

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EXTRATO DE *Bauhinia variegata* POSSUI EFEITO  
TIPO-ANTIDEPRESSIVO EM CAMUNDONGOS COM  
ENVOLVIMENTO DO SISTEMA MONOAMINÉRGICO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Ana Paula Schöffner**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**EXTRATO DE *Bauhinia variegata* POSSUI EFEITO  
TIPO-ANTIDEPRESSIVO EM CAMUNDONGOS COM  
ENVOLVIMENTO DO SISTEMA MONOAMINÉRGICO**

por

**Ana Paula Schöffner**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maribel Antonello Rubin**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A comissão examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**EXTRATO DE *Bauhinia variegata* POSSUI EFEITO TIPO-  
ANTIDEPRESSIVO EM CAMUNDONGOS COM ENVOLVIMENTO DO  
SISTEMA MONOAMINÉRGICO**

elaborada por  
**Ana Paula Schöffner**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**Comissão examinadora:**

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Maribel Antonello Rubin (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Severo Rodrigues (UFSC)**

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Sara Marchesan de Oliveira (UFSM)**

Santa Maria, 10 de abril de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Rosimeri e Osvin, que estiveram comigo desde o início da minha caminhada. Obrigada por acreditarem na minha formação profissional, por serem a base de meus princípios e meu porto seguro.

À minha irmã, Carol, pelo carinho, amizade e compreensão.

Aos meus avós, Avelino e Leonora, pelo incentivo e pelo apoio para seguir em frente. Obrigada pelo carinho.

Ao meu companheiro, Ismael, pelo amor, incentivo e paciência. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Aos colegas do LabNeuro que tornaram minha caminhada mais leve. Por dividirem os dias comigo, pela amizade, ajuda e pelos momentos alegres que vivenciamos juntos. Sentirei saudade de todos.

À minha orientadora, Maribel, pela oportunidade de fazer parte do grupo LabNeuro, pela orientação e dedicação.

Aos professores da banca, Ana Lúcia e Sara, por avaliarem este trabalho; à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia; e à CAPES pela bolsa de estudos concedida.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **EXTRATO DE *Bauhinia variegata* POSSUI EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO EM CAMUNDONGOS COM ENVOLVIMENTO DO SISTEMA MONOAMINÉRGICO**

AUTORA: Ana Paula Schöffner  
ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup> Maribel Antonello Rubin  
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 10 de abril de 2015.

A depressão é um transtorno psiquiátrico que atinge 2-15% da população mundial. É uma neuropatologia heterogênea, pois inclui sintomas psicológicos, comportamentais e fisiológicos. Apesar de possuir diversos tratamentos para depressão, eles ainda não são tão efetivos e possuem muitos efeitos colaterais indesejáveis. Por isso, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas a fim de aperfeiçoar os tratamentos atuais. Diante disso, abrem-se possibilidades para o uso de plantas medicinais, uma vez que estas vem sendo utilizadas há milhares de anos por muitas populações para tratar diversas enfermidades. A *Bauhinia variegata*, conhecida popularmente como “pata-de-vaca”, possui efeitos benéficos à saúde, como: atividade anti-inflamatória, antidiabética, antidiarréica, entre outras. No presente estudo, foi investigado o efeito tipo-antidepressivo do extrato hidroetanólico bruto de folhas de *Bauhinia variegata* em dois testes preditivos de propriedade antidepressiva, o teste de suspensão pela cauda (TSC) e do teste do nado forçado (TNF) em camundongos machos adultos. Além disso, foi investigado o envolvimento do sistema monoaminérgico no efeito do extrato e sua atividade sobre a monoamina-oxidase A (MAO-A). O extrato bruto hidroetanólico foi administrado por via oral (vo) por gavagem. O tratamento agudo com o extrato de *Bauhinia variegata* (300 mg/kg) reduziu o tempo de imobilidade no TST. Além disso, a administração repetida (uma vez por dia durante 7 dias) do extrato também produziu um efeito tipo-antidepressivo no TSC (100 e 300 mg/kg) e TNF (300 mg/kg). O pré-tratamento de camundongos com cetanserina (5 mg/kg, ip, antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2A</sub>), prazosina (1 mg/kg, ip, antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico), ioimbina (1 mg/kg, ip, antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico), propranolol (2 mg/kg, ip, antagonista  $\beta$ -adrenérgico), SCH23390 (0,05 mg/kg, ip, antagonista do receptor dopaminérgico D<sub>1</sub>) ou sulpirida (50 mg/kg, ip, antagonista do receptor dopaminérgico D<sub>2</sub>) reverteu o efeito anti-imobilidade do extrato (300 mg/kg) no TSC. A combinação de doses sub-efetivas dos antidepressivos clássicos, fluoxetina (5 mg/kg, vo), imipramina (5 mg/kg vo) ou bupropiona (5 mg/kg, vo) com uma dose sub-efetiva do extrato (100 mg/kg) produziu um efeito antidepressivo sinérgico no TSC. O extrato não causou alteração locomotora no teste de campo aberto em doses eficazes, tanto no TSC como no TNF. Além disso, o extrato inibiu a atividade da MAO-A em preparações de mitocôndria encefálicas *in vitro*. Estes resultados sugerem que o extrato hidroetanólico bruto de folhas de *Bauhinia variegata* apresenta um potencial efeito tipo-antidepressivo, que pode ser dependente do sistema monoaminérgico.

Palavras-chave: Depressão, teste do nado forçado, teste da suspensão da cauda, *Bauhinia variegata*, monoamina-oxidase A.

## ABSTRACT

Dissertation of Master's degree  
Post Graduation Program in Pharmacology  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### ***Bauhinia variegata* EXTRACT HAS ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECT IN MICE WITH INVOLVEMENT MONOAMINERGIC SYSTEM**

AUTHOR: Ana Paula Schöffner

ADVISOR: Dr<sup>a</sup> Maribel Antonello Rubin

Place and date of defense: Santa Maria, April, 10, 2015.

Depression is a psychiatric disorder that affects 2-15% of the world population. It is a heterogeneous neuropathology, it includes psychological, behavioral and physiological symptoms. Despite having several treatments for depression, they are not as effective and have many undesirable side effects. Therefore, it is necessary the development of new therapeutic strategies to improve current treatments. Therefore, open up doors to the use of plant medicines, which has already been used for thousands of years by various populations for different diseases. The *Bauhinia variegata*, popularly known as "pata-de-vaca", has beneficial health effects, such as anti-inflammatory activity, antidiabetic, antidiarrheal. In the present study, we investigated the antidepressant-like effect of the crude hydroethanolic extract of leaves of *Bauhinia variegata* in two predictive tests of antidepressant property, the tail suspension test (TST) and the forced swimming test (FST) in mice. Furthermore, the involvement of monoaminergic system in its antidepressant-like effect was investigated and the effect of extract on monoamine oxidase A (MAO-A) activity was also evaluated. The acute treatment with the extract of *Bauhinia variegata* (300 mg/kg, p.o.) significantly reduced the immobility time in the TST. Moreover, the repeated administration (once a day for 7 days) of the extract by p.o. route also produced an antidepressant-like effect in the TST (100 and 300 mg/kg) and FST (300 mg/kg). The pretreatment of mice with ketanserin (5 mg/kg, i.p. a preferential 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist), prazosin (1 mg/kg, i.p. an  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist), yohimbine (1 mg/kg, i.p. an  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist), propranolol (2 mg/kg, i.p. a  $\beta$ -adrenoceptor antagonist), SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p. a dopamine D<sub>1</sub> receptor antagonist) or sulpiride (50 mg/kg, i.p. a dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonist) was able to reverse the anti-immobility effect of the extract (300 mg/kg, p.o) in TST. The combination of subeffective dose of fluoxetine (5 mg/kg, p.o.), imipramine (5 mg/kg, v.o.) or bupropion (5 mg/kg, v.o.) with a subeffective dose of the extract (100 mg/kg) produced a synergistic antidepressant-like effect in the TST. The extract did not cause motor alteration in the open-field test at effective doses in both TST and FST. We also showed that the extract inhibited the MAO-A activity of mice brain *in vitro*. These results suggest that the extract from *Bauhinia variegata* present an antidepressant-like potential, which may be dependent on the monoaminergic system and its MAO-A inhibitory properties.

**Keywords:** Depression, Forced swimming test, Tail suspension test, *Bauhinia variegata*, monoamine oxidase A.

## FIGURA

Figura 1- <i>Bauhinia variegata</i> .....	18
---	----

## TABELA

Tabela 1 - Critérios Diagnósticos da Depressão de Acordo com o DSM-V.....12



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ADT: Antidepressivos tricíclicos

IMAO: Inibidores da Monoamina oxidase

ISRS: Inibidores seletivos da recaptção de serotonina

MAO: Monoamina oxidase

OMS: Organização Mundial da Saúde

SNC: Sistema Nervoso Central

TDM: Transtorno depressivo maior

TNF: Teste do Nado Forçado

TSC: Teste da Suspensão pela Cauda

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 DEPRESSÃO.....	11
1.1.1 Tratamento da depressão.....	14
1.2 PLANTAS MEDICINAIS.....	16
1.2.1 Plantas e depressão.....	15
1.2.2 <i>Bauhinia variegata</i> .....	18
1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAR DEPRESSÃO.....	19
1.4 JUSTIFICATIVA.....	20
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>3 MANUSCRITO</b> .....	23
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	46
4.1 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	47
4.2 CONCLUSÃO GERAL.....	47
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48

## 1. INTRODUÇÃO

---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Depressão

A depressão é uma doença heterogênea, pois inclui sintomas psicológicos, comportamentais e fisiológicos. É uma neuropatologia que acomete em torno de 9,4% da população mundial (KESSLER, 2012), e é considerada a segunda principal causa de limitações no mundo, superada apenas pelas doenças isquêmicas do coração (NEMEROFF & OWENS, 2002). A depressão é reconhecida como um problema de saúde pública tanto pela sua prevalência, quanto pelo impacto que causa no cotidiano de pacientes e familiares envolvidos (NESTLER & CARLEZON, 2006). A depressão é associada com menor duração de vida e maior risco de doença cardíaca (KESSLER, 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a depressão é projetada como maior contribuinte para a carga global de doenças para o ano de 2030 (LÉPINE & BRILEY, 2011).

A forma mais comum de classificação da depressão é aquela que diferencia a depressão unipolar e a depressão bipolar (CARLSON, 2002), a primeira é caracterizada por um estado contínuo ou periódico de depressão, e a segunda por longos períodos de depressão intercalados com episódios de mania (euforia).

De acordo com Fava e Kendler (2000), a depressão unipolar é conhecida como uma síndrome clínica e comportamental chamada de Transtorno Depressivo Maior (TDM), e segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Distúrbios Mentais V, é caracterizada por anedonia (perda de interesse/prazer nas atividades diárias normais) e/ou humor deprimido por um período superior a duas semanas e mais quatro sintomas acessórios, no mínimo (Tabela 1). Os indivíduos também apresentam alterações do sono, de peso e de apetite, sentimentos recorrentes de culpa, agitação psicomotora, diminuição da capacidade de pensar e de tomar decisões e pensamentos de morte ou suicídio. A depressão também interfere no crescimento e desenvolvimento, no desempenho escolar e na reação familiar, podendo levar o paciente ao suicídio (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013).

Tabela 1 - Critérios diagnósticos da depressão de acordo com o DSM-V.

---

1. Humor deprimido (sentimento de tristeza, vazio, falta de esperança)
  2. Anedonia (interesse ou prazer acentuadamente diminuído em quase todas as atividades e quase todos os dias)

---

  3. Sentimentos de culpa ou desvalia
  4. Perda/ganho de peso ou apetite não intencional
  5. Agitação psicomotora/letargia
  6. Fadiga ou falta de energia
  7. Insônia/hipersônia
  8. Dificuldade de concentração, de pensar e de tomar decisões
  9. Pensamentos recorrentes de morte ou suicídio
- 

Fonte: Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais, quinta edição (DSM-V, 2013)

Em contraste com as experiências normais de tristeza, que são caracterizadas por um estado de humor deprimido transitório experimentado por muitas pessoas em algum momento da sua vida (perda, derrota e desapontamentos), a depressão clínica não consegue ser curada com medidas simples como um passeio com os amigos, pois é uma doença crônica que pode interferir significativamente na qualidade de vida do indivíduo, com prejuízo significativo no funcionamento social e profissional (DURA-VILA et al., 2013).

Estudos mostram que pacientes adultos com depressão apresentam alterações volumétricas e neuroquímicas em estruturas cerebrais. Assim, foi verificado uma diminuição do volume do hipocampo (SUSLOW et al., 2010) e do giro do cíngulo (WINGEN et al., 2010) durante episódio agudo de depressão, sendo que houve recuperação do volume nos pacientes em remissão comparados a controles saudáveis.

As causas da depressão ainda não estão bem elucidadas. A genética é um fator de risco para a doença: quem tem pai, mãe ou irmão com o transtorno tem duas ou três vezes mais chances de desenvolver depressão. Entretanto, existem fatores fisiológicos, bioquímicos, morfológicos e ambientais associados ao episódio depressivo (NESTLER et al., 2002). A depressão também é descrita como uma doença relacionada com o estresse, podendo este causar alterações neuroquímicas e morfológicas que contribuem para o risco de depressão (NESTLER et al., 2002).

Alguns autores propõem que o aumento da perda de células neuronais pode contribuir para a fisiopatologia da depressão. A doença tem sido relacionada com danos nas vias de sinalização que controlam a neuroplasticidade e sobrevivência celular e com a diminuição de número e tamanho de células nervosas no hipocampo. A recorrência ou persistência da doença e a falta de tratamento antidepressivo podem favorecer para a diminuição gradual do volume hipocampal, que por sua vez, pode explicar os problemas de memória de alguns pacientes, e também vários outros sintomas da depressão (MANJI, 2001; JAN, 2008).

Tem sido descrito que a redução de fatores de crescimento, principalmente o fator neurotrófico derivado do encéfalo, pode estar envolvido na gênese da depressão (DRZYZGA, 2009).

Diante disso, a depressão não deve ser vista como uma doença única, com uma só causa, e sim como uma síndrome heterogênea composta de inúmeros fatores causadores e de fisiopatologia distintas.

A hipótese mais aceita para explicar a fisiopatologia da depressão é a hipótese monoaminérgica, a qual postula que há uma deficiência na transmissão de monoaminas (serotonina, noradrenalina e dopamina) na fenda sináptica de pacientes deprimidos (BELMAKER & AGAM, 2008; ELHWUEGI, 2004; KISS, 2008).

Na década de 1950, pesquisadores observaram que a reserpina, usada para hipertensão e esquizofrenia, induzia depressão em modelos animais, bem como em seres humanos (10 a 15% dos pacientes). Isso porque a reserpina provoca depleção de serotonina, noradrenalina e dopamina nos neurônios pré-sinápticos ao inibir o transporte desses neurotransmissores nas vesículas sinápticas. E acredita-se que a consequente redução da neurotransmissão monoaminérgica seja responsável pela depressão (BEAR et al., 2008; DAWSON, 2000).

A hipótese monoaminérgica da depressão é confirmada pelo fato de que a maioria dos antidepressivos usados para tratar a depressão aumenta os níveis de monoaminas no encéfalo diminuindo os sintomas depressivos (NEMEROFF, 2007). O aumento das monoaminas ocorre por três mecanismos: bloqueio do transportador pré-sináptico de monoaminas, o qual é responsável por recaptar o neurotransmissor liberado na fenda sináptica e quando bloqueado, permite que os neurotransmissores permaneçam mais tempo na fenda; inibição da enzima monoamina-oxidase (MAO) que é responsável pela degradação das monoaminas neurotransmissoras; e através da inibição ou excitação de receptores pré e pós-sinápticos que regulam a liberação

das monoaminas (NEMEROFF & OWENS, 2002). Também está descrito que alterações estruturais ou funcionais dos receptores pré e pós-sinápticos para monoaminas contribuem para o desenvolvimento do quadro depressivo e suas variantes (BELMAKER & AGAM, 2008).

No entanto, apesar das evidências em torno da hipótese monoaminérgica, esta é muito limitada na sua capacidade de explicar a fisiopatologia da depressão pois ainda existem controversas. Nem todas as drogas que aumentam as monoaminas apresentam efeito antidepressivo, como por exemplo a cocaína. Além disso, com os antidepressivos há um rápido aumento das monoaminas no Sistema Nervoso Central (SNC) e a melhora dos sintomas depressivos leva semanas para ocorrer (WONG & LUCINO, 2001; SAMUELS et al., 2011). Isso nos faz pensar que há efeitos secundários decorrentes do aumento das monoaminas que são responsáveis pela melhora dos sintomas depressivos.

#### 1.1.1. Tratamento da depressão

A depressão já vem sendo tratada há décadas, mas apenas recentemente a compreensão sobre os mecanismos de ação dos antidepressivos tem sido melhor conhecida (TAYLOR et al., 2005; LEVINSTEIN & SAMUELS, 2014). Existem vários medicamentos e outros tratamentos não farmacológicos que estão disponíveis e são eficazes para pacientes com depressão. No entanto, uma percentagem substancial de pacientes não conseguem atingir a remissão com estas intervenções e as taxas de recaída são elevadas (LEVINSTEIN & SAMUELS, 2014).

Os tratamentos farmacológicos atuais são eficazes em 70-80% dos pacientes e a maioria das terapias requerem várias semanas de tratamento antes da melhora dos sintomas, em torno de 5 a 8 semanas, até que os pacientes respondam ao tratamento. Além disso, os tratamentos convencionais podem provocar efeitos colaterais indesejáveis, como hipotensão, arritmias, insônia e disfunção sexual (PAEZ-PEREDA, 2005; TAYLOR & STEIN, 2005; SAMUELS et al., 2011).

Os antidepressivos são um grupo heterogêneo de drogas que agem principalmente aumentando a disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica. Dentre elas citamos a imipramina que foi descoberta em 1954 por seu efeito antidepressivo em pacientes que a usavam como anti-histamínico em alergias. Este grupo de compostos, pela sua estrutura química, ficou conhecido como

antidepressantes tricíclicos (ADT) e gerou outros compostos amplamente comercializados, como a amitriptilina e a clomipramina (NESTLER et al., 2002). Já a iproniazida usada inicialmente para tuberculose foi descoberta por ter efeito contra depressão com grande sucesso, e foi classificada como inibidor da MAO (IMAO) (NESTLER et al., 2002). Hoje, ambos grupos de drogas ainda são muito utilizados, mas devido aos seus efeitos colaterais causados pela pouca especificidade de sua ação farmacológica foram criados medicamentos novos, de segunda geração, superiores em tolerância e com menos efeitos colaterais (NEMEROFF & OWENS, 2002).

Além dos ADT e IMAO, várias classes de fármacos aprovadas com atividade antidepressiva têm sido desenvolvidas, incluindo os inibidores seletivos da recaptação da serotonina e inibidores da recaptação da norepinefrina (SAMUELS et al., 2011).

Atualmente, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) são a classe de antidepressivos mais prescrita no mundo. O primeiro fármaco desta classe, a fluoxetina (Prozac®), começou a ser comercializada em 1987. Os ISRS são mais seguros mesmo em doses elevadas, bem toleradas e com perfil de efeitos colaterais leves. Os ISRS agem impedindo a captação da serotonina da fenda sináptica. Deste modo, a serotonina permanece disponível por mais tempo, causando melhora no humor dos pacientes deprimidos (RANG & DALE, 2007).

Encontram-se também como medicamentos de segunda geração os inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina, como a venlafaxina e a duloxetina, e também os inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina, como a reboxetina (BERTON & NESTLER, 2006).

Além do tratamento farmacológico, várias outras intervenções demonstraram eficácia para depressão, incluindo a eletroconvulsoterapia, a estimulação do nervo vago e estimulação magnética transcraniana (HOLTZHEIMER & MAYBERG, 2011). O uso da terapia eletroconvulsivante é na maior parte limitada a pacientes com depressão que são altamente resistentes ao tratamento (FAVA & KENDLER, 2000). A estimulação do nervo vago altera a concentração líquórica de neurotransmissores ou seus metabólitos e também altera a atividade funcional em regiões do sistema nervoso central, tais como o córtex orbitofrontal, o tálamo, hipotálamo, o cíngulo e hipocampo (CARPENTER et al., 2004; RUSH et al., 2005). A estimulação magnética transcraniana tem sido muito estudada e diversas



publicações têm mostrado benefícios clínicos do tratamento com essa terapia em aproximadamente 40% dos pacientes com depressão maior refratários à medicação antidepressiva (FITZGERALD et al., 2003; WASSERMANN & LISANBY, 2001).

## **1.2. Plantas medicinais**

As plantas são utilizadas há muito tempo como fonte de medicamentos para o tratamento das enfermidades que acometem o homem (CARVALHO et al., 2010). No Brasil, o surgimento da medicina popular com uso das plantas, deve-se aos índios, com contribuições dos negros e europeus; na época em que o Brasil era colônia de Portugal (REZENDE, 2002).

O termo “planta medicinal” foi oficialmente reconhecido durante a 31ª Assembleia da OMS (1973), sendo proposto que “planta medicinal é aquela que, administrada ao homem ou animais, por qualquer via ou sob qualquer forma, exerce algum tipo de ação farmacológica” (SILVA, 2006).

Há um amplo uso de fitoterápicos pela população mundial (FERREIRA et al., 2010). Aproximadamente 80% da população mundial depende da fitoterapia no que se refere à atenção primária em saúde (BRASILEIRO et al., 2008; VEIGA JUNIOR, 2008). De 365.000 espécies catalogadas, aproximadamente 25.000 espécies de plantas são de utilização popular e destas, somente 1.100 espécies foram estudadas como fontes de compostos biologicamente ativos (ALBAGLI, 2001). Por isso, ainda há muito para ser estudado da flora mundial como alvo terapêutico.

O uso de fitoterápicos caracteriza uma das terapêuticas mais procuradas atualmente. Aquino (2002) menciona que 40% dos medicamentos produzidos no Brasil possuem princípios ativos retirados das plantas. Entre os preferidos pelos brasileiros hoje estão a hortelã, empregada como expectorante; a babosa, para tratamento de queimaduras; o boldo e a carqueja, indicados para má digestão; o alho, usado no tratamento de gripes e resfriados, além de auxiliar na redução do colesterol; e a calêndula, como anti-inflamatório e antisséptico (SIMÕES et al., 1999).

Estudos mostram que o uso de terapias alternativas tem sido muito procurado por pacientes com depressão, especialmente o uso de medicamentos fitoterápicos

(ZHANG, 2004; THACHIL et al., 2007; WANG et al., 2008). Por isso, abrem-se novos caminhos para o uso de plantas medicinais.

### 1.2.1 Plantas e depressão

A pesquisa de novos agentes terapêuticos com potencial antidepressivo provenientes de plantas medicinais e seus compostos isolados tem sido ampliada significativamente (ZHANG, 2004). Atualmente a erva de São João (*Hypericum perforatum*) tem sido empregada mundialmente para o tratamento da depressão leve e moderada, com menos efeitos indesejáveis do que aqueles apresentados pelos antidepressivos convencionais (McGARRY et al., 2007; SAKAKIBARA et al., 2006).

Vários estudos têm descrito a atividade antidepressiva de muitos extratos de plantas e substâncias ativas isoladas, em ratos e camundongos, tais como: extrato etanólico de *Schinus molle* L. (MACHADO et al., 2008), extrato etanólico de *Tabebuia avellanedae* (FREITAS et al., 2010), flavonoides extraídos de *Apocynum venetum* (ZHENG et al., 2013) em testes preditivos para avaliar depressão. Assim, o extrato hidroalcoólico de caule e folhas de *Rosmarinus officinalis* possui efeito tipo-antidepressivo no TSC e TNF e este efeito é revertido por antagonistas dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico sugerindo o envolvimento desses sistemas no efeito tipo-antidepressivo deste extrato (MACHADO et al., 2009). O extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia brasiliensis* também apresenta efeito tipo-antidepressivo no TSC, o qual foi revertido por antagonistas dos sistema monoaminérgico mostrando o envolvimento deste no efeito do extrato. A administração de uma dose sub-efetiva do extrato de *Eugenia brasiliensis* com uma dose sub-efetiva de fluoxetina, imipramina e bupropiona produziu um efeito antidepressivo no TSC em camundongos (COLLA et al., 2012).

### 1.2.2 *Bauhinia variegata*

O gênero *Bauhinia* está incluído na família *Fabaceae* de acordo com a lista de espécies da Flora do Brasil (VAZ, 2001; SOARES & SCARMINIO, 2008; VAZ, 2010). A família inclui cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18000 espécies, sendo que no Brasil encontram-se 200 gêneros e 1500 espécies (VAZ, 2010). Estudos recentes reconheceram três subfamílias em *Fabaceae* (*Leguminosae*) -

*Caesalpinoideae*, *Cercidae* e *Mimosoideae* (VAZ & TOZZI, 2005). O gênero *Bauhinia* está incluído na *Cercidae*.

O gênero *Bauhinia* é encontrado nas áreas tropicais do planeta e é utilizado na medicina popular em várias regiões do mundo, incluindo África, Ásia, América Central e do Sul (CORRÊA et al., 1998; SILVA & FILHO, 2002). Apresenta importante valor comercial e é utilizada como planta ornamental, forrageira e principalmente medicinal.

No Brasil, várias espécies de *Bauhinia* são usadas pela população como hipoglicemiante. As folhas são consideradas diuréticas e hipocolesteremiantes, sendo empregadas na medicina popular também contra cistites, parasitoses intestinais e elefantíase (NOGUEIRA & SABINO, 2012).



Figura 1 – *Bauhinia variegata*. Fonte: [www.hrd.gov.tw/e\\_content/facility/facility02in.aspx?Gid=27](http://www.hrd.gov.tw/e_content/facility/facility02in.aspx?Gid=27)

A *Bauhinia variegata* (Figura 1) é conhecida popularmente no Brasil como pata-de-vaca. Estudos fitoquímicos identificaram flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas, antraquinonas e terpenóides no extrato de *Bauhinia variegata* (MISHRA et al., 2013).

Tem sido mostrado que a *Bauhinia variegata* possui ação anti-inflamatória (RAO et al., 2008; RAJKAPOOR et al., 2006), antioxidante (MISHRA, 2013) antibacteriana (RAJKAPOOR et al., 2006; MISHRA et al., 2013) e antidiabética (PAREKH & CHANDA, 2007; KUMAR et al., 2012). A casca do caule da *Bauhinia variegata* é tradicionalmente usada na medicina popular como tônico, no tratamento de úlceras e em doenças de pele. Foi também descrito que a casca do caule exerce

atividade hepatoprotetora (BODAKHE & RAM, 2007). Também auxilia contra disenteria e diarreia (PAREKH & CHANDA, 2007), atua como moduladora imunológica (GHAISAS, 2009). Flavonoides do caule de *Bauhinia variegata* possuem atividade citotóxica *in vitro* (RAJKAPOOR et al., 2009). São também atribuídas propriedades antifúngicas e antibacterianas aos flavonoides do caule de *Bauhinia variegata* (AHMED et al., 2012; MISHRA et al., 2013). As raízes são utilizadas como um antídoto para veneno de cobra (JAN et al., 2008). Porém, até o momento, não existem estudos do efeito antidepressivo da *Bauhinia variegata*.

### **1.3. Modelos experimentais para avaliar depressão**

Modelos animais são fundamentais para os avanços das ciências médicas para aprofundar o conhecimento das causas das doenças humanas e possibilitar testes com terapias inovadoras. Os modelos animais são indispensáveis nas pesquisas de novos compostos com efeito antidepressivo e para fornecer novos conhecimentos sobre as bases neurobiológicas dos transtornos psiquiátricos (CRYAN et al., 2002).

No entanto, muitos sintomas fundamentais que caracterizam a depressão como humor deprimido e sentimentos de culpa não podem ser avaliados em animais de laboratório. Por isso, são amplamente utilizados modelos com validade preditiva, como o teste do nado forçado (TNF) e o teste de suspensão pela cauda (TSC) para o estudo da depressão. Estes modelos com validade preditiva são baseados no efeito comportamental dos fármacos usados clinicamente, contudo não mimetizam sintomas ou bases neurobiológicas da doença, já que é difícil caracterizar os sintomas depressivos característicos em animais.

O TNF foi descrito primeiramente por Porsolt e colaboradores (1977), sendo utilizado em ratos e depois em camundongos, e o TSC foi descrito em camundongos por Steru et al. (1985). Ambos testes caracterizam-se pela exposição do animal à uma situação de estresse inescapável, causando um desespero comportamental, observado pela tentativa inicial de escape ou luta para sair desta situação através de movimentos intensos. Após os primeiros minutos, o animal permanece quase imóvel diante desta situação inescapável. Sendo assim, o comportamento de imobilidade

exibido em roedores quando submetidos a uma situação de estresse inescapável, reflete um estado de desespero comportamental, que é comparado e relacionado ao estado depressivo em humanos.

Estes dois modelos são amplamente utilizados na busca por compostos com possível ação antidepressiva (BOURIN et al., 2005), pois ambos são de fácil e rápido manuseio e de boa reprodutibilidade (CRYAN et al., 2002).

#### **1.4. Justificativa**

A depressão tem sido relatada como uma doença neuropsiquiátrica de alta prevalência (KESSLER, 2012). Entretanto, muitos pacientes mostram-se refratários ao tratamento com antidepressivos (LEVINSTEIN & SAMUELS, 2014). Além disso, o tratamento com os antidepressivos convencionais leva duas a três semanas para fazer efeito e também causa vários efeitos indesejáveis (SAMUELS et al., 2011; LEVINSTEIN & SAMUELS, 2014).

Embora tenha sido descrito que a *Bauhinia variegata* possui ação anti-inflamatória, antibacteriana, antitumoral, antidiabética, e hepatoprotetora, até o momento não existem estudos sobre o efeito antidepressivo da *Bauhinia variegata*. Portanto, no presente estudo foi avaliado o efeito tipo-antidepressivo do extrato hidroetanólico de folhas de *Bauhinia variegata* e o envolvimento do sistema monoaminérgico neste efeito.

## **2. OBJETIVOS**

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito tipo-antidepressivo do extrato hidroetanólico bruto de folhas de *Bauhinia variegata*, bem como seu mecanismo de ação em camundongos.

### 2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar o efeito tipo-antidepressivo da administração aguda e crônica do extrato de *Bauhinia variegata* no teste de suspensão pela cauda e no teste do nado forçado em camundongos;

2.2.2. Estudar o envolvimento dos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico no efeito do extrato de *Bauhinia variegata* utilizando o teste da suspensão pela cauda em camundongos;

2.2.3. Avaliar o possível efeito sinérgico de dose sub-efetiva do extrato de *Bauhinia variegata* em combinação com dose sub-efetiva de antidepressivos clássicos;

2.2.4. Avaliar o efeito do extrato de *Bauhinia variegata* sobre a atividade da MAO-A de mitocôndrias encefálicas de camundongos;

2.2.5. Avaliar o efeito do extrato de *Bauhinia variegata* sobre a atividade locomotora utilizando o teste do campo aberto em camundongos.

**3. MANUSCRITO**

---



### 3. MANUSCRITO



Título:

**Antidepressant-like effect of the hydroethanolic extract of leaves of Amazonian *Bauhinia variegata* in mice: Involvement of the monoaminergic system**

Manuscrito submetido para publicação no periódico:

**Phytomedicine**

Comprovante de submissão do manuscrito:

**Phytomedicine** Contact us  Help  Maintenance outage on 26 April 2015 ... [more](#)  
"My EES Hub" available for consolidated users ... [more](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#) Username: maribel.rubin@gmail.com  
Switch To: [Author](#) Go to: [My EES Hub](#) Version: [EES\\_2015\\_4](#)

Revisions Being Processed for Author **Maribel Antonello Rubin, Ph.D**

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display  results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Date Submission Began	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>	PHYMED-D-15-00265R1	Antidepressant-like effect of the hydroethanolic extract of leaves of Amazonian <i>Bauhinia variegata</i> in mice: Involvement of the monoaminergic system	Apr 24, 2015	Apr 24, 2015	Revision Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display  results per page.

**Antidepressant-like effect of the hydroethanolic extract of leaves of Amazonian *Bauhinia variegata* in mice: Involvement of the monoaminergic system**

Ana Paula Schöffner<sup>a</sup>, Jardel Gomes Villarinho<sup>a</sup>, Carlos Fernando Mello<sup>a</sup>, Marla Hahn Veroneze<sup>b</sup>, Lediane Tomazi<sup>a</sup>, Leandro Machado de Carvalho<sup>c</sup>, Fernanda Oliveira Lima<sup>c</sup>, Carine Viana<sup>d</sup>, Maribel Antonello Rubin<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>Pharmacology Graduate Program, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

<sup>b</sup>Biochemistry Graduate Program, Center of Exact and Natural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

<sup>c</sup>Chemistry Graduate Program, Center of Exact and Natural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

<sup>d</sup>Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

\*Corresponding author: MA Rubin, PhD, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Natural and Exact Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, 97105-900. Tel: + 55 55 3220 8053, Fax: + 55 55 3220 8978  
E-mail address: maribel.rubin@gmail.com (M.A. Rubin)

**Abbreviations**

FST, forced swimming test; MAO-A, monoamine oxidase A; OFT, open field test; TST, tail suspension test.

## ABSTRACT

**Background:** *Bauhinia variegata* has been used as an antidiabetic, antimicrobial and anti-inflammatory drug in the southeast Asia and south Africa. However, the effects of *Bauhinia variegata* on animal models of psychiatric disorders, such depression, has not been evaluated to date.

**Purpose:** To investigate whether the extract of Amazonian *Bauhinia variegata* induces antidepressant-like effect and possible underlying mechanisms.

**Methods:** The antidepressant-like effect was investigated using the tail suspension (TST) and the forced swimming (FST) tests in mice. The effect of selected receptor antagonists and of the association of subeffective doses of the extract and fluoxetine, imipramine and bupropion were investigated in the TST. The effect of *Bauhinia variegata* extract on monoamine oxidase A (MAO-A) activity of brain crude mitochondrial fractions was also assessed.

**Results:** *Bauhinia variegata* extract (300 mg/kg) caused an antidepressant-like effect similar to that induced by fluoxetine (10 mg/kg). Prazosin ( $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist, 1 mg/kg), propranolol ( $\beta$ -adrenoceptor antagonist, 2 mg/kg), SCH23390 ( $D_1$  receptor antagonist, 0.05 mg/kg) or sulpiride ( $D_2$  receptor antagonist, 50 mg/kg) prevented the anti-immobility effect of the extract. The combination of a subeffective dose of fluoxetine (5 mg/kg), imipramine (5 mg/kg) or bupropion (5 mg/kg) with a subeffective dose of the extract (100 mg/kg) produced a synergistic antidepressant-like effect in the TST. *Bauhinia variegata* extract inhibited MAO-A activity *in vitro*.

**Conclusion:** The ethanolic extract from *Bauhinia variegata* induces antidepressant-like effects, which are prevented by monoamine antagonists, and inhibits brain MAO-A activity *in vitro*. These findings support a role for monoaminergic transmission in the antidepressant-like effect of *Bauhinia variegata*.

**Keywords:** Antidepressant, Forced swimming test, Tail suspension test, *Bauhinia variegata*

## Introduction

Major depressive disorder, a debilitating psychiatric disorder that affects millions of people worldwide, has a lifetime prevalence in the range of 1.5 and 19%, with a median estimate of 9.4% (Kessler, 2012). According to the World Health Organization, depression may become main cause of the global burden of disease by 2030.

Although the neurobiology of depression is still incompletely understood, an important role of monoamines has been acknowledged. Accordingly, a decrease in extracellular concentrations of noradrenaline, serotonin and dopamine has been associated with depression (Belmaker & Agam, 2008). Evidence suggests that classical antidepressants, such as MAO inhibitors, selective serotonin noradrenaline and dopamine reuptake inhibitors facilitate monoaminergic transmission and decrease depressive symptoms (Nemeroff & Owens, 2002).

Depression management with classical antidepressants provides a complete remission in 70-80% of the patients and it often takes more than 5 to 8 weeks until the patients respond to the treatment (Berton & Nestler, 2006; Kemp *et al.*, 2008). The conventional treatment of depression produces many side effects, including arrhythmias, sexual dysfunction and gastrointestinal disturbances that may reduce the adherence of patients to treatment (Guadarrama-Cruz *et al.*, 2008). Thus, there is a need for novel treatments as well as strategies that could improve the efficacy of conventional therapies. In this context, medicinal plants research have been considered as an option for the development of drugs with innovative mechanisms of action and/or conceivably minimized adverse side effects.

*Bauhinia variegata* (Leguminosae) is a medium sized tree found in China, India and Africa. In Brazil, this plant is found in the Amazon region and is commonly known as “pata-de-vaca”. Some studies have reported that this plant has a number of pharmacological activities such as anti-inflammatory, antimicrobial (Raj Kapoor *et al.*, 2006) and antidiabetic (Kumar *et al.*, 2012). However, there are no studies regarding the possible antidepressant-like action of this plant. In this regard, considering the comorbidity of depression and diabetes, in which depression has a harmful impact on glycemic control and, in turn, the poorly controlled diabetes intensifies the depressive symptoms (Eren *et al.*, 2008), the use of an extract with

both antidiabetic and antidepressant action seems particularly attractive (Prabhakar *et al.*, 2014).

Therefore, the present study aimed to investigate the effects of the extract of *Bauhinia variegata* in tail suspension test (TST) and the forced swimming test (FST). We investigated the possible involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the extract of *Bauhinia variegata*. We also investigated the effect of the extract of *Bauhinia variegata* on brain MAO-A activity *in vitro*.

## Materials and methods

### *Preparation of the extract of Bauhinia variegata*

The medicinal plant species *Bauhinia variegata* (deposit n° IAN 185932) was obtained from the herbal collection of the Brazilian Agricultural Research Corporation - Embrapa Amazônia Oriental, Belém/Pará, Brazil. The species is from the Amazonian region and cultivated in the “Horto de Plantas Mediciniais e Aromáticas”. CNPq (process number 010529/2014-4) issued authorization for use of the Brazilian genetic patrimony.

Dry extracts of *Bauhinia variegata* were obtained by maceration of leaves at room temperature ( $25 \pm 2$  °C). Dried leaves (450 g) were maintained in 70% (v/v) ethanol for 7 days with occasional agitation of the maceration bath. The solvent was renewed and the procedure was repeated three times, completing a 4-week extraction process. After completing the maceration process, part of the extract was filtered and evaporated under pressure in a rotary evaporator to obtain the crude hydroethanolic extract. The dry extract was stored at 4 °C until use.

### *Analysis of phenolic compounds in plant extracts*

Phenolic compounds were determined in a Knauer HPLC system (Knauer GmbH, Berlin, Germany), consisting of a Smartline Pump 1000 coupled to a Smartline Manager 5000 and a DAD detector (model Smartline UV Detector 2600) equipped with a 3.3.1 ChromGate® software. The hydroethanolic dry extract was resuspended in methanol at a 2% (w/v) concentration and injected in the HPLC system using a 20 µL injection loop. The chromatographic runs were conducted at room temperature ( $21 \pm 2$ °C) using a reversed-phase Knauer Eurospher® 100-5 C18 column (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 µm particle size) with a Dionex Acclaim® 120 C18 guard cartridge (4.3 mm i.d. × 10 mm, 5 µm particle size). All the standards of

phenolic compounds were purchased from Sigma-Aldrich (Germany), except caffeic and ferulic acids, which were purchased from Fluka (Switzerland). Stock solutions of the standards (1000 mg L<sup>-1</sup>) were prepared by dissolving appropriate amounts of each substance in HPLC grade methanol. Working solutions of phenolic compounds were freshly prepared by further dilution of the stock solutions in methanol to desired concentrations.

Using optimized gradient-elution conditions, the mobile phase was composed of solvent A (0.1% orthophosphoric acid) and solvent B (100% acetonitrile). The mobile-phase gradient program was the following: 90–80% A and 10–20% B (0–5 min); 80–75% A and 20–25% B (5–35 min); 75–0% A and 25–100% B (35–55 min). The flow rate gradient program was the following: 0.8 mL min<sup>-1</sup> (0–35 min); 0.8–1.0 mL min<sup>-1</sup> (35–55 min). After individual runs, the re-equilibration period was 10 min. The detection was performed simultaneously at different wavelengths (206, 254, 320 and 360 nm). After optimizing, the method was validated by determining the following parameters: linearity, quantification limit, detection limit, precision and accuracy. For the screening and quantification of phenolic compounds by the validated HPLC method, crude extracts of *Bauhinia variegata* were resuspended in methanol at a 2% (w/v) concentration. Then each resuspended extract was injected in the HPLC system using an injection loop of 20 µL. The peak identification was based on retention times and UV-Vis spectral data by comparison to reference standards.

### *Animals*

Adult male Swiss mice (35-40 g) provided by the animal house of the Federal University of Santa Maria, maintained at constant room temperature of 22°C ± 1°C with water and standard laboratory chow (Guabi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil) *ad libitum*, under a 12:12 h light:dark cycle (lights on at 07:00 h) were used. All manipulations were carried out between 8:00 and 17:00 h, with each animal used only once. All experimental procedures were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the local Ethics Committee (process number 116/2013).

### *Drugs and treatment*

Prazosin hydrochloride, propranolol, (R)-(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride (SCH23390), sulpiride, fluoxetine, imipramine and bupropion were purchased from Sigma Chemical Co. St. Louis, USA. Drugs were dissolved in saline, except sulpiride, that was diluted in saline with 5% dimethylsulfoxide (DMSO), and fluoxetine, imipramine and bupropion that were dissolved in distilled water. Prazosin, propranolol and sulpiride were administered by intraperitoneal (i.p.) route, while SCH23390 was administered by subcutaneous (s.c.) route. Fluoxetine, imipramine and bupropion were administered by oral gavage (p.o.). The drugs were administered in a constant volume of 10 ml/kg body weight.

The *Bauhinia variegata* extract was dissolved in saline with 5% Tween 80 and was administered by oral gavage (p.o.) 60 min before the tests. The dissolution of the extract was freshly prepared from the lyophilized powder immediately before its administration. A control group received saline with 5% Tween 80 as vehicle. Fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) was used as a positive control.

In those experiments designed to study the time-course effect of the *Bauhinia variegata* extract (300 mg/kg, p.o.), the immobility time in the TST was assessed in an independent group of mice 30, 60, 120 and 240 min after the administration of the extract.

In the experiment designed to evaluate the effect of the sub-chronic administration of the extract, mice received *Bauhinia variegata* extract once a day for 7 days by oral gavage, and the tests were performed one hour after the last administration.

In those experiments performed to determine the involvement of the monoaminergic system in the effect of the extract, mice were pre-treated with vehicle, prazosin (1 mg/kg,  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist), propranolol (2 mg/kg,  $\beta$ -adrenoceptor antagonist), SCH23390 (0.05 mg/kg, D<sub>1</sub> receptor antagonist) or sulpiride (50 mg/kg, D<sub>2</sub> receptor antagonist), and 30 min later they received vehicle or *Bauhinia* extract (300 mg/kg, p.o.). Sixty minutes later, the TST and open field test (OFT) were carried out.

In order to evaluate whether the extract potentiates the antidepressant-like effect of conventional antidepressants, mice received, by oral gavage, vehicle or a subeffective dose of fluoxetine (5 mg/kg, a selective serotonin reuptake inhibitor),

imipramine (5 mg/kg, a noradrenaline reuptake inhibitor) or bupropion (5 mg/kg, a dopamine reuptake inhibitor) and, immediately thereafter, a subeffective dose of the extract (100 mg/kg, p.o.) or vehicle. Sixty minutes later, the TST and OFT were carried out.

### *Behavioral measurements*

#### *Tail suspension test (TST)*

The antidepressant-like effect of the *Bauhinia variegata* extract was measured using the TST, according to Steru *et al.* (1985).

#### *Forced swimming test (FST)*

To confirm the antidepressant-like effect of the *Bauhinia variegata* extract the FST was used, as previously described (Porsolt *et al.*, 1977).

#### *Open-field test (OFT)*

Mice were subjected to the open-field test (Zeni *et al.*, 2012) 60 min after the administration of the *Bauhinia variegata* extract in order to assess possible effects of the extract on locomotor activity. The number of crossing responses with the four paws (general locomotor activity) was registered for 5 min.

#### *Determination of MAO-A activity in vitro*

MAO-A activity was measured in crude brain mitochondrial fractions by a fluorometric method using kynuramine as a substrate, as previously described (Villarinho *et al.*, 2012). The *Bauhinia variegata* extract was tested at a concentration range of 10-1000 µg/ml and the IC<sub>50</sub> value was determined.

#### *Statistical analysis*

Data were analyzed by one- or two-way analysis of variance (ANOVA), depending on the experimental design. *Post hoc* analyses were carried out by the Student-Newman-Keuls (SNK) test when indicated. IC<sub>50</sub> values were calculated by nonlinear regression using sigmoidal dose-response with a variable slope equation.



A  $p < 0.05$  was considered to be significant. GraphPad Prism software v. 6.05 was used for all calculations.

## Results

### *Determination of phenolic compounds as chemical markers in Bauhinia variegata extracts*

Chemical markers are considered unique components that contribute to the therapeutic effects of an herbal medicine, including primary and secondary metabolites. In this context, phenolic compounds such as rutin, quercetin, ferulic acid and chlorogenic acid have been widely used as chemical markers in medicinal plants, been also involved in physiological processes as bioactive compounds (Li *et al.*, 2008). Thus, previous phytochemical studies in *Bauhinia variegata* extracts (Mishra *et al.*, 2013) reported the presence of terpenoids, phenolics, flavonoids, anthraquinones, saponins, tannins, and alkaloids. Within the possible bioactive compounds that can be determined in *Bauhinia* extracts, this work focused on the possible phenolic antioxidants extracted in a polar hydroethanolic extract obtained by maceration. Thus, the HPLC-DAD method with gradient elution was employed for screening of 12 phenolic compounds (Lima, 2012). Considering all investigated binary mixtures based of acetonitrile/water, methanol/water, or tetrahydrofuran/water, those containing 30:70 (v/v) acetonitrile/0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> adjusted to pH 4.0 was found to be the best eluent under isocratic conditions. Thus, using the optimized gradient elution conditions, a good compromise between peak resolution and chromatographic run time was achieved for all the remaining compounds eluting from the system. Supplemental Figure 1S shows the chromatogram obtained for the studied compounds using the gradient program of mobile-phase composition and flow rate.

The optimized method was validated using the aforementioned optimized separation conditions. The results obtained for linearity, LOD, LOQ, precision and accuracy are summarized in Supplemental Table 1S. The low relative standard deviation (RSD) obtained for all samples spiked with standards indicated good precision and repeatability for the method. The accuracy of the method ranging from 84 to 119% was acceptable, mainly considering the concentration levels in the measurements and matrix complexity. Chromatograms in Figure 1 show that among the phenolic compounds found in crude extracts of *Bauhinia variegata*, rutin (a

flavonoid) and ferulic acid (a hydroxycinnamic acid) were determined as major compounds in concentrations of  $10.84 \pm 1.1$  g kg<sup>-1</sup> for rutin and  $2.53 \pm 0.12$  g kg<sup>-1</sup> for ferulic acid.

#### *Effect of acute treatment with the Bauhinia variegata extract on the immobility time in the TST*

Fig. 2A shows the effect of increasing doses of *Bauhinia variegata* extract on the immobility time in the TST. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed that the extract (300 mg/kg) and fluoxetine (10 mg/kg, positive control) decreased the immobility time in the TST [ $F(4,28)=6.53$ ;  $P<0.05$ ].

Fig. 2B shows the time-course curve of the *Bauhinia variegata* extract (300 mg/kg, p.o.) in the TST. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed that the extract produced an antidepressant-like effect at 60 and 120 min, but not 240 min after administration extract [ $F(7,32)=4.84$ ;  $P<0.05$ ]. Considering these data, all subsequent experiments were performed using 60 min as the time interval between extract administration and behavioral testing.

#### *Effect of the sub-chronic administration of the extract of Bauhinia variegata on the immobility time in the TST and FST*

Fig. 3 shows the effect of the sub-chronic administration (once a day for 7 days) of *Bauhinia variegata* extract on the immobility time in the TST and FST. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed that the extract (100 and 300 mg/kg, p.o.) decreased the immobility time in the TST [ $F(3,28)=4.98$ ;  $P<0.05$ ; Fig. 3A). Moreover, the sub-chronic administration of the extract of *Bauhinia variegata* (300 mg/kg, p.o.) or fluoxetine (10 mg/kg, p.o., used as a positive control) also decreased the immobility time in the FST [ $F(3,24)=4.56$ ;  $P<0.05$ ; Fig. 3B).

#### *Investigation of the mechanisms underlying the antidepressant-like effect of the Bauhinia variegata extract in the TST*

##### *Involvement of the noradrenergic system*

Figs. 4A and 4B respectively show the effect of prazosin (1 mg/kg) and propranolol (2 mg/kg) on the antidepressant-like effect of *Bauhinia variegata* in the TST. Statistical analyses (two-way ANOVA) revealed significant antagonist versus

extract interactions for prazosin [ $F(1,21)=4.74$ ;  $P<0.05$ ] and for propranolol [ $F(1,20)=5.67$ ;  $P<0.05$ ] respectively, indicating that the two antagonists prevented the extract-induced decrease of immobility.

#### *Involvement of the dopaminergic system*

Figs. 5A and 5B respectively show the effect of SCH23390 (0.05 mg/kg) and sulpiride (50 mg/kg) on the antidepressant-like effect of *Bauhinia variegata* in the TST. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant antagonist versus extract interaction for SCH23390 [ $F(1,16)=4.79$ ;  $P<0.05$ ], and sulpiride [ $F(1,16)=6.49$ ;  $P<0.05$ ], indicating that the two antagonists prevented the extract-induced decrease of immobility.

#### *Interaction of the Bauhinia variegata extract with conventional antidepressants in the TST*

The potential synergistic effect of the administration of subeffective doses of antidepressants and subeffective doses of the extract was also investigated. Figs. 6A, 6B and 6C respectively show that a subeffective dose of *Bauhinia variegata* (100 mg/kg) potentiated the antidepressant-like effect of subeffective dose of fluoxetine (5 mg/kg), imipramine (5 mg/kg) or bupropion (5 mg/kg), evidenced by the significant antidepressant versus extract interaction in the two-way ANOVA for fluoxetine [ $F(1,24)=5.75$ ;  $P<0.05$ ], imipramine [ $F(1,24)=4.08$ ;  $P<0.05$ ] and bupropion [ $F(1,24)=4.32$ ;  $P<0.05$ ].

#### *Locomotor activity*

Neither *Bauhinia variegata* (30-300 mg/kg) extract nor any other drug used in the current study altered the locomotor activity in open field test (Supplemental Table 2S).

#### *MAO-A activity*

*Bauhinia variegata* extract inhibited brain MAO-A activity in a concentration-dependent manner [ $IC_{50}$  value for MAO-A inhibition of 241.5 (208.9 – 279.1)  $\mu\text{g/ml}$ , Fig. 7].

## Discussion

In this study we showed that the administration of a single dose of *Bauhinia variegata* hydroethanolic extract by gavage decreased the immobility response in the TST, 60 min after its administration. Moreover, the repeated administration (once a day, for 7 days) of *Bauhinia variegata* extract also decreased immobility in the TST and FST.

Behavioral tests have been developed and used for rapid screening of novel antidepressant-like drugs, such as the FST and the TST (Cryan *et al.*, 2005). These tests are based on the observation that mice, after initial escape-oriented movements, develop an immobile posture when placed in an inescapable situation. The antidepressant-like activity is usually expressed by the decrease of immobility time, an effect that is exhibited by conventional antidepressants (Bourin *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2014; Steru *et al.*, 1985). Therefore, the currently reported *Bauhinia variegata*-induced decrease of immobility in both behavioral tests suggests an antidepressant activity for this extract. Interestingly, the effect produced by the *Bauhinia variegata* extract (subchronic) was comparable to that induced by fluoxetine (10 mg/kg).

Among the phenolic compounds found in *Bauhinia variegata* extract, rutin and ferulic acid were determined as major components. Furthermore, the most relevant phenolic chemical/bioactive markers found in this work for *Bauhinia variegata* have also been identified as isolated flavonoids from the extract of *Schinus molle* and produces an anti-immobility effect in the TST (Machado *et al.*, 2008). Rutin has also been implicated in the antidepressant-like activity of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) (Wurglics & Schubert-Zsilavec, 2006). Therefore, it is possible that at least part of the antidepressant-like effect of *Bauhinia variegata* extract is due to the presence of rutin. Ferulic acid also has anti-immobility effect in the TST (Zeni *et al.*, 2012). Therefore, it is possible that at least part of the antidepressant-like effect of *Bauhinia variegata* extract is due to the presence of rutin and/or ferulic acid.

A remarkable finding of the current study is that  $\alpha_1$ ,  $\beta$ , D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> antagonists prevented the antidepressant-like effect of *Bauhinia variegata* in the TST. Monoaminergic systems have been considered important targets in the treatment of depression (Elhwuegi, 2004). Accordingly depressive symptoms are associated to impairment of monoaminergic function and decreased 5-HT, NE and DA (Belmaker & Agam, 2008). Antidepressants increase monoaminergic transmission and, by these

means, decrease depressive symptoms (Nemeroff & Owens, 2002; Nutt, 2006). In the present study, the pretreatment of mice with prazosin or propranolol blocked the antidepressant-like effect of *Bauhinia variegata*, suggesting the involvement of the noradrenergic system in the antidepressant-like effect of extract. The dopaminergic system has also been implicated in the regulation of mood (Dunlop & Nemeroff, 2007). Accordingly, D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor agonists, as well as drugs that increase dopamine function, have an antidepressant profile in patients and antidepressant-like effect in animal models of depression (Sato *et al.*, 2010). Moreover, dopamine receptors antagonists, such as SCH23390 and sulpiride, prevent the antidepressant-like effect of bupropion in FST (Yamada *et al.*, 2004). In the current study, the injection of SCH23390 or sulpiride also prevented the antidepressant-like effect of *Bauhinia variegata*, suggesting that the dopaminergic system is involved in the antidepressant-like effect of *Bauhinia variegata*. Interestingly, our study showed that the combination of a subeffective dose of fluoxetine, imipramine or bupropion with a subeffective dose of the extract produced a synergistic antidepressant-like effect in the TST, reinforcing the involvement monoaminergic system in the depression.

At last, the extract inhibited MAO-A activity in enriched mitochondrial fractions of mice brain, in a concentration-dependent manner. MAO-A uses a variety of amines as substrate, but preferentially degrades biogenic amines such as epinephrine, norepinephrine and serotonin. A study reported that MAO-A density was elevated throughout the brain on average by 34% in depressive patients compared to controls. Accordingly, MAO-A inhibitors have been successfully used as antidepressants (Meyer *et al.*, 2006). In fact, some herbal natural products that inhibit MAO-A activity (Viña *et al.*, 2012) such as *A. catechu* (IC<sub>50</sub> = 665 ± 65.1 µg/ml) (Dar and Khatoon, 2000), have antidepressant activity. Therefore, one might propose that the currently described inhibitory effect of *Bauhinia variegata* on MAO-A may underlie its antidepressant-like effect. In this context, if the extract inhibited MAO activity a general increase of monoaminergic activity would be expected, and the antidepressant-like effect of the extract should be sensitive to specific antagonists of these amines, as shown in this study. Although current evidence suggests a role for MAO-A in the antidepressant-like effect of the *Bauhinia variegata*, more studies are necessary to define whether MAO-A is a target *in vivo*, as well as the contribution of other putative mechanisms for this effect.

## Conclusion

*Bauhinia variegata* causes antidepressant-like effect in animal models predictive of antidepressant activity in humans, without altering locomotor activity. Antidepressant-like effect is dependent on its interaction with the serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems and may be mediated by inhibition of MAO-A activity.

## Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

## Acknowledgement

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (306468/2014-0). CFM, LMC and MAR are recipients of CNPq fellowships. APS and LT are recipients of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES fellowships. The authors specifically thank to the Research Program for the SUS (PPSUS) implemented by Decit/SCTIE/MS, through the CNPq, with support of FAPERGS and SES/RS.

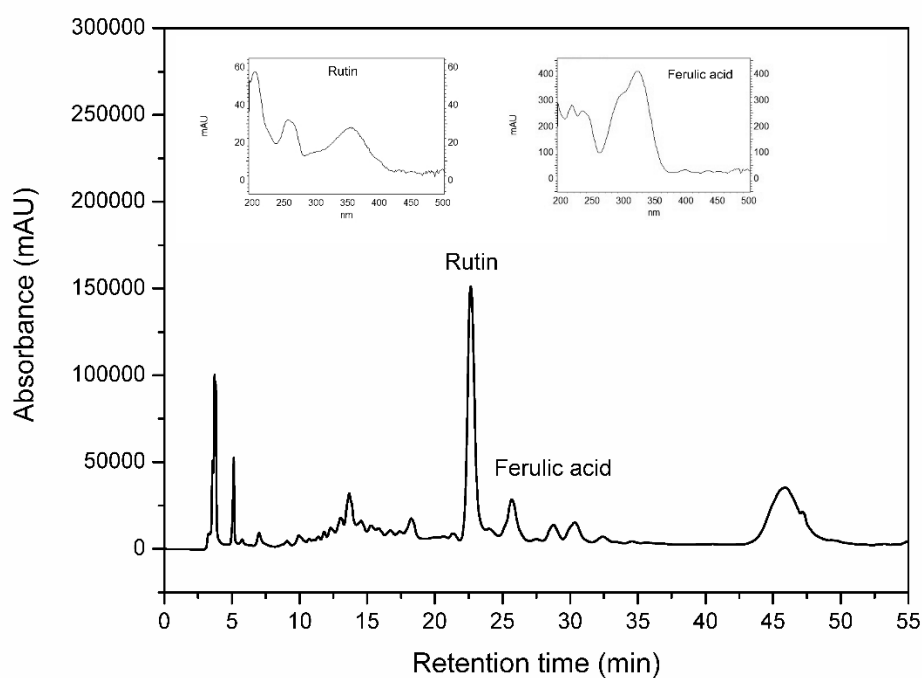
## References

- Belmaker, R.H., Agam G. 2008. Major depressive disorder. *New Engl J Med* 358, 55-68.
- Berton, O., Nestler, E.J. 2006 New approaches to antidepressant drug Discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 2, 137-151.
- Bourin, M., Chenu, F., Ripoll, N., David, D.J. 2005. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. *Behav Brain Res* 164, 266-269.
- Cryan, J.F., Mombereau, C., Vassout, A 2005. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 571-625.
- Dar, A., Khatoon, S. 2000. Behavioral and biochemical studies of dichloromethane fraction from the Areca catechu nut. *Pharmacol Biochem Behav* 65, 1-6.
- Dunlop, B.W., Nemeroff, C.B. 2007. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry* 64, 327-337.
- Elhwuegi, A.S. 2004. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28, 435-451.
- Eren, I., Erdi, O., Sahin, M. 2008. The effect of depression on quality of life of patients with type II diabetes mellitus. *Depress Anxiety* 25, 98-106.
- Guadarrama-Cruz, G., Alarcon, F.J., Lezama, R., Vazquez, G., Bonilla, H. 2008. Antidepressant-like effects of *Tagetes lucida* Cav. in the forced swimming test. *J Ethnopharmacol* 120, 277-281.

- Kemp, A.H., Gordon, E., Rush, A.J., Williams, L.M. 2008. Improving the prediction of treatment response in depression: integration of clinical, cognitive, psychophysiological, neuroimaging, and genetic measures *CNS Spectr* 12, 1066-1086.
- Kessler., R.C. 2012. The costs of depression. *Psychiatr Clin North Am* 35, 1-14.
- Kumar, P., Baraiya, S., Gaidhani, S.N., Gupta, M.D., Wanjari, M.M. 2012. Antidiabetic activity of stem bark of *Bauhinia variegata* in alloxan-induced hyperglycemic rats. *J Pharmacol Pharmacother* 3, 64-66.
- Li, S., Han, Q., Qiao, C., Song, J., Cheng, C. L., Xu, H. 2008. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese Med* 3, 1-7.
- Lima, F.O. 2012 Comparative study of the bioactivity of phenolic compounds in medicinal plants (PhD thesis), Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.
- Machado, D.G., Bettio, L.E., Cunha, M.P., Santos, A.R., Pizzolatti, M.G., Brighente, I.M., Rodrigues, A.L. 2008. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Eur J Pharmacol* 587, 163-168.
- Meyer, J.H., Ginovart, N., Boovariwala, A., Sagrati, S., Hussey, D., Garcia, A., Young, T., Praschak-Rieder, N., Wilson, A.A., Houle, S. 2006. Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63, 1209-1216.
- Mishra, A., Sharma, A.K., Kumar, S., Saxena, A.K., Pandey, A.K. 2013. *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. *Biomed Res Int* 2013, 1-10.
- Nemeroff, C.B., Owens, M.J. 2002. Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci* 5, 1068-1070.
- Nutt, D.J. 2006. The role of dopamine and norepinephrine in depression and antidepressant treatment. *J Clin Psychiatry* 67, 3-8.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M. 1977. Depression: a new model sensitive to antidepressant treatment. *Nature* 266, 730-732.
- Prabhakar, P.K., Kumar, A., Doble M. 2014. Combination Therapy: A new strategy to manage diabetes and its complications. *Phytomedicine* 21, 123-130.
- Raj Kapoor, B., Jayakar, B., Murgeshand, N., Aktijsekaran, D. 2006. Chemoprevention and cytotoxic effect of *Bauhinia variegata* against N-nitrosodiethylamine induced liver tumors and human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 104, 407-409.
- Reis, J.S.S., Oliveira, G.B., Monteiro, M.C., Machado, C.S., Torres, Y.R., Prediger, R.D., Maia, C.S.F. 2014. Antidepressant- and anxiolytic-like activities of an oil extract of propolis in rats. *Phytomedicine* 21, 1466-1472.
- Sato, A., Nakagawasai, O., Tan-No, K., Onogi, H., Nijima, F., Tadano, T. 2010. Influence of olfactory bulbectomy on maternal behavior and dopaminergic function in nucleus accumbens in mice. *Behav Brain Res* 215, 141-145.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P. 1985. The tail Suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacol* 83, 367-370.
- Villarinho, J.G., Fachinetto, R., Pinheiro, F.V., Sant'Anna, G.S., Machado, P., Dombrowski, P.A., da Cunha, C., de Almeida Cabrini, D., Martins, M.A., Bonacorso, H., Zanatta, N., Rubin, M., Ferreira, J. 2012. Antidepressant-like effect of the novel MAO inhibitor 2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-4,5-dihydro-1H-

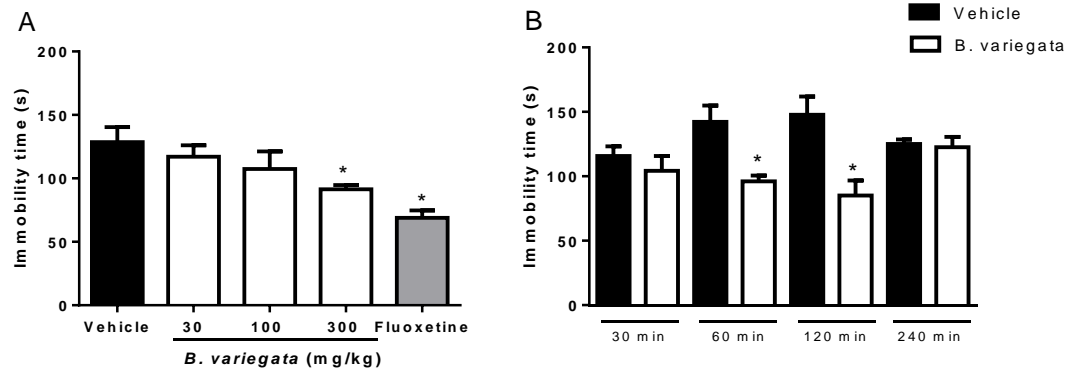
- imidazole (2-DMPI) in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 39, 31-39.
- Viña, D., Serra, S., Lamela, M., Delogu, G. 2012. Herbal natural products as a source of monoamine oxidase inhibitors: a review. *Curr Top Med Chem* 12, 2131-2144.
- Zeni, A.L., Zomkowski, A.D., Maraschin, M., Rodrigues, A.L., Tasca, C.I. 2012. Ferulic acid exerts antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for the involvement of the serotonergic system. *Eur J Pharmacol* 679, 68-74.
- Wurglics, M., Schubert-Zsilavec, M. 2006. *Hypericum perforatum*: a 'modern' herbal antidepressant: pharmacokinetics of active ingredients. *Clin Pharmacokinet* 45, 449-468.
- Yamada, J., Sugimoto, Y., Yamada, S. 2004. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol* 504, 207-211.

## Figures and legends

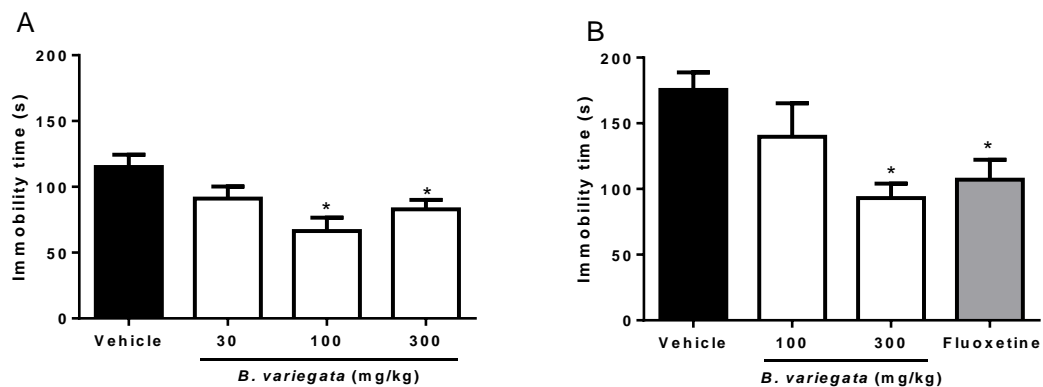


**Fig. 1.** Chromatogram obtained from hydroethanolic extract of *Bauhinia variegata*.

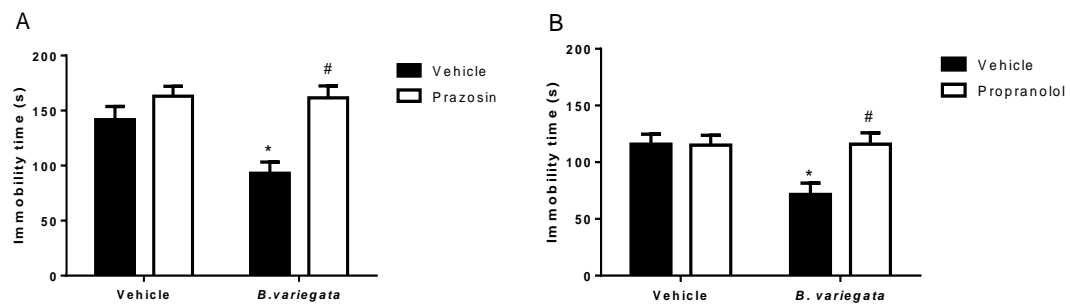




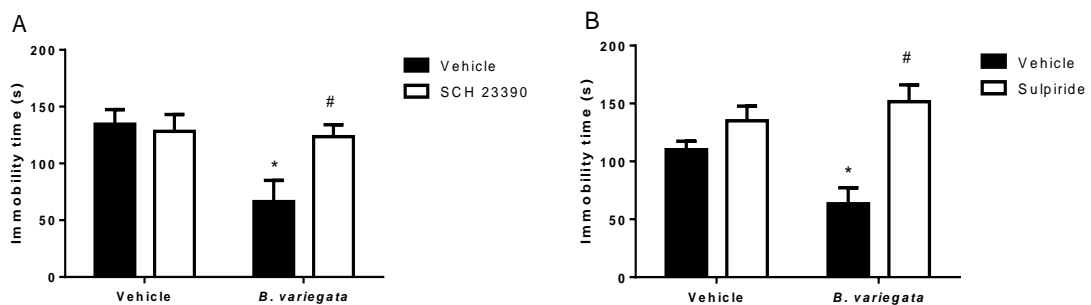
**Fig. 2.** Antidepressant-like effect of the extract of *Bauhinia variegata* (30-300 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) administered 60 min before the TST (A) and time course of the antidepressant-like effect of the extract of *Bauhinia variegata* (300 mg/kg, p.o., B). Each column represents the mean + S.E.M. (n=5-7). \* $p < 0.05$  compared with respective vehicle-group.



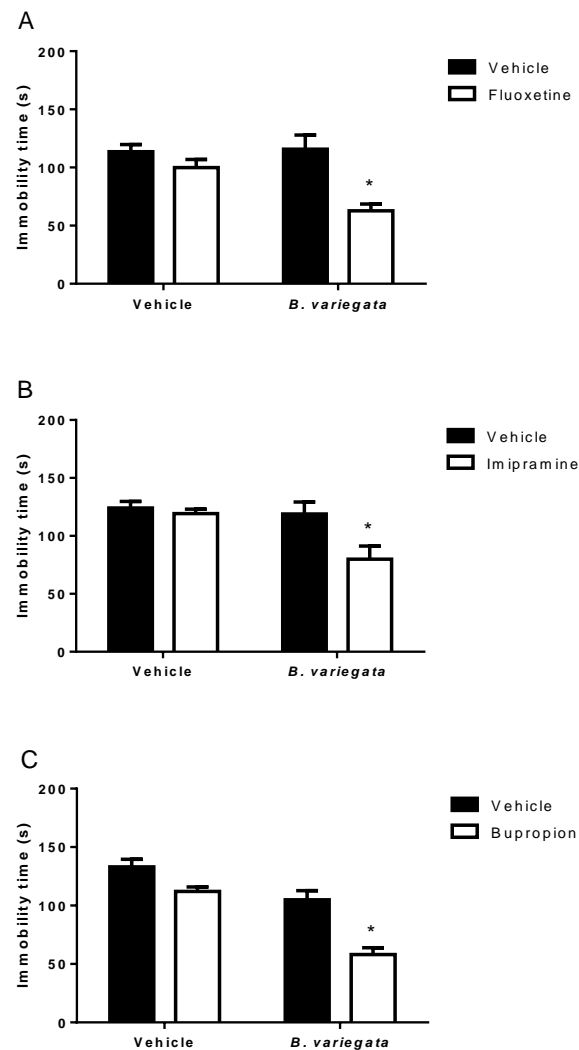
**Fig. 3.** Effect of the sub-chronic administration of the extract of *Bauhinia variegata* or fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) once a day for 7 days, with the last administration 60 min before the TST (A) or FST (B) in mice. Each column represents the mean + S.E.M (n=7-8). \* $p < 0.05$  compared with vehicle-group.



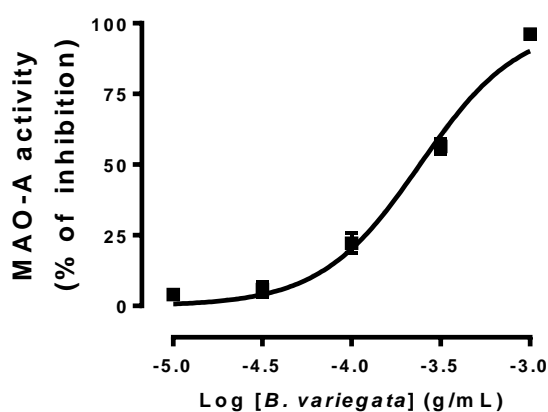
**Fig. 4.** Effect of pretreatment with prazosin (1 mg/kg, i.p., A) or propranolol (2 mg/kg, i.p., B) on the effect of the extract of *Bauhinia variegata* (300 mg/kg, p.o.) in the TST. Vehicle or antagonists were administered 30 min before the extract. The animals were tested 60 min after the administration of the extract. Each column represents the mean + S.E.M. (n=6-7). \* $p < 0.05$  compared with vehicle-group. # $p < 0.05$  compared with vehicle-*Bauhinia variegata* group.



**Fig. 5.** Effect of pretreatment with SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c., A) or sulpiride (50 mg/kg, i.p., B) on the effect of the extract of *Bauhinia variegata* (300 mg/kg, p.o.) in the TST. The antagonists or vehicle were administered 30 min before vehicle or extract. The animals were tested 60 min after the administration of the extract. Each column represents the mean + S.E.M. (n=5). \* $p < 0.05$  compared with vehicle-group. # $p < 0.05$  compared with vehicle-*Bauhinia variegata* group.

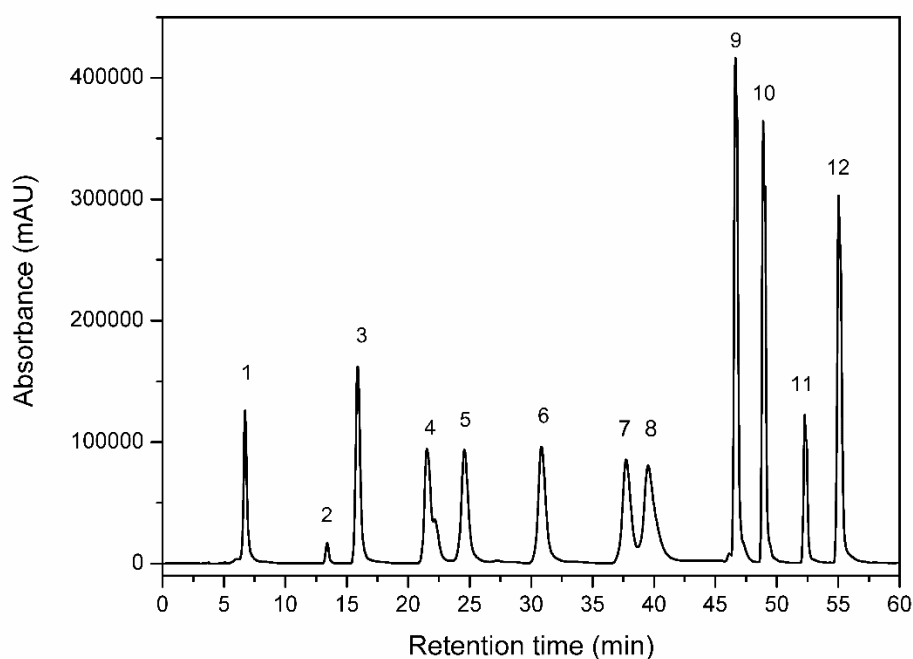


**Fig. 6.** Effect of the administration of a subeffective dose of the *Bauhinia variegata* (100 mg/kg, p.o.) and subeffective doses of fluoxetine (5 mg/kg, p.o., A), imipramine (5 mg/kg, p.o., B) and bupropion (5 mg/kg, p.o., C) in the TST. Mice received vehicle or antidepressants and immediately after, received vehicle or extract. The animals were tested 60 min after the administration of the extract. Each column represents the mean + S.E.M. (n=7). \* $p < 0.05$  compared with respective vehicle-group.



**Fig. 7.** *Bauhinia variegata* inhibits brain MAO-A activity *in vitro*. Values are means  $\pm$  S.E.M. of three experiments performed in duplicate.

### Supplementary data



**Supplemental Figure 1S.** Chromatogram obtained from a standard 25 mg L<sup>-1</sup> mixture of (1) gallic acid; (2) (+)-catechin; (3) caffeic acid; (4) rutin; (5) ferulic acid; (6) quercitrin; (7) myricetin; (8) fisetin; (9) quercetin; (10) kaempferol; (11) chrysin; (12) flavone. Conditions: mobile phase phosphoric acid 0.1% (A) and acetonitrile (B); Gradient elution as described in experimental section.

**Supplemental Table 1S.** Validation results for phenolic compounds by the optimized HPLC-DAD method ( $n = 3$ ).

Phenolic compound	Slope	Intercept	r	Linear range (mg L <sup>-1</sup> )	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	Intraday precision (%)	Interday precision (%)	Recovery (%)
Caffeic acid	152574.7	193635.8	0.9997	1.0 – 100.0	0.03	0.11	0.8	2.3	103.4 ± 2.3
Catechin	310444.2	1327323.2	0.9997	2.5 – 100.0	0.06	0.19	1.2	3.5	83.8 ± 3.5
Chrysin	120028.8	147269.4	0.9995	0.5 – 100.0	0.05	0.16	1.0	3.1	93.0 ± 3.0
Ferulic acid	138585.8	9784.2	0.9997	1.0 – 100.0	0.04	0.12	0.5	1.6	97.6 ± 1.6
Fisetin	109117.3	-205570.6	0.9932	2.5 – 100.0	0.01	0.05	1.1	3.2	118.9 ± 3.2
Flavone	105395.2	82608.0	0.9997	0.5 – 100.0	0.36	1.20	0.7	2.1	97.2 ± 2.1
Gallic acid	87813.0	-41399.7	0.9990	0.5 – 100.0	0.03	0.10	0.6	1.9	104.7 ± 1.9
Kaempferol	99103.3	49705.8	0.9997	0.5 – 100.0	0.02	0.08	0.8	2.5	99.9 ± 2.5
Myricetin	72266.8	-242820.9	0.9976	2.5 – 100.0	0.03	0.09	1.4	4.2	91.8 ± 4.2
Quercetin	92000.7	40350.2	0.9997	0.5 – 100.0	0.04	0.14	0.5	1.6	93.9 ± 1.5
Quercitrin	61704.6	-94405.9	0.9984	1.0 – 100.0	0.02	0.08	1.2	3.7	94.6 ± 3.7
Rutin	46117.1	-15484.3	0.9996	0.5 – 100.0	0.05	0.16	0.9	2.8	88.2 ± 2.7

**Supplemental Table 2S.** Effect of treatments on locomotor activity in open field test

<b>Treatment (mg/kg)</b>	<b>Number of crossing</b>
Vehicle	59.0 ± 5.6
<i>B. variegata</i> (30)	60.0 ± 8.1
<i>B. variegata</i> (100)	62.0 ± 14.5
<i>B. variegata</i> (300)	78.4 ± 14.2
Fluoxetine	54.1 ± 7.1
Prazosin + vehicle	46.8 ± 8.2
Propranolol + vehicle	44.6 ± 5.5
SCH23390 + vehicle	41.4 ± 8.1
Sulpiride + vehicle	34.2 ± 7.9
Prazosin + <i>B. variegata</i> (300)	44.6 ± 7.7
Propranolol + <i>B. variegata</i> (300)	48.1 ± 5.0
SCH23390 + <i>B. variegata</i> (300)	36.0 ± 4.1
Sulpiride + <i>B. variegata</i> (300)	51.8 ± 5.3
Fluoxetine + vehicle	37.7 ± 7.1
Imipramine + vehicle	62.2 ± 8.6
Bupropion + vehicle	39.0 ± 5.0
Fluoxetine + <i>B. variegata</i> (100)	30.1 ± 5.9
Imipramine + <i>B. variegata</i> (100)	59.8 ± 7.8
Bupropion + <i>B. variegata</i> (100)	38.5 ± 4.9

The values are mean ± SEM of 5-10 animals in each group.

## 4. CONCLUSÕES

---

## 4. CONCLUSÕES

### 4.1. CONCLUSÕES PARCIAIS

Com os resultados do presente estudo podemos concluir que:

4.1.1. O extrato bruto hidroetanólico de folhas de *Bauhinia variegata* apresentou um efeito tipo-antidepressivo em camundongos no teste de suspensão pela cauda e no teste do nado forçado. O efeito foi verificado após a administração aguda e sub-crônica do extrato;

4.1.2. O efeito tipo-antidepressivo do extrato de *Bauhinia variegata* envolve os sistemas noradrenérgico e dopaminérgico, visto que antagonistas destes sistemas preveniram o efeito tipo-antidepressivo apresentado pelo extrato de *Bauhinia variegata*;

4.1.3. A administração de dose sub-efetiva do extrato de *Bauhinia variegata* em combinação com dose sub-efetiva de antidepressivos clássicos, apresentou efeito sinérgico, isto é, apresentou efeito tipo-antidepressivo;

4.1.4. O extrato de *Bauhinia variegata* inibiu a atividade da MAO-A *in vitro*.

4.1.5. O efeito tipo antidepressivo do extrato de *Bauhinia variegata* não está associado a nenhum efeito motor, uma vez que as doses administradas não afetaram a atividade locomotora dos animais.

### 4.2. CONCLUSÃO GERAL

Com os resultados do presente estudo concluímos que o extrato hidroetanólico de folhas de *Bauhinia variegata* apresentou efeito tipo-antidepressivo com envolvimento do sistema noradrenérgico e dopaminérgico.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, A.S. et al. The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of diferente fractions of four South African Bauhinia species used traditionally to treat diarrhoea. **J Ethnopharmacol** 143: 826-839, 2012.
- Albagli, S. Amazônia: Fronteira geopolítica da biodiversidade. **Parcerias estratégicas** 12: 5-19, 2001.
- American Psychiatric Association. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders** (5th ed.). Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013.
- Aquino, T. M. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Recife. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ETNOBIOLOGIA E ETNOECOLOGIA, Recife, 96, 2002.
- Bear, M. F.; Connors, B. W.; Paradiso, M. A. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 3. Ed. Artmed Editora, Porto Alegre, 2008.
- Berton, O.; Nestler, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat rev Neurosci** 7: 137-151, 2006.
- Belmaker, R.H.; Agam, G. Mechanisms of disease: major depressive disorder. **N Engl J Med** 358: 55-68, 2008.
- Bodakhe, S.H.; Ram, A. Hepatoprotective properties of Bauhinia variegata bark extract. **Yakugaku Zasshi**. 127: 1503-1507, 2007.
- Bourin, M. et al. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behav Brain Res** 164: 266-269, 2005.
- Brasileiro, B.G. et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no "Programa de Saúde da Família", Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 44: 629-636, 2008.
- Carlson, G.A.; Kashani, J.H. What is new in bipolar disorder and major depressive disorder in children and adolescents. **Child Adolesc Psychiatr Clin N Am** 11: 15-22, 2002.

- Carpenter, L.L. et al. Effect of vagus nerve stimulation on cerebrospinal fluid monoamine metabolites, norepinephrine, and gamma-aminobutyric acid concentrations in depressed patients. **Biol Psychiatry** 56: 418-426, 2004.
- Carvalho, M.C.G. et al. Evidências para o uso de Indigo naturalis no tratamento da psoríase tipo placa: uma revisão sistemática. **Natureza on line** 8: 127-131, 2010.
- Colla, A.R. et al. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. **J Ethnopharmacol** 143: 720-731, 2012.
- Correa, A.D. et al. Plantas Mediciniais: Do cultivo à terapia – 2. ed. Editora Vozes, Petrópolis, 1998.
- Cryan, J.F. et al. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci** 23: 238–245, 2002.
- Cryan, J.F. et al. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci Biobehav Rev** 29: 571-625, 2005.
- Dawson, T. M. New animal models for Parkinson's disease. **Cell** 101: 115-118, 2000.
- Drzyzga, L.R.; Marcinowska A.; Obuchowicz, E. Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies. **Brain Res Bull** 79: 248-257, 2009.
- Dura-Vila, G. et al. Depression and the medicalization of sadness: conceptualization and recommended help-seeking. **The Int J Soc Psychiatry** 59: 165-175, 2013.
- Elhwuegi, A.S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 28: 435-451, 2004.
- Fava, M.; Kendler, K.S. Major Depressive Disorder. **Neuron** 28: 335–341, 2000.
- Ferreira, V.F.; Pintol, A.C. A fitoterapia no mundo atual. **Quím Nova** 33: 9, 2010.

- Fitzgerald, P.B. et al. Transcranial magnetic stimulation in the treatment of depression: a double-blind, placebo controlled trial. **Arch Gen Psychiatry** 60: 1002-1008, 2003.
- Freitas, A.E. et al. Antidepressant-like action of the ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 34: 335-343, 2010.
- Ghaisas, M.M. et al. Evaluation of immunomodulatory activity of methanolic extract of stem bark of *Bauhinia variegata* Linn. **Int J Green Pharm** 3: 70–74, 2009.
- Holtzheimer, P. E.; Mayberg, H. S. Deep brain stimulation for psychiatric disorders. **Annu Rev Neurosci** 34: 289–307, 2011.
- Jan, S. et al., Herbal remedies used for gastrointestinal disorders in Kaghan valley, NWFP, Pakistan, **Pakistan J Weed Sci Res** 14: 169–200, 2008.
- Kessler, R.C. The costs of depression. **Psychiatr Clin North Am** 35, 1-14, 2012.
- Kiss, P.J. Theory of active antidepressants: a nonsynaptic approach to the treatment of depression. **Neurochem Int** 52: 34-9; 2008.
- Kumar, R. et al. Antidiabetic activity of stem bark of *Bauhinia variegata* in alloxan-induced hyperglycemic rats. **J Pharmacol Pharmacother** 3: 64-66, 2012.
- Lépine, J.P.; Briley, M. The increasing burden of depression. **Neuropsychiatr Dis Treat.** 7: 3-7, 2011.
- Levinstein, M.R.; Samuels, B.A. Mechanisms underlying the antidepressant response and treatment resistance. **Front Behav Neurosci** 8: 208, 2014.
- Machado, D.G. et al. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **Eur J Pharmacol** 587: 163-168, 2008.
- Machado, D.G. et al. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 33: 642-650, 2009.

- Manji, H.K. et al. The cellular neurobiology of depression. **Nat Med** 7: 541-547, 2001.
- McGarry, H. et al. General practitioners and St. John's Wort: a question of regulation or knowledge? **Complement Ther Med** 15: 142–148, 2007.
- Mishra, A. et al. Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidante and anticâncer activities. **Biomed Res Int** 1-10, 2013.
- Nemeroff, C.B.; Owens, M.J. Treatment of mood disorders. **Nat Neurosci** 5: 1068-1070, 2002.
- Nemeroff, C. B. The burden of severe depression: A review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **J Psychiatr Res** 41: 189-206, 2007.
- Nestler, E.J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, 34: 13-25, 2002.
- Nestler, E.J.,; Carlezon, W.A. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol Psychiatry**. 59: 1151-1159, 2006.
- Nogueira, A. C. O.; Sabino, C. V. S. **Revista Fitos**, 7, Cap.77, 2012.
- Paez-Pereda, M. New drug targets in the signaling pathways activated by antidepressants. **Progress Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr** 29: 1010–1016, 2005.
- Parekh, J.; Chandra, S. Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. **Afr J Biom Res** 10: 175–181, 2007.
- Porsolt, R.D. et al. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nat** 266: 730-732, 1977.
- Raj Kapoor, B. et al. Cytotoxic activity of a flavanone from the stem of Bauhinia variegata linn. **Nat Prod Res** 23: 1384–1389, 2009.
- Raj Kapoor, B. et al. Chemoprevention and cytotoxic effect of Bauhinia variegata against N-nitrosodiethylamine induced liver tumors and human cancer cell lines. **J Ethnopharmacol** 104: 407-409, 2006.

Rang H.P.; Dale, M.M. Farmacologia. Rio de Janeiro: Elsevier 2007.

Rao, Y.K. et al. Antiinflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*, **Phytother Res** 22: 957–962, 2008.

Rezende, H.A.; Cocco, M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Rev Esc Enferm** 36: 282-288, 2002.

Rush, A.J. et al. Vagus nerve stimulation for treatment-resistant depression: a randomized, controlled acute phase trial. **Biol Psychiatry** 58: 347-354, 2005.

Sakakibara, H. et al. Antidepressant effect of extracts from *Ginkgo biloba* leaves in behavioral models. **Biol Pharm Bull** 29: 1767–1770, 2006.

Samuels, B. A et al., Modeling treatment-resistant depression. **Neuropharmacol** 61: 408–413, 2011.

Silva, K.L.; Filho, V.C. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Quím Nova** 25: 3, 2002.

Silva, P. Farmacologia. 7. ed. Guanabara Koogan, 2006.

Simões, C.M.O. et al. Farmacognosia – Da planta ao Medicamento. 1. ed., Ed. da UFSC, 308-310, 1999.

Soares, P.K.; Scarminio, I.S. Multivariate chromatographic finger print preparation and authentication of plant material from the genus *Bauhinia*. **Phytochem Anal** 119: 78–85, 2008.

Steru, L. et al. The tail Suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacol** 83: 367-370, 1985.

Suslow, T. Automatic mood-congruent amygdala responses to masked facial expressions in major depression. **Biol Psychiatry** 67: 155-160, 2010.

- Tachil, A.F. et al., The evidence base of complementary and alternative therapies in depression. **J Affect Disord** 97, 23–35, 2007.
- Taylor, C. et al. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. **Cell Signal** 17: 549–557, 2005.
- Taylor, S.; Stein, M.B. The future of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in psychiatric treatment. **Med Hypotheses** 66: 14–21, 2005.
- Vaz, A. M. S. F. Taxonomia de Bauhinia sect. Pauletia (Leguminosae-aesalpinioideae: Cercideae) no Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 315p., 2001.
- Vaz, A. M. S. F.; Tozzi, A. M. G. A. Sinopse de Bauhinia sect. Pauletia (Cav.) DC. (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 28: 477-449, 2005.
- Vaz, A. M. S. F. *Bauhinia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010.
- Veiga Junior, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18: 308-313, 2008.
- Zhang, Z. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. **Life Sci** 75: 1659–1699, 2004.
- Zheng, M. et al. Antidepressant-like effect of flavonoids extracted from *Apocynum venetum* leaves on brain monoamine levels and dopaminergic system. **J Ethnopharmacol** 147: 108-113, 2013.
- Wang, R. et al. The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors. **Eur J Pharmacol** 578: 43–50, 2008.
- Wassermann, E.M.; LISANBY, S.H. Therapeutic application of repetitive transcranial magnetic stimulation: a review. **Clin Neurophysiol** 112: 1367-1377, 2001.

Wingen, G.A. et al. Neural state and trait bases of mood-incongruent memory formation and retrieval in first-episode major depression. **J Psychiatr Res** 44: 527-534, 2010.

Wong, M.L.; Licinio, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci** 2: 343–351, 2001.