxidative Stress Parameters

The results of oxidative stress are depicted in Fig. 3. CMS increased protein carbonyl in the PFC (Fig. 3a; $F = 7.87$; $p < 0.01$) and HIP (Fig. 3a; $F = 14.37$; $p < 0.01$). EFF-*Cp* treatment was not able to reverse the carbonylation of protein. In the NAc, CMS did not produce a significant increase in carbonyl levels, but EFF-*Cp* treatment did produce a significant reduction in carbonylated proteins, as compared to the untreated stressed groups (Fig. 3a; $F = 5.69$; $p < 0.01$). The CMS animals had a significant increase in TBARS levels in the HIP, AMY, and NAc, but not in PFC. EFF-*Cp* significantly reversed the elevated levels of TBARS in the HIP (Fig. 3b; $F = 128.23$; $p < 0.01$), AMY (Fig. 3b; $F = 65.42$; $p < 0.01$), and NAc

(Fig. 3b; $F = 28.25$; $p < 0.01$). The myeloperoxidase (MPO) activity significantly increased after CMS and was reversed by EFF-*Cp* treatment in the AMY (Fig. 3c; $F = 10.16$; $p < 0.01$), HIP (Fig. 3c; $F = 21.43$; $p < 0.01$), and NAc (Fig. 3c; $F = 8.06$; $p < 0.01$). The concentration of nitrite and nitrate increased significantly in the HIP and NAc of stressed animals. The increase of nitrite and nitrate was reversed by EFF-*Cp* treatment in the HIP (Fig. 3d; $F = 6.34$; $p < 0.01$) and NAc (Fig. 3d; $F = 3.59$; $p < 0.05$). The activity of SOD was decreased in the AMY, HIP, and NAc of animals submitted to CMS. EFF-*Cp* only reversed the ECM effect in the NAc. Levels in the AMY (Fig. 3e; $F = 18.42$; $p < 0.01$), HIP (Fig. 3e; $F = 19.51$; $p < 0.01$), and NAc (Fig. 3e; $F = 14.75$; $p < 0.01$) were not significantly affected by EFF-*Cp*. Finally, the CAT enzyme activity was decreased in the PFC, HIP, and NAc under the effect of CMS and EFF-*Cp* significantly reversed the effect, but only in the NAc. The levels in the PFC (Fig. 3f; $F = 22.82$; $p < 0.01$), HIP (Fig. 3f; $F = 8.63$; $p < 0.01$) and NAc (Fig. 3f; $F = 13.92$; $p < 0.01$) were not significantly affected.

Measurement of Energy Metabolism

The results of energy metabolism are presented in Fig. 4. Complex I activity increased in the PFC, AMY, and HIP under CMS, both in saline and EFF-*Cp*-treated animals. In the NAc, complex I activity was unchanged in stressed and saline-treated animals, but significantly increased in stressed and EFF-*Cp*-treated rats. Levels: PFC (Fig. 4a; $F = 23.62$; $p < 0.01$), AMY (Fig. 4a; $F = 48.08$; $p < 0.01$), HIP (Fig. 4a; $F = 34.18$; $p < 0.01$), and NAc (Fig. 4a; $F = 72.02$; $p < 0.01$). Complex II activity increased in the PFC under CMS and was reversed by EFF-*Cp* treatment (Fig. 4b; $F = 25.97$; $p < 0.01$). In the AMY, complex II activity increased in stressed animals, but did not reach statistical significance. However, EFF-*Cp* treatment significantly reduced complex II activity in the AMY of stressed animals (Fig. 4b; $F = 10.46$; $p < 0.01$). The activity of succinate:cytochrome c oxidoreductase, complex II-III, significantly increased in the PFC and AMY under CMS effects. The EFF-*Cp* treatment reduced complex II-III activity to statistically lower levels than observed in non-stressed animals. Levels: PFC (Fig. 4c; $F = 27.07$; $p < 0.01$) and AMY (Fig. 4c; $F = 26.31$; $p < 0.01$). In the HIP, complex II-III activity increased in stressed animals, but did not attain statistical significance. However, EFF-*Cp* significantly reduced complex II-III activity in HIP of stressed animals (Fig. 4c; $F = 3.73$; $p < 0.05$). Complex IV activity, under the influence of EFF-*Cp*, significantly increased in all brain regions studied. In both controls and stressed animals, complex IV activity of animals treated with EFF-*Cp* increased in the analyzed

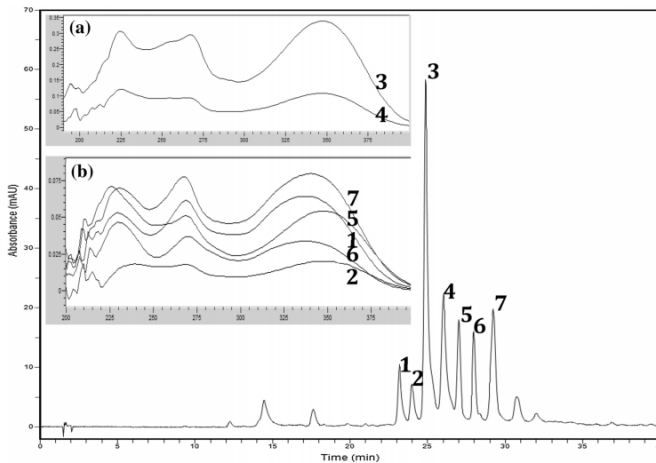


Fig. 1 HPLC chromatogram of enriched C-glycosyl flavonoid fraction (EFF-Cp) and corresponding UV/DAD spectra of flavonoid peaks. **3** Isoorientin, **4** orientin, **7** isovitexin and **1, 2, 5, 6** unidentified compounds

Table 1 Isoorientin and total flavonoids content in EFF-Cp

Flavonoid	Content (mg/g) ^a	Content (%)
Isoorientin	43.46 ± 0.88	4.34 ± 0.08
Total flavonoids	118.53 ± 2.50	11.85 ± 0.25

^a Expressed as mg/g of EFF-Cp ± SD ($n = 3$)

brain structures, indicating an intrinsic EFF-Cp effect on complex IV. Levels: PFC (Fig. 4d; $F = 97.08$; $p < 0.01$), AMY (Fig. 4d; $F = 74.66$; $p < 0.01$), HIP (Fig. 4d; $F = 26.74$; $p < 0.01$), and NAc (Fig. 4d; $F = 17.11$; $p < 0.01$). CK activity significantly increased in the AMY of animals under CMS and EFF-Cp treatment (Fig. 4e; $F = 22.29$; $p < 0.01$). In the HIP, CK activity was significantly reduced in both stressed groups, indicating an inhibitory effect of chronic stress, which was not reversed by EFF-Cp (Fig. 4e; $F = 5.61$; $p < 0.01$).

Discussion

In this study, chronic mild stress increased immobility time in the forced swimming test, producing a depressant-like effect in the animals, in accordance with other studies (Amikishieva et al. 2011; Gazal et al. 2014; Garabadu et al.

2015). In stressed animals treated with EFF-Cp, the immobility time was significantly lower than in stressed animals and those treated with saline. In fact, the immobility time was similar to the non-stressed animals. This result indicates that the EFF-Cp treatment promoted an antidepressant-like effect in stressed animals. In experiments conducted by Gazal et al. (2014), aqueous extracts of *C. pachystachya* also induced an antidepressant-like effect in animals submitted to a similar stress protocol. Thus, our results showed that the enriched C-glycosyl flavonoids fraction of *C. pachystachya* demonstrated antidepressant-like effects in the forced swimming similar to imipramine (Réus et al. 2013).

In the splash test, although the number of groomings was not different between control and stressed animals, EFF-Cp significantly increased the amount of grooming by animals subjected to stress. Other researchers have found that grooming activities were reduced in animals subjected to chronic stress and that the reduction was reversed by classical antidepressants and atypical antipsychotics (Mutlu et al. 2012). Therefore, since non-stressed animals had behavior similar to stressed animals, treatment with EFF-Cp decreased the number of groomings in these animals compared to the control group, but not compared with the stressed group, this suggests an increased reward stimulus.

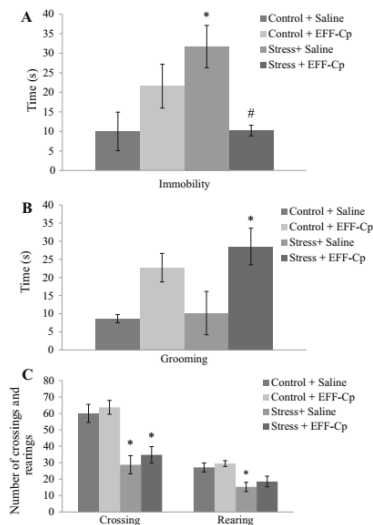


Fig. 2 CMS and EFF-*Cp* (50 mg/kg, over 7 days) effect on the immobility time in the forced swimming test (a), grooming time in the splash test (b) and locomotor activity (crossing and rearing number) in the open field (c). Values expressed as the mean and standard error of the mean ($M \pm SEM$). *Different from control, $p < 0.05$; # Different from stress versus saline, $p < 0.05$

The locomotor activity, measured in the open-field test, was reduced in stressed animals. Other studies also show that exploratory behavior in open-field tests was reduced in animals submitted to chronic stress (Che et al. 2015). However, there was no difference in locomotor activity between saline- and EFF-*Cp*-treated animals, indicating that EFF-*Cp* by itself does not produce impairment in locomotor activity; this result ensures that the effect of the EFF-*Cp* in the forced swimming test and splash test showed no bias in locomotion of the animals in each treatment group.

CMS increased protein carbonylation in the PFC and HIP, and EFF-*Cp* was unable to reverse this. In the NAc, CMS did not produce a significant increase in carbonyl levels, but EFF-*Cp* promoted a significant carbonyl reduction, as compared to untreated stressed groups. It has already been reported that CMS induces an increase of protein carbonylation in different brain regions, such as the PFC, HIP, striatum, and other cortical regions (Lucca et al.

2009; de Mello et al. 2014), as well as in the PFC, AMY, and NAc (Réus et al. 2015a, b). Protein carbonylation is a process that may increase directly and proportionally to the formation of ROS. The carbonylation process can be irreversible and result in a loss of protein function with consequent diminishment in cellular function and disease progression (Dalle-Donne et al. 2006). A study showed that carbonyl protein formation was significantly higher in the fibroblasts of MDD patients than in those derived from control subjects (Gibson et al. 2012). It is worth noting that some classical antidepressants function as antioxidants, for example, in the reversal of protein carbonylation in the brain tissue of animals with depressive-like behavior (Zafir et al. 2009). The results of the present research suggest that EFF-*Cp* does not have a relevant function in reversing the effect of stress on carbonylation. In the NAc, carbonyl contents of stressed and EFF-*Cp*-treated animals were significantly lower than in the stressed and non-treated group, though the levels are comparable to the control group. Bearing in mind that the carbonylation process can affect different proteins and depends on the accessible residue of specific reactions (Gibson et al. 2012), it is also important to consider that the antioxidant mechanisms may behave differently with the carbonyl molecule. Thus, EFF-*Cp* seems to exert a protective effect against the carbonylation of proteins in NAc. The protective effect of EFF-*Cp* in the NAc still requires more rigorous studies to better understand its antioxidant therapeutic profile in depression and other psychiatric disorders.

As in other studies (Arent et al. 2012; Gazal et al. 2014), chronic stress also increased production of TBARS, a marker of lipid peroxidation, in some brain regions. In this work, stressed animals had a significant increase in TBARS levels in the HIP, AMY, and NAc, but not the PFC. EFF-*Cp* significantly reversed elevated levels of TBARS, corroborating the results obtained by Gazal et al. (2014). However, our study is limited by the technique used to measure the levels of TBARS. This technique has been widely used, however, in more complex biological systems, many compounds (including simple and complex carbohydrates, protein oxidation products, and nucleic acid oxidation products) react with thiobarbituric acid to produce colored adducts. Thus, one cannot directly equate the measurement of TBARS with MDA or lipid peroxidation when measured in a complex biological system.

The myeloperoxidase (MPO) activity was significantly increased in the HIP, AMY, and NAc after chronic mild stress. EFF-*Cp* significantly prevented the effect of stress on MPO activity. MPO is expressed in hippocampal neurons and seems to be involved in the oxidative stress underlying neurodegenerative diseases (Green et al. 2004). Moreover, MPO can permeate into the brain through infiltrating neutrophils and macrophages and is present in

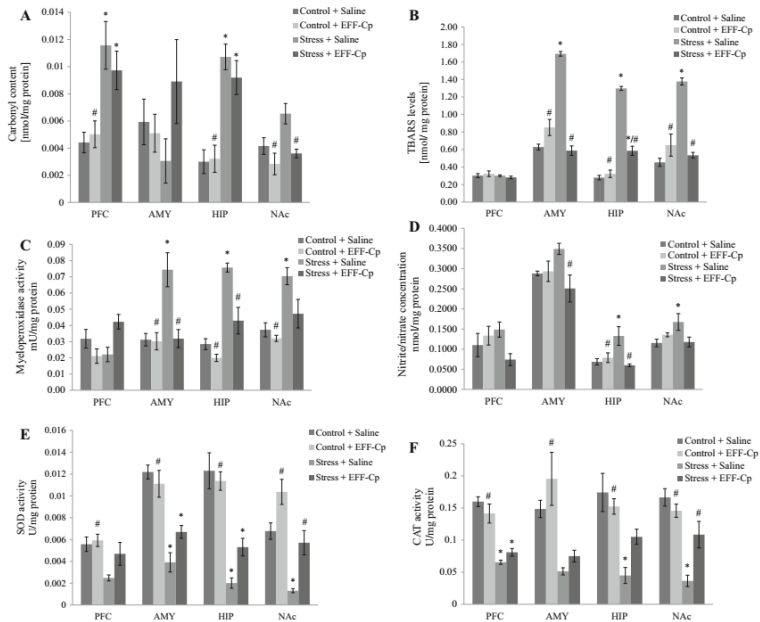


Fig. 3 CMS and EFF-Cp (50 mg/kg, over 7 days) effect on oxidative stress measured by carbonyl protein content (a), TBARS levels as a lipid peroxidation marker (b), MPO activity (c), nitrite/nitrate concentration (d), antioxidant enzymes, SOD (e) and CAT activities

(f). Values expressed as the mean and standard error of the mean ($M \pm SEM$). *Different from control, $p < 0.05$. # Different from stress versus saline, $p < 0.05$; PFC, AMY, HIP, and NAc

inflammatory processes (Yap et al. 2007). MPO promotes conversion of hydrogen peroxide to hypochlorous acid (Harrison and Schultz, 1976) and generates carbonyl proteins (Yan et al. 1997) and reactive nitrogen species (Byun et al. 1999), making it an important oxidant enzyme to study. The effect of EFF-Cp in reversing the increase in MPO activity induced by chronic stress indicates a significant protective action of the EFF-Cp against oxidative damage associated with stress and depression.

The concentrations of nitrite and nitrate, reflecting the nitric oxide content (NO), nitrosative and oxidative stress (O&NO stress), increased significantly in the HIP and NAc of stressed animals. The increase in nitrite and nitrate in these regions was reversed by EFF-Cp treatment. In the AMY, all groups had a high concentration of nitrite and

nitrate, suggesting this may be a characteristic of the region. However, the stressed and EFF-Cp-treated animals had a significant reduction in the concentration of nitrite and nitrate when compared to stressed and saline-treated animals. Overall, these results indicate that EFF-Cp exerts a protective effect against oxidative and nitrosative stress. O&NS-induced neurotoxicity has been observed in many studies. For example, the NO synthases induced under inflammatory conditions (iNOS) or neuronal NO synthase (nNOS) in excitotoxicity processes, increase the production of NO, which may react with superoxide to form peroxynitrite, an anion with strong oxidant properties (Calabrese et al. 2007). Studies have also shown that overproduction of O&NS by iNOS results in oxidative and inflammatory processes leading to neurotoxicity (Sayre et al. 2008). The

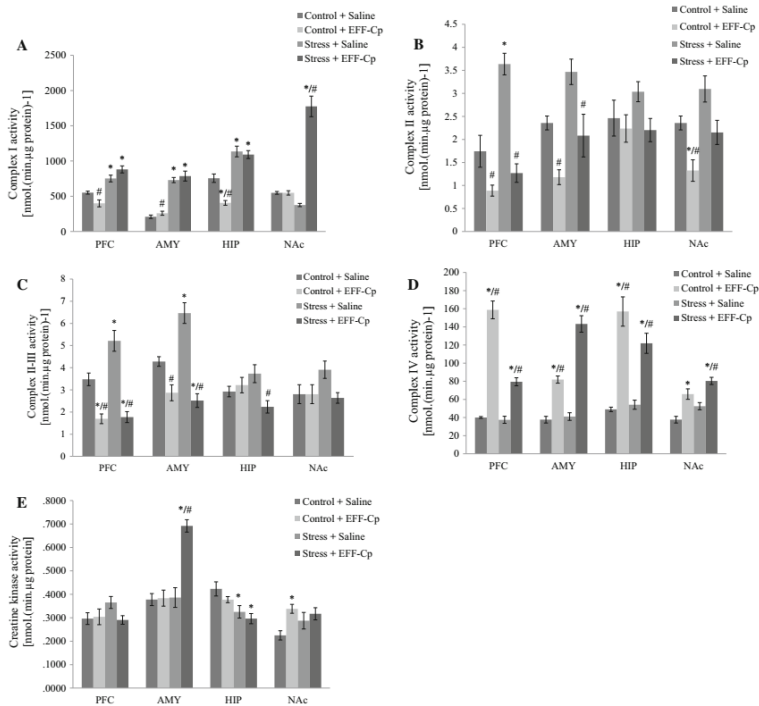


Fig. 4 CMS and EFF-Cp (50 mg/kg, over 7 days) effect on energy metabolism measured by enzymatic activity of complexes I (a), II (b), II-III (c), IV (d) and creatine kinase (CK) (e). Values expressed as the

mean and standard error of the mean ($M \pm SEM$). *Different from control, $p < 0.05$. # Different from stress versus saline, $p < 0.05$; PFC, AMY, HIP, and NAc

inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase in neurons may be a cause of neuronal death due to high levels of NO (Brown and Cooper 1994). In CMS, NO derived from nNOS exerts negative effects on hippocampal neurogenesis and seems to be partially responsible for the depressive-like behavior induced by stress (Zhou et al. 2007). Studies indicate that NOS inhibitors exert antidepressant-like effects in animals submitted to stress and depression protocols (Zhou et al. 2007; Dhir and Kulkarni 2007; Zhang et al. 2013; Tomaz et al. 2014). However, little is known about whether clinically available psychotropic drugs and

antidepressants affect the NO system in the brain (Suzuki et al. 2002a). Recently, Suzuki et al. (2002b) demonstrated that chronic treatment with imipramine, a tricyclic antidepressant, induced NOS-II mRNA and that this was accompanied by an increase in nitrate levels in the rat hypothalamus. More studies are necessary to elucidate the full effects of antidepressants on the NO system.

Orientin and its isomer isorientin are the major flavonoid compounds in EFF-Cp and their powerful antioxidant function has been attributed to free radical scavenging (Deepha et al. 2014; Praveena et al. 2014). A recent study

showed an antidepressant-like effect exerted by orientin at 20 and 40 mg/kg, along with a reduction in oxidative stress, both in the scavenging of free radicals and in the increase of antioxidant enzyme activity in the HIP and PFC of mice subjected to chronic stress. Furthermore, orientin increased levels of serotonin and norepinephrine, reduced neurodegeneration induced by chronic stress, and activated molecular processes underlying neuronal plasticity (Liu et al. 2015). On the other hand, our results showed that EFF-*Cp* presented antidepressant-like effect at 50 mg/kg, suggesting that orientin is not the only compound responsible for the activity detected herein. Thus, the detected antidepressant-like effect is possibly related to the synergic effects of these C-glycosyl flavonoids. There are numerous examples of plant extracts that exhibit synergistic effects based on multi-target mechanisms of action (Wagner 2011).

The activity of the superoxide dismutase (SOD) enzyme was decreased in the AMY, HIP and NAc of animals submitted to CMS. EFF-*Cp* reversed the effect of CMS on SOD levels in the NAc alone. In the other regions, though EFF-*Cp* did increase the SOD activity, the effect did not reach statistical significance or reach the level of animals without stress. The activity of the catalase (CAT) enzyme was decreased in the PFC, HIP and NAc of animals submitted to CMS. EFF-*Cp* reversed the CMS effect only in the NAc. In work conducted by Gazal et al. (2014), chronic stress did not reduce the activity of SOD or CAT, both in the PFC or in the HIP. Perhaps the difference between the study performed by Gazal et al. (2014) and this study is the frequency of exposure to stress. They subjected the animals to a 14-day protocol, whereas in this study, the chronic stress protocol was for 40 days. In another study where stress was applied for a longer period (28 days), the CAT activity in the PFC and HIP was significantly reduced in stressed animals, compared to control animals (Che et al. 2015). In an even more prolonged chronic stress protocol, the authors found a significant decrease in SOD and CAT activity, an increase in oxidative stress markers such as lipid peroxidation, and an increase in depressive-like behaviors such as anhedonia and immobility. Both depressive-like behaviors and alterations to oxidative balance were reversed by the flavonoid orientin (Liu et al. 2015).

Studies have suggested that depression caused by stress was accompanied by oxidative stress dysregulation, including abnormal total antioxidant capacity (TAC), antioxidants, free radicals, oxidative damage, and autoimmune response products (Liu et al. 2015). Moreover, oxidative damage due to persistent ROS exposure results in oxidative damage to mitochondria and cellular lipids, proteins, and nucleic acids (Bhat et al. 2015). Acute ROS exposure would lead to the malfunctioning of Fe-S

centers of electron transport chain complexes I, II, and III, and tricarboxylic acid cycle aconites, resulting in the shutdown of mitochondrial energy production (Ghezzi and Zeviani, 2012). However, our study showed that the activity of complex I from the mitochondrial chain was increased in the PFC, AMY, and HIP of animals subjected to the CMS, both in saline and EFF-*Cp*-treated animals, suggesting that stress increases the activity of complex I and that EFF-*Cp* did not influence the effect of stress on this enzyme. Of note, in the NAc, complex I activity was unchanged in stressed and saline-treated animals, but significantly increased in stressed and EFF-*Cp*-treated animals. Complex II activity increased in the PFC under the effect of CMS and was reversed by EFF-*Cp* treatment. In the AMY, complex II activity increased in stressed animals, but not enough to gain statistical significance. However, EFF-*Cp* significantly reduced the complex II activity in the AMY of stressed animals. The activity of succinate:cytochrome c oxidoreductase, complex II-III, significantly increased in the PFC and AMY under CMS. The EFF-*Cp* treatment reduced complex II-III activity to statistically relevant reduced levels, even lower than those of the non-stressed animals. In the HIP, complex II-III activity increased in stressed animals, but did not reach statistical relevance. EFF-*Cp* significantly reduced the complex II-III activity in the HIP of stressed animals. Complex IV activity under the influence of EFF-*Cp* significantly increased in all brain regions studied. In both controls and under CMS, the complex IV activity of animals treated with EFF-*Cp* increased in the analyzed brain structures, indicating a potentially intrinsic effect of EFF-*Cp* on complex IV activity. Authors have found that chronic stress increases the expression of complex IV genes in the PFC but reduces it in the HIP (Adzic et al. 2009; Xing et al. 2013), and the enzymatic expression influences their activity (Gao et al. 2007; Liang et al. 2009). Previous studies showed that the chronic mild stress protocols altered the energy metabolism in rats' brains by altering complexes I, II, II-III, and IV, and chronic treatment with minocycline, a second-generation tetracycline with anti-inflammatory properties, regulated these alterations in specific brain areas (Réus et al. 2015a). Abelaira et al. (2011) showed that acute and chronic treatment with lamotrigine, an anticonvulsant drug, prevented mitochondrial dysfunction by increasing complex II, II-III, and IV levels in the rat brains. In this study, complex IV activity was unchanged from chronic stress, but increased after treatment with EFF-*Cp*, both in controls and stressed animals. These results are intriguing, but it may be that EFF-*Cp* has stimulated the function of these brain regions and therefore increased energy demands, which could result in increased enzyme activity, as previously reported (Adzic et al. 2009).

Some authors have observed that complexes of the mitochondrial chain were inhibited by chronic stress in some brain regions (Madrigal et al. 2001; Rezin et al. 2009). However, in this study, and in another study that evaluated the same brain regions (Garabadu et al. 2015), the activity of mitochondrial complexes was increased under chronic stress, indicating that stress can induce different functions depending on the brain region being evaluated. The areas evaluated in this study are key structures involved in the pathogenesis of depression (Russo and Nestler, 2013). It is therefore possible that chronic stress has increased energy demand in some regions and thus required an increase in the mitochondrial chain activity to meet the needs of these brain areas (Adzic et al. 2009).

During the electron transfer process, complexes I and III produce superoxide (O_2^-), a free anion radical that is converted to O_2 and H_2O_2 by SOD under physiological conditions (Manji et al. 2012). Therefore, in areas experiencing high energy demand, the oxidative balance can be impaired. In this study, EFF-*Cp* reversed the increased activity of complexes II and II-III in the PFC and AMY, suggesting that EFF-*Cp* helps balance the effect of chronic stress on these complexes and prevent an excess of oxidative stress. It is important to note that risperidone, an atypical antipsychotic, also reverses increased mitochondrial chain activity caused by chronic stress while also reducing depressive-like behavior (Garabadu et al. 2015). Complex I activity was increased by CMS and EFF-*Cp* did not significantly reverse this increased activity. However, the effect of EFF-*Cp* may not be in reducing the activity of complex I, but rather in modulating the oxidative stress produced by an increase in the activity of this complex (Mu et al. 2015). More studies are required to elucidate the specific requirements of each complex to meet the energy demands in different functional conditions of the organism.

Regarding CK, its activity significantly increased in the AMY of animals under CMS and treated with EFF-*Cp*. In the HIP, the CK activity was significantly reduced in both CMS groups, indicating an inhibitory effect of chronic stress that was not reversed by EFF-*Cp*. Although researchers have described different results for CK activity (Agostinho et al. 2009; Bhatia et al. 2011; Abelaira et al. 2013), CK appears to be sensitive to oxidative damage (Brines and Cerami, 2006) and might be one of the targets for ROS in neurodegenerative disease (Barinaga, 1997). Therefore, antioxidant activity seems to be important in the homeostasis of CK. However, in this study it was not possible to confirm the effect of EFF-*Cp* on impaired CK activity due to chronic stress. Thus, more studies are needed to clarify the function of CK in chronic stress situations and the role of antioxidants in the balance of CK activity.

This is the first work to assess the effect of the *Cecropia pachystachya* on depressive-like behavior induced by

chronic mild stress in animals, as well as the parameters of the oxidative balance in conjunction with the enzymatic activity of mitochondrial chain complexes and creatine kinase. It is important to emphasize that an enriched C-glycosyl flavonoid fraction, with isoorientin, orientin, and isovitexin as the primary components, had antidepressant-like effects in animal models of chronic mild stress. The antidepressant function was correlated to several important properties in the reduction of oxidative stress, such as reduced oxidative markers and increased activity of antioxidant enzymes. In addition, EFF-*Cp* also produced effects on the metabolism of the mitochondrial respiratory chain. However, more studies are needed to clarify the specific mechanism of EFF-*Cp*, as well as the dynamic effect it has on energy metabolism.

Acknowledgments Laboratory of Neurosciences (Brazil) is a center within the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM) and a member of the Center of Excellence in Applied Neurosciences of Santa Catarina (NENASC). This research was supported by grants from CNPq (JQ and GZR), FAPESC (JQ), Instituto Cérebro e Mente, and UNESC (JQ and ELS). JQ, FHR, and ELS are CNPq Research Fellows. C.F. ORTMANN is also grateful to CAPES for their research fellowship. Center for Translational Psychiatry (USA) is funded by Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, The University of Texas Medical School at Houston.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors have declared no conflicts of interest exist relevant to the current manuscript.

References

- Abelaira HM, Réus GZ, Ribeiro KF, Zappellini G, Ferreira GK, Gomes LM, Carvalho-Silva M, Luciano TF, Marques SO, Streck EL, Souza CT, Quevedo J (2011) Effects of acute and chronic treatment elicited by lamotrigine on behavior, energy metabolism, neurotrophins and signaling cascades in rats. *Neurochem Int* 59:1163–1174
- Abelaira HM, Réus GZ, Ribeiro KF, Steckert AV, Mina F, Rosa DV et al (2013) Effects of lamotrigine on behavior, oxidative parameters and signaling cascades in rats exposed to the chronic mild stress model. *Neurosci Res* 75:324–330
- Adzic M, Djordjevic A, Demonacos C, Krstic-Demonacos M, Radojic MB (2009) The role of phosphorylated glucocorticoid receptor in mitochondrial functions and apoptotic signaling in brain tissue of stressed Wistar rats. *Int J Biochem Cell Biol* 41:2181–2188
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
- Agostinho FR, Scaini G, Ferreira GK, Jeremias IC, Réus GZ, Rezin GT et al (2009) Effects of olanzapine, fluoxetine and olanzapine/fluoxetine on creatine kinase activity in rat brain. *Brain Res Bull* 80:337–340
- Amikishieva AV, Initskaya SI, Nikolov VP, Popova NA, Kaledin VI (2011) Depressive-like psychoemotional state versus acute stresses enhances Lewis lung carcinoma metastasis in C57BL/6J mice. *Exp Oncol* 33:222–225
- Andrade-Cetto A, Heinrich M (2005) Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol* 99:325–348

- Arent CO, Réus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Steckert AV, Mina F et al (2012) Synergist effects of *n*-acetylcysteine and deferoxamine treatment on behavioral and oxidative parameters induced by chronic mild stress in rats. *Neurochem Int* 61:1072–1080
- Bakunina N, Pariante CM, Zunsain PA (2015) Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. *Immunology* [Epub ahead of print]
- Bannister JV, Calabrese L (1987) Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 32:279–312
- Barinaga M (1997) What makes brain neurons run? *Science* 276:196–198
- Behr GA, Moreira JC, Frey BN (2012) Preclinical and clinical evidence of antioxidant effects of antidepressant agents: implications for the pathophysiology of major depressive disorder. *Oxid Med Cell Longev* 2012, 609421
- Belmaker RH, Agam G (2008) Major depressive disorder. *N Engl J Med* 358:55–68
- Berg CC, Rosselli PF (2005) Cecropia. *Flora Neotropica/The New York Botanical Garden*, New York
- Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, Ganai AS (2015) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother* 74:101–110
- Bhatia N, Jaggi AS, Singh N, Anand P, Dhawan R (2011) Adaptogenic potential of curcumin in experimental chronic stress and chronic unpredictable stress-induced memory deficits and alterations in functional homeostasis. *Nat Med* 65:532–543
- Birben E, Sahiner UM, Sakcesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 5:9–19
- Brimes M, Cerami A (2006) Discovering erythropoietin's extrahematopoietic functions: biology and clinical promise. *Kidney Int* 70:246–250
- Brown GC, Cooper CE (1994) Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 356:295–298
- Byun J, Henderson JP, Mueller DM, Heinecke JW (1999) 8-Nitro-2'-deoxyguanosine, a specific marker of oxidation by reactive nitrogen species, is generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system of activated human phagocytes. *Biochemistry* 38:2590–2600
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM (2007) Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 8:766–775
- Calabrese F, Molteni R, Racagni G, Riva MA (2009) Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology* 1:5208–5216
- Cassina A, Radi R (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 328:309–316
- Chaillou LL, Nazareno MA (2006) New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *J Agric Food Chem* 54:8397–8402
- Che Y, Zhou Z, Shu Y, Zhai C, Zhu Y, Gong S et al (2015) Chronic unpredictable stress impairs endogenous antioxidant defense in rat brain. *Neurosci Lett* 584:208–213
- Costa GM, Ortman CF, Schenkel EP, Reginaldo FH (2011a) An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* Species. *J Braz Chem Soc* 22:1096–1102
- Costa GM, Schenkel EP, Reginaldo FH (2011b) Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. *Nat Prod Commun* 6:913–920
- Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2006) Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 10:389–406
- de Mello AH, Gassenferth A, Schraiber RB, Souza LR, Florentino D, Danielski LG et al (2014) Effects of omega-3 on behavioral and biochemical parameters in rats submitted to chronic mild stress. *Metab Brain Dis* 29:691–699
- De Yong LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM (1989) Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* 26:335–341
- Deepha V, Praveena R, Sivakumar R, Sadasivam K (2014) Experimental and theoretical investigations on the antioxidant activity of isoorientin from *Crotalaria globosa*. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 121:737–745
- Dhir A, Kulkarni SK (2007) Involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:921–925
- El-Alfy AT, Abourashed EA, Matsumoto rr (2012) Nature against depression. *Curr Med Chem* 19:2229–2241
- Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407–421
- Fedorova M, Bollini RC, Hoffmann R (2014) Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev* 33:79–97
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM et al (1995) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23–26
- Gamaro GD, Streck EL, Matté C, Prediger ME, Wyse AT, Dalmaz C (2003) Reduction of hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Res* 28:1339–1344
- Gao J, Chi ZF, Liu XW, Shan PY, Wang R (2007) Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rat. *Neurosci Lett* 411:152–157
- Garabadu D, Ahmad A, Krishnamurthy S (2015) Risperidone attenuates modified stress-re-stress paradigm-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in rats exhibiting post-traumatic stress disorder-like symptoms. *J Mol Neurosci* Mar 7. Epub ahead of print. doi: 10.1007/s12031-015-0532-7
- Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Andreazza AC, Sertiz L et al (2008) Chronic administration of ketamine elicits antidepressant-like effects in rats without affecting hippocampal brain-derived neurotrophic factor protein levels. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103:502–506
- Gazal M, Ortman CF, Martins FA, Streck EL, Quevedo J, de Campos AM et al (2014) Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia*chystachya leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. *Brain Res Bull* 108:10–17
- Ghezzi D, Zeviani M (2012) Assembly factors of human mitochondrial respiratory chain complexes: physiology and pathophysiology. *Adv Exp Med Biol* 748:65–66
- Gibson SA, Korade Ž, Shelton RC (2012) Oxidative stress and glutathione response in tissue cultures from persons with major depression. *J Psychiatr Res* 46:1326–1332
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131–138
- Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, Crowley JR, Gronow D, Hyman BT et al (2004) Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 90:724–733
- Harrison JE, Schultz J (1976) Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 251:1371–1374
- Hughes BP (1962) A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. *Clin Chim Acta* 7:597–604

- Ignácio ZM, Réus GZ, Abelaira HM, Quevedo J (2014) Epigenetic and epistatic interactions between serotonin transporter and brain-derived neurotrophic factor genetic polymorphism: insights in depression. *Neuroscience* 275:455–468
- Isingrini E, Camus V, Le Guisquet AM, Pingaud M, Devers S, Belzung C (2010) Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. *PLoS ONE* 5:e10404
- Jou SH, Chiu NY, Liu CS (2009) Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Chang Gung Med J* 32:370–379
- Lee SY, Lee SJ, Han C, Patkar AA, Masand PS, Pae CU (2013) Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: targets for novel antidepressant. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 46:224–235
- Leuchter AF, Cook IA, Hamilton SP, Narr KL, Toga A, Hunter AM et al (2010) Biomarkers to predict antidepressant response. *Curr Psychiatry Rep* 12:553–562
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG et al (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464–478
- Liang HL, Ongwijitwat S, Wong-Riley MT (2009) The role of phosphorylated glucocorticoid receptor in mitochondrial functions and apoptotic signalling in brain tissue of stressed Wistar rats. *Int J Biochem Cell Biol* 41:2181–2188
- Liu Y, Lan N, Ren J, Wu Y, Wang ST, Huang XF et al (2015) Orientin improves depression-like behavior and BDNF in chronic stressed mice. *Mol Nutr Food Res*. doi:10.1002/mnfr.201400753
- Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F, Petronilho F et al (2009) Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int* 54:358–362
- Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizaola I, Lorenzo P, Rodrigo J et al (2001) Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 24:420–429
- Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M (2011) A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:676–692
- Manji H, Kato T, Di Prospero NA, Ness S, Beal MF, Krams M et al (2012) Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 13:293–307
- Morris G, Berk M (2015) The many roads to mitochondrial dysfunction in neuroimmune and neuropsychiatric disorders. *BMC Med* 13:68
- Moylan S, Maes M, Wray NR, Berk M (2013) The neuroprogressive nature of major depressive disorder: pathways to disease evolution and resistance, and therapeutic implications. *Mol Psychiatry* 18(5):595–606
- Mu HN, Li Q, Pan CS, Liu YY, Yan L, Hu BH et al (2015) Caffeic acid Attenuates rat liver reperfusion injury through Sirt3-dependent regulation of mitochondrial respiratory chain. *Free Radic Biol Med*. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.033
- Mutlu O, Gumuslu E, Ulak G, Celikuyuk IK, Kokturk S, Kir HM et al (2012) Effects of fluoxetine, tiapentine and olanzapine on unpredictable chronic mild stress-induced depression-like behavior in mice. *Life Sci* 91:1252–1262
- Nicasio-Torres MP, Erazo-Gómez JC, Cruz-Sosa F (2009) In vitro propagation of two antidiabetic species known as guarumbo: *Cecropiaobtusifolia* and *Cecropiapeltata*. *Acta Physiol Plantarum* 31:905–914
- Pacheco NR, Pinto NCC, Silva JM, Mendes RF, Costa JC, Aragão DMO, Castañón MCMN, Scio E (2014) *Cecropiapachystachya*: a species with expressive in vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant effects. *BioMed Res Int* 2014:1–10
- Paxinos G, Watson C (1986) The rat brain: stereotaxic coordinates, 2nd edn. Academic, San Diego
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229:327–336
- Praveena R, Sadasivam K, Deepha V, Sivakumar R (2014) Antioxidant potential of orientin: a combined experimental and DFT approach. *J Mol Struct* 1061:114–123
- Rawdin BJ, Mellon SH, Dhabhar FS, Epel ES, Puterman E, Su Y et al (2013) Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression. *Brain Behav Immun* 31:143–152
- Réus GZ, Abelaira HM, dos Santos MA, Carlessi AS, Tomaz DB, Neotti MV, Liraço JL, Gubert C, Barth M, Kapczynski F, Quevedo J (2013) Ketamine and imipramine in the nucleus accumbens regulate histone deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors. *Behav Brain Res* 256:451–456
- Réus GZ, Abelaira HM, Maciel AL, Dos Santos MA, Carlessi AS, Steckert AV et al (2015a) Minocycline protects against oxidative damage and alters energy metabolism parameters in the brain of rats subjected to chronic mild stress. *Metab Brain Dis* 30:545–553
- Réus GZ, Carlessi AS, Titus SE, Abelaira HM, Ignácio ZM, da Luz JR, Matias BI, Bruchchen L, Florentino D, Vieira A, Petronilho F, Quevedo J (2015b) A single dose of S-ketamine induces long-term antidepressant effects and decreases oxidative stress in adulthood rats following maternal deprivation. *Dev Neurobiol* [Epub ahead of print]
- Rezin GT, Gonçalves CL, Daufenbach JF, Fraga DB, Santos PM, Ferreira GK et al (2009) Acute administration of ketamine reverses the inhibition of mitochondrial respiratory chain induced by chronic mild stress. *Brain Res Bull* 79:418–421
- Rice-Evans C (2001) Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 8:797–807
- Russo SJ, Nestler EJ (2013) The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci* 14:609–625
- Rustín P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM et al (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35–51
- Sayre LM, Perry G, Smith MA (2008) Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 21:172–188
- Strecek EL, Gonçalves CL, Furlanetto CB, Scaini G, Dal-Pizzol F, Quevedo J (2014) Mitochondria and the central nervous system: searching for a pathophysiological basis of psychiatric disorders. *Rev Bras Psiquiatr* 36:156–167
- Suzuki E, Nakaki T, Shintani F, Kanba S, Miyaoka H (2002a) Antipsychotic, antidepressant, anxiolytic, and anticonvulsant drugs induce type II nitric oxide synthase mRNA in rat brain. *Neurosci Lett* 333:217–219
- Suzuki E, Nakaki T, Kanba S, Inada K, Yokoyama M, Maruta H, Miyaoka H (2002b) Oral administration of imipramine increased nitrate in rat hypothalamus. *Int J Neuropsychopharmacol* 5:101–102
- Talhi O, Silva AMS (2012) Advances in C-glycosylflavonoid research. *Curr Org Chem* 16:859–896
- Tomaz VS, Cordeiro RC, Costa AM, de Lucena DF, Nobre/dnior HV, de Sousa FC et al (2014) Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. *Neuroscience* 268:236–246
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44–84

- Wagner H (2011) Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia* 82:34–47
- Xing G, Barry ES, Benford B, Grunberg NE, Li H, Watson WD et al (2013) Impact of repeated stress on traumatic brain injury-induced mitochondrial electron transport chain expression and behavioral responses in rats. *Front Neurol* 4:196
- Yan LJ, Lodge JK, Traber MG, Matsugo S, Packer L (1997) Comparison between copper-mediated and hypochlorite-mediated modifications of human low density lipoproteins evaluated by protein carbonyl formation. *J Lipid Res* 38:992–1001
- Yap YW, Whiteman M, Cheung NS (2007) Chlorinative stress: an under appreciated mediator of neurodegeneration? *Cell Signal* 19:219–228
- Zafir A, Ara A, Banu N (2009) In vivo antioxidant status: a putative target of antidepressant action. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:220–228
- Zhang GF, Wang N, Shi JY, Xu SX, Li XM, Ji MH et al (2013) Inhibition of the L-arginine-nitric oxide pathway mediates the antidepressant effects of ketamine in rats in the forced swimming test. *Pharmacol Biochem Behav* 110:8–12
- Zhou QG, Hu Y, Hua Y, Hu M, Luo CX, Han X et al (2007) Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J Neurochem* 103:1843–1854

2.5 DISCUSSÃO GERAL

Os resultados demonstrados nesse capítulo compilam as informações a respeito da obtenção de uma fração enriquecida em flavonoides de *C. pachystachya* (FEF-*Cp*) e sua potencial atividade tipo-antidepressiva. Processos de padronização foram realizados com intuito de obter, a partir do extrato bruto hidroetanólico (EB-*Cp*), uma fração enriquecida e purificada nos compostos de interesse. A FEF-*Cp* apresentou um teor aproximadamente três vezes superior em flavonoides em relação ao EB-*Cp*, permitindo a redução na dose ativa de 200 mg.kg⁻¹ utilizada no trabalho de GAZAL e colaboradores (2014) para 50 mg.kg⁻¹, o que evidencia a relação desses compostos com a atividade observada.

A efetividade da FEF-*Cp* no SNC foi primeiramente observada por meio do tratamento agudo de animais submetidos a experimentos de comportamento. Nesses ensaios, foi observada a redução no tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado nas doses de 50 e 100 mg.kg⁻¹. Ainda, a FEF-*Cp* parece atuar na prevenção do dano oxidativo nos níveis de radicais carbonila, TBARS, atividade da mieloperoxidase, e concentração de nitrito/nitrato em algumas regiões cerebrais. Também foram observadas alterações nos níveis dos complexos do metabolismo energético mitocondrial. Essas evidências sugeriram que o mecanismo de ação da FEF-*Cp* está relacionado ao potencial antioxidante nas estruturas cerebrais avaliadas.

Considerando a efetividade do tratamento agudo de FEF-*Cp*, e a obtenção de atividade tipo-antidepressiva com doses inferiores aos do extrato bruto hidroetanólico (EB-*Cp*), novos estudos pré-clínicos foram realizados com intuito de explorar o potencial antidepressivo por meio do modelo do 50 e 100 mg.kg⁻¹ (ECM). Baseado na anedonia, sintoma associado ao transtorno depressivo maior, o ECM é extensivamente validado e realista, no qual os animais são submetidos a uma série de agentes estressores moderados levando ao comportamento tipo-anedônico (HILL et al., 2012). O estresse gerado induz efeitos de longa duração nos parâmetros comportamentais, neuroquímicos, neuroimunes e neuroendócrinos que se assemelham às disfunções observadas em pacientes deprimidos, que podem ser revertidos por tratamento com antidepressivo crônico, mas não agudo (CZÉH et al., 2016).

Nesse contexto, os animais foram submetidos ao protocolo de estresse durante 40 dias, recebendo tratamento com FEF-*Cp* (50 mg.kg⁻¹) durante 7 dias.

Como esperado no protocolo do ECM, os animais estressados apresentaram maior tempo de imobilidade no teste do nado forçado, em

relação aos animais não-estressados. Além disso, o tratamento com a FEF-*Cp* foi capaz de reverter o efeito do ECM, sendo observado um menor tempo de imobilidade em relação ao grupo não-tratado, o que indica o efeito tipo-antidepressivo da FEF-*Cp*.

Já nos parâmetros de estresse oxidativo, FEF-*Cp* também foi efetiva em prevenir o aumento de TBARS, atividade da mieloperoxidase, e concentração de nitrito/nitrato em algumas regiões cerebrais, além de reverter à redução dos níveis de SOD/CAT. Considerando a atividade nos complexos mitocondriais, foi observado o aumento na atividade do complexo IV dos animais tratados com FEF-*Cp* em todas as regiões cerebrais. Esses dados corroboram com os resultados demonstrados anteriormente em relação ao potencial antioxidante da FEF-*Cp*, atuando no balanço oxidativo de diversas regiões cerebrais avaliadas.

Em uma avaliação recente da literatura foram observados inúmeros trabalhos de revisão e meta-análise que evidenciam o potencial dos derivados vegetais no tratamento de transtornos de humor (FARAHANI et al., 2015). Em especial, estudos relatam que a atividade tipo-antidepressiva observada é frequentemente associada aos efeitos antioxidantes de seus compostos (EL-ALFY; ABOURASHED; MATSUMOTO, 2012).

Dessa forma, os flavonoides se destacam como metabólitos secundários de interesse farmacêutico, visto que trabalhos inferem a esta classe de compostos um potencial efeito no SNC (RENDEIRO; RHODES; SPENCER, 2015). Adicionalmente, Singh e colaboradores descreveram as flavonas como importantes compostos com ação neuroprotetora (SINGH; KAUR; SILAKARI, 2014). Por fim, Liu et al (2015) demonstraram o efeito tipo-antidepressivo da orientina, atividade esta atribuída a melhora no balanço oxidativo, neurotransmissão e neuroplasticidade.

A determinação do teor de flavonoides totais da FEF-*Cp* foi realizada por CLAE/DAD de acordo com metodologia já desenvolvida e validada (COSTA et al., 2011). O detector de arranjo de diodos acoplado a esse cromatógrafo permitiu a visualização das características espectrofotométricas do núcleo dos flavonoides presentes na FEF-*Cp*, sendo observados em sua maioria derivados das agliconas apigenina e luteolina.

A caracterização do perfil químico dos flavonoides presentes na FEF-*Cp* com a utilização da ferramenta de espectrometria de massas (CLUE/EM/EM) permitiu a detecção de compostos ainda não descritos para essa fração, assim como para *C. pachystachya*. Foi observado um perfil extremamente rico em flavonoides glicosídicos, sendo detectados

15 flavonoides, mas com apenas seis massas moleculares diferentes, o que sugere a ocorrência de diversos isômeros. Entre os flavonoides visualizados, três compostos já eram relatados, os flavonoides majoritários isoorientina, orientina e isovitexina.

A presença de flavonoides da classe dos *O*-glicosil-*C*-glicosilflavonoides também foi observada. Esses compostos apresentam como característica a substituição *O*-glicosídica por meio de uma hidroxila fenólica do esqueleto do flavonoide e/ou através de uma hidroxila do fragmento *C*-glicosídico (TALHI; SILVA, 2012). Foram detectados três isômeros derivados da aglicona luteolina com $[M+H]^+$ 581 *m/z* e perfil de fragmentação semelhante aos flavonoides isoorientina/orientina. Nesse contexto, também foram observados outros três isômeros derivados da aglicona apigenina com $[M+H]^+$ 565 *m/z* e perfil de fragmentação semelhante ao flavonoide isovitexina. Os dados de fragmentação sugeriram que esses flavonoides são possivelmente derivados dos flavonoides majoritários isoorientina e isovitexina, respectivamente. Além desses compostos, foram sugeridas a presença de dois isômeros com possível estrutura do flavonoide diosmetina-*C*-hexosídeo $[M+H]^+$ 461 *m/z*, e de outros dois flavonoides de estrutura não identificada com $[M+H]^+$ 593 *m/z*.

Até o momento, esse trabalho foi o primeiro a relatar a presença do flavonoide vitexina para *C. pachystachya*, assim como sugerir a presença de flavonoides do tipo *O*-glicosil-*C*-glicosilflavonoides para a espécie. A ausência de relatos dos *O*-glicosil-*C*-glicosilflavonoides para *C. pachystachya* é compreensível, tendo em vista que esses flavonoides são facilmente suscetíveis à degradação em meio ácido e/ou temperatura elevada, condições usualmente empregadas em cromatografia em coluna de bancada, seguida de eliminação do solvente em rotaevaporador. Essas condições favorecem a degradação de sua estrutura química com a perda do resíduo de açúcar *O*-glicosil, o que conseqüentemente induz a formação dos flavonoides majoritários (isoorientina/orientina e isovitexina).

Estudos de estabilidade da FEF-*Cp* foram realizados, e conforme previamente relatado na literatura, os flavonoides *C*-glicosídeos apresentaram estabilidade, sendo observada resistência à degradação em diferentes condições de temperatura. No estudo de armazenamento em temperatura de refrigeração (4 °C ± 2 °C) não foram observadas alterações significativas no teor de flavonoides totais da FEF-*Cp* na forma de pó e de solução aquosa durante 30 dias. Da mesma forma, nas condições de estabilidade acelerada (40 °C ± 2 °C e 75% ± 5% UR) os flavonoides da FEF-*Cp* permaneceram estáveis durante todo experimento, assim como

não foram detectadas alterações significativas no teor de flavonoides totais durante os seis meses de experimento.

Por outro lado, no estudo em condições de estresse de temperatura, a FEF-*Cp* permaneceu na temperatura de $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 dias. Os flavonoides da FEF-*Cp* foram resistentes a degradação durante 5 dias sob essa condição, embora a partir do 10^o dia tenha sido observada alteração significativa no teor de flavonoides totais em relação ao tempo zero. Por fim, cabe destacar que ao final dos 30 dias de experimento, foram visualizadas alteração na coloração da FEF-*Cp*, e um teor de flavonoides totais cerca de 12% menor.

O estudo de estresse ou degradação forçada é utilizado para prever possíveis produtos de degradação formados durante o período de armazenamento, o que justifica a utilização de condições mais severas que as utilizadas em estudos de estabilidade acelerada (SINGH et al., 2013). Considerando a formação de novos compostos e/ou de produtos de degradação, não foi observada a presença das agliconas (apigenina e luteolina), assim como não foram detectados novos picos no perfil qualitativo monitorado por CLAE/DAD em todas as condições de estabilidade avaliadas.

Corroborando com dados da literatura, os flavonoides *C*-heterosídeos apresentaram perfil de estabilidade nas diferentes condições de temperatura utilizadas. O resultado do estudo acelerado forneceu importante indicativo da estabilidade desses compostos, sendo usualmente empregado com o objetivo de prever o que aconteceria com o produto farmacêutico armazenado em condições normais por um longo período de tempo (BRASIL, 2005). Apesar do teor de flavonoides totais ter apresentado diminuição mais representativa (superior a 10%) no estudo de estresse, ainda é possível inferir que esses compostos apresentam resistência à degradação, especialmente considerando que $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ é uma temperatura elevada para armazenamento, e que, mesmo sob estas condições, 88% do teor de flavonoides totais foram mantidos inalterados. A diminuição no teor de flavonoides provavelmente se deve aos flavonoides glicosídicos que não apresentam estrutura *C*-heterosídeo. A ocorrência desses compostos foi sugerida em análise por LC/MS, no entanto sua identificação não foi possível.

Os resultados da caracterização química e da estabilidade apresentados nesse capítulo demonstraram que a FEF-*Cp* apresenta um perfil rico em flavonoides glicosídicos, oriundos dos flavonoides majoritários isoorientina/orientina e isovitexina, que são resistentes à degradação em diferentes condições de temperatura e umidade. Adicionalmente, a atividade tipo-antidepressiva observada para FEF-*Cp*,

demonstra que os flavonoides são os responsáveis pelo efeito visualizado. Com base nos resultados apresentados, esse trabalho teve como próximo objetivo, o desenvolvimento de estudos no campo da tecnologia farmacêutica, visando à obtenção de um sistema fitoterápico microestruturado contendo a FEF-*Cp*.

REFERÊNCIAS

BOTT, R. F.; OLIVEIRA, W. P. Storage conditions for stability testing of pharmaceuticals in hot and humid regions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, n. 4, p. 393-401, 2007.

BRANGO-VANEGAS, J.; COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; ARÉVALO-FERRO, C.; CASTELLANOS, L. Glycosylflavonoids from *Cecropia pachystachya* Trécul are quorum sensing inhibitors. **Phytomedicine**, v. 21, n. 5, p. 670-675, 2014.

BRASIL, **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 45, de 9 de agosto de 2012**. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 2012. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/>

BRASIL, in **Farmacopéia Brasileira**, ANVISA, Editor 2010: Brasília. p. 546, 2010.

BRASIL, **Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 2005.

COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, n. 6, p. 1096-1102, 2011.

COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. Seasonal variations in the amount of isoorientin and isovitexin in *Cecropia glaziovii* Sneth. leaves over a two-year period. **Revista Colombiana de Ciências Químicas e Farmacêuticas**, v.43, n. 1, p. 162-172, 2014.

CZÉH, B.; FUCHS, E.; WIBORG, O.; SIMON, M. Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 293-310, 2016.

EL-ALFY, A.T.; ABOURASHED, E. A.; MATSUMOTO, R. R. Nature against depression. **Current Medicinal Chemistry**; v, 19, n. 14, p.2229-2241, 2012.

FARAHANI, M.S.; BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M. H.; ABDOLLAHI, M.; RAHIMI, R. Plant-derived natural medicines for the management of depression: an overview of mechanisms of action. **Reviews in Neurosciences**, v. 26, n. 3, p. 305-332, 2015.

GAZAL, M.; KAUFMANN, F. N.; ACOSTA, B. A.; OLIVEIRA, P. S.; VALENTE, M. R.; ORTMANN, C. F.; STURBELLE, R.; LENCINA, C. L.; STEFANELLO, F. M.; KASTER, M. P.; REGINATTO, F. H.; GHISLENI, G. Preventive Effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. **Neurochemical Research**, 2015a.

GAZAL, M.; ORTMANN, C. F.; MARTINS, F. A.; STRECK, E. L.; QUEVEDO, J.; DE CAMPOS, A. M.; STEFANELLO, F. M.; KASTER, M. P.; GHISLENI, G.; REGINATTO, F. H.; LENCINA, C. L. Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. **Brain Research Bulletin**, v. 108, n. 0, p. 10-17, 2014.

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

HILL, M. N.; HELLEMANS, K. G. C.; VERMA, P.; GORZALKA, B. B.; WEINBERG, J. Neurobiology of chronic mild stress: Parallels to major depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 9, p. 2085-2117, 2012.

JÄGER, A. K.; SAABY, L. Flavonoids and the CNS. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1471-1485, 2011.

KOPLEMAN, S. H.; NGUYENPHO, A.; ZITO, W. S.; MULLER, F. X.; AUGSBURGER, L. L. et al. Selected physical and chemical properties of commercial *Hypericum perforatum* extracts relevant for formulated product quality and performance. **AAPS PharmSci**, v. 3, n. 4, 2001.

LI, J.; CHASE, H. A. Characterization and evaluation of a macroporous adsorbent for possible use in the expanded bed adsorption of flavonoids from *Ginkgo biloba* L. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8730–8740, 2009.

LIU, Y.; LAN, N.; REN, J.; WU, Y.; WANG, S.T.; HUANG, X.F.; YINGHUA, Y.U. Orientin improves depression-like behavior and BDNF in chronic stressed mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 6, p. 1130–1142, 2015.

LIANG, Z.; ZHANG, B.; SU, W. W.; WILLIAMS, P. G.; LI, Q. X. C-Glycosylflavones Alleviate Tau Phosphorylation and Amyloid Neurotoxicity through GSK3 β Inhibition. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 7, n. 7, p. 912-923, 2016.

MESSAOUDI M.; BISSON, J. F.; NEJDI, A.; ROZAN, P.; JAVELOT, H. Antidepressant-like effects of a cocoa polyphenolic extract in Wistar-Unilever rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 11, n. 6, p. 269-276, 2008.

MÜLLER, S. D.; FLORENTINO, D.; ORTMANN, C. F.; MARTINS, F. A.; DANIELSKI, L. G.; MICHELS, M.; CONSTANTINO, L. ; PETRONILHO, F.; REGINATTO, F. H.. Anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract of *Cecropia glaziovii* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 185, p. 255-262, 2016

LIU, Y.; LAN, N.; REN, J.; WU, Y.; WANG, S.T.; HUANG, X.F.; YINGHUA, Y.U. Orientin improves depression-like behavior and BDNF in chronic stressed mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 6, p. 1130–1142, 2015.

PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; COSTA, G. M.; KAPPEL, V. D.; DE OLIVEIRA, S. Q.; FORTUNATO, J.; CITTADINI-ZANETTE, V.; MOREIRA, J. C. F.; SIMÕES, C. M. O.; REGINATTO, F. H. Hepatoprotective effects and HSV-1 activity of the hydroethanolic extract of *Cecropia glaziovii* (embaúba-vermelha) against acyclovirresistant strain. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 7, p. 911-918, 2012.

PLAZA, M.; POZZO, T.; LIU, J.; ARA, G. K. Z.; TURNER, C.; KARLSSON, E. N. Substituent Effects on in Vitro Antioxidizing Properties, Stability, and Solubility in Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 15, p. 3321–3333, 2014.

RENDEIRO, C.; RHODES, J. S.; SPENCER, J. P. The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. **Neurochemistry International**, v. 89, p. 126-139, 2015.

SANTOS, T. C. **Desenvolvimento e caracterização de sistema fitoterápico nanoestruturado de cecropia glaziovii snethl para o tratamento do herpes labial**. 2016. Tese de Doutorado - Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SANTOS, T. C.; BATTISTI, M. A.; ORTMANN, C. F.; REGINATTO, F. H.; SIMÕES, C. M. O.; CAMPOS, A. M. Development and effect of storage on the stability of Enriched Flavonoid Fraction of *Cecropia glaziovii* -loaded PLGA nanoparticles. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 3, p. 1-36, 2016.

SANTOS, T. C.; RESCIGNANO, N.; BOFF, L.; REGINATTO, F. H.; SIMÕES, C. M. O.; CAMPOS, A. M.; MIJANGOS, C. In vitro antiherpes effect of C -glycosyl flavonoid enriched fraction of *Cecropia glaziovii* encapsulated in PLGA nanoparticles. **Materials Science & Engineering**, v. 75, p. 1214-1220, 2017.

SINGH, S.; KUMAR, V. Recent Developments on Long-Term Stability Test Conditions. **The pharma review**, p. 61-68, 2006.

SINGH, M.; KAUR, M.; SILAKARI, O. Flavones: an important scaffold for medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 84, p. 206-239, 2014.

SINGH, S.; JUNWAL, M.; MODHE, G.; TIWARI, H.; KURMI, M.; PARASHAR, N.; SIDDURI, P. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. **Trends in Analytical chemistry**, v. 49, p. 71-88, 2013.

SILVA, I. T.; COSTA, G. M.; STOCO, P. H.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H.; SIMÕES, C. M. O. In vitro antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, p. 143-148, 2010.

TALHI, O.; SILVA, A. M. S. Advances in C-glycosylflavonoid research. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 859-896, 2012.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; BLÁZQUEZ, M. A.; VIGUERA, C. G.; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENTE, F. A comparative study of different amberlite XAD resins in flavonoid analysis. **Phytochemical Analysis**, v. 3, n. 4, p. 178–181, 1992.

WANG, S.; YU, Y.; FENG, Y.; ZOU, F.; ZHANG, X.; HUANG, J.; ZHANG, Y.; ZHENG, X.; HUANG, X. F.; ZHU, Y.; LIU, Y. Protective effect of the orientin on noise-induced cognitive impairments in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 1, n. 296, p. 290-300, 2016.

WASOWSKI, C.; MARDER, M. Flavonoids as GABAA receptor ligands: the whole story? **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 4, p. 24-49, 2012.

XIAO, J.; CAPANOGLU, E.; JASSBI, A. R.; MIRON, A. Advance on the Flavonoid Cglycosides and Health Benefits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, n. 56, S29-S45, 2016.

ZUCOLOTTO, S. M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E. P. Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American Passiflora Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 3, p. 232-239, 2012.

Capítulo 3

**Desenvolvimento e caracterização de sistema fitoterápico
microestruturado contendo os flavonoides C-heterosídeos de
Cecropia pachystachya Trécul**

CAPÍTULO 3 – Desenvolvimento e caracterização de sistema fitoterápico microestruturado contendo os flavonoides C-heterosídeos de *Cecropia pachystachya* Trécul

3.1 INTRODUÇÃO

Atualmente a tecnologia farmacêutica tem recebido grande investimento na produção de terapias inovadoras. Diversos fármacos e medicamentos convencionais apresentam restrições em relação à biodisponibilidade, estabilidade e características organolépticas que dificultam o tratamento e adesão do paciente. Dessa forma, a encapsulação de ativos oferece oportunidades para contornar esses aspectos e modular a liberação no tempo e local desejado (IQBAL et al., 2015; SHARMA et al., 2015).

A microencapsulação é um processo no qual gotículas ou partículas, de material líquido ou sólido, são cercadas ou revestidas por uma película contínua de material polimérico em escala micrométrica (AGNIHOTRI et al., 2012). Diversas vantagens são atribuídas a esses sistemas, como a proteção do ativo a condições de pH e temperatura, melhora de características físico-químicas e propriedades organolépticas, e em especial, a propriedade de controlar a liberação do ativo (AGUIAR et al., 2017). Essas características são possíveis em virtude dos materiais poliméricos utilizados atribuírem versatilidade a esses sistemas (IQBAL et al., 2015).

A encapsulação têm se mostrado um recurso eficiente para aumentar a biodisponibilidade de substâncias bioativas, e, no contexto de derivados vegetais, essa ferramenta permite contornar possíveis limitações tecnológicas de extratos vegetais secos (ONWULATA, 2012). O emprego de novas tecnologias e inovações para garantir o efeito terapêutico dos medicamentos fitoterápicos é uma tendência atual. Um sistema de liberação microestruturado pode proporcionar melhor biodisponibilidade dos metabólitos secundários, pois as micropartículas conferem maior estabilidade, capacidade industrial e oferecem a possibilidade de ajuste de dose para alcançar níveis terapêuticos adequados (FELTRIN; CHORILLI, 2010; AGUIAR et al., 2017). Adicionalmente, a tecnologia da microencapsulação tem sido extensamente utilizada para manutenção da estabilidade química e obtenção de um controle na liberação de compostos fenólicos (LU; KELLY; MIA, 2015).

Os sistemas de liberação modificada têm como objetivo liberar e manter de maneira sustentada quantidades de ativo suficientes para

alcançar níveis terapêuticos durante o período de tempo adequado (SHARMA et al., 2015). Considerando a obtenção de microestruturas para esse fim, diversas técnicas e materiais são descritos na literatura (SRIS et al., 2012; AGNIHOTRI et al., 2012; SHARMA et al., 2015; PAULO, SANTOS et al., 2017).

Nesse trabalho, a técnica de dupla emulsão seguida de extração-
evaporação do solvente foi selecionada para encapsulação dos flavonoides da FEF-*Cp*. A microencapsulação por dupla-emulsão apresenta potencial para incorporação de substâncias de caráter hidrofílico (IQBAL et al., 2015), sendo por esse motivo utilizada para obtenção de microestruturas contendo a FEF-*Cp*.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar um sistema fitoterápico microestruturado de liberação modificada contendo a fração enriquecida em flavonoides C-heterosídeos de *Cecropia pachystachya* Trécul.

3.2.2 Objetivos específicos

- Realizar um estudo de formulação para estabelecer a composição do sistema microestruturado e o método de preparação mais adequado.
- Caracterizar os sistemas quanto à morfologia, tamanho de partícula, eficiência de encapsulação e teor associado.
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* dos sistemas microestruturados desenvolvidos.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Materiais

O polímero utilizado para preparação das micropartículas foi o Eudragit® RS100 (etilacrilato:metil-metacrilato: cloreto de etil metacrilato de trimetil amônio, 1:2:0,1 - Evonik®). Para preparação do sistema microestruturado foram utilizados álcool polivinílico - PVA (Mowiol40-88, Sigma-Aldrich®), cloreto de sódio (Vetec®), diclorometano (Merck®), laurilsulfato de sódio (Vetec®). Os solventes acetonitrila e

metanol são de procedência Merck®, e a água ultrapura foi obtida pelo sistema de filtração MilliQ (Millipore®).

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Estudos preliminares de formulação

Considerando o caráter hidrofílico dos flavonoides de FEF-*Cp*, as micropartículas foram preparadas pela técnica de dupla emulsão a/o/a seguida de extração do solvente, com pequenas adaptações à formulação desenvolvida por Santos (2012). Inicialmente, visando estabelecer a quantidade de FEF-*Cp* a ser adicionada à fase interna aquosa da dupla emulsão, avaliou-se o teor em flavonoides totais obtido a partir da dispersão de 50 ou 100 mg da fração em 1 mL de água. Estas dispersões permaneceram sob agitação durante 24 horas a temperatura ambiente e sistema fechado e foram, a seguir, filtradas em membrana de PVDF (0,45 µm). O teor de flavonoides totais solubilizado em água foi determinado por CLAE/DAD conforme descrito no item 2.3.4 (COSTA et al., 2011).

A seguir, um estudo preliminar foi realizado para definir as condições de extração do solvente após a formação da dupla emulsão e avaliar a influência deste parâmetro sobre as características de sistemas obtidos, bem como a capacidade destes sistemas de incorporar a FEF-*Cp*.

Neste estudo, foram mantidos constantes para todas as formulações os parâmetros relativos à composição: (i) fase orgânica, constituída por uma solução de 500 mg de Eudragit® RS100 em 5 mL de diclorometano, previamente solubilizada com auxílio de banho de ultrassom; (ii) fase aquosa interna (a_1), determinada com base no resultado da solubilidade dos flavonoides da FEF-*Cp* em água, constituída de 100 mg de FEF-*Cp* solubilizados em 1 mL de água ultrapura e filtrada em membrana PVDF de diâmetro de poro 0,45 µm, e (iii) fase aquosa externa (a_2), constituída por 100 mL de solução aquosa de álcool polivinílico (PVA) a 0,5 % (m/V).

Quanto à técnica de preparação, em todas as formulações para a formação da emulsão primária (a_1/o), a fase oleosa foi vertida sobre a fase aquosa interna sob agitação com auxílio do dispersor Ultra-turrax® T25 Basic (IKA, Alemanha) a 10.000 rpm durante 3 minutos. A seguir, a emulsão primária foi vertida sobre 100 mL de PVA 0,5% (m/V) sob agitação em Ultra-turrax®. As variáveis avaliadas nesta etapa foram a velocidade (4.000 e 6.000 rpm) e o tempo (1 e 3 min) de agitação necessários para formação da dupla emulsão.

Depois de formada a dupla emulsão, a fase aquosa de extração, diferentes volumes (100 ou 200 mL) de uma solução aquosa de PVA a 0,1 % (m/V), foi adicionada ao sistema. A combinação das variáveis avaliadas resultou em 6 diferentes formulações conforme descrito no quadro 7.

Quadro 7: Formulações preparadas a partir do estudo preliminar de formulação.

ETAPA	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Fase aquosa interna	100 mg FEF- <i>Cp</i> - 1 mL água					
Fase oleosa	500 mg Eudragit – 5 mL diclorometano					
Emulsão primária	Agitação 10.000 rpm – 3 minutos					
Fase aquosa externa	PVA 0,5 % (m/V) 100 mL					
Dupla emulsão	Agitação:					
	6000 rpm 3 min	4000 rpm 3 min	6000 rpm 1 min	4000 rpm 1 min	6000 rpm 3 min	4000 rpm 1 min
Fase aquosa de extração	PVA 0,1% 100 mL	PVA 0,1% 100 mL	PVA 0,1% 100 mL	PVA 0,1% 100 mL	PVA 0,1% 200 mL	PVA 0,1% 200 mL

Transcorrido o tempo de eliminação do diclorometano, as micropartículas foram isoladas por filtração em papel filtro quantitativo faixa preta (diâmetro de poro de 7 – 12 μm ; Unifil®). As partículas isoladas foram lavadas três vezes com 100 mL de água purificada e, a seguir, congeladas a - 20 °C por 48 horas, e secas por liofilização durante 24 horas.

3.3.2.2 Preparação dos sistemas microparticulados

A partir dos resultados obtidos nos estudo anterior, um estudo de formulação foi conduzido, no qual foi avaliada influência da concentração da solução orgânica do polímero (500 mg de polímero dissolvidos em 3 ou 4 mL de diclorometano) sobre a eficiência de encapsulação e o teor de flavonoides nas micropartículas. Neste estudo foram fixados os seguintes parâmetros: (i) fase aquosa interna, 100 mg FEF-*Cp* dissolvidos em 1 mL de água; (ii) fase aquosa externa, 100 mL de solução aquosa de PVA 0,5 % (m/V); (iii) fase aquosa de extração, 300 mL de solução aquosa de PVA 0,1 % (m/V); (iv) agitação para formação da emulsão primária: ultraturax, 10.000 rpm, durante 3 min; (v) agitação para formação da

dupla emulsão: ultraturrax, 4.000 rpm, durante 1 min. As formulações foram preparadas em duplicata conforme o quadro 8, e o procedimento de isolamento, lavagem e secagem das micropartículas foi realizado conforme descrito acima.

Quadro 8: Formulações preparadas a partir do estudo de formulação.

ETAPA	F1	F2
Fase oleosa	500 mg Eudragit 3mL diclorometano	500 mg Eudragit 4mL diclorometano
Fase aquosa interna	100 mg FEF- <i>Cp</i> 1 mL água	
Emulsão primária	Agitação 10.000 rpm – 3 minutos	
Fase aquosa externa	PVA 0,5 % (m/V) 100 mL	
Dupla emulsão	4000 rpm - 1 min	
Fase aquosa de extração	PVA 0,1% - 300 mL	

Visando avaliar a repercussão da redução do tempo de eliminação do diclorometano sobre a eficiência de encapsulação e teor de flavonoides das micropartículas, um novo estudo de formulação foi realizado em ambiente climatizado sob uma temperatura de 40 °C. Neste estudo foram mantidas as condições de preparação e as formulações descritas no quadro 2 e incluída uma nova formulação na qual o polímero foi dissolvido em 5 mL de solvente. As formulações foram preparadas em triplicata e estão sumarizadas no quadro 9. O procedimento de isolamento, lavagem e secagem das micropartículas foi realizado conforme descrito anteriormente.

Quadro 9: Formulações preparadas a partir do estudo de formulação para avaliação da influência da temperatura de evaporação/extração do solvente.

ETAPA	MCP ₁	MCP ₂	MCP ₃
Fase oleosa	500 mg Eudragit diclorometano (3 mL)	500 mg Eudragit diclorometano (4mL)	500 mg Eudragit diclorometano (5mL)
Fase aquosa interna	100 mg FEF-Cp 1 mL água		
Emulsão primária	Agitação 10.000 rpm – 3 minutos		
Fase aquosa externa	PVA 0,5% 100 mL		
Dupla emulsão	4000 rpm - 1 min		
Fase aquosa de extração	PVA 0,1% - 300 mL 40 °C		

3.3.2.2.1 Influência da pressão osmótica sobre a eficiência de encapsulação

Considerando que osmolaridade do meio pode influenciar a formação de poros e, conseqüentemente, no perfil de liberação das micropartículas (FARAGO et al., 2008; SANTOS, 2012), um novo estudo foi realizado, tomando como base a formulação MCP₁ (descrita no Quadro 9), na qual foi adicionado cloreto de sódio a 3 % (m/V) na fase aquosa de extração. Esta formulação foi denominada MCP₁-NaCl.

3.3.2.3 Caracterização das formulações

3.3.2.3.1 Determinação do rendimento das formulações

O rendimento foi calculado pela relação entre a massa obtida de micropartículas e a quantidade total de sólidos da formulação, levando em consideração a massa de polímero e a massa de flavonoides totais presentes em 100 mg FEF-Cp. O resultado foi apresentado em porcentagem conforme a equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \left(\frac{\text{micropartículas (mg)}}{\text{total de sólidos da formulação (mg)}} \right) \times 100$$

Equação 1

3.3.2.3.2 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das micropartículas foram avaliados por difração a laser em equipamento Mastersizer® 2000 Hydro (Malvern Instruments, Reino Unido), equipado com unidade óptica duplo laser feixe convergente de Hélio/Neônio (632,8 nm) e LED (470 nm). As amostras foram analisadas em câmara de dispersão aquosa Hydro 2000SM (Malvern, Reino Unido) a 1500 rpm.

A medida do diâmetro médio das partículas (D[4,3]) é calculada com base na teoria de que a difração da luz incidida na amostra é dependente do tamanho das partículas que a compõem. A distribuição granulométrica foi inferida a partir dos valores de Span e calculada conforme a equação 2. Os índices $D_{(0,1)}$, $D_{(0,5)}$ e $D_{(0,9)}$ representam o diâmetro por volume equivalente ao qual 10, 50 e 90 % das partículas são menores. Com essa informação, o valor de Span é calculado como indicativo da distribuição de tamanhos da amostra. Neste índice, quanto mais próximo de zero, mais monodispersa é a amostra.

$$Span = \left(\frac{D_{(0,9)} - D_{(0,1)}}{D_{(0,5)}} \right)$$

Equação 2

3.3.2.3.3 Morfologia das partículas

As micropartículas liofilizadas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) quanto à formação e morfologia. As amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro e analisadas em aumentos variando entre 20 a 1400 vezes em microscópio JSM-6390LV (JEOL, EUA), disponível no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC).

3.3.2.3.4 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e teor de flavonoides totais nos sistemas microparticulados

Exatamente cerca de 45 mg de micropartículas foram solubilizadas em 3,0 mL de uma mistura acetoneitrila:metanol (2:1, V/V) com auxílio de banho de ultrassom durante 5 minutos. As soluções resultantes foram filtradas em membrana de PVDF (0,45 µm) e o teor de flavonoides totais foi determinado por CLAE/DAD (COSTA et al., 2011).

A observação de possíveis interferências dos componentes da formulação sobre a quantificação dos marcadores foi avaliada utilizando misturas físicas do polímero e da formulação branca com a FEF-*Cp* na mesma proporção estabelecida para a formulação. As misturas foram preparadas e avaliadas por CLAE/DAD nas mesmas condições anteriormente descritas, e o teor de flavonoides totais obtido foi comparado com a solução de FEF-*Cp*.

Para o cálculo da eficiência de encapsulação foi utilizada a equação 3, que descreve a relação entre a massa de flavonoides encapsulada e a massa total de flavonoides utilizada em cada formulação (massa de flavonoides presentes em 100 mg de FEF-*Cp*).

$$EE (\%) = \left(\frac{\text{massa de flavonoides totais encapsulada (mg)}}{\text{massa de flavonoides totais utilizada na formulação (mg)}} \right) \times 100$$

Equação 3

O teor de flavonoides totais para cada formulação foi expresso como mg de flavonoides totais por 100 mg de micropartículas, conforme descrito na equação 4.

$$\text{Teor (\%)} = \left(\frac{\text{massa de flavonoides totais encapsulados}}{\text{massa de micropartículas}} \right) \times 100$$

Equação 4

3.3.2.3.5 Estudo de liberação dos sistemas microparticulados

O perfil de liberação dos sistemas microparticulados MCP₁ e MCP-NaCl foi avaliado em tampão HCl pH 1,2 e tampão fosfato pH 7,4 (USP), ambos contendo 0,5 % (m/V) de lauril sulfato de sódio. Cerca de 100 mg de micropartículas exatamente pesados foram transferidos para frascos contendo 15 mL de meio de liberação, de maneira a manter condições *sink*.

Para análise em pH 1,2 foram avaliadas amostras após 30, 60 e 120 minutos de liberação, enquanto que para pH 7,4 foram avaliados os tempos 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas. Cada tempo de análise foi preparado em triplicata em frascos individuais. Os frascos permaneceram fechados e mantidos em banho termostático (Dubnoff, CT-232) a 37 °C ± 0,5 °C com agitação de 150 rpm. Transcorrido o tempo de liberação, as amostras foram imediatamente filtradas em membrana PVDF (0,45 µm)

e analisadas por CLAE/DAD. Como controle, a FEF-*Cp* foi submetida às mesmas condições de liberação descritas para as formulações de micropartículas. A partir dos resultados, gráficos de porcentagem de flavonoides totais liberados em função do tempo foram construídos.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha da técnica e do polímero para encapsulação dos flavonoides da FEF-*Cp* em um sistema microparticulado foi realizada com base no trabalho de Santos (2012). A técnica da dupla emulsão a/o/a seguida de evaporação/extração do solvente é descrita na literatura para a microencapsulação de substâncias hidrofílicas (GIRI et al., 2013; IQBAL et al., 2015). As emulsões múltiplas, especialmente a/o/a, são relatadas como sistemas apropriados para encapsulação, proteção e liberação de ativos de caráter hidrofílico, além de permitirem a obtenção de maior eficiência de encapsulação em relação a emulsão simples, por exemplo (McCLEMENTS, 2015). Como matriz polimérica foi utilizado Eudragit RS100, que vem sendo utilizado para encapsulação de fármacos visando administração por via oral (TRAPANI et al., 2007; CRUZ et al., 2010; ALHNAN; BASIT, 2011; KLEEMANN et al., 2017; PATRA et al., 2017).

Considerando a característica hidrofílica da FEF-*Cp*, a técnica de dupla emulsão seguida de extração/evaporação do solvente foi utilizada para o desenvolvimento de micropartículas de Eudragit RS100 contendo os flavonoides da FEF-*Cp*. Diversos parâmetros foram estudados com o objetivo de obter micropartículas contendo maior teor encapsulado dos flavonoides da FEF-*Cp*, bem como obter uma liberação modificada dos ativos e evitar uma possível degradação no trato gastro-intestinal.

3.4.1 Estudo preliminar de formulação

Para definir a quantidade de FEF-*Cp* a ser utilizada no preparo das micropartículas, foi avaliada a concentração em flavonoides totais das soluções obtidas após a dispersão de 50 e 100 mg de FEF-*Cp* em 1 mL de água. A concentração de flavonoides totais nos filtrados das dispersões aquosas da FEF-*Cp* foi de $4769,18 \pm 44,61$ e $8956,04 \pm 78,01$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para 50 e 100 mg de FEF-*Cp*, respectivamente, correspondendo a $102,64\% \pm 0,96\%$ e $96,37\% \pm 0,83\%$ dos valores teóricos esperados. Desta forma, definiu-se a fase aquosa interna (a_1) como a solução resultante da dispersão de 100 mg de FEF-*Cp* em 1 mL de água, equivalentes a 89,56

$\pm 0,78$ mg de flavonoides totais adicionados à formulação de micropartículas.

As formulações foram avaliadas por CLAE/DAD para determinação da eficiência de encapsulação e teor de flavonoides totais conforme metodologia previamente descrita (COSTA et al., 2011). Para observar possíveis interferências na detecção dos marcadores pelos componentes da formulação, misturas físicas do polímero e da formulação branca com a FEF-*Cp* foram preparadas, obedecendo à proporção da formulação. O teor de flavonoides totais encontrado nas misturas foi comparado com solução de FEF-*Cp* de igual concentração, sendo encontrado o valor de $97,93 \pm 2,63$ % e $100,17 \pm 1,55$ % para a primeira e segunda misturas respectivamente, demonstrando que os componentes da formulação não interferem na quantificação dos marcadores por CLAE/DAD pelo método utilizado.

Estudos preliminares de formulação foram realizados com o objetivo de estabelecer as condições de preparação das micropartículas, que possibilitassem obter sistemas com características físico-químicas aceitáveis e com elevado teor de flavonoides totais encapsulado. Os componentes da formulação, quantidades e método para formação da emulsão primária foram mantidos fixos, de acordo com o relatado no quadro 7. Dessa forma, o valor teórico máximo do teor de flavonoides totais encapsulado seria de 1,76 mg de flavonoides em 100 mg de micropartículas, considerando uma eficiência de encapsulação de 100%. Nesse contexto, atingir valores próximos a esses foram o objetivo dos estudos de formulação.

Este estudo preliminar demonstrou que a velocidade e o tempo de agitação parecem influenciar o teor encapsulado (Tabela 1). As formulações F4 e F6, preparadas com agitação menos vigorosa (4.000 rpm) e por menor tempo (1 min), apresentaram eficiência de encapsulação e teor de flavonoides superiores às demais. Esses resultados corroboram com estudos anteriormente publicados, como o descrito por Ito e colaboradores, que descreveram a velocidade e o tempo de agitação da emulsão primária exercem influência na eficiência de encapsulação de micropartículas de PLGA contendo fármacos hidrofílicos (ITO; FUJIMORI; MAKINO, 2008). As alterações em relação ao aumento do volume da fase aquosa de extração foram realizadas com o objetivo de facilitar a difusão do solvente orgânico (diclorometano) para o meio aquoso, aumentando a velocidade de solidificação do polímero durante a etapa de formação das micropartículas (YEO; PARK, 2004; JELVEHGARI et al., 2011).

Tabela 1: Resultados do estudo preliminar de formulação.

Formulações	Rendimento (%)	EE# (%)	Teor de flavonoides (mg/100 mg MCP)
F1	86	13,95	0,26
F2	86	13,23	0,23
F3	88	14,69	0,26
F4	90	27,32	0,43
F5	85	17,29	0,30
F6	85	26,75	0,47

#Eficiência de encapsulação

Como pode ser observado na tabela 1, os valores de encapsulação e teor podem ser considerados muito baixos, mesmo considerando o caráter hidrofílico dos compostos encapsulados. A encapsulação de moléculas hidrofílicas e anfifílicas é considerada um desafio, devido à possibilidade de partição do ativo presente nas gotículas da fase orgânica para a fase de maior volume, a fase aquosa externa (McCLEMENTS, 2015; RAMAZANI et al., 2016).

Nesse contexto, a seleção da metodologia para microencapsulação depende do grau de hidro/lipofilicidade dos ativos (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008). A técnica de emulsão simples óleo-em-água (o/a) é geralmente utilizada para encapsulação de ativos hidrofóbicos ou fracamente solúveis em água. Entretanto, essa técnica não é adequada para ativos hidrofílicos em função da possibilidade de difusão do ativo para a fase contínua durante a formação das partículas. Nesse sentido, as emulsões múltiplas representam alternativas promissoras, sendo a dupla emulsão ($a_1/o/a_2$) geralmente utilizada. Os ativos hidrofílicos são solubilizados na fase aquosa interna (a_1) da emulsão conferindo ao sistema maior eficiência de encapsulação (IQBAL et al., 2015). Adicionalmente, Lu e colaboradores (2016) também descreveram a dupla-emulsão como método ideal para encapsulação de polifenóis em sistemas de liberação modificada.

Para obtenção de uma elevada eficiência de encapsulação de ativos hidrofílicos também são relatados outros aspectos, como a manutenção da estabilidade da emulsão primária (a/o), principalmente regida pela proporção do volume das gotículas da fase aquosa interna para o volume da fase orgânica, descrita como de fundamental importância. Além disso, a alta viscosidade da fase orgânica, influenciada pelo peso molecular e/ou

concentração do polímero, também se correlaciona com a obtenção de maior eficiência de encapsulação (RAMAZANI et al., 2016).

Os métodos geralmente utilizados para microencapsulação têm como base o processo de emulsificação, onde gotículas contendo o polímero e ativo formam microesferas a partir da extração do solvente (RAMAZANI et al., 2016). Nesse contexto, outro ponto a ser destacado, é a escolha do solvente na técnica de emulsão seguida de evaporação, sendo desejável que o mesmo contemple os seguintes critérios: capacidade de solubilização do polímero escolhido; baixa solubilidade na fase contínua; baixo ponto de ebulição e alta volatilidade; e baixa toxicidade. Clorofórmio, acetato de etila, formiato de etila e diclorometano são usualmente utilizados nessa técnica, mas o diclorometano é amplamente descrito devido à rápida volatilização, produção de microestruturas esféricas e uniformes, além de alta eficiência de encapsulação (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008).

Considerando os aspectos discutidos, a técnica de emulsão/evaporação permite que a encapsulação dos ativos seja diretamente influenciada pela velocidade de solidificação das microesferas, etapa que ocorre em dois momentos, primeiramente pela extração do solvente para a fase aquosa externa, e após pela evaporação para o ambiente (RAMAZANI et al., 2016). Durante essa etapa da formulação, a difusão dos flavonoides da FEF-*Cp* se encontra facilitada, principalmente considerando o caráter hidrofílico da matriz fitoquímica da FEF-*Cp* e consequente afinidade pela fase aquosa externa.

Com base nas evidências apresentadas, estudos de formulação foram conduzidos visando à obtenção de micropartículas com maior teor encapsulado e rendimento.

3.4.2 Preparação e caracterização dos sistemas microparticulados

3.4.2.1 Preparação do sistema microparticulado

O estudo de formulação realizado a seguir objetivou avaliar a repercussão da relação de volumes entre fase aquosa contendo a FEF-*Cp* e fase orgânica contendo o polímero sobre a eficiência de encapsulação. Assim, foram preparadas formulações nas quais o volume de diclorometano foi reduzido (3 ou 4 mL), mantendo a quantidade de polímero (500 mg). Esta alteração, além da relação de volumes entre fase interna aquosa e fase orgânica, também repercute no tempo de formação das micropartículas e, consequentemente, sobre a capacidade de encapsulação do sistema. Ainda, também com vistas a reduzir o tempo de

eliminação do solvente, um novo aumento do volume da fase aquosa de extração foi investigado.

As formulações 1 e 2 apresentaram teor médio de $0,95 \pm 0,07$ e $0,70 \pm 0,08$ mg de flavonoides totais em 100 mg de micropartículas, e eficiência de encapsulação de $54,10 \% \pm 4,02 \%$ e $39,08 \% \pm 4,50 \%$, respectivamente, evidenciando um aumento do teor encapsulado em relação ao primeiro estudo preliminar de formulação. Estes resultados demonstram que as variáveis avaliadas podem influenciar na obtenção de um teor elevado de flavonoides totais associado às micropartículas.

Com base nos indicativos apontados durante os estudos anteriores, foi observado que a velocidade de eliminação do solvente parece exercer influência para obtenção de micropartículas com maior teor encapsulado. Nesse sentido, foram preparadas formulações com diferentes volumes de diclorometano (DCM) para solubilização do polímero na fase oleosa, e a etapa de eliminação do solvente foi realizada em ambiente climatizado a 40°C em função da temperatura de evaporação do diclorometano ($39,6^\circ\text{C}$). Os resultados de rendimento, eficiência de encapsulação e teor de flavonoides totais estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Caracterização dos sistemas microparticulados.

FORMULAÇÃO	Rendimento (%)	Eficiência de encapsulação (%)	Teor de flavonoides (mg/100 mg MCP)
MCP ₁ (3 mL DCM)	$83,70 \pm 3,86$	$49,21 \pm 1,14$	$0,87 \pm 0,02$
MCP ₂ (4 mL DCM)	$82,01 \pm 7,93$	$35,68 \pm 0,92$	$0,63 \pm 0,01$
MCP ₃ (5 mL DCM)	$94,98 \pm 2,15$	$22,82 \pm 0,61$	$0,40 \pm 0,01$
MCP ₁ -NaCl	$83,52 \pm 1,76$	$69,03 \pm 1,14$	$1,22 \pm 0,06$

Os resultados descritos na tabela 2 confirmaram as observações do estudo preliminar de formulação, considerando as variáveis no preparo da formulação que exercem influência para obtenção de maior teor de flavonoides totais encapsulado. As formulações preparadas com menor volume de diclorometano (MCP₁) na fase oleosa apresentaram maior eficiência de encapsulação e teor associado.

Ramazani e colaboradores (2016) relatam que a encapsulação de moléculas de caráter hidrofílico se configura um desafio, considerando que o ativo possui a tendência de difundir da fase polimérica para a fase

externa previamente à solidificação da microestrutura, fator que contribui para baixa eficiência de encapsulação. Portanto, parâmetros que acelerem a solidificação das microesferas levam ao aumento da eficiência de encapsulação de ativos de caráter hidrofílico e anfifílico (RAMAZANI et al., 2016). Nesse contexto, os resultados encontrados corroboram com o perfil hidrofílico dos flavonoides presentes na FEF-*Cp*, sendo evidenciada a correlação entre o menor tempo de eliminação do solvente, e a conseqüente formação mais rápida das micropartículas, com o maior teor de flavonoides associado ao sistema microparticulado.

3.4.2.2 Influência da pressão osmótica sobre a eficiência de encapsulação

A adição de cloreto de sódio na fase aquosa de extração teve como objetivo avaliar o efeito da elevação da pressão osmótica durante a formação das micropartículas sobre diversas propriedades do sistema como tamanho de partícula, morfologia, eficiência de encapsulação e teor de flavonoides totais associado. Essa estratégia foi utilizada baseada na observação já amplamente descrita na literatura da influência da pressão osmótica na estrutura das partículas obtidas, principalmente na diminuição da porosidade e, conseqüentemente, na capacidade de encapsulação e perfil de liberação do sistema (O'DONNELL; MCGINITY, 1997; PÉANA et al., 1998; HAN et al., 2001; HE et al., 2006; WANG; GUO, 2008; YE, KIM; PARK, 2010).

As micropartículas preparadas sob a influência de pressão osmótica elevada pela presença de NaCl (MCP₁-NaCl) apresentaram eficiência de encapsulação e teor de flavonoides totais superiores às MCP₁ (Tabela 2). Esses resultados corroboram com os descritos por Santos (2012), que testou diversas concentrações de NaCl na preparação de microestruturas por dupla emulsão, descrevendo a obtenção de microesferas com maior eficiência de encapsulação e perfil de liberação controlado sob influência da pressão osmótica na fase aquosa externa da formulação. Adicionalmente, Ye e colaboradores (2010) também relatam que a adição de sal na fase aquosa externa, contribui para o aumento da eficiência de encapsulação devido à película densa e polímero gerada em torno das microesferas, e do equilíbrio da pressão osmótica gerado na fase aquosa interna, que não permitem a saída do ativo para a fase aquosa externa.

A utilização de agentes osmóticos como o NaCl para o aumento da pressão osmótica do sistema dificulta a entrada de água da fase externa em direção ao interior da partícula, diminuindo a possível formação de poros que ocasionam na perda dos ativos para o meio externo durante o preparo da formulação (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008). Esse aspecto

é relevante, principalmente considerando que a técnica de emulsão/evaporação utilizada na preparação do sistema é fundamentada na evaporação do solvente da fase oleosa que leva à formação das micropartículas pela solidificação do polímero (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008). Durante essa etapa de formação e solidificação das micropartículas são gerados canais de água que conectam a fase aquosa interna e externa, devido ao efeito osmótico, podendo ocasionar ao influxo dos ativos para o meio externo (JELVEHGARI et al., 2011; IQBAL et al., 2015).

Os resultados obtidos neste estudo foram considerados satisfatórios, uma vez que as micropartículas contendo os flavonoides da FEF-*Cp* desenvolvidas neste trabalho têm por objetivo a avaliação final em modelo animal de depressão. Nesse contexto, micropartículas com maior teor de substâncias ativas resultam em uma menor dose a ser administrada, o que é sempre desejável, principalmente considerando a administração via oral em modelo *in vivo*.

3.4.2.3 Caracterização dos sistemas microparticulados

3.4.2.3.1 Avaliação do tamanho e morfologia das micropartículas

Os resultados da determinação de tamanho médio de partícula e distribuição granulométrica (inferida pelo valor de span) estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 3: Granulometria das micropartículas. D[4,3]: diâmetro médio em volume; D(0,1), D(0,5) e D(0,9) diâmetro de partícula correspondente, respectivamente, a 10 %, 50 % e 90 % da distribuição acumulada; Span: polidispersão de tamanhos.

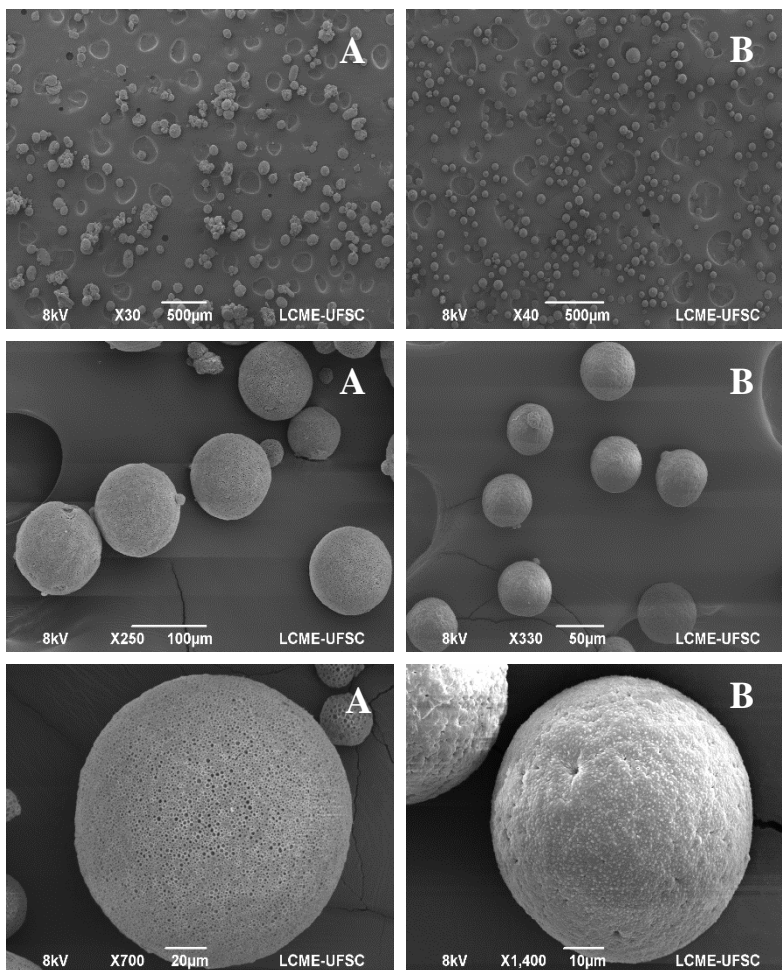
Amostra	Tamanho (µm)				SPAN
	D _[4,3]	D(0,1)	D(0,5)	D(0,9)	
MCP ₁	95	31	77	157	1,6
MCP ₁ -NaCl	62	30	57	103	1,2

A análise morfológica das partículas, realizada a partir das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), revelou partículas esféricas para os dois sistemas preparados (Figura 15). As micropartículas preparadas sem adição de cloreto de sódio (MCP₁) apresentaram na superfície poros de diversos tamanhos distribuídos por

toda superfície. Por outro lado, as micropartículas preparadas com adição do agente osmótico (MCP₁-NaCl) apresentaram uma superfície aparentemente rugosa, com menor número de poros distribuídos pela superfície comparados ao sistema MCP₁.

De acordo com o demonstrado na tabela 4, as MCP₁ apresentaram diâmetro médio de 95 µm e faixa granulométrica variando de 31 a 157 µm. O agente osmótico também contribuiu para obtenção de micropartículas menores e com menor distribuição de tamanhos, visto que as MCP₁-NaCl apresentaram diâmetro médio de 62 µm com faixa granulométrica de 30 a 103 µm. A polidispersão de tamanhos, verificada pelo valor de Span, foi menor para as MCP₁-NaCl em relação às MCP₁.

Figura 21: Micrografias obtidas em MEV para as formulações MCP₁ (A) e MCP₁-NaCl (B).



Autores relatam que a eficiência de encapsulação e o tamanho de partícula não são completamente controlados na metodologia da dupla emulsão (a/o/a), porém fatores como a velocidade de agitação, viscosidade da fase oleosa, concentração do polímero, e em especial, influência da pressão osmótica, estão relacionadas as essas propriedades (ITO; FUJIMORI; MAKINO, 2007). O controle da pressão osmótica pela adição de sal na fase aquosa do sistema contribuí para obtenção da

partículas mais uniformes e com menor distribuição de tamanhos (GASPARINI et al., 2008; GASPARINI; HOLDICH; KOSVINTEV, 2010).

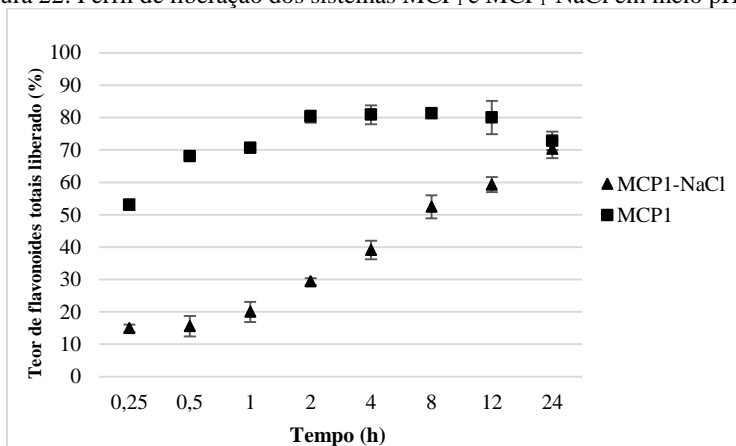
3.4.2.3.2 Estudo de liberação dos sistemas microparticulados

Os perfis de liberação dos sistemas microparticulados foram avaliados em pH 1,2 simulando o tempo de residência no estômago, e no pH 7,4 considerando o tempo de trânsito das formulações no intestino. Os resultados referentes ao teor de flavonoides totais liberado no estudo em pH 1,2 estão sumarizados na tabela 4, e o perfil de liberação em meio pH 7,4 são demonstrados na figura 16.

Tabela 4: Teor de flavonoides totais nos intervalos de liberação em meio pH 1,2 para os sistemas MCP₁ e MCP₁-NaCl.

Amostras	Teor de flavonoides totais liberado (%)		
	0,5	1h	2h
MCP ₁	55,42 ± 1,71	50,64 ± 4,19	53,19 ± 3,98
MCP ₁ -NaCl	12,41 ± 0,80	15,94 ± 0,36	23,76 ± 2,78

Figura 22: Perfil de liberação dos sistemas MCP₁ e MCP₁-NaCl em meio pH 7,4.



O estudo de liberação demonstrou perfis diferentes para os dois sistemas microparticulados. O sistema MCP₁ apresentou uma liberação em torno de 50% no pH 1,2, enquanto que no pH 7,4 em duas horas foram verificados cerca de 80% do teor de flavonoides totais livre no meio de liberação. Esses resultados corroboram com a estrutura porosa revelada nas micrografias (Figura 15A), estando o mecanismo de liberação possivelmente relacionado à entrada do meio aquoso para o interior do sistema, através dos poros, levando à difusão dos flavonoides para o exterior da partícula (McCLEMENTS, 2015).

O sistema preparado com a utilização do gradiente osmótico MCP₁-NaCl apresentou modulação da liberação nos dois meios de liberação avaliados quando comparado ao sistema MCP₁ (Tabela 4 e Figura 16). No meio com pH 1,2 foi verificada uma liberação inicial de 12% em 30 minutos, sendo observado, ao final do período de duas horas, um teor de flavonoides totais de aproximadamente 24%. Já no pH 7,4 foi observado uma liberação lenta e contínua durante todo o estudo. O sistema MCP₁-NaCl atingiu cerca de 30% de liberação em 2 horas, e aumentou para 50% em 8 horas de experimento. Ao final do experimento foi observada a liberação de cerca de 70% do teor de flavonoides associado. Para a fração livre, em ambos os meios foi observada uma liberação de 100% nos primeiros tempos avaliados, demonstrando que as condições de estudo não foram limitantes da liberação.

As micrografias revelaram a presença de poros na superfície dos dois sistemas (Figura 15), e essa porosidade parece exercer influência no perfil de liberação. No sistema preparado sem a influência da pressão osmótica (ausência de NaCl), foi observado maior número de poros na superfície das partículas, e também menor controle da liberação. Já as microestruturas do sistema MCP₁-NaCl apresentaram maior controle de liberação em relação ao MCP₁, efeito possivelmente relacionado à aparente a menor porosidade desse sistema.

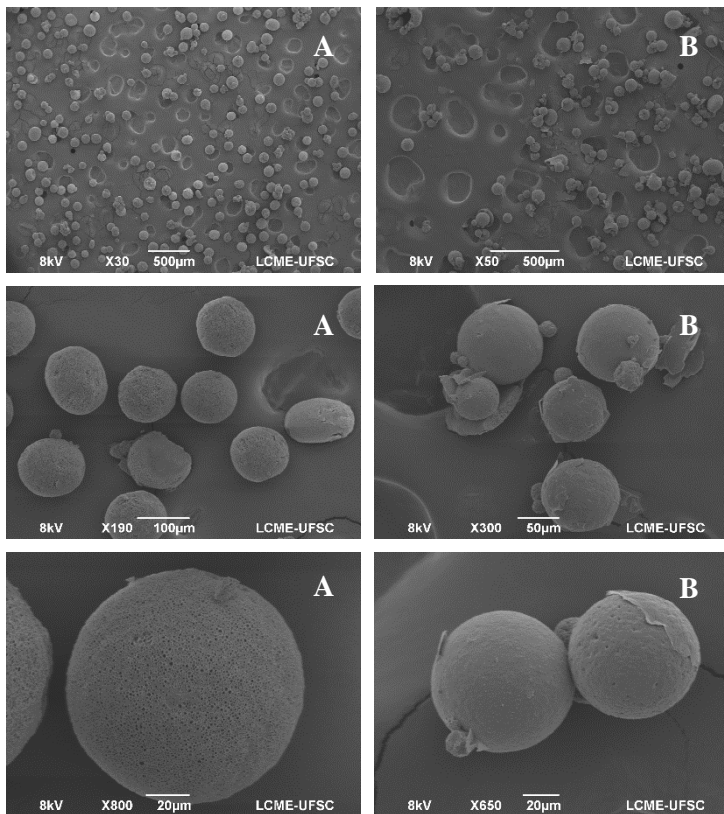
A liberação de compostos hidrofílicos em sistemas porosos depende da sua capacidade de difusão através da rede polimérica, e do tamanho molecular em relação ao diâmetro do poro (McCLEMENTS, 2015). Além disso, a porosidade dos sistemas exerce influência na modulação da liberação do ativo, sendo observado que a maior presença de poros pode aumentar consideravelmente a taxa de liberação (YANG, CHUNG; PING NG, 2001; FREIBERG; ZHU, 2004; GASPARINI; HOLDICH; KOSVINTEV, 2010).

Em um trabalho de revisão recentemente publicado (LU; KELLY; MIAO, 2016), os autores relatam que existem poucos estudos na literatura sobre a liberação, transporte e absorção *in vivo* de sistemas

microemulsionados incorporados de polifenóis. Os autores comentam que os polifenóis encapsulados por dupla-emulsão apresentam liberação mais prolongada e controlada em relação ao sistema de emulsão simples (a/o). Porém, esses compostos encapsulados na fase aquosa interna em dupla-emulsão (a/o/a), podem gradualmente difundir para a fase oleosa ou até mesmo para a fase aquosa externa, devido às suas propriedades anfífilas, e esses fatores podem alterar o perfil de liberação.

A fim de verificar possíveis alterações na estrutura das partículas, foram realizadas micrografias dos sistemas após o estudo de liberação (Figura 17). Para o sistema MCP₁ não foram observadas alterações morfológicas evidentes nas microestruturas após contato com o meio de dissolução. Já para o sistema MCP₁-NaCl, foram visualizadas partículas mais aglomeradas com um início de erosão da matriz polimérica. Eudragit® RS 100 é um copolímero com grupos amônio quaternários presentes na forma de sais. Estes grupos conferem certo grau de permeabilidade ao polímero, além de atuar como agentes canalizadores, facilitando a entrada do meio através dos poros formados na parede da partícula promovendo um inchaço da matriz polimérica (JELVEHGARI et al., 2012). No caso das micropartículas preparadas com NaCl, a presença do sal pode ter deixado a matriz polimérica mais permeável (PATRA et al., 2017), facilitando a entrada de água e consequente flexibilização da cadeia polimérica iniciando assim a erosão da partícula durante o teste de dissolução.

Figura 23: Micrografias obtidas em MEV para as formulações MCP₁ (A) e MCP₁-NaCl (B) após o estudo de liberação em pH 7,4.



3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como objetivo desse capítulo, foram preparados e caracterizados dois sistemas microestruturados (MCP₁ e MCP₁-NaCl) contendo FEF-*Cp*, visando obter um prolongamento da liberação dos flavonoides de *Cecropia pachystachya*. Considerando o perfil hidrofílico da FEF-*Cp* foi utilizada a técnica de dupla emulsão seguida de extração do solvente. Entre os parâmetros estudados, foi observado que o tempo de eliminação do solvente - observado pela redução do volume de diclorometano da fase oleosa, e temperatura controlada em 40 °C - exerceram influência para obtenção de microesferas com maior eficiência de encapsulação e teor de flavonoides associado.

Ainda, como parte dos objetivos, foi observado que o sistema MCP₁-NaCl apresentou maior controle de liberação dos flavonoides associados, devido à adição de cloreto de sódio para controle da pressão osmótica do sistema, levando aparentemente à redução na porosidade, maior eficiência de encapsulação e controle de liberação, em relação ao sistema MCP₁.

Nesse contexto, os resultados para a formulação MCP₁-NaCl foram considerados satisfatórios, tendo em vista que foi obtida uma eficiência de encapsulação de cerca de 70% e um teor de 1,22 mg de flavonoides por 100 mg de micropartículas, em um sistema que apresentou uma liberação lenta e contínua *in vitro* durante 24 horas, com liberação acima de 70% em 8 horas. Por fim, considerando que o presente trabalho tem como objetivo a modulação da liberação dos flavonoides da FEF-*Cp* em um sistema microestruturado para avaliação via oral em modelo animal de depressão, é esperada uma possível redução na dose ativa devido à modulação da liberação dos flavonoides durante o tempo de residência da formulação no trato gastrointestinal.

REFERÊNCIAS

AGNIHOTRI, N.; MISHRA, R.; GODA, C.; ARORA, M. Microencapsulation – A Novel Approach in Drug Delivery: A Review. **Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2; n. 1, p. 1-20; 2012

ALHNAN, M. A.; BASIT, A. W. Engineering polymer blend microparticles: An investigation into the influence of polymer blend distribution and interaction. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1–2, p. 30-36, 2011

AGUIAR, J.; COSTA, R.; ROCHA, F.; ESTEVINHO, B. N.; SANTOS, L. Design of microparticles containing natural antioxidants: Preparation, characterization and controlled release studies. **Powder Technology**, v. 313, p. 287–292, 2017

COSTA, G. M.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. **Natural product communications**, v. 6, n. 6, p. 913-920, 2011

CRUZ, L.; ASSUMPÇÃO, E.; ANDRADE, S. F.; CONRADO, D. J.; KULKAMP, I. C.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Gastroresistant microparticles containing sodium alendronate prevent the bone loss in ovariectomized rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 5, p. 441-447, 2010

FARAGO, P.V.; RAFFIN, R.P.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; SAZADSKI, S.F. Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 7, p. 1298-1305, 2008.

FELTRIN, E. P.; CHORILLI, M. Extratos Secos Padronizados: Tendência Atual em Fitoterapia. **Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde**, v. 7, p. 109-115, 2010

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, n. 1-2, p. 1-18, 2004

GASPARINI, G.; KOSVINTSEV, S. R.; STILLWELL, M. T.; HOLDICH, R. G. Preparation and characterization of PLGA particles for subcutaneous controlled drug release by membrane emulsification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, n. 2, p. 199-207, 2008.

GASPARINI, G.; HOLDICH, R. G.; KOSVINTSEV, S. R. PLGA particle production for water-soluble drug encapsulation: Degradation and release behaviour. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 2, p. 557-564, 2010

GIRI, T. K.; CHOUDHARY, C.; AJAZUDDIN, A. A.; BADWAIK, H.; TRIPATHI, D. K. Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 125-141, 2013

HAN, K.; LEE, K. D.; GAO, Z. G.; PARK, J. S. Preparation and evaluation of poly(l-lactic acid) microspheres containing rhEGF for chronic gastric ulcer healing. **Journal of Controlled Release**, v. 75, n. 3, p. 259-269, 2001

IQBAL, M.; ZAFAR, N.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 173-190, 2015

ITO, F.; FUJIMORI, H.; MAKINO, K. Incorporation of water-soluble drugs in PLGA microspheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 54, n. 2, p. 173-178, 2007

ITO, F.; FUJIMORI, H.; MAKINO, K. Factors affecting the loading efficiency of water-soluble drugs in PLGA microspheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, n. 1, p. 25-29, 2008

JELVEHGARI, M.; BARAR, J.; NOKHODCHI, A.; SHADROU, S.; VALIZADEH, H. Effects of process variables on micromeritic properties and drug release of non-degradable microparticles. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 1, n. 1, p. 18-26, 2011

KLEEMANN, C. R.; SANTOS, T. C.; TAVARES, L.; PIZZOLATTI, M. G.; CAMPOS, A. M. Development and Characterization of Synthetic

Chalcones-Loaded Eudragit RS 100 Microparticles for Oral Delivery. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 6, p. 1074-1080, 2017

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 26-39, 2008

LU, W.; KELLY, A. L.; MIAO, S. Emulsion-Based Encapsulation and Delivery Systems for Polyphenols, **Trends in Food Science & Technology**, 2015

MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, Protection, and Release of Hydrophilic Active Components: Potential and Limitations of Colloidal Delivery Systems, **Advances in Colloid and Interface Science**, 2015

O'DONNELL, P. B.; MCGINITY, J. W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, n. 1, p. 25-42, 1997

ONWULATA, C. I. Encapsulation of New Active Ingredients. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 183–202, 2012

PATRA, C. N., PRIYA, R., SWAIN, S., KUMAR, J. G., PANIGRAHI, K. C., GHOSE, D. Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Future Journal of Pharmaceutical sciences**, 2017, doi: 10.1016/j.fjps.2017.02.001.

PAULO, F.; SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Material Science & Engineering C**, v. 1, n. 77, p. 1327-1340, 2017

PÉANA, J.-M; VENIER-JULIENNA, M-C; BOURYA, F.; MENEIB, P.; DENIZOTA, B.; BENOITA, J-P. NGF release from poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. Effect of some formulation parameters on encapsulated NGF stability. **Journal of Controlled Release**, v. 56, n. 1-3, p. 175-187, 1998

RAMAZANI, F.; CHEN, W.; VAN NOSTRUM, C. F.; STORM, G.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T.; HENNINK, W. E.; KOK, R. J. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs

in PLGA microspheres: state-of-the-art and challenges. **International Journal of Pharmaceutics**, 2016

SANTOS, T. C. **Microesferas contendo extrato padronizado de Cecropia glaziovii para o tratamento da hipertensão arterial**. 2012. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis

SHARMA, N.; SINGH, S.; PAWAR, P.; ARORA, S. Production Techniques And Versatile Applications Of Microparticles As Controlled Drug Delivery System. **International Journal of Innovative Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 93-101, 2015

SRI.S, J.; SEETHADEVI A.; SURIA P. S.;MUTHUPRASANNA P.; PAVITRA P. Microencapsulation: A Review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.3, n. 1, 2012

TRAPANI, A. LAQUINTANA, V.; DENORA, N.; LOPEDOTA, A.; CUTRIGNELLI, A.; FRANCO, M.; TRAPANI, G.; LISO, G. Eudragit RS 100 microparticles containing 2hydroxypropyl- β -cyclodextrin and glutathione: Physicochemical characterization, drug release and transport studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 1, p. 64-74, 2007

WANG, S.; GUO, S. Disodium norcantharidate-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres: II. Modification of morphology and release behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1-2, p. 15-20, 2008

YANG, Y.-Y.; CHUNG, T.-S.; PING NG, N. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. **Biomaterials**, v. 22, n. 3, p. 231-241, 2001.

YE, M.; KIM, S.; PARK, K. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 2, p. 241-260, 2010

YEO, Y.; PARK, K. N. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2004

Considerações Finais

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo dos anos, os medicamentos fitoterápicos de origem etnofarmacológica forneceram novas entidades químicas com suposto perfil antidepressivo (EL-ALFY et al., 2012). Em uma avaliação recente da literatura foram observados inúmeros trabalhos de revisão e meta-análise que evidenciam o potencial de derivados vegetais no tratamento de transtornos de humor (FARAHANI et al., 2015). Entretanto, apesar dos produtos naturais representarem caminhos viáveis para o desenvolvimento de novos tratamentos antidepressivos, ainda podem ser considerados escassos estudos sobre o mecanismo de ação desses compostos no SNC (EL-ALFY et al., 2012).

Cecropia pachystachya Trécul (Urticaceae) é amplamente distribuída na região sul do Brasil (LORENZI & MATOS, 2002) tendo seu potencial farmacológico descrito por diversos autores (CONSOLINI et al., 2006; SCHINELLA et al., 2008; ARAGÃO et al., 2010; CRUZ et al., 2013; PACHECO et al., 2014), e também pelo nosso grupo de pesquisa (BRANCO-VANEGAS et al., 2014; GAZAL et al., 2014; GAZAL et al., 2015). Com relação à composição química, o extrato aquoso das folhas de *C. pachystachya* apresenta uma matriz rica em compostos fenólicos, especialmente de flavonoides *C*-heterosídeos como isoorientina, orientina e isovitexina (COSTA et al., 2011).

Considerando a composição química de *C. pachystachya*, e as evidências científicas para os flavonoides, que se destacam entre os metabólitos secundários com potencial para tratamento de patologias do SNC (MESSAOUDI et al., 2008; JÄGER; SAABY, 2011; WASOWSKI; MARDER, 2012), foram realizados estudos em parceria com pesquisadores de outras IES tendo como objetivo investigar o potencial do extrato aquoso (EA-*Cp*) no SNC (GAZAL et al., 2014; GAZAL et al., 2015).

Esses estudos sugeriram que o potencial neurofarmacológico do EA-*Cp* estaria possivelmente relacionado a sua composição rica em flavonoides, e nos levaram aos objetivos contemplados nessa tese. Dessa forma, o presente trabalho buscou aprofundar a investigação do potencial dos flavonoides *C*-heterosídeos de *C. pachystachya* no SNC, especialmente do efeito tipo-antidepressivo (GAZAL, et al., 2014).

Com intuito de aperfeiçoar a atividade já evidenciada, e de proporcionar uma possível redução na dose terapêutica, uma fração enriquecida em flavonoides *C*-heterosídeos de *C. pachystachya* (FEF-*Cp*) foi desenvolvida. A padronização e otimização da FEF-*Cp* realizada a partir de trabalhos anteriores (COSTA et al., 2011; SANTOS et al., 2016)

sendo possível obter uma fração enriquecida em cerca de três vezes o teor de flavonoides totais expressos em isoorientina ($118.53 \pm 2.50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) em relação ao extrato de origem ($44.82 \pm 0.45 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

O perfil de flavonoides da FEF-*Cp* foi observado primeiramente por CLAE/DAD, sendo sugerida a presença de flavonoides de núcleo flavona, possivelmente derivados das agliconas apigenina e luteolina, devido às bandas características observadas no espectro de ultravioleta. A investigação mais aprofundada do perfil de flavonoides da FEF-*Cp* foi realizada com a utilização da ferramenta de espectrometria de massas (CLUE/EM/EM) que permitiu a detecção de compostos ainda não descritos para essa fração, assim como para *C. pachystachya*. Foi observado um perfil extremamente rico em flavonoides glicosídicos, sendo detectados 15 flavonoides, dos quais diversos isômeros.

Ainda sobre as características químicas dos flavonoides da FEF-*Cp*, esses apresentaram perfil de estabilidade em diferentes condições de temperatura avaliadas. Nos estudos de estabilidade em temperatura de refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$; 30 dias), e acelerado ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR), não foram detectadas alterações no teor de flavonoides totais durante todos os experimentos. Porém, em condições de estresse ($80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$; 30 dias) o teor de flavonoides totais permaneceu estável durante apenas 5 dias, sendo visualizado ao final do experimento um teor de flavonoides totais cerca de 12% menor.

A avaliação do efeito tipo-antidepressivo da FEF-*Cp* foi realizada em dois modelos animais. No tratamento agudo, a FEF-*Cp* apresentou redução no tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado nas doses de 50 e 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, permitindo uma redução na dose ativa na ordem de quatro vezes em relação aos resultados do EA-*Cp* (200 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) (GAZALet al., 2014). Nesse estudo, foi observado que o mecanismo de ação da FEF-*Cp* estaria possivelmente relacionado ao seu potencial antioxidante, sendo observado efeito preventivo do dano oxidativo nos níveis de radicais carbonila, TBARS, atividade da mieloperoxidase, e concentração de nitrito/nitrato em algumas regiões cerebrais, como hipocampo, núcleo *accumbens* e amígdala.

A partir dos resultados anteriores, a FEF-*Cp* foi avaliada em modelo de estresse crônico moderado (ECM). O tratamento com a FEF-*Cp* foi capaz de reverter o efeito do ECM, indicando efeito tipo-antidepressivo. De forma mais específica, a FEF-*Cp* foi capaz de reverter o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na amígdala, hipocampo e núcleo *accumbens*. Além disso, o aumento da atividade da enzima mieloperoxidase, envolvida em processos de estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas, também foi prevenido por FEF-*Cp* na

amígdala e hipocampo, assim como foi prevenido o aumento da concentração de nitrito/nitrato no hipocampo. A administração da FEF-*Cp* também causou diminuição das enzimas pró-oxidantes superóxido dismutase e catalase no núcleo *accumbens*. Esses resultados corroboram para demonstrar um perfil neuroprotetor da FEF-*Cp* contra o dano oxidativo, os quais estão associados ao estresse e a depressão (NG et al., 2008).

Nos últimos anos, grandes avanços no desenvolvimento de sistemas terapêuticos de liberação modificada com base em matrizes fitoterápicas têm sido relatados na literatura (AJAZUDDIN, 2010; CHATUVERDI et al., 2011; ANSARI; ISLAM; SAMEEM, 2012). A encapsulação têm se mostrado um recurso eficiente para aumentar a biodisponibilidade de substâncias bioativas, permitindo contornar possíveis limitações tecnológicas de extratos vegetais secos, por exemplo (ONWULATA, 2012). Neste contexto, o emprego de formulações de liberação modificada, em especial de micropartículas, pode aperfeiçoar a efetividade terapêutica de extratos vegetais e de seus derivados ativos (CHATUVERDI et al., 2011). Do ponto de vista tecnológico, a fração enriquecida desenvolvida (FEF-*Cp*) já apresenta vantagens em relação ao extrato de origem (EA-*Cp*), pois os altos teores obtidos para os constituintes majoritários permitiram uma redução da dose ativa.

Dentro desse contexto, como etapa final do presente trabalho, foram desenvolvidas micropartículas contendo a FEF-*Cp* visando uma liberação modificada dos flavonoides. Baseado em um sistema previamente descrito para outra espécie de *Cecropia* (SANTOS, 2012), foram realizados estudos de formulação, onde foram investigados diversos parâmetros na preparação de microestruturas de Eudragit RS100 pela técnica de dupla emulsão seguida de evaporação do solvente.

Como resultados do estudo de formulação, foi observado que os parâmetros que favoreceram a eliminação do solvente orgânico, e por consequência facilitaram a solidificação das micropartículas, levaram a obtenção de maior eficiência de encapsulação e teor de flavonoides associado. Entre os fatores podem ser citados a diminuição do volume do solvente orgânico, o aumento do volume da fase aquosa de extração, e a utilização de temperatura controlada em 40 °C. Ainda, a influência da pressão osmótica, por meio da adição de cloreto de sódio na fase aquosa de extração foi avaliada na formação das micropartículas.

Nesse contexto, duas formulações foram desenvolvidas e caracterizadas, codificadas como MCP₁ e MCP₁-NaCl. O sistema preparado sob influência da pressão osmótica (MCP₁-NaCl) apresentou maior eficiência de encapsulação (69,03 ± 1,14 %) e teor de flavonoides

associado ($1,22 \pm 0,06$ mg/100 g de micropartículas), além de perfil de liberação lento e contínuo. Esses resultados foram considerados satisfatórios, tendo em vista a perspectiva de avaliação em modelo *in vivo* de depressão.

Conclusões gerais

5. CONCLUSÕES GERAIS

- ♣ A obtenção de uma fração enriquecida em flavonoides *C*-heterosídeos (FEF-*Cp*) a partir do extrato hidroetanólico (EB-*Cp*) de *Cecropia pachystachya* Trécul foi desenvolvida e padronizada. A FEF-*Cp* apresentou teor de flavonoides totais de $118,53 \pm 2,50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ expressos em isoorientina, teor cerca de três vezes superior ao obtido para o EB-*Cp* ($43,46 \pm 0,88 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).
- ♣ O perfil de flavonoides da FEF-*Cp* foi caracterizado por CLUE/EM/EM sendo possível detectar a presença de 15 flavonoides diferentes, incluindo diversos isômeros. FEF-*Cp* apresenta uma matriz rica em flavonoides glicosídicos de núcleo flavona, especialmente apigenina e luteolina. A presença de flavonoides da classe *O*-glicosil-*C*-glicosilflavonoides foi sugerida, sendo também detectada a presença de vitexina até o momento não descrita para *C. pachystachya*.
- ♣ Os estudos de estabilidade demonstraram que os flavonoides da FEF-*Cp* apresentaram resistência à degradação em diversas condições de temperatura. O teor de flavonoides totais se manteve sem alterações significativas nos experimentos de estabilidade sob refrigeração ($4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$; 30 dias), e acelerado ($40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR), entretanto em condições de estresse ($80 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$; 30 dias) o teor de flavonoides totais permaneceu estável durante apenas cinco dias.
- ♣ FEF-*Cp* apresentou efeito tipo-antidepressivo após administração aguda *in vivo* nas doses de 50 e 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, atuando principalmente na atividade da enzima mieloperoxidase, concentração de nitrito/nitrato, e no metabolismo energético cerebral.
- ♣ No modelo do estresse crônico moderado (ECM) *in vivo*, a FEF-*Cp* na dose de 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ foi capaz de reverter o comportamento tipo-depressivo induzido pelo protocolo. Foi observado efeito preventivo do estresse oxidativo em diversas regiões cerebrais envolvidas na patogênese da depressão, permitindo inferir que a fração atua no equilíbrio oxidativo e exerce importante papel no mecanismo fisiológico da atividade tipo-antidepressiva da FEF-*Cp*.

- ♣ Micropartículas de Eudragit RS100 contendo os flavonoides da FEF-*Cp* foram preparadas pelo método de dupla emulsão (a/o/a) seguida de evaporação do solvente. Os estudos de formulação demonstraram que os parâmetros estudados no sentido de favorecer a eliminação do solvente orgânico contribuíram para obtenção de maior eficiência de encapsulação e teor de flavonoides associado.
- ♣ Foram preparados e caracterizados dois sistemas microestruturados, MCP₁ e MCP₁-NaCl, sendo no último estudada a influência da pressão osmótica sobre as características físico-químicas e perfil de liberação. Os resultados do sistema MCP₁-NaCl foram considerados satisfatórios, sendo observada maior eficiência de encapsulação (69,03 ± 1,14 %) e teor de flavonoides associado (1,22 ± 0,06 mg/100 g de micropartículas), além de perfil de liberação lento e contínuo.

REFERÊNCIAS

- AJAZUDDIN; SARAF, S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 680-689, 2010
- ANSARI, S. H.; ISLAM, F.; SAMEEM, M. Influence of nanotechnology on herbal drugs: A Review. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, v. 3, n. 3, p. 142-146, 2012
- ARAGÃO, D. M. O.; GUARIZE, L.; LANINI, J.; DA COSTA, J. C.; GARCIA, R. M. G.; SCIO, E. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 629-633, 2010
- BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M. H.; FARAHANI, M. S.; RAHIMI, R. Phytochemical constituents as future antidepressants: a comprehensive review. **Reviews in the Neurosciences**, v. 26, n. 6, p. 699-719, 2015
- BERG, C.C.; ROSSELLI, P.F. **Cecropia**. New York: Flora Neotropica / The New York Botanical Garden, 2005
- BRAKOWSKI, J.; SPINELLI, S.; DÖRIG, N.; BOSCH, O. G.; MANOLIU, A.; HOLTFOORTH, M. G.; SEIFRITZ, E. Resting state brain network function in major depression – Depression symptomatology, antidepressant treatment effects, future research. **Journal of Psychiatric Research**, v. 92 p.147-159, 2017
- BRANGO-VANEGAS, J.; COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; ARÉVALO-FERRO, C.; CASTELLANOS, L. Glycosylflavonoids from *Cecropia pachystachya* Trécul are quorum sensing inhibitors. **Phytomedicine**, v. 21, n. 5, p. 670-675, 2014
- BROWN, E.; HURD, N. S.; MCCALL, S.; CEREMUGA, T. E. Evaluation of the anxiolytic effects of chrysin, a *Passiflora incarnata* extract, in the laboratory rat. **ANNA Journal**, v. 75, n. 5, 2007
- CASOLARO, M.; CASOLARO, I. Controlled release of antidepressant drugs by multiple stimulus-sensitive hydrogels based on α -amino acid

residues. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 30, p. 82-89, 2015

CHATTOPADHYAY, D.; NAIK, T. N. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure- activity relationship and scope. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.7, p. 275-301, 2007

CHATUVERDI M.; KUMAR, M.; SINHAL, A.; SAIFI, A. Recent development in novel drug delivery systems of herbal drugs. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 5, n. 2, p. 87-94

CONSOLINI, A. E.; MIGLIORI, G. N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 417-422, 2005

CONSOLINI, A. E.; RAGONE, M. I.; MIGLIORI, G. N.; CONFORTI, P.; VOLONTÉ, M. G. Cardiostimulant and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 90-96, 2006

COVINGTON, H. E. III; VIALOU, V.; NESTLER, E. J. From synapse to nucleus: novel targets for treating depression. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 4-5, p. 683-693, 2010

COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1096-1102, 2011

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013

CRUZ, E. D. M.; DA SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. D. C.; ALVES, E. S. S.; LUCON JR, J. F.; REIS, M. B. G. D.; TOLEDO, C. E. M. D.; CRUZ, F. G.; VANNIER-SANTOS, M. A. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**, v. 89, n. 0, p. 71-77, 2013

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

FAVA, M.; KENDLER, K. S. Major depressive disorder. **Neuron**, v. 28, n. 2, p. 335-341, 2000

EL-ALFY, A.T.; ABOURASHED, E. A.; MATSUMOTO, R. R. Nature against depression. **Current Medicinal Chemistry**; v. 19, n. 14, p. 2229-2241, 2012

FARAHANI, M.S.; BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M. H.; ABDOLLAHI, M.; RAHIMI, R. Plant-derived natural medicines for the management of depression: an overview of mechanisms of action. **Reviews in Neurosciences**, v. 26, n. 3, p. 305-332, 2015

GAZAL, M.; ORTMANN, C. F.; MARTINS, F. A.; STRECK, E. L.; QUEVEDO, J.; DE CAMPOS, A. M.; STEFANELLO, F. M.; KASTER, M. P.; GHISLENI, G.; REGINATTO, F. H.; LENCINA, C. L. Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. **Brain Research Bulletin**, v. 108, n. 0, p. 10-17, 2014

GAZAL, M.; KAUFMANN, F. N.; ACOSTA, B. A.; OLIVEIRA, P. S.; VALENTE, M. R.; ORTMANN, C. F.; STURBELLE, R.; LENCINA, C. L.; STEFANELLO, F. M.; KASTER, M. P.; REGINATTO, F. H.; GHISLENI, G. Preventive Effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. **Neurochemical Research**, 2015

GILIANI, A. H.; RAHMAN, A. U. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.43-49, 2005

GROSSO, C.; VALENTÃO, P.; FERRERES, F.; ANDRADE, P. B. The Use of Flavonoids in Central Nervous System Disorders. **Current Medicinal Chemistry**; v. 20, p. 4684-4719, 2013

GUPTA, S.; PARVEZ, N.; BHANDARI, A.; SHARMA, P. K. Microspheres based on herbal actives: the less-explored ways of disease treatment. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 14, p. 148–157, 2015

JÄGER, A. K.; SAABY, L. Flavonoids and the CNS. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1471-1485, 2011

KASTER, M. P.; MORETTI, M.; CUNHA, M. P.; RODRIGUES, A. L. Novel approaches for the management of depressive disorders. **European Journal of Pharmacology**, v. 771, p. 236-240, 2016

LOBO, M. K.; NESTLER, E. J.; COVINGTON, H. E. Potential Utility of Optogenetics in the Study of Depression. **Biological Psychiatry**, v. 71, n. 1068-1074

LORENZI, H., MATOS., F.J. **Plantas Mediciniais do Brasil**, Nova Odessa. Instituto Plantarum, São Paulo, BraSil, 2002

LIU, Y.; LAN, N.; REN, J.; WU, Y.; WANG, S. T.; HUANG, X. F.; YU, Y. Orientin improves depression-like behavior and BDNF in chronic stressed mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 6, p. 14130-1442, 2015

LIANG, Z.; ZHANG, B.; SU, W. W.; WILLIAMS, P. G.; LI, Q. X. C-Glycosylflavones Alleviate Tau Phosphorylation and Amyloid Neurotoxicity through GSK3 β Inhibition. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 7, n. 7, p. 912-923, 2016

MESSAOUDI, M.; BISSON, J. F.; NEJDI, A.; ROZAN, P.; JAVELOT, H. Antidepressant-like effects of a cocoa polyphenolic extract in Wistar-Unilever rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 11, n. 6, p. 269-276, 2008

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p.p 629-661, 2016

ONWULATA, C. I. Encapsulation of New Active Ingredients. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 183–202, 2012

PACHECO, N. R.; PINTO, N. C. C.; SILVA, J. M.; MENDES, R. F.; COSTA, J. C.; ARAGÃO, D. M. O.; CASTAÑON, M. C. M. N.; SCIO, E. *Cecropia pachystachya*: A Species with Expressive In Vivo Topical Anti-Inflammatory and In Vitro Antioxidant Effects. **BioMedical Research International**; p. 1-10, 2014

PAPAKOSTAS, G. I., IONESCU, D. F. Towards new mechanisms: an update on therapeutics for treatment-resistant major depressive disorder. **Molecular Psychiatry**, p. 1–9, 2015

PARK, K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 120, n. 1-2, p. 1-3, 2007

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.50-52, 2005

PAULO, F.; SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Material Science & Engineering C**, v. 1, n. 77, p. 1327-1340, 2017

SANTOS, T. C. **Microesferas contendo extrato padronizado de *Cecropia glaziovii* para o tratamento da hipertensão arterial**. 2012. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis

SANTOS, T. C. **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMA FITOTERÁPICO NANOESTRUTURADO DE *Cecropia glaziovii* Snethl PARA O TRATAMENTO DO HERPES LABIAL**. 2016. Tese de Doutorado - Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis

SARAF, A. F. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, p. 680–689, 2010

SCHINELLA, G.; AQUILA, S.; DADE, M.; GINER, R.; DEL CARMEN RECIO, M.; SPEGAZZINI, E.; DE BUSCHIAZZO, P.; TOURNIER, H.; RÍOS, J. L. Anti-Inflammatory and Apoptotic Activities of Pomolic Acid

Isolated from *Cecropia pachystachya*. **Planta Med**, v. 74, n. EFirst, p. 215-220, 17.03.2008 2008

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO, P.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1–2, p. 91-97, 2003

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the New Millennium: Leadfinding and Biotechnology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, n.3, p.253-262, 2002

WASOWSKI, C.; MARDER, M. Flavonoids as GABAA receptor ligands: the whole story? **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 4, p. 24-49, 2012

WANG, S.; YU, Y.; FENG, Y.; ZOU, F.; ZHANG, X.; HUANG, J.; ZHANG, Y.; ZHENG, X.; HUANG, X. F.; ZHU, Y.; LIU, Y. Protective effect of the orientin on noise-induced cognitive impairments in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 1, n. 296, p. 290-300, 2016

WHO Report by the secretariat. **Global burden of mental disorders and the need for a comprehensive, coordinated response from health and social sectors at the country level**. Executive board EB 130/9; 2011 (130th session, Provisional agenda item 6.2). Disponível em: <<http://www.ghwatch.org/who-watch/eb130/mentalhealth>>