

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Obtenção de frações de valepotriatos através de fluido supercrítico e triagem
psicofarmacológica de *Valeriana glechomifolia* Meyer**

Luisa de Andrade Salles

PORTO ALEGRE, janeiro de 2010.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Obtenção de frações de valepotriatos através de fluido supercrítico e triagem
psicofarmacológica de *Valeriana glechomifolia* Meyer**

Tese de Doutorado apresentada por
Luisa de Andrade Salles visando a
obtenção do título de Doutor em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser

Co-orientador: Profa. Dra. Stela Maris Kuze Rates

PORTO ALEGRE, janeiro de 2010.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 18.01.10, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Angela Terezinha de Souza Wyse
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

S168o Salles, Luisa de Andrade
Obtenção de frações de valepotriatos através de fluido supercrítico e triagem psicofarmacológica de *Valeriana glechomifolia* Meyer. – Porto Alegre : UFRGS, 2010. – xiii, 109 p. : il.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Valeriana. 2. Valerianaceae. 3. Valepotriatos. I. von Poser, Gilsane Lino. II. Rates, Stela Maris Kuze. III. Título.

CDU: V547.9:582.975

Bibliotecária responsável:
Heloísa do Canto Canabarro – CRB 10/1036

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Farmacognosia e Psicofarmacologia da Faculdade da Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação das prof.(as) Dras. Gilsane Lino von Poser e Stela Maris Kuze Rates, e com colaboração dos Laboratórios de Farmacologia Bioquímica e Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob supervisão dos professores Drs. François Noel e Luís Eduardo Quintas, e do Laboratório de Operações Unitárias da Faculdade de Engenharia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob supervisão do professor Dr. Eduardo Cassel.

Apoio financeiro: bolsista CAPES

AGRADECIMENTOS

A Deus, pai e amigo de todas as horas.

As orientadoras, professoras Dras. Gilsane Lino von Poser e Stela Maris Kuze Rates, pelo respeito, oportunidade, confiança, orientação, apoio e incentivo.

Aos professores Drs. François Noel e Luís Quintas, do Laboratório de Farmacologia e Bioquímica Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela oportunidade de estágio e pela colaboração nos experimentos de radioligação e avaliação da atividade enzimática.

Ao professor Dr. Eduardo Cassel, do Laboratório de Operações Unitárias da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de trabalhar com o processo de extração por fluido supercrítico.

A professora Dra. Teresa Dalla Costa pela utilização do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência.

A Faculdade de Farmácia (UFRGS) e ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela estrutura física e burocrática.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia: Raquel, Jaqueline e Satchie por terem aguentado a mim e ao “perfume” de nosso material de trabalho. A Simone por ter me apresentado o “mundo do fluido supercrítico”; a Jéssica, incansável em ajudar; a Flávia, Gabriela, Eduardo, Damiana e Maikon pela agradável convivência, conversas e gargalhadas.

Aos colegas do Laboratório de Psicofarmacologia: Andresa, Gilda, Mariana, Thiago, Camila, Ana Cristina, Eveline, Fernanda, Andressa parceiros nos treinamentos, nos experimentos em finais de semana, nas reclamações, nas risadas, no café, no apoio moral.

A minha família: pais, irmãs, cunhados, sobrinhos, sogros, pelo apoio incondicional, pelas demonstrações de carinho e por serem uma base sólida na qual todos podemos nos firmar. Amo vocês.

Ao Leomar que me conheceu quando eu estava fazendo mestrado e mesmo assim me apoiou a fazer o doutorado. “Que loucura”. Obrigada por toda a atenção, paciência, dedicação, tranquilidade, respeito e amor.

**O grande destino do homem
é remover os escombros
criados pelo ódio e partir de
novo, no vento da liberdade
para frente e para cima.
Que venham os tiranos que
os prendam e torturem
que caia dos céus bolas de
fogo e ele levanta-se roto e
ensanguentado e com a força
que lhe dá a vida parte uma vez
mais em direção da liberdade.**

Vinícius de Moraes

RESUMO

Espécies do gênero *Valeriana* são tradicionalmente utilizadas para tratar ansiedade, irritabilidade e distúrbios de sono. A Organização Mundial da Saúde indica o uso de preparações farmacêuticas como alternativa aos benzodiazepínicos para tratamento da ansiedade e insônia. Entre as substâncias ativas presentes no gênero *Valeriana* destacam-se os óleos voláteis, valepotriatos, flavonóides e lignanas. Entretanto, estudos farmacológicos com produtos isolados são escassos. Espécies nativas de *Valeriana*, que ocorrem no Rio Grande do Sul, têm sido estudadas em relação a sua composição química, sendo a espécie *Valeriana glechomifolia* a que possui maior teor de valepotriatos. Neste estudo, diferentes métodos de extração de valepotriatos foram comparados e extratos enriquecidos em valepotriatos foram testados em modelos animais de sedação, ansiedade e depressão. Valepotriatos isolados foram submetidos a ensaios de ligação a receptores benzodiazepínico e serotoninérgico (5HT_{1A}) e ensaios de atividade da enzima Na⁺K⁺ATPase. A extração por fluido supercrítico com dióxido de carbono (SCCO₂) foi realizada em temperatura constante de 40 °C e pressões variáveis (90, 120, 150 e 200 bar) e demonstrou maior teor de valepotriatos que os métodos de extração por maceração em ultrassom e maceração. Entre as diferentes pressões de extração utilizadas no método de SCCO₂, o maior teor de valepotriatos foi apresentado pela fração obtida na pressão de 90 bar. Todos os extratos mostraram o mesmo perfil qualitativo de valepotriatos. Flavonóides também foram obtidos através de maceração por ultrassom em metanol. A dose letal mediana dos valepotriatos obtidos por maceração por ultrassom foi de 42±3 mg/kg, i.p. Esta mesma solução extrativa, na dose de 10 mg/kg, v.o. (gavage), foi inefetiva no labirinto em cruz elevado e tempo de sono barbitúrico, sugerindo a ausência de propriedades ansiolíticas e hipnótico-sedativas. Resultados similares foram obtidos com a solução extrativa enriquecida em flavonóides. Valtrato, acevaltrato, 1-β-acevaltrato, diavaltrato e o flavonóide codificado como B6 não apresentaram ligação ao sítio benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A, nem ao receptor serotoninérgico (5HT_{1A})

na faixa de concentração de 1-100 μM . Os valepotriatos inibiram a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ na faixa de concentração micromolar. A fração de valepotriatos obtida por SCCO_2 (10 mg/kg, gavage) foi efetiva no teste da natação forçada, sem interferir na atividade locomotora espontânea, sugerindo uma atividade do tipo antidepressiva. Em conclusão, a extração por fluido supercrítico com dióxido de carbono mostrou-se eficiente para a obtenção de frações enriquecidas em valepotriatos e estas substâncias representam uma nova classe química com atividade inibitória não seletiva da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, e com atividade do tipo antidepressiva.

Palavras chaves: *Valeriana*, valepotriatos, sedativo, ansiolítico, antidepressivo, $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$.

ABSTRACT

Species of the genus *Valeriana* are traditionally used to treat anxiety, irritability and sleep disorders. The World Health Organization indicates pharmaceutical preparations of *V. officinalis* as an alternative to benzodiazepine drugs for treating anxiety and insomnia. Volatile oil, valepotriates, flavonoids and lignan have been suggested as active substances of the *Valeriana* genus. However pharmacological studies on isolated compounds are scarce. Species of *Valeriana* native to Rio Grande do Sul have been studied regarding their chemical composition being *Valeriana glechomifolia* the species with highest valepotriate' contents. In this study different methods of extraction of valepotriates from aerial parts of *V. glechomifolia* were compared, and valepotriate' enriched extracts were tested in mice models of sedation, anxiety and depression. Isolated valepotriates were submitted to binding to benzodiazepine and 5HT_{1A} receptors, and assayed for the Na⁺K⁺ATPase inhibitory activity. The extraction by supercritical carbon dioxide (SCCO₂) was carried out at 40 °C under 90, 120, 150 or 200 bar affording higher valepotriates contents than maceration with dichloromethane and ultrasound. The highest valepotriates yielding was obtained with SCCO₂ (40 °C , 90 bar). All extracts presented the same qualitative valepotriate' profile. Flavonoids were also obtained from methanol extracts. The median lethal dose of valepotriates obtained by maceration was determined as 42±3 mg/kg, i.p. This valepotriate' enriched extract (10 mg/kg, p.o., gavage) was ineffective in the elevated plus maze and barbiturate sleeping time tests suggesting that it does not present anxiolytic or hypnotic-sedative properties. Similar results were obtained with flavonoids' enriched extract. Valtrate, acevaltrate, 1-β-acevaltrate, diavaltrate and the flavonoid named B6 did not bind to benzodiazepine site of receptor GABA_A complex neither to serotonergic receptor (5HT_{1A}) at 1-100 μM. The valepotriates inhibited the Na⁺K⁺ATPase activity at micromolar concentration range. The valepotriates fraction obtained by SCCO₂ (10 mg/kg, gavage) was effective in the forced swimming test without interfering with the spontaneous locomotor activity suggesting that it presents an antidepressant-like activity. In conclusion the extraction by supercritical carbon dioxide is

valuable to obtain valepotriates enriched fractions; and valepotriates seem to represent new chemical entities with no selective inhibitory activity of Na⁺K⁺ATPase, as well as with antidepressant-like activity.

Keyword: *Valeriana*, valepotriates, sedative, anxiolytic, antidepressant, Na⁺K⁺ATPase.

LISTA DE FIGURAS

3.1	Rotas biossintéticas para iridóides.....	10
4.1	Esquema do procedimento de extração e isolamento de valepotriatos.....	43
4.2	Esquema de extração dos flavonóides.....	45
4.3	Esquema do procedimento de isolamento de flavonóides.....	46
4.4	Esquema do extrator.....	47
4.5	Esquema da preparação de membranas sinaptossomais de córtex de rato (receptor benzodiazepínico).....	51
4.6	Esquema da preparação das membranas sinaptossomais de hipocampo de rato (receptor 5HT _{1A}).....	53
4.7	Esquema empregado para avaliação do efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado.....	57
4.8	Esquema empregado para avaliação do efeito sobre o tempo de sono barbitúrico.....	58
4.9	Esquema empregado para avaliação da atividade antidepressiva no teste da natação forçada.....	59
4.10	Esquema empregado para avaliação da atividade locomotora espontânea....	60
5.1	A: curva padrão valtrato; B: curva padrão acevaltrato; C: curva padrão 1-β-acevaltrato.....	64
5.2	Perfil de extração dos valepotriatos no tempo de 40 minutos.....	66
5.3	Teor de cada valepotriato nas quatro pressões de extração.....	67
5.4	Teor de cada valepotriato nas quatro pressões de extração.....	68
5.5	Comparação entre os rendimentos em valepotriatos extraídos pelos métodos de maceração, maceração em ultrassom e fluido supercrítico.....	70
5.6	Curvas de inibição da enzima Na ⁺ K ⁺ ATPase presente em homogenatos de rim e hemisférios cerebrais de rato pelos valepotriatos 1-β-acevaltrato, acevaltrato e valtrato.....	74
5.7	Efeito da mistura de valepotriatos obtidos por extração em fluido supercrítico (dose 10 mg/kg, v.o) no teste de natação forçada.....	85

LISTA DE TABELAS

3.1	Tribos, subtribos e gênero do sistema de Graebner (1906). A distribuição geográfica é dada pelas abreviações: As = Ásia, Eur = Europa, N Am = América do Norte, S Am = América do Sul.....	06
3.2	Sistemas cromatográficos para análise qualitativa de valepotriatos por CCD.	16
3.3	Métodos para análise quantitativa por CLAE de valepotriatos e baldrinal descritos na literatura.....	18
3.4	Exemplos representativos de extração em soxhelt, líquido-líquido e em fase sólida.....	20
3.5	Exemplos do uso de CL-EM na análise de flavonóides.....	21
5.1	Teores de valepotriatos, em cada tempo de extração, nas frações obtidas nas diferentes pressões de trabalho.....	65
5.2	Teores de valepotriatos encontrados nas frações obtidas por diferentes pressões de extração.....	66
5.3	Percentual de inibição ligação do flunitrazepam tritiado ao receptor benzodiazepínico e do 8-hidróxi-2-(di- <i>n</i> -propilamino) tetralina tritiado ao receptor serotoninérgico 5HT _{1A} por valepotriatos e flavonóides.....	71
5.4	Substituintes ligados ao núcleo ciclopentano diidropirano dos valepotriatos testados no ensaio de inibição da enzima Na ⁺ K ⁺ ATPase.....	75
5.5	Efeito da solução extrativa diclorometânica de <i>V. glechomifolia</i> (VAL 10 mg/kg, v.o) no labirinto em cruz elevado (valores absolutos).....	80
5.6	Efeito da solução extrativa metanólica de <i>V. glechomifolia</i> (FLA 10 mg/kg, v.o) no labirinto em cruz elevado (valores absolutos).....	81
5.7	Efeito da solução extrativa diclorometânica e metanólica de <i>V. glechomifolia</i> no tempo de sono induzido por pentobarbital (40 mg/kg, i.p).....	81
5.8	Efeito da mistura de valepotriatos obtida por extração por fluido supercrítico (VAL SC) no ensaio de atividade locomotora.....	85

SUMÁRIO

Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xii
1. Introdução	01
2. Objetivos	05
3. Revisão bibliográfica	06
3.1 Dados taxonômicos.....	06
3.2 Perfil fitoquímico da família Valerianaceae.....	07
3.2.1 Iridóides.....	07
3.2.2 Flavonóides.....	13
3.2.3 Lignanas.....	14
3.2.4 Óleos voláteis.....	15
3.3 Métodos analíticos aplicados às substâncias presentes em <i>Valeriana</i>	15
3.3.1 Valepotriatos.....	15
3.3.2 Flavonóides.....	20
3.4 Extração por fluido supercrítico.....	21
3.5 Dados farmacológicos para o gênero <i>Valeriana</i>	25
3.5.1 Atividade sedativa e ansiolítica.....	25
3.5.2 Atividades farmacológicas distintas.....	30
3.5.3 Estudos de toxicidade.....	31
3.6 Insônia, ansiedade e depressão.....	34
3.7 Bomba adenosina trifosfatase sódio e potássio (Na ⁺ K ⁺ ATPase).....	39
4. Materiais e métodos	42
4.1 Material vegetal.....	42
4.1.1 Identificação botânica.....	42
4.1.2 Tratamento do material vegetal.....	42

4.2	Condições extrativas, análise cromatográfica, isolamento.....	42
4.2.1	Valepotriatos.....	42
4.2.2	Flavonóides.....	44
4.3	Obtenção de extratos de <i>V. glechomifolia</i> com fluido supercrítico e quantificação por CLAE.....	47
4.3.1	Obtenção das frações com CO ₂ supercrítico.....	47
4.3.2	Quantificação de valepotriatos por CLAE.....	48
4.4	Ensaio farmacológicos.....	48
4.4.1	Material Biológico.....	48
4.4.2	Ética.....	49
4.4.3	Tratamentos.....	49
4.4.4	Ensaio bioquímicos.....	50
4.4.4.1	Preparação das membranas sinaptossomais (receptor benzodiazepínico)...	50
4.4.4.2	Doseamento de proteína.....	51
4.4.4.3	Ensaio de ligação ao receptor benzodiazepínico.....	52
4.4.4.4	Preparação das membranas sinaptossomais (receptor serotoninérgico).....	52
4.4.4.5	Doseamento de proteína.....	54
4.4.4.6	Ensaio de ligação ao receptor serotoninérgico 5HT _{1A}	54
4.4.4.7	Avaliação da atividade da enzima Na ⁺ K ⁺ ATPase <i>in vitro</i>	55
4.4.4.7.1	Preparo dos homogenatos.....	56
4.4.5	Ensaio de toxicidade aguda.....	56
4.4.6	Experimentos comportamentais.....	56
4.4.6.1	Teste do labirinto em cruz elevado.....	57
4.4.6.2	Teste de potenciação do sono barbitúrico.....	58
4.4.6.3	Teste da natação forçada.....	59
4.4.6.4	Teste da atividade locomotora espontânea.....	59
4.5	Análise estatística.....	60
5	Resultados e discussão	61
6	Conclusões	89
7	Referências	92

1. INTRODUÇÃO

Plantas medicinais são utilizadas desde tempos remotos para cura de doenças e promoção do bem estar. Aquelas que provocam alterações de consciência e sensoriais recebem especial atenção dos cientistas que dirigem esforços na busca do entendimento dos mecanismos de ação que desencadeiam mudanças comportamentais, bem como cognitivas e de humor. Propriedades do tipo estimulante, alucinógena, analgésica, ansiolítica, antidepressiva e hipnótico-sedativa são algumas das atividades relatadas pelos pesquisadores. Diversas espécies são responsáveis por estas ações como *Ephedra sinica* Stapf., *Paulinia cupana* K., *Papaver somniferum* L., *Passiflora incarnata* L., *Piper methysticum* G Forst., *Hypericum perforatum* L. entre outras (Carlini, 2003).

Entre as plantas medicinais consideradas ansiolíticas e sedativas, cita-se o gênero *Valeriana* L. que compreende entre 300–400 espécies (Backlund e Moritz, 1998) e é pertencente à família Valerianaceae Batsch. Os antigos gregos usavam estas plantas para problemas no trato digestivo e urinário e no século 17, em vários países da Europa, passaram a ser prescritas para o tratamento de epilepsia, histeria, ansiedade e insônia (Duke, 1985; Hobbs, 1989). Suas indicações mais atuais são: sedativo leve (promotor do sono), para alívio de estados de excitação nervosa, tensão, irritabilidade e ansiedade indutora de distúrbios do sono (Who, 1999; Blumenthal, 2000).

As espécies mais empregadas na produção de fitoterápicos são *V. officinalis*, *V. wallichii* e *V. edulis*. A espécie *V. officinalis* é a matéria-prima de diversas especialidades farmacêuticas podendo estar associada a outras plantas. No Brasil há registro de dois medicamentos produzidos a base de *V. officinalis* que são Extrato seco de *Valeriana officinalis*[®] (Química e Farmacêutica Nikko do Brasil Ltda) e *Valeriana officinalis* associada a *Humulus lupulus*[®] (Zeimport Comércio de Importação e Exportação Ltda) (ANVISA, 2009).

A Organização Mundial da Saúde considera que as preparações farmacêuticas obtidas a partir de *V. officinalis* podem ser utilizadas como alternativa aos benzodiazepínicos. A principal indicação de uso é como sedativo leve, porém seu efeito terapêutico não é imediato, o que limita sua utilização para tratamento agudo (Who, 1999).

A maioria dos dados farmacológicos encontrados na literatura refere-se à ação sedativa de espécies *Valeriana*, havendo controvérsias quanto à definição das substâncias responsáveis por esta ação, sendo atribuída primeiramente aos óleos voláteis, em seguida aos valepotriatos (ésteres de iridóides não glicosilados) e, ainda, alguns autores consideraram a possibilidade da ação sinérgica de ambos (Hoobs, 1989). Além de óleos voláteis e valepotriatos, outras classes de substâncias estão sendo abordadas, como flavonóides e lignanas, que também demonstram ação sedativa nos ensaios pré-clínicos realizados (Schumacher *et al.*, 2002; Wasowski *et al.*, 2002; Marder *et al.*, 2003).

Os ensaios pré-clínicos compreendem estudos comportamentais através da utilização de modelos animais de ansiedade e sedação, bem como estudos de eletrofisiologia e de radioligação a receptores neuronais (Mennini *et al.*, 1993; Capasso *et al.*, 1996; Marder *et al.*, 2003; Granger *et al.*, 2005).

Em termos de estudos clínicos, os resultados obtidos são controversos. Alguns autores afirmam que extratos de espécies *Valeriana* produzem sedação, melhorando a qualidade do sono, contudo outros relatam inefetividade. Segundo a opinião de autores que executaram revisões sistemáticas de ensaios duplo-cegos e placebo-controlados do uso de *V. officinalis* para tratamento da insônia, os resultados controversos obtidos pelos diferentes ensaios decorrem da variabilidade no número de pacientes, da qualidade metodológica e do delineamento dos estudos (Stevinson e Ernst, 2000; Bent *et al.*, 2006; Taibi *et al.*, 2007).

No Brasil, foram descritas dezessete espécies de *Valeriana*. Borsini (1962), após revisão do gênero brasileiro, estabeleceu quinze espécies. Anos mais tarde, Sobral

(1999^a, 1999^b, 1999^c) descreveu outras duas. Doze destas, *Valeriana bornmuelleri* Briq., *V. catharinensis* Graebn., *V. chamaedryfolia* Cham. & Schltl., *V. eichleriana* (C.A.Mull.) Graebn., *V. eupatoria* Sobral, *V. glechomifolia* Meyer, *V. polystachya* Smith, *V. salicariifolia* Vahl., *V. scandens* L., *V. reitziana* Borsini, *V. tajuvensis* Sobral e *V. ulei* Graebn. ocorrem no Rio Grande do Sul (Sobral, 1999^a, 1999^b, 1999^c).

Há cerca de uma década, algumas destas espécies têm sido estudadas. Salles e colaboradores (2000) isolaram e identificaram nove iridóides, sendo oito valepotriatos e um iridóide glicosilado, de folhas, caules e raízes de *V. glechomifolia*. Também desenvolveram a metodologia para o estabelecimento de culturas de células *in vitro* (cultura de calos) (Salles, 1999) e de propagação de plantas (micropropagação) (Salles *et al.*, 2002). Silva (2001), após desenvolvimento e validação de um método de quantificação por fase reversa em CLAE acoplado a espectroscopia UV, quantificou cinco valepotriatos em nove espécies de *Valeriana* coletadas no Rio Grande do Sul, sendo estas *V. catharinensis*, *V. chamaedryfolia*, *V. eichleriana*, *V. eupatoria*, *V. glechomifolia*, *V. polystachya*, *V. salicariifolia*, *V. scandens* e *V. tajuvensis*. Em paralelo, foram quantificados os valepotriatos produzidos pelas culturas de calos e suspensão de *V. glechomifolia*. De Carvalho (2004) otimizou o protocolo de micropropagação de *V. glechomifolia* e desenvolveu diferentes métodos de preparação para a transferência *ex vitro* e cultivo a campo. Russowiski (2007) estabeleceu a produção de valepotriatos em culturas líquidas de *V. glechomifolia*. Maurmann e colaboradores (2008) desenvolveram um meio nutriente para produção de biomassa e valepotriatos em culturas de *V. glechomifolia* estocadas por longos períodos.

Conforme determinado por Silva (2001), as diferentes espécies nativas de *Valeriana* apresentaram concentrações diferenciadas de valepotriatos. A espécie que apresentou teores mais elevados (2,05 %), sendo o caule o órgão de maior acúmulo, foi *V. glechomifolia*. Em sequência se destacou *V. eupatoria* (1,17 %), *V. eichleriana* (0,52 %) e *V. tajuvensis* (0,30 %). Foi verificado que todas as amostras analisadas apresentaram valepotriatos, exceto nos extratos provenientes dos caules de *V. chamaedryfolia* e *V. salicariifolia*, onde não foi possível detectá-los. Os valepotriatos quantificados foram: diidrovaltrato, 1- β -acevaltrato, acevaltrato, diavaltrato e valtrato.

Mediante a pesquisa com espécies nativas de *Valeriana*, em termos biotecnológicos e químicos, frente à escassez de dados farmacológicos, os objetivos deste trabalho foram a realização de análises farmacológicas em modelos animais de ansiedade, sedação e depressão, bem como a realização de ensaios bioquímicos em sistemas relacionados. Além disso, com intuito de encontrar um método de obtenção mais seletivo e eficiente dos compostos de interesse, também foi investigada a eficiência de um método de extração não convencional para a obtenção de alguns constituintes químicos de *V. glechomifolia*.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

- Obtenção dos constituintes químicos de espécies de *Valeriana* com ênfase em valepotriatos e flavonóides;
- Avaliação da atividade de *Valeriana glechomifolia* no Sistema Nervoso Central.

2.2. Específicos

- Obtenção de soluções extrativas de valepotriatos pelas técnicas de maceração por ultrassom e por fluido supercrítico;
- Avaliação da atividade de frações enriquecidas de valepotriatos e flavonóides obtidos de *V. glechomifolia* em modelos animais de ansiedade, sedação e depressão;
- Realização de estudos bioquímicos, como experimentos de radioligação a receptores benzodiazepínico e serotoninérgico, com valepotriatos e flavonóides, e avaliação da atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ com valepotriatos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Dados Taxonômicos

A família Valerianaceae é subdividida em três tribos: *Patrinieae*, *Triplostegieae* e *Valerianeae*. Estas tribos englobam quatorze gêneros, dois da tribo *Patrinieae*, um da tribo *Triplostegieae* e onze gêneros distribuídos em cinco subtribos da tribo *Valerianeae* (tabela 3.1) (Eriksen, 1989).

Tabela 3.1: Tribos, subtribos e gênero do sistema de Graebner (1906). A distribuição geográfica é dada pelas abreviações: As = Ásia, Eur = Europa, N Am = América do Norte, S Am = América do Sul.

Tribos	Subtribos	Genus sensu Graebner
Patrinieae	-	<i>Patrinia</i> (As) <i>Nardostachys</i> (As)
Triplostegieae	-	<i>Triplostegia</i> (As)
Valerianeae	Plectridinae	<i>Plectritis</i> (N Am) <i>Valerianella</i> (Eur.)
	Fediinae	<i>Fedia</i> (Eur.)
	Valerianinae	<i>Valeriana</i> (As, Eur., Am) <i>Phyllactis</i> (S Am) <i>Aretiastrum</i> (S Am) <i>Belonanthus</i> (S Am) <i>Phuodendron</i> (S Am) <i>Stangea</i> (S Am)
	Centranthinae Graebn.	<i>Centranthus</i> (Eur.)
	Aatrephinae Graebn.	<i>Astrephia</i> (S Am)

Fonte: Eriksen, B. Notes on generic and infrageneric delimitation in the Valerianaceae. *Nordical Journal of Botany*, v.9, n.2, p.179-187, 1989.

Como os gêneros *Patrinia* e *Triplostegieae*, mais primitivos, são nativos da Ásia, diversos autores consideram que a família Valerianaceae tenha sido originada neste continente (Eriksen, 1989). Alguns gêneros como *Centranthus*, *Fedia* e *Valerianella*, mais evoluídos que os primeiros, são nativos da região do Mediterrâneo, onde ocorrem também algumas espécies de *Valeriana*. O último, constituído de 300 espécies, tem o maior número de representantes na América do Sul, especialmente na região andina, onde o gênero sofreu muitas modificações adaptativas. A adaptação às condições

extremas resultou na formação de um grande número de espécies (Cronquist, 1981; Eriksen, 1989).

No Brasil foram descritas dezessete espécies do gênero *Valeriana*, sendo doze delas nativas no Rio Grande do Sul (*V. bornmuelleri*; *V. catharinensis*; *V. chamaedryfolia*; *V. eichleriana*; *V. eupatoria*; *V. glechomifolia*; *V. polystachya*; *V. reitzania*; *V. salicariifolia*; *V. scandens*; *V. tajuvensis* e *V. ulei*). O gênero se desenvolve em regiões de clima temperado, com condições edafológicas pobres, típicas de campos rochosos (Sobral, 1999^a; Sobral, 1999^b; Sobral, 1999^c). Morfologicamente o gênero é pouco homogêneo constituindo-se na maioria de ervas e subarbustos, mas contendo também uma espécie trepadeira e uma arbustiva. Possuem um odor característico, decorrente da liberação de ácido isovalérico resultante da hidrólise enzimática de alguns dos constituintes químicos presentes, o qual pode ser utilizado na identificação da família (Cronquist, 1981; Houghton, 1994).

3.2 Perfil fitoquímico da família Valerianaceae

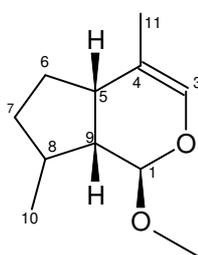
A família Valerianaceae se caracteriza quimicamente pela presença de iridóides, especialmente os valepotriatos, flavonóides, lignanas e óleos (Costa, 1975; Duke, 1985; Hobbs, 1989; Bruneton, 1991; Backlund e Moritz, 1998).

3.2.1 Iridóides

Os primeiros iridóides isolados foram inicialmente designados “amaróides”, devido ao sabor intensamente amargo, e “pseudoindicanos”, uma vez que, por hidrólise ácida em condições oxidativas, polimerizam originando substâncias de coloração azul-escura. Após a obtenção de iridodial, o mais simples dos iridóides, isolado de formigas do gênero *Iridomirmex*, passaram a ser chamados de iridóides (Boros e Stermitz, 1990). Nos vegetais, estas substâncias desempenham papel de dissuasórios alimentares,

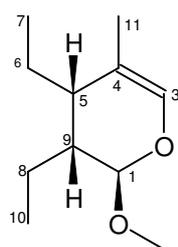
devido ao sabor amargo e, numa interação co-evolutiva, são sequestrados por alguns animais que os utilizam em sua própria defesa (Rimpler, 1991).

As primeiras estruturas de iridóides foram definidas na década de 50 e são conhecidos diversos produtos que podem ser divididos em dois grandes grupos: iridóides carbocíclicos e *seco*-iridóides. A estrutura geral de um iridóide carbocíclico consiste no sistema ciclopentanodihidropirano, metilado nas posições 4 e 8, denominado esqueleto iridano (1).



(1)

Uma cisão oxidativa da ligação C-7 e C-8 no anel ciclopentano conduz aos *seco*-iridóides (2) que compõem a estrutura dos alcalóides indólicos monoterpênicos encontrados em Apocynaceae, Rubiaceae e Loganiaceae (El-Naggar e Beal, 1980; Boros e Stermitz, 1990).



(2)

Com exceção de algumas substâncias produzidas por insetos, os iridóides são restritos às dicotiledôneas, sendo abundantes em certas ordens das simpétalas, tais como Dipsacales (na qual está incluída a família Valerianaceae), Cornales, Gentianales e Lamiales (*Sensu* Dahlgren, 1989), onde são formados por diferentes rotas

biossintéticas (Jensen *et al.*, 1975; Dahlgren, 1980; Jensen, 1992). Devido à distribuição restrita a determinados táxons, essas substâncias têm sido amplamente empregadas em estudos taxonômicos. *Seco*-iridóides, por exemplo, são mais frequentes na ordem Gentianales, enquanto iridóides carbocíclicos são amplamente distribuídos na ordem Lamiales (Jensen *et al.*, 1975; Dahlgren, 1980; Dahlgren, 1989; Jensen, 1992).

A diversidade estrutural dos iridóides carbocíclicos deve-se ao padrão de substituição e a modificações no esqueleto básico. Normalmente, o anel ciclopentano está ligado ao anel diidropirano em configuração *cis* apresentando H-5 e H-9 em posição β . A molécula pode ser encontrada na forma livre, ou combinada com açúcares, formando os iridóides glicosilados. Em ambas as formas, o C-10 e/ou C-11 podem estar ausentes. O carbono 11 usualmente ocorre como grupo carboxila ou carbometoxila, embora, grupamentos com menor nível de oxidação como metila, hidroximetila e formila, nesta posição, também sejam encontrados (Jensen, 1991). Produtos com grupamento hidroximetila na posição 11 são característicos de Valerianaceae e Caprifoliaceae (*Sensu* Cronquist, 1981). Os iridóides glicosilados presentes nestes táxons apresentam, frequentemente, o açúcar ligado nesta posição, enquanto que na maior parte destes produtos a ligação heterosídica ocorre no C-1. O açúcar presente nos iridóides glicosilados é, na maioria das vezes, a glicose (Inouye, 1991; Jensen, 1991).

Em relação à biossíntese de iridóides, vários experimentos estabeleceram o ácido mevalônico como precursor e o pirofosfato de geranila como intermediário na rota biossintética (Jensen, 1991; Franzky, 1993). Subsequentemente, com maior número de informações, tem sido proposto que os iridóides sejam biossintetizados a partir de duas rotas principais (rota I e rota II). Nestas, os dois grandes grupos de iridóides (carbocíclicos e *seco*-iridóides) são formados a partir de precursores - iridodial (5) e *epi*-iridodial (9) - que se diferenciam apenas pela estereoquímica da metila (C-10) ligada ao carbono 8

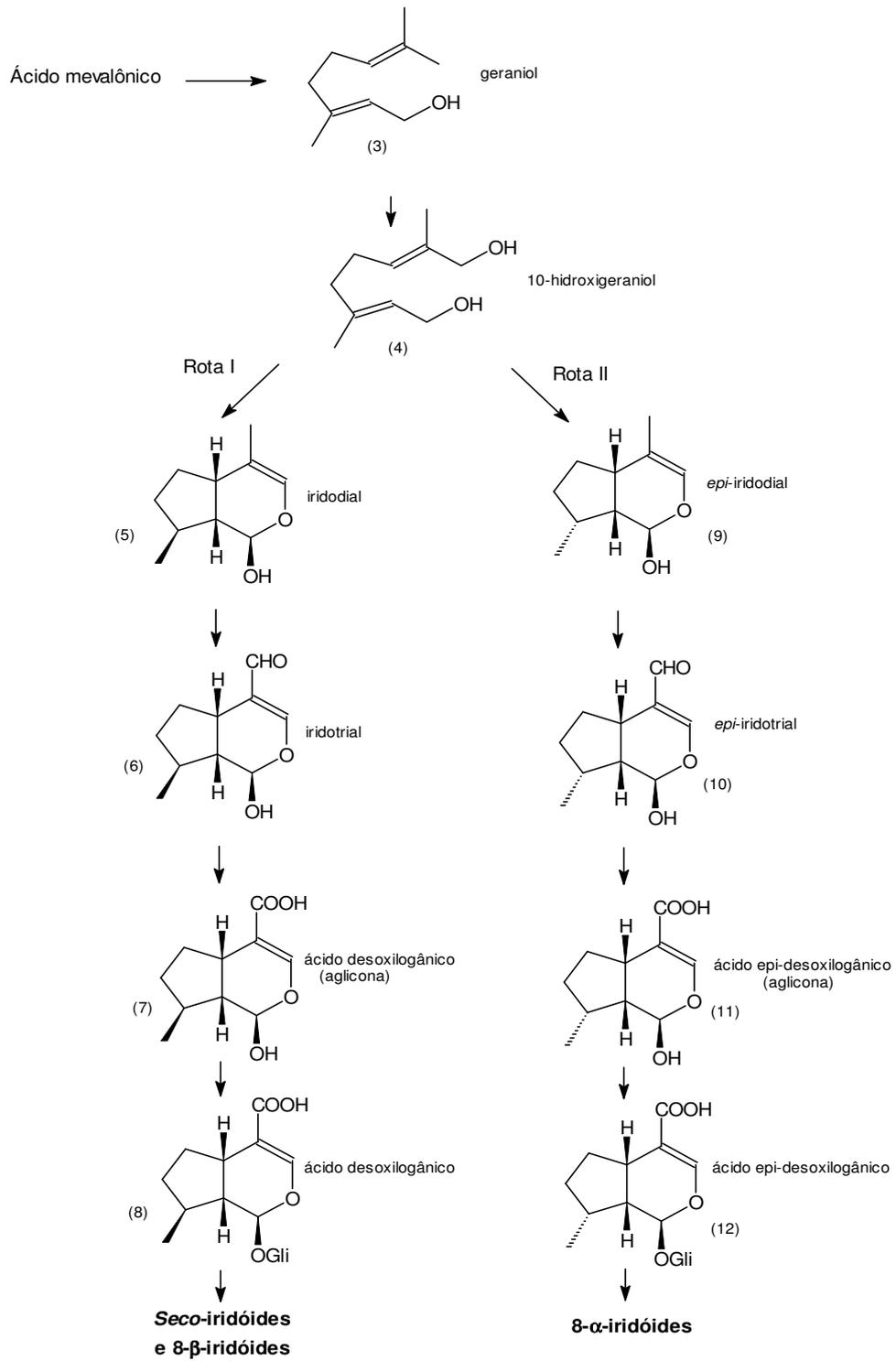


Figura 3.1: rotas biossintéticas para iridóides (adaptado de von Poser, 1997).

(figura 3.1) (Jensen, 1991; Jensen, 1992; Damtoft *et al.*, 1993^a; Damtoft *et al.*, 1993^b; Damtoft, 1994).

A rota I inicia a partir de geraniol (3) e 10-hidroxigeraniol (4), via iridodial (5) e iridotrial (6). Iridotrial sofre oxidação de C-11 até estágio de carbonila originando a aglicona do ácido desoxilogânico (7). A glicosilação de (7) fornece ácido desoxilogânico (8), precursor de *seco*-iridóides e iridóides carbocíclicos com estereoquímica 8β (C-10 em conformação β). Na rota II, rota de biossíntese da série 8-*epi*, ou seja, iridóides com estereoquímica 8α (C-10 em conformação α), *epi*-iridodial (9), via *epi*-iridotrial (10), com posterior oxidação de C-11, origina-se a aglicona do ácido *epi*-desoxilogânico (11). Este ácido, por glicosilação, fornece ácido *epi*-desoxilogânico (12), o precursor dos iridóides carbocíclicos com estereoquímica 8α (Jensen, 1991; Jensen, 1992).

Os valepotriatos são iridóides carbocíclicos não glicosilados que apresentam configuração 8β . Assim, embora não existam estudos sobre a biossíntese dessas substâncias, é possível inferir que as mesmas sejam biossintetizadas a partir do precursor da Rota I. As variações estruturais devem-se aos diferentes substituintes ácidos esterificados com os grupos hidroxila, à presença ou ausência de um grupo epóxido e ao número e posição das ligações duplas no núcleo principal (Hobbs, 1989).

Os valepotriatos são divididos em dois grupos principais: monoênicos e diênicos. Os diênicos distinguem-se dos monoênicos por possuírem uma segunda ligação dupla entre C5-C6. Os valepotriatos monoênicos, mais frequentes em espécies de *Valeriana*, são: diidrovaltrato, homodiidrovaltrato, isovaleroxiidroxi-diidrovaltrato (IVHD-valtrato), acetoxiidroxi-diidrovaltrato (AHD-valtrato), isodiidrovaltrato e 11-homoidroxildiidrovaltrato, enquanto que os diênicos são valtrato, isovaltrato, diavaltrato, homovaltrato 1, homovaltrato 2, 11-acevaltrato, 1-homoacevaltrato, hidroxivaltrato, 1-homoisoacevaltrato e seneciovaltrato (Sthal e Schild, 1971; Funke e Friedrich 1975; Hölzs e Jurcic, 1975; Handyeieva e Zaikin 1978; Handyeieva *et al.*, 1978; Tittel *et al.*, 1978; Kucaba *et al.*, 1980; Dossaji e Becker, 1981; Becker *et al.*, 1983; Foerster *et al.*, 1984; Hölzl e Koch, 1984; Bach *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 2002).

Os valepotriatos são instáveis e sob influência de calor, umidade e acidez, decompõem-se produzindo ácidos livres e núcleos monoterpênicos. Dessa instabilidade surgem os produtos de degradação baldrinal, homobaldrinal, deacilbaldrinal, isovaltral e valtroxal (Denee *et al.*, 1979; Houghton, 1988; Hobbs, 1989). A hidrólise de valepotriatos durante o processo de secagem e armazenamento da planta resulta na liberação de ácido valérico, responsável pelo odor típico das espécies de *Valeriana*.

Tanto valepotriatos monoênicos como diênicos podem apresentar o anel epóxido aberto. São exemplos: valtrato hidrina B1, valtrato hidrina B2, valtrato hidrina B4, valtrato hidrina B5, valtrato hidrina B6, valtrato hidrina B7, valtrato hidrina B8, valtrato hidrina B3, valeclorina (diidrovaltrato hidrina), acetoxivaltrato hidrina, 10-acetoxi-1-homovaltrato hidrina, 10-acetoxi-1-acevaltrato hidrina (Hölzl e Koch, 1984; Koch e Hölzl, 1985; Houghton, 1988; Hobbs, 1989; Bach *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 2002).

Um quarto grupo de estruturas é dos valepotriatos desoximonoênicos, nos quais o anel epóxido ligado ao C8 do anel ciclopentano está substituído por um metileno ($\text{CH}_2=$), são exemplos: o 8,11-desoxidiidrovaltrato e 8,11-desoxiomodiidrovaltrato (Bos *et al.*, 2002). Mais recentemente, foram obtidos valepotriatos apresentando, em lugar do epóxido, um grupamento metila (8-metilvalepotriato) (Wang *et al.*, 2008) e também compostos acilados apresentando uma porção *o*-hidroxi benzoiloxi ligado ao C10 (jamanvaltratos) (Lin *et al.*, 2009).

Os valepotriatos encontram-se exclusivamente em espécies da família Valerianaceae, ocorrendo em teores de até 5,9% em partes aéreas de *V. kilimandascharica* e 14,5% em partes subterrâneas de *V. thalictroides* (Dossaji e Becker, 1981; Becker *et al.*, 1983).

Silva (2001) analisou nove, entre as doze espécies de valeriana que ocorrem no Rio Grande do Sul. Inflorescências, folhas, caules, raízes e rizomas de *V. catharinensis*, *V. chamaedryfolia*, *V. eichleriana*, *V. eupatoria*, *V. glechomifolia*, *V. polystachya*, *V. salicariifolia*, *V. scandens* e *V. tajuvensis* foram investigados quanto ao conteúdo de valepotriatos por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Através de CCD, foi constatado a presença de substâncias com

comportamento cromatográfico (extinção de fluorescência a 254 nm e reação frente ao agente cromogênico) semelhante aos valepotriatos existentes em todas as espécies estudadas e, por CLAE, foi realizada a quantificação dos mesmos.

O doseamento realizado por CLAE de fase reversa revelou *V. glechomifolia* como a espécie de teores mais elevados de valepotriatos (2,05 %), sendo o caule o órgão de maior acúmulo. Em sequência destacaram-se *V. eupatoria* (1,17 %), *V. eichleriana* (0,52 %) e *V. tajuvensis* (0,30 %). Os valepotriatos foram quantificados em todos os órgãos analisados, demonstrando que a capacidade de biossíntese e de acúmulo destas substâncias não está restrita aos órgãos subterrâneos (Silva, 2001).

3.2.2 Flavonóides

Flavonóides são metabólitos secundários de baixo peso molecular encontrados em plantas vascularizadas. Estruturalmente, são polifenóis sintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, podendo ser encontrados na forma de aglicona livre ou conjugados com açúcares (Harborne, 1975). No reino vegetal, atuam como moléculas defensoras e sinalizadoras dos processos reprodutivos, patogênicos e simbióticos (Rijke *et al.*, 2006).

Estruturalmente, os flavonóides são relacionados ao esqueleto tipo cromano com substituinte fenila nas posições C-2 ou C-3. Frequentemente apresentam hidroxilas nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e ou 5' e as mesmas podem ser metiladas, acetiladas, preniladas e sulfatadas. De modo geral, são subdivididos em flavona, flavonol, isoflavona, flavanona, chalcona, antocianidina, catequina, flavanovol e ocorrem como *O*- e *C*-glicosídeos, sendo que os açúcares mais comuns são β -*D*-glicose, L-arabinose, β -*D*-galactose e L-ramnose. Os *O*-glicosídeos apresentam o açúcar ligado ao grupo hidroxila da aglicona nas posições 3 ou 7, enquanto os *C*-glicosídeos, o açúcar liga-se usualmente ao carbono da aglicona nas posições 6 ou 8 (Rijke *et al.*, 2006).

Os flavonóides relatados para as espécies de *Valeriana* são quercetina, diosmetina, luteolina, apigenina, acacetina, canferol, acacetina 7-*O*- β -soforosídeo e

acacetina 7-O-(6''-O- α -ramnopiranosil)- β -soforosídeo (Kornievskii *et al.*, 1979; Fursa, 1979; Fursa, 1980; Fursa e Litvinenko, 1981; Fursa *et al.*, 1981; Fursa, 1982; Trzhetsinskii *et al.*, 1983; Fursa, 1983; Fursa e Belyaeva, 1983; Fursa *et al.*, 1984; Fursa, 1984; Fursa *et al.*, 1987; Tang *et al.*, 2002).

Wasowski e colaboradores (2002) isolaram de *V. wallichii* e detectaram em *V. officinalis* o flavonóide 6-metilapigenina. No ano seguinte isolaram das mesmas espécies um flavonóide muito comum em espécies cítricas, porém desconhecido em valeriana, o 2S(-)-hesperidina (Marder *et al.*, 2003). O mesmo grupo de pesquisadores isolou linarina de *V. officinalis*, um flavonóide glicosilado identificado pela primeira vez em espécies de *Valeriana* (Fernández *et al.*, 2004).

3.2.3 Lignanais

As lignanas, bem como neolignanais e seus análogos, dá-se a designação genérica de lignóide, que caracteriza micromoléculas, cujo esqueleto é formado exclusivamente pelo grupo fenilpropânico (C₆-C₃)_n, no qual *n* é restrito a poucas unidades. São formadas através do acoplamento oxidativo de álcoois cinâmicos entre si ou destes com ácidos cinâmicos. Estruturalmente, os resíduos *n*-propilbenzênicos apresentam o carbono gama (C-8) oxigenado, como ocorre no cicloariciresinol de *Auracaria angustifolia* (Bertl.) Kuntze, e o pinoresinol isolado de espécies de *Picea* (Filho, 2003).

A partir de um extrato metanólico de raízes de *V. officinalis*, oito lignanas foram isoladas, 8'-hidroxipinoresinol, pinoresinol-4-O- β -D-glicosídeo, 7,9'-monoepoxilignana massoniresinol-4'-O- β -D-glicosídeo, 4'-O- β -D-glicosila-9-O-(6''-desoxisacarosil) olivila, berquemol-4'-O- β -D-glicosídeo, 7,9': 7', 9-diepoxilignana pinoresinol-4,4'-di- β -O- D-glicosídeo, 8-hidroxipinoresinol-4'- O - β - D-glicosídeo e 8'-hidroxipinoresinol-4'- O - β - D-glicosídeo (Schumacher *et al.*, 2002).

De raízes de *V. prionophylla* foram isolados dois glicosídeos 7,9':7'',9-diepoxilignana, determinados como prinsepiol-4-*O*- β -*D*-glicopiranosídeo e fraxiresinol-4'-*O*- β -*D*-glicopiranosídeo (Piccinelli *et al.*, 2004).

3.2.4 Óleos voláteis

A concentração e a constituição dos óleos voláteis variam amplamente entre as espécies de acordo com as condições ambientais sob as quais as plantas crescem, o número de cromossomos e o fenótipo das mesmas. Os principais componentes citados são α e β -pineno, acetato de bornila, valeranona, ácido valerênico, (-)-pacifigorgiol, ésteres de valerênol do tipo *E*- e *Z*-acetato de valerênol, valeracetato, um sesquiterpeno do tipo guaiano, drimenol, um sesquiterpeno da série biciclofarnesol, quessano, acetato de α -quessil, maaliol, ácido (-)-3- β -epoxivalerênico e ácido 4- β -epoxivalerênico (Dharmaratne *et al.*, 2002), tamariceno, valerana-4,7(11)dieno, pacifigorgia 1-10dieno, pacifigorgia 1(6),10-dieno, pacifigorgia 1(9),10-dieno, pacifigorgia 2,10-dieno e pacifigorgia 2(10),11-dieno (Houghton, 1988; Hobbs, 1989; Nishiyama *et al.*, 1992; Gränicher *et al.*, 1995; Nishiyama *et al.*, 1995; Bos *et al.*, 1996; Tori *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 2001).

3.3. Métodos analíticos aplicados a substâncias presentes em *Valeriana*

3.3.1 Valepotriatos

Conforme revisão na literatura realizada por Bos e colaboradores (2002), diversos métodos analíticos qualitativos e quantitativos são descritos para determinação de valepotriatos contidos tanto em extratos brutos, quanto em especialidades farmacêuticas. Espectrofotometria, titulometria, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrometria de massas e eletroforese capilar (EC) têm sido aplicados.

A CCD (tabela 3.2) é um método adequado e possibilita a análise rápida de um grande número de amostras. Em termos quantitativos, o método de escolha é CLAE e CLAE acoplada à espectrometria de massas. Tais métodos são os mais utilizados para determinação de valepotriatos em extratos vegetais brutos, ou enriquecidos, bem como no controle de qualidade de fitoterápicos comercializados na forma de tinturas, cápsulas e comprimidos revestidos (Bos *et al.*, 2002).

Métodos cromatográficos visando à quantificação de valepotriatos foram desenvolvidos e inicialmente alguns valepotriatos e seus produtos de degradação foram dosados por densitometria após eluição em CCD. No ano de 1978, foi desenvolvido o primeiro método quantitativo por CLAE, que utilizou como fase estacionária coluna gel de sílica, *n*-hexano:acetato de etila (20:3) como eluente e detecção por UV. Nos anos seguintes, vários métodos usando fase normal e fase reversa (RP-8 e RP-18), eluição isocrática ou gradiente e detecção por luz UV em diferentes comprimentos de onda foram descritos, como pode ser observado na tabela a seguir (tabela 3.3) (Bos *et al.*, 2002).

Tabela 3.2: Sistemas cromatográficos para análise qualitativa de valepotriatos por CCD.

Fase estacionária	Fase móvel	Detecção
Sílica gel 60 F ₂₅₄ ^a	hexano:2-butano (8:2) (2-dim.)	benzidina /ácido clorídrico
Sílica gel HF ₂₅₄	<i>n</i> -hexano:metil-etil-cetona (4:1)	
Sílica gel 60 F ₂₅₄	benzeno:acetato de etila (85:15) tolueno: metil-etil-cetona (4:1) tolueno: <i>n</i> -hexano:metil-etil-cetona (35:45:20)	benzidina /ácido clorídrico
Sílica gel G	éter petróleo: acetona: acetato de etila (100:8:8) (prep.)	benzidina /ácido clorídrico
Sílica gel G	diclorometano: acetona: acetato de etila (50:1:1) (prep.)	
Sílica gel F 60	<i>n</i> -hexano: metil-etil-cetona (8:2)	UV (254/366)
Sílica gel HF _{254/366}	benzeno:acetato de etila (83:17) diclorometano:metil-etil-cetona (98:2)	ácido acético/ ácido clorídrico hidroxilamina/ ácido clorídrico/ hidróxido sódio/etanol
Sílica gel HF ₂₅₄	<i>n</i> -hexano:metil-etil-cetona (8:2)(2x10cm)	benzidina /ácido clorídrico
Alumina (neutro)	<i>n</i> -hexano: metil-etil-cetona (7:3)(1x13cm)	benzidina /ácido clorídrico
Sílica gel 60 F ₂₅₄	<i>n</i> -hexano: metil-etil-cetona (8:2) diclorometano: acetona: acetato etila (48:1:1) (prep.)	UV, DNPH

Continuação: Sistemas cromatográficos para análise qualitativa de valepatriatos por CCD.

Sílica gel	benzeno:acetato de etila (9:1) éter de petróleo: acetato de etila (8:2) dietil éter: hexano (5:5) éter de petróleo : acetona (8:2)	0,1% DNPH em ácido clorídrico (25%) / ácido sulfúrico (1:1)
Sílica gel GF ₂₅₄	n-hexano:metil-etil-cetona (8:2) (2x10cm)	UV 254/benzidina /ácido clorídrico (110 °C) ácido clorídrico 6N ácido clorídrico (25%)/ ácido sulfúrico (1:1) tricloreto antimônio (22% em clorofórmio)
Sílica gel GF F ₂₅₄	benzeno:acetato de etila (9:1) éter de petróleo :acetato etila (8:2) dietil éter: hexano (5:5) éter de petróleo: acetona (8:2)	22% cloreto antimônio/ DNPH (105 °C)
Sílica gel GF ₂₅₄	hexano:metil-etil-cetona (9:1) (2dim) hexano:metil-etil-cetona (8:2) (2dim) diclorometano :metil-etil-cetona (9:1) (2dim) tolueno:acetato de etila: metil-etil-cetona (80:15:5) (insat, 13cm)	UV 254/DNPH (5min 105 °C) UV 254/DNPH (5min 105 °C)
HPTLC (RP-C ₁₈)	metanol: água (8:2)	gás amônia /UV/ 279nm/255nm/425nm
Sílica gel 60 F ₂₅₄	diclorometano: acetona: acetato de etila (48:1:1) diclorometano :meti-etil-cetona (98:2) n-hexano:metil-etil-cetona (8:2) n-hexano:metil-etil-cetona (8:2) benzeno:acetato de etila (83:17) tolueno: acetato de etila: metil-etil-cetona (80:15:5)	UV (254nm)/ DNPH/NBP NBP (3% em acetona, 40 °C,90min) UV/ (254/366)/DNPH DNPH/NPB
Sílica gel HG 60 F ₂₅₄	tolueno: acetato de etila (78:22)	UV (254nm)/ácido acético/ ácido clorídrico
Sílica gel GF ₂₅₄	clorofórmio : metanol (50:0,5) clorofórmio : metanol (8:2)	UV (254nm)

Fonte: Bos *et al.*, 2002; DNPH 2,4-dinitrofenilidrazina; NPB 4-(4-nitrobenzil)-piridina; ^a impregnado com 1% polietileno em metanol.

Foi demonstrado que valepatriatos isômeros e homólogos de extratos clorofórmicos de raízes de *V. officinalis* foram separados por fase normal e reversa sendo que a última proporciona um melhor perfil de separação (Van Meer e Labadie, 1981; Dossaji e Becker, 1981). Foerster e colaboradores (1984) quantificaram os valepatriatos valtrato, isovaltrato, homovaltrato, acevaltrato, diidrovaltrato e IVHD-

valtrato, utilizando coluna cromatográfica preparativa Altex Ultrasphere – ODS (10 x 250 mm, 5 μ dp), sistema gradiente metanol:água (bomba A 60:40; bomba B 90:10) e detecção a λ 254 nm para valepotriatos diênicos. Para os monoênicos foi empregado um sistema isocrático acetonitrila:água (70:30), detecção em λ 206 nm.

Tabela 3.3: Métodos para análise quantitativa por CLAE de valepotriatos e baldrinal descritos na literatura.

Fase estacionária	Fase móvel	Deteção
Fase normal		
Nucleosil 50 (250x4 nm)	<i>n</i> -hexano:acetato de etila (20:3)	IV e UV
Lichrosorb Si 100 (5 μ m)	diclorometano:acetato de etila (20:1)	UV (254 nm)
Spherisorb sílica S5W (250x4,6 mm, 5 μ m)	hexano:metanol (92:8)	UV (254 nm)
Partisil sílica (250x3 mm, 5 μ m)	<i>n</i> -hexano:acetato de etila (90:10) <i>n</i> -hexano:acetato de etila (95:5) <i>n</i> -hexano:etanol (99,5:0,5)	
Fase reversa		
Spherisorb ODS (250x3 mm, 5 μ m)	metanol:água (50:50)	UV (206 e 256 nm)
Bondapack C ₁₈ (300 x 3,9 mm)	acetonitrila:água (60:40)	UV (206 e 256 nm)
	A (metanol:água 2:8) B (metanol:água 8:2)	UV (254 nm)
Ultrasphere ODS (250x10 nm, 5 μ m)	metanol:água (8:2)	UV (208 nm)
	acetonitrila:água (7:3) A (metanol:água 6:4) B (metanol:água (9:1)	UV (206 nm) UV (254 nm)
Licrospher 100 CH (250x4 nm, 5 μ m)	A (metanol:água 4:6)	UV (208 e 254 nm)
	B (metanol:água 9:1)	
Licrosorb RP-18	metanol:água (8:2; 0,5%ácido fosfórico)	UV (255 nm)
Nucleosil C ₁₈ (250x4 mm, 5 μ m)	A (metanol:água 9:1)	UV (206 e 254 nm)
	B (metanol:água 4:6)	
Nucleosil C ₁₈ (250x4 mm, 5 μ m)	metanol:água (7:3)	UV (208 nm)
Nucleosil C ₁₈ (250x4 mm, 5 μ m)	A (metanol:água 9:1) B (metanol:água 6:4)	UV (208 e 254 nm)
Zorbax RP-18 ODS (250x4,6 mm)	acetonitrila:água (62:38)	UV (254 nm)
Lichrosorb RP-18 (250x4 mm, 10 μ m)	metanol:água (3:7)	UV (220 nm)
Nova-Pak C-18 (150x3,9 mm, 4 μ m)	acetonitrila:água (55:45)	UV (254 nm)
ApexPrep ODS-2 (250x4,6 mm, 8 μ m)	metanol:água (8:2; 0,5% H_3PO_4 , pH 2)	
CLAE Preparativa		
Lichrosorb Si 100 (350x8 mm)	<i>n</i> -hexano: acetato de etila (20:3)	UV
Nucleosil 100-7 RP-18 (250x21 mm)	acetonitrila:água (55:45)	UV
Altex Ultrasphere ODS (250x10 mm)	acetonitrila:água (7:3)	UV 206 nm
Altex Ultrasphere ODS (250x10 mm)	A (metanol:água 6:4) B (metanol:água 9:1)	UV 254 nm

Fonte: Bos *et al.*, 2002

Freytag (1983) descreveu um método que permitiu a quantificação simultânea de ácido hidroxivalerênico, ácido acetoxivalerênico, ácido valerênico e de valerenal, na presença de acevaltrato, diidrovaltrato, valtrato e isovaltrato em extratos e tinturas de *V. officinalis*. Para tanto, utilizou uma coluna *LiChrosorb* RP18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), sistema isocrático acetonitrila:água (65:35 pH 2,0 ajustado com ácido fosfórico), detecção a λ 225 nm à temperatura de 30 °C .

Perry e colaboradores (1996) propuseram o uso de padrão interno (anilida de ácido graxo) para análise de valtrato e ácido valerênico em extratos de *V. officinalis*. Segundo Bos e colaboradores (2002), o sistema cromatográfico considerado mais adequado para separação simultânea de valepotriatos, seus produtos de decomposição e os sesquiterpenos consiste de CLAE com detector fotodiodo, coluna analítica RP - 18 (5 mm), eluição em sistema isocrático seguido de gradiente linear (bomba A – 800 g água e 156,4 g acetonitrila; bomba B – 200 g água e 625,6 g acetonitrila; ambos contendo 1 mM ácido fosfórico). Esse foi incluído na quarta edição da Farmacopéia Européia no ano de 2002.

Silva (2001) validou um método de quantificação de valepotriatos por fase reversa em CLAE acoplado a espectroscopia UV, em extratos obtidos de *V. glechomifolia*, espécie nativa no Rio Grande do Sul. Os equipamentos utilizados foram os seguintes: módulo de separação Shimadzu (mod. LC 10 – AD), com módulo de comunicação CBM (mod. SPD 10 – A), equipado com um sistema de remoção de gases, injeções automáticas e sistema de detecção por UV-VIS Shimadzu mod. SP 10 – A. As condições cromatográficas: fase estacionária coluna Nova Pak C₁₈ Waters 4 µm (3,9 x 150 mm), pré-coluna Nova Pak C₁₈ Waters 60 A 4 µm (3,9 x 20 mm); fase móvel isocrática acetonitrila:água (50:50); *loop* 10 µL; fluxo de 1 mL/min; sensibilidade 1,0 Afs; atenuação 5; comprimento de onda de 208 nm (valepotriatos monoênicos) e 254 nm (valepotriatos diênicos).

3.3.2 Flavonóides

Diversas estratégias são empregadas na análise de flavonóides contidos em diferentes matrizes (plantas, alimentos e fluidos biológicos). Os processos extrativos envolvem extração com solventes, extração líquido-líquido, micro extração em fase sólida, extração em fase sólida e soxhlet (tabela 3.4).

Tabela 3.4: exemplos representativos de extração em soxhlet, líquido-líquido e em fase sólida

ANÁLISE	SOLVENTES	AMOSTRAS	DETALHES	IDENTIFICAÇÃO
Soxhlet				
Diversos flavonóides	MeOH	<i>M. spicata</i> , <i>T. europea</i> , <i>U. dioica</i> , <i>H. perforatum</i>	12 h extração com metanol, evaporação, resuspensão em metanol tamponado (80:20 v/v)	CG - EM
Daidzeína, genisteína	MeOH-H ₂ O (9:1 v/v)	Leite de soja, farinha, carne	1 h acima de 30 °C	CL - DE
Flavonóides glicosilados	EtOH-H ₂ O (7:3 v/v)	Folhas de <i>Ginkgo biloba</i>		CL - UV
Extração líquido-líquido				
Galato de epicatequina, galato de epigallocatequina	EtOAc-H ₂ O (1:1 v/v)	Chá verde		
Quercitrina	Et ₂ O HCl 0,1 M (pH 2)	Vinho tinto	Extrato seco dissolvido em metanol-água (1:1 v/v)	CI - UV
Extração em fase sólida				
catequinas, rutina, apigenina, luteolina, quercetina	MeOH	Folhas de <i>Ginkgo biloba</i>	Folhas secas sonicadas com 5 mL metanol por 30 min	EC - DE
Isoflavona e glicosídeo de dimalonato de flavonol	MeOH-H ₂ O (9:1 v/v)	Folhas de <i>T. pratense</i> , <i>T. dubium</i> , <i>T. repens</i> , <i>L. corniculatus</i>	Folhas secas, extraídas duas vezes com metanol:água, filtração prévia a 2 ^a extração	CL-UV-EM fluorescência
Daidzina, glicetina, genistina, daidzeína, gliciteína, genisteína	MeCN-H ₂ O (1:1 v/v)	soja	Sem hidrólise para determinar malonatos e acetatos	CL - EM

Fonte: RJIKE *et al.*, 2006

Abreviações: MeCN: acetonitrila, EtOAc: acetato de etila, Et₂O: éter dietílico, MeOH: metanol, EtOH: etanol, Me₂O: acetona, CL: cromatografia líquida, CG: cromatografia gasosa, EC: eletroforese capilar, DE: detector eletroquímico, UV: ultravioleta, EM: espectrometria de massas.

No isolamento de flavonóides utilizam-se métodos cromatográficos, tais como: cromatografia líquida (CL), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), eletroforese; sendo que a mais utilizada é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) (tabela 3.5).

Tabela 3.5: Exemplos do uso de CL-EM na análise de flavonóides

AMOSTRA	FLAVONÓIDES	MODO DE IONIZAÇÃO	ELUENTES CL
<i>Genista tinctora</i>	16-flavona, glicosídeo-malonato-isoflavona e aglicona	IES (-)	MeCN, AcOH
Leguminosae (4 espécies)	Isoflavona, glicosídeo(di)malonato flavonol e (di)glicosídeo flavonol	ACPI (-)	MeOH, formato de amônia
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Wogonina-5-O-glicosídeo, wogonosídeo, baicalína, wogonina, norwogonina, crisina-6-C-arabinose-8-C-glicose, crisina-6-C-glicose-8-arabinose	IES (-)	MeCN, AcONH ₄
Comprimidos de <i>Ginkgo biloba</i>	Rutina, quercitrina, quercetina, campferol, isoramnetina, quercetina-glicosídeo	IES (-)	MeCN, AF
<i>Hypericum perforatum</i> , <i>Rhoiola rosea</i> , vinho, suco de laranja, chá verde	50 flavonóis, flavanonas, flavonas, catequinas e antocianinas	IES (+)	MeOH, AF
Trevo vermelho	49 isoflavonas (glicosídeo-malonato, glicosídeos-acetatos) e agliconas	IES (+)	MeCN, H ₂ O
<i>Helichrysum stoechas</i>	6 chalconas, flavonóis e flavanonas	ACPI (-)	MeCN, formato de amônia

Fonte: Fonte: RJIKE *et al.*, 2006

Abreviações: MeCN: acetonitrila, AcOH: ácido acético, MeOH: metanol, AcNH₄: acetato de amônia, AF: ácido fórmico, IES: ionização eletro-spray

3.4 Extração por fluido supercrítico

Além dos métodos tradicionais para extração de compostos de *Valeriana*, como maceração e maceração por ultrassom, alguns trabalhos têm citado a utilização de fluido supercrítico para obtenção de componentes voláteis de *V. officinalis* (Zizovic *et al.*, 2007; Safaralie *et al.*, 2008).

Um fluido supercrítico é definido como sendo formado acima do ponto crítico, da temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c), o que pode ser visualizado em um

diagrama de fases. Quando somente um valor crítico é atingido (temperatura ou pressão) o fluido é considerado em estado subcrítico (Pinto *et al.*, 2006).

No estado supercrítico, as propriedades físico-químicas de um fluido assumem valores intermediários àqueles dos estados líquido e gasoso. Propriedades relacionadas à capacidade de solubilização, como a densidade de um fluido supercrítico, aproximam-se daquelas típicas de um líquido, enquanto que propriedades relacionadas ao transporte de matéria, como a difusividade e a viscosidade, alcançam valores típicos de um gás. Sabe-se que os líquidos são excelentes solventes, mas de difusão lenta e alta viscosidade. Os gases, por sua vez, são péssimos solventes, mas se difundem com extrema facilidade e são pouco viscosos. Os solventes supercríticos, combinando características desejáveis, tanto de líquidos quanto de gases, são ótimos solventes com alta difusividade e baixa viscosidade. Outra importante característica do fluido supercrítico, é que sua densidade pode ser precisamente ajustada, variando os valores de temperatura e pressão, enquanto a densidade de um líquido só é alterada pela adição de outros solventes, ou com uma grande elevação da temperatura. Como consequência, a extração por fluido supercrítico é um processo rápido e eficiente.

A operação de extração inicia com o bombeamento do solvente para a célula extratora que contém a amostra. O gás é então pressurizado e aquecido até chegar às condições desejadas. Na célula extratora, ocorre o contato entre a amostra e o fluido supercrítico; que pode ser de maneira dinâmica, na qual o fluido supercrítico é continuamente passado através da matriz ou estática, onde se emprega uma quantidade fixa de fluido supercrítico que permanece um período de tempo em contato com a matriz, acontecendo a extração. Após esta etapa, o extrato obtido é levado até um restritor (fixo ou variável), no qual há um controle de temperatura e pressão. O extrato é separado do fluido, que retorna ao seu estado físico original (devido a despressurização); é recolhido em um sistema de coleta utilizando geralmente um solvente, um sistema criogênico, uma retenção em fase sólida adequada ou ainda acoplamento “on-line” com um sistema de análise ou detecção. O solvente extrator normalmente é recolhido e reutilizado (Pinto *et al.*, 2006).

A extração por fluido supercrítico é adequada para a extração e purificação de uma variedade de compostos, principalmente aqueles que apresentam baixa volatilidade e polaridade. Além disso, é aplicada em situações que há restrição à extração com solventes convencionais devido a regulações ambientais ou de saúde, para melhorar a qualidade do produto, agregando valor, bem como para a manufatura de produtos inovadores (Díaz-Reinoso *et al.*, 2006).

Entre os fluidos supercríticos mais utilizados, destaca-se o dióxido de carbono (CO₂), por apresentar baixas pressão (74 bar) e temperatura (32 °C) críticas, baixa toxicidade e não inflamabilidade, baixo custo com alta pureza, fácil remoção do extrato e adequabilidade na extração de produtos de baixa volatilidade e polaridade (Díaz-Reinoso *et al.*, 2006; Pourmortazavi *et al.*, 2007). As propriedades físico-químicas do CO₂ supercrítico, alta difusividade, baixa viscosidade e baixa tensão superficial facilitam a transferência de massa.

Os parâmetros que governam a extração por fluido supercrítico são temperatura, pressão, velocidade de fluxo, tamanho de partícula, tempo de extração e transferência de massa (Díaz-Reinoso *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2006; Pourmortazavi *et al.*, 2007).

A extração por fluido supercrítico envolve as seguintes etapas sequenciais: transporte de CO₂ para a superfície externa da partícula; penetração e difusão do fluido na matriz sólida; solubilização dos componentes; transporte do soluto através da matriz sólida; transporte do soluto da superfície externa da matriz (transferência de massa externa). A extração de solutos a partir de matrizes vegetais depende da transferência de massa externa, da difusibilidade do soluto no sólido (matriz), da solubilidade do soluto no solvente supercrítico e na interação entre soluto e matriz (Díaz-Reinoso *et al.*, 2006).

O efeito da temperatura na solubilidade é complexo, devido à combinação das variáveis densidades e pressão de vapor. A pressão de vapor do soluto aumenta com a temperatura, causando uma elevação na solubilidade. Entretanto, esse aumento de temperatura pode levar a redução da densidade do CO₂ supercrítico, reduzindo seu

poder solvente causando, um decréscimo da solubilidade do soluto (Pourmortazavi *et al.*, 2007).

A pressão pode ser usada na busca da seletividade de extração, sendo o principal parâmetro que influencia na eficiência da extração. De modo geral, quanto maior a pressão, maior o poder solvente (maior a densidade), menor a seletividade. O comportamento do soluto no meio supercrítico é ditado por quatro parâmetros: 1) a miscibilidade ou limiar de pressão, que corresponde à pressão na qual o soluto particiona para o fluido supercrítico; 2) a pressão na qual o soluto atinge o máximo de solubilidade; 3) a pressão de fracionamento, que é a faixa de pressão entre as pressões máximas de miscibilidade e solubilidade; 4) conhecimento das propriedades físicas do soluto. Altas pressões nem sempre são recomendadas para matrizes complexas, pois a alta solubilidade dos solutos pode gerar extratos complexos de difícil análise (Pourmortazavi *et al.*, 2007).

O fluxo do fluido é importante se o processo for controlado pela resistência a transferência de massa externa (transferência do produto da superfície da matriz para o fluido), sendo a quantidade de fluido que entra no sistema determinante da razão de extração. Com baixa velocidade de fluxo, maior é a penetração na matriz. O tamanho de partícula é importante quando o processo é controlado pela resistência a transferência de massa interna, desde que pequenas partículas reduzem o caminho de difusão do solvente, além de aumentarem a superfície de contato. Contudo, partículas muito pequenas podem provocar o surgimento de canais dentro do leito de extração, nos quais parte do fluido adentra e não faz contato com o material a ser extraído ocasionando a perda de eficiência e diminuindo o rendimento do processo (Reverchon e De Marco, 2006; Pourmortazavi *et al.*, 2007).

3.5. Dados farmacológicos para o gênero *Valeriana*

3.5.1 Atividade sedativa e ansiolítica

Estudos realizados com valeranona, um dos componentes do óleo volátil de *V. officinalis*, exerceu um efeito hipotensor fraco em ratos na dose de 5 mg/kg. Com 100 mg/kg foi verificado um aumento do tempo de sono induzido por pentobarbital, quando administrado pela via i.p (intraperitoneal) e via oral. Também foi observada uma potenciação na queda da temperatura, prevenção a úlceras provocadas por estresse e perda da coordenação motora (Houghton, 1988; Morazzoni e Bombardelli, 1995). Outros componentes, como ácido valerênico e valerenal, provocaram decréscimo da atividade motora e ataxia, indicativos comuns para atividade sedativa. O ácido valerênico, na dose de 50 mg/kg, reduziu a atividade locomotora e, nas doses acima de 400 mg/kg, causou hemorragia, convulsão e morte (Morazzoni e Bombardelli, 1995).

Capasso e colaboradores (1996) investigaram o perfil farmacológico de um extrato aquoso liofilizado das partes aéreas de *V. adscendens*. O extrato reduziu a atividade locomotora e a coordenação motora, o comportamento estereotipado e prolongou o sono induzido por pentobarbital, nos camundongos tratados com 25, 50, 100 mg/kg, de modo dose dependente. Esses efeitos sugeriram propriedades sedativas.

Um extrato etanólico de raízes de *V. officinalis*, nas doses de 4,5 e 6 mg/kg, apresentou atividade anticonvulsivante contra picrotoxina e aumento do tempo de sono barbitúrico em camundongos (Hiller e Zetler, 1996).

Um estudo *in vitro* da interação de extratos, em diferentes sítios do complexo receptor GABA-benzodiazepínico, revelou que os extratos totais (aquosos e hidroalcoólicos), bem como a fração aquosa, apresentaram afinidade ao receptor GABA_A. A fração lipofílica (contendo ácidos valerênico), o ácido hidroxivalerênico e diidrovaltrato, não mostraram afinidade pelo sítio benzodiazepínico, contudo apresentaram afinidade pelo sítio barbitúrico e pelos sítios alostéricos que controlam o influxo de íons cloreto (Mennini *et al.*, 1993).

Extratos de *V. officinalis* e ácido valerênico demonstraram atividade agonista parcial em receptores 5-HT_{5a}. O extrato de éter de petróleo, na concentração de 50 µg/mL, inibiu em 86 % a ligação do ácido lisérgico dietilamida aos receptores 5-HT_{5a}, enquanto o extrato metanólico com igual concentração inibiu em 51 % (Dietz *et al.*, 2005).

O flavonóide 6-metilapigenina, isolado de extratos de raízes e rizomas de *V. wallichii* ligou aos receptores benzodiazepínicos com Ki de 495 nM (Wasowski *et al.*, 2002). A mesma substância promoveu um aumento do percentual de entradas e do tempo gasto nos braços abertos, no teste do labirinto em cruz elevada, indicando um efeito do tipo ansiolítico causado pela dose de 1 mg/kg, via i.p. (Marder *et al.*, 2003).

Marder e colaboradores (2003) testaram a atividade do flavonóide hesperidina, isolado de extratos de raízes e rizomas de *V. wallichii*. Na dose de 4 mg/kg, via i.p, apresentou uma ação depressora dose-dependente, indicada pelo decréscimo da atividade locomotora, redução da exploração e do número de levantamentos (*rearings*) no *holeboard* e aumento do tempo de sono induzido por tiopental. Contudo, não produziu atividade ansiolítica no labirinto em cruz elevado e não apresentou afinidade por receptores benzodiazepínicos. Através de uma análise isobolar foi determinada uma interação sinérgica entre diazepam e hesperidina nos testes de tempo de sono induzido por tiopental e *hole board*. Em vista disso, os autores sugeriram que benzodiazepínicos e hesperidina possam ser utilizados concomitantemente e, desse modo, viabilizar a redução das doses dos medicamentos benzodiazepínicos utilizados na terapêutica (Fernández *et al.*, 2005).

O flavonóide linarina, isolado de *V. officinalis*, também apresentou ação sedativa dose-dependente, em camundongos, no modelo de sono induzido por tiopental, em doses variando de 4 - 14 mg/kg (i.p). Porém, apesar do marcado efeito sedativo, o flavonóide linarina não apresentou atividade ansiolítica, nem afinidade pelo sítio benzodiazepínico (Fernández *et al.*, 2004).

Schumacher e colaboradores (2002) isolaram e identificaram oito lignanas a partir de um extrato metanólico de raízes de *V. officinalis*. Essas foram submetidas a

ensaios de ligação a diversos receptores como adenosina (A_1 e A_{2A}), serotonina ($5HT_{1A}$), sítio benzodiazepínico e $GABA_A$. Nenhum dos produtos isolados inibiu significativamente a ligação dos radioligantes aos receptores $5HT_{1A}$, benzodiazepínico ou $GABA$; exceção feita a 4'- O - β - D -glicosil-9- O -(6''-desoxisacarosil) olivila, que exibiu atividade agonista parcial em receptores de adenosina A_1 , sendo essa a primeira substância do tipo não nucleosídeo e que não possui estrutura química relacionada ao agonista fisiológico adenosina.

Um ensaio de interação com receptores de adenosina A_1 e A_{2A} foi conduzido com extratos secos padronizados de valeriana - VE-1 (*V. officinalis*), humulus - HE (*Humulus lupulus*) e com uma associação de valeriana e humulus denominado Ze 91019. O extrato de valeriana continha 0,388 % de ácidos valerênicos, livre de valepotriatos, enquanto que o extrato de humulus continha 0,479 % de flavonóides. O extrato fixo consistiu da associação de 250 e 60 mg do extrato seco padronizado de valeriana e humulus, por comprimido, respectivamente. O extrato Ze 91019 e o extrato de valeriana exibiram afinidade seletiva aos receptores A_1 em uma proporção quinze vezes maior que a afinidade por receptores A_{2A} . Através de experimentos de ligação de [35 S]GTP γ S, foi possível determinar que estes extratos possuem ação agonista de receptores de adenosina subtipo A_1 (Müller *et al.*, 2002).

Abourashed e colaboradores (2004) testaram os mesmos extratos acima citados em 14 subtipos de cinco classes de receptores centrais (dopamina, serotonina, melatonina e neuropeptídeo-Y). Os extratos apresentaram afinidade pelos receptores de melatonina (ML_1 e ML_2) e serotonina ($5-HT_{4e}$, $5-HT_6$ e $5-HT_7$). O extrato HE apresentou um IC_{50} de 21 μ g/mL para o receptor $5-HT_6$, enquanto Ze91019, foi de 180 μ g/mL. No receptor ML_1 , o IC_{50} foi de 450, 71 e 97 μ g/mL para VE, HE e Ze91019, respectivamente. Como o extrato de humulus é o componente minoritário da associação, os autores sugerem uma interação sinérgica entre HE (*H. lupulus*) e VE (*V. officinalis*) no receptor ML_1 .

Há na literatura vários relatos de ensaios clínicos realizados com preparações de *Valeriana*, entre os quais, são observados resultados controversos. Stevinson e Ernst

(2000) elaboraram uma revisão sistemática de ensaios duplo-cegos e placebo-controlados do uso de *V. officinalis* para tratamento da insônia. Foram avaliados diversos parâmetros experimentais, como variações no número de pacientes alocados por ensaio (8 a 128); tempo de duração do tratamento (3 a 28 dias); tipo de formulação administrada (extrato aquoso, extrato etanólico); dose diária (60 a 1215 mg), tipo de tratamento (agudo ou crônico); tipo de paciente (sadios e insones); idade (jovens e idosos) e orientação sob fatores que poderiam afetar o sono (consumo de álcool, cafeína e realização de exercícios físicos antes de dormir). Ao final da análise, concluíram que a massa de dados obtida não fundamentava a eficácia clínica de valeriana em casos de distúrbio do sono. Segundo os revisores, esta situação se deve a variabilidade no número de pacientes, a qualidade metodológica e ao delineamento dos estudos. Conclusões semelhantes foram descritas em ensaios clínicos mais recentes, nos quais a efetividade clínica das preparações não foi corroborada. Porém, foi salientada a necessidade de utilização de preparações padronizadas e a adequabilidade de delineamento em ensaios clínicos futuros (Bent *et al.*, 2006; Taibi *et al.*, 2007).

Um estudo duplo-cego, randomizado, avaliou a eficácia de um extrato etanólico de valeriana em 121 pacientes com distúrbios do sono. Os pacientes receberam, durante 28 dias, 600 mg do extrato ou placebo, diariamente. Foram utilizadas as escalas de humor, questionário de sono Gortelmayer e uma escala de impressões clínicas globais para avaliar a qualidade do sono. Após os 28 dias, foram observadas mudanças em todas as escalas do grupo tratado com extrato de valeriana, em relação ao placebo (Gyllenhaal *et al.*, 2000).

Um grupo de pesquisadores utilizou dez voluntários, que receberam cinco cápsulas idênticas contendo placebo (amido de milho), 10 mg de diazepam (controle positivo) e 600, 1200 e 1800 mg de um extrato padronizado de valeriana, uma vez por semana, durante cinco semanas. Os dados obtidos sugerem que a administração aguda do extrato padronizado de valeriana, pela manhã, em voluntários sadios, não altera o humor, nem prejudica a performance psicomotora / cognitiva (Gutierrez *et al.*, 2004).

O efeito da valeriana na arquitetura do sono tem sido explorado. Alguns pesquisadores mostraram que ocorreu um aumento no sono de ondas lentas (estágios 3 e 4), geralmente referido como sono profundo ou restaurador (Mcenany, 2000).

Um extrato hidroalcoólico padronizado de *V. edulis* (0,54 % de valepotriatos) e de *V. officinalis* (66 % de ácido valerênico), na dose 450 mg, foi administrado em vinte pacientes de ambos os sexos, com insônia, por quatro noites consecutivas. Os resultados mostraram que o extrato de *V. edulis* reduziu os episódios de despertar, enquanto ambos os tratamentos aumentaram o tempo do sono MOR (movimentos oculares rápidos). Efeitos benéficos na arquitetura do sono foram produzidos por ambos os extratos, pois diminuíram o tempo dos estágios 1 e 2 do sono não MOR e aumentaram o sono delta. Também reduziram a sonolência matutina e não afetaram a memória anterógrada (Arellano *et al.*, 2001).

Poyares e colaboradores (2002) investigaram a possibilidade de usar valeriana como um tratamento alternativo em pacientes usuários de longa data de benzodizepínicos. Dezenove pacientes foram submetidos à retirada gradual de benzodizepínicos e após receberam placebo, ou um extrato seco padronizado de valeriana (80 % diidrovaltrato, 15% valtrato e 5 % acevaltrato) por 15 dias. Os pacientes que receberam o extrato seco relataram uma maior satisfação do seu sono em relação aos pacientes do grupo placebo. Os autores sugeriram que esta percepção da melhora da qualidade de sono estava ligada a um moderado efeito ansiolítico. Também houve um aumento na frequência de ondas delta associado ao aumento percentual dos estágios 3 e 4 do sono de ondas lentas, que fez os autores acreditarem ser uma leve recuperação do processo do sono em usuários crônicos de benzodiazepínicos.

Existe um único ensaio clínico a respeito da atividade ansiolítica de *V. officinalis*. Os autores utilizaram uma formulação contendo uma mistura de valepotriatos, na dose de 81,3 mg/dia, por 4 semanas. Os dados preliminares sugeriram que os valepotriatos poderiam ter efeito ansiolítico potencial nos sintomas psíquicos da ansiedade (Andreatini *et al.*, 2002).

3.5.2 Atividades farmacológicas distintas

A espécie *V. officinalis* é a que apresenta maior número de relatos na literatura, porém outras espécies são usadas pela população em diversas partes do mundo. Preparações provenientes das diferentes espécies são utilizadas tradicionalmente para o tratamento de hipertensão, angina, palpitação, asma brônquica, cólica menstrual, espasmo gastrintestinal, diurese, hepatoprotetora e antidiarreica, além dos usos para tratamento de insônia, epilepsia, histeria e neurose (Duke, 1985; Houghton, 1988). A seguir, estão citados resultados encontrados por alguns pesquisadores que tem desenvolvido estudos considerando as utilizações tradicionais e a escassez de dados científicos que as corroborem.

- Ação depressora cardíaca, em órgão isolado de coelho, de uma solução extrativa alcoólica de *V. jatamansi* (Sajid *et al.*, 1996);
- Efeito vasodilatador do extrato de raízes de *V. officinalis* na rede vascular pulmonar em felinos, sendo mediado por um mecanismo GABA não seletivo (Fields *et al.*, 2003);
- Desenvolvimento de atividade imunomodulatória de polissacarídeos de *V. officinalis* através de testes mitogênicos em timócitos de ratos (Ebringerova *et al.*, 2003);
- Atividade neuroprotetora de soluções extrativas alcoólicas de *V. officinalis* em experimentos de toxicidade do peptídeo beta amilóide 25-35 Abeta, em cultura de neurônios hipocâmpais de rato (Malva *et al.*, 2004); e efeito neuroprotetor contra lipoperoxidação, induzida por diferentes agentes pró-oxidantes (Sudati *et al.*, 2009);
- Determinação de atividade antimicrobiana da fração óleo volátil de *V. officinalis* contra *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Saccharomyces cerevisiae* (Letchamo *et al.*, 2004) e da solução extrativa etanólica de *V. prionophylla* contra *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 607) (Macú, 2007);

- Atividade antiespasmódica e hipotensiva das frações clorofórmica e aquosa de *V. wallichii*, em preparações de jejuno de coelho e em ratos normotensos, mediadas através ativação canal K_{ATP} (Gilani *et al.*, 2005);
- Ação antiinflamatória do ácido valerênico e ácido acetilvalerenólico de *V. officinalis*, via inibição do $NF\kappa B$ em células *HeLa* (Jacobo-Herrera *et al.*, 2006);
- Propriedades anticoronarispástica, antiipertensiva e antibroncospástica em *Cavea* sp (cobaias) tratados com 50, 100 e 200 mg/kg, via oral, de uma solução extrativa etanólica (alto teor de valepotriatos) obtida de *V. officinalis* (Circosta *et al.*, 2007).

3.5.3 Estudos de toxicidade

Estudos de toxicidade demonstraram o efeito citotóxico e mutagênico de valepotriatos. Bounthanh e colaboradores (1981) testaram valtrato, diidrovaltrato e baldrinal, este um produto de degradação do valtrato, quanto à atividade citotóxica e antitumoral, em células de hepatoma de ratos, *in vitro*, e em camundongos fêmeas sofrendo de tumor ascítico KREBS II, *in vivo*, respectivamente. As três substâncias apresentaram citotoxicidade, porém valtrato foi o mais ativo levando a 100 % de mortalidade celular, após 24 horas de contato, na concentração de 33 $\mu\text{g/mL}$. Diidrovaltrato apresentou atividade antitumoral, promovendo uma rápida regressão dos ascites 24 horas após os camundongos terem sido tratados com 12,5 mg/mL intraperitonealmente.

Os valepotriatos valtrato, diidrovaltrato e desóxido-diidrovaltrato (análogo estrutural do diidrovaltrato, porém com uma ligação dupla entre C7-C8 no lugar do grupamento epóxido) são potentes inibidores da síntese de DNA e proteínas, sendo seus efeitos dependentes da dose e do tempo de exposição às células (Bounthanh *et al.*, 1983).

Alguns autores consideram que a citotoxicidade dos valepotriatos é devida, principalmente, à ligação dupla entre C5-C6 e que o grupo epóxido não é essencial. Bounthanh e colaboradores (1983) mostraram que valtrato é mais tóxico que diidrovaltrato, que não apresenta a ligação dupla entre C5-C6. Por outro lado, diidrovaltrato possui uma toxicidade similar ao desóxido-diidrovaltrato que, por sua vez, não possui o grupo epóxido ligado ao C8, mas uma ligação dupla entre C7-C8. Contudo, outros pesquisadores demonstraram que o grupo epóxido, presente nos valepotriatos, atua como um agente alquilante, induzindo, desse modo, citotoxicidade (Hobbs, 1989).

A possibilidade de utilização dos valepotriatos por mulheres grávidas, em substituição aos benzodiazepínicos, levou Tufik e colaboradores (1994) a investigarem os efeitos da administração prolongada destas substâncias em ratas grávidas. A administração de uma mistura de valepotriatos, contendo 80 % de diidrovaltrato, 15 % de valtrato e 5 % acevaltrato, nas doses de 6, 12 e 24 mg/kg, via oral, por um período de 30 dias, não alterou o tempo do ciclo estral, nem o número de fases estrais durante este período. Também não houve alteração do índice de fertilidade, e nenhuma mudança foi detectada no desenvolvimento das ninhadas cujas mães foram tratadas durante a gravidez. Na mesma linha de trabalho, Yao e colaboradores (2007) demonstraram que ratas tratadas diariamente, entre o 1°-8°, ou entre 8°-15° dias de gestação, com solução extrativa etanólica (45 %, *V. officinalis*), não apresentaram efeitos adversos na fertilidade ou no desenvolvimento fetal. Também não foram evidentes sinais de toxicidade materna.

Hui-Lian e colaboradores (2003) realizaram um estudo de genotoxicidade, no qual avaliaram a capacidade das vitaminas C e E de atenuar os danos causados no DNA de células endoteliais humanas, linhagem ECV304, induzidos por um extrato clorofórmico das raízes de uma espécie de valeriana (espécie não citada, obtida no mercado chinês). As células endoteliais (3 a 5×10^5 células) foram tratadas com diferentes concentrações do extrato clorofórmico (5, 10, 20, 40 e 60 $\mu\text{g/mL}$). Não foram observados danos no DNA das células tratadas com 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ do extrato clorofórmico, exceto nas células tratadas com 40 e 60 $\mu\text{g/mL}$. No extrato clorofórmico

foram identificados baldrinal, homobaldrinal, valtroxal e diidrovaltrato, sendo que a maioria configura produtos de degradação, exceto o diidrovaltrato.

Vo e colaboradores (2003) investigaram os efeitos provocados pela administração oral do óleo volátil de valeriana, no fígado de ratos e em cultura de células de hepatoma humana. Os animais foram tratados agudamente com 8 mL/kg (doses de 0,31, 3,1 e 18,6 g/kg) e cronicamente com a dose de 3,1 g/kg, por 28 dias. Após tratamento agudo (24 horas), não ocorreu redução do fluxo de bile, modificação da atividade enzimática (alanina aminotransferase, glutamil transpeptidase e fosfatase alcalina) e dano histológico. Houve um aumento de morte celular nas culturas de células incubadas com 20 mg/mL de extrato de valeriana. Os autores concluíram que a toxicidade demonstrada *in vitro* é de 2 – 3 ordens de magnitude de grandeza das doses recomendadas para uso humano.

Estudos genotóxicos foram conduzidos em camundongos tratados com 500, 1000 e 2000 mg/kg/dia de uma suspensão aquosa (elaborada a partir de cápsulas contendo 800 mg de raiz de valeriana e 200 mg de um extrato seco padronizado em 0,8 % de ácidos valerênicos), via gavagem, durante 7 dias. Os resultados mostraram aberrações nos cromossomas testiculares e anormalidades nos espermatozóides (Al-Majed *et al.*, 2006).

Em um estudo produzido com a finalidade de determinar parâmetros de segurança de utilização de plantas comumente utilizadas como medicinais no México, foi demonstrado que uma solução extrativa produzida a partir de *V. procera*, com uma mistura metanol e diclorometano (1:1), induziu mutação na cepa (TA98) de *Salmonella typhimurium* pelo teste de Ames (Déciga-Campos *et al.*, 2007).

Derivados acilados de valepotriatos, conhecidos como jatamanvaltratos identificados em *V. wallichii*, e valepotriatos foram submetidos a testes de citotoxicidade para adenocarcinoma de pulmão (A549), câncer de próstata metastático (PC-3M), câncer de cólon (HCT-8) e linhagens celulares de hepatoma (Bel7402). Acetoxi diidrovaltrato hidrina, IVHD-valtrato, 5-hidroxi diidrovaltrato, valtrato e acevaltrato foram citotóxicos em todas as culturas celulares, sendo considerado acevaltrato o produto

mais ativo (IC_{50} = 2,9, 1,4, 1,0 e 1,7 μ M, respectivamente as culturas celulares citadas). Os jamanvaltratos foram ativos somente contra a linhagem de câncer de próstata metastático (IC_{50} entre 1,4 e 6,3 μ M) (Lin *et al.*, 2009).

3.6 Insônia, ansiedade e depressão

A insônia é um transtorno primário dissonal e pode ser definida como a crença de que não se está dormindo adequadamente (Guimarães, 1999; Sthal, 2000). Enquanto altos níveis de ansiedade e depressão são evidentes em pacientes com insônia, há também elevados percentuais de distúrbios de sono em pacientes com desordens de ansiedade e depressão. Evidências sugerem a existência de um forte entrelaçamento entre as mesmas, trazendo implicações para as intervenções e conceitualizações teóricas (Jasson-Fröjmark e Lindblom, 2008). Distúrbios de sono, geralmente, reduzem com o tratamento da depressão; por outro lado, tem sido demonstrado que a insônia aumenta o risco de recorrência de episódios depressivos (Jindal e Thase, 2004). Buckner e colaboradores (2008) mostraram que sintomas da depressão foram mediadores de uma relação entre ansiedade e desordens do sono.

Os neurotransmissores envolvidos na regulação da vigília são: catecolaminas, acetilcolina, histamina, glutamato, aspartato e os peptídeos hipocretina e orexina; e os envolvidos na regulação do sono: serotonina, GABA, adenosina, acetilcolina, e outros fatores como citocinas, reguladores do hormônio de crescimento e prolactina (Rosenthal, 1998; Ursin, 2002; Stenberg, 2007).

Em um estudo preliminar em humanos, foi constatada uma redução dos níveis de GABA em indivíduos com insônia primária em relação aos indivíduos normais (Winkelman *et al.*, 2008). Outras investigações têm demonstrado que agonistas não específicos para os receptores 5-HT_{2A/2C} aumentam a vigília e inibem o sono de ondas lentas, enquanto antagonistas, como ritanserina, seganserina e eplivanserina aumentam a duração do sono não MOR (Landolt e Wehrle, 2009).

A maioria dos medicamentos hipnóticos-sedativos utilizados no tratamento da insônia liga-se ao receptor GABA. Benzodiazepínicos agem em subtipos de receptores

GABA_A contendo as subunidades α_1 , α_2 , α_3 e α_5 e a subunidade γ_2 . Estudos usando camundongos *knock-in* mostraram que a subunidade α_1 media as ações sedativa e amnésica e a subunidade α_2 media a ação relaxante muscular (Winsky-Sommerer, 2009). Além dos benzodiazepínicos, outros fármacos são utilizados no tratamento da insônia, incluindo fármacos não benzodiazepínicos como: zolpidem (liga-se seletivamente na subunidade α_1 do receptor GABA_A); zaleplon (age no sítio tipo 1 benzodiazepínico do complexo GABA_A); eszopiclona (liga ao receptor GABA_A); e ramelteon (age como agonista receptor de melatonina (MT1 e MT2); e fármacos antidepressivos, que apresentam efeitos menos pronunciados na indução do sono. Os mecanismos que explicam o efeito sedativo dos antidepressivos incluem o agonismo em receptor histaminérgico (H₁), antagonismo em receptor serotoninérgico 5HT₂ e antagonismo em receptor α_1 adrenérgico. Na prática clínica, baixas doses de antidepressivos sedativos são utilizadas para tratamento da insônia em indivíduos não deprimidos (Curry *et al.*, 2006; Tariq *et al.*, 2008).

A ansiedade é determinada por um grupo característico de respostas comportamentais e fisiológicas, incluindo esquivas, vigilância e atenção, que são evocadas para proteger o indivíduo de algum perigo eminente (Gross e Hen, 2004). A suscetibilidade de um indivíduo à ansiedade ao longo da vida está relacionada ao estágio inicial de desenvolvimento, podendo ser determinada pela interação da influência genética e fatores ambientais. De acordo com DSM-IV, a desordem de ansiedade generalizada é caracterizada por uma ansiedade patológica longa (> 6 meses), enfatizada por uma preocupação incontrolável. Pelo menos a associação de três sintomas somáticos ou psíquicos são requeridas para o diagnóstico, incluindo agitação, fadiga, tensão muscular, irritabilidade, dificuldade de concentração e distúrbios do sono (Gorman *et al.*, 2002).

Diferentes aspectos da resposta ansiolítica são mediados por vários neurotransmissores em áreas cerebrais anatomicamente distintas. Deste modo, o foco da pesquisa tem sido primariamente o complexo GABA-benzodiazepínico, o sistema noradrenérgico e o serotoninérgico (Gorman *et al.*, 2002).

O GABA (ácido gama-aminobutírico) é o neurotransmissor inibitório majoritário do SNC de mamíferos e pode se ligar a três diferentes subtipos de receptores: GABA_A e GABA_C, que são canais transmembrana carreadores de cloreto; e GABA_B, um receptor tipo metabotrópico acoplado a proteínas G (Bormann, 2000; Chebib e Johnston, 2000; Bettler e Tiao, 2006). Todos esses receptores são formados por subunidades protéicas sendo que já foram identificados 19 diferentes tipos de subunidades, a saber: α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , ρ_{1-3} (Möhler, 2006; Winsky-Sommerer, 2009). As diferentes combinações possíveis entre as subunidades levam à expressão dos sítios de ligação presentes no complexo (Möhler *et al.*, 1995; Nutt e Malizia, 2001). Benzodiazepínicos são moduladores alostéricos da neurotransmissão gabaérgica potencializando a habilidade do GABA em aumentar a condutância dos íons cloreto através do canal (Stahl, 2000). A ativação de receptores benzodiazepínicos por agonistas inversos pode induzir a sintomas comportamentais, neuroquímicos e autonômicos associados à ansiedade (Gorman *et al.*, 2002).

A serotonina produz seus efeitos através de uma variedade de receptores acoplados à membrana, que estão localizados pré e pós sinapticamente nos nervos terminais e nos corpos celulares serotonérgicos através do sistema nervoso central, (Barnes e Sharp, 1999; Hoyer *et al.*, 2002; Gorman *et al.*, 2002). Com exceção do receptor 5HT₃, que é um canal iônico, os receptores serotonérgicos são receptores acoplados à proteína G, representados por sete famílias: 5HT₁, (subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} e 5-HT_{1F}); 5HT₂ (subtipos 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}); 5ht₅ (5ht_{5a} e 5ht_{5b}); 5HT₄; 5ht₆; e 5HT₇ (Barnes e Sharp, 1999; Hoyer *et al.*, 2002).

De modo geral, os receptores 5HT₁ e 5HT₂ são os mais proeminentes na modulação de respostas ansiolíticas. A ativação dos receptores 5HT_{1A} causa hiperpolarização neuronal, um efeito mediado através dos canais de K⁺ acoplados à proteína G (Hoyer *et al.*, 2002). De acordo com dados de eletrofisiologia e estudos de microdiálise, agonistas do receptor 5HT_{1A} induzem uma queda na liberação de serotonina, um efeito que envolve os autoreceptores presentes núcleo da *raphe* (Barnes e Sharp, 1999). Em experimentos com camundongos *knockout* para receptor 5HT_{1A}, foi demonstrado um aumento da ansiedade dos animais em diferentes

paradigmas experimentais, com diminuição do tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, no centro do campo aberto e perfil exploratório de novos objetos (Hoyer *et al.*, 2002).

Os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico não funcionam independentemente um do outro e há dados que sugerem que as desordens de ansiedade podem provir de uma desregulação entre estes sistemas, sendo que evidências apontam para uma hiperatividade do sistema noradrenérgico e diminuição da função do sistema serotoninérgico (Gorman *et al.*, 2002).

O tratamento da desordem de ansiedade generalizada inclui medidas não farmacológicas, como psicoterapia, e o uso de ansiolíticos e antidepressivos, como benzodiazepínicos, azapironas (buspirona), antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptção de serotonina e inibidores da recaptção de serotonina e norepinefrina (Cheetham e Heal, 2000; Gorman *et al.*, 2002).

A depressão é uma condição médica comum, crônica e recorrente. Está frequentemente associada a incapacitação funcional e comprometimento da saúde física. Os episódios depressivos podem ser classificados em episódios leve, moderado e grave, que são caracterizados pelos sintomas fundamentais (humor deprimido, perda de interesse e fadigabilidade) e acessórios (concentração e atenção reduzidas, auto-estima e autoconfiança reduzidas, idéias de culpa e inutilidade, visões desoladas e pessimistas do futuro, idéias ou atos autolesivos ou suicídio, sono perturbado e apetite diminuído) (Flecka *et al.*, 2003).

As intervenções mais utilizadas no tratamento da depressão são psicoterapia, farmacoterapia e terapia eletroconvulsiva (Rakofsky *et al.*, 2009). Os medicamentos utilizados são os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), os inibidores da recaptção de serotonina e norepinefrina (IRSN), os antidepressivos tricíclico e tetracíclicos (AT), os inibidores da monoamino oxidase (IMAO) e os antidepressivos atípicos (mirtazapina, trazodona, nefazodona e bupropiona). Os mecanismos de ação dos AT, ISRS e IRSN envolvem a inibição de recaptção de norepinefrina e/ou serotonina no terminal pré-sináptico. Os IMAO inibem a monoamino oxidase, enzima

responsável pela degradação de norepinefrina, serotonina e dopamina no terminal pré-sináptico. Os antidepressivos atípicos bloqueiam ou estimulam um ou mais receptores monoaminérgicos pré-sinápticos e/ou pós-sinápticos (Rakofsky *et al.*, 2009).

Os ISRS são os fármacos antidepressivos mais frequentemente prescritos, por serem bem tolerados e não apresentarem efeitos adversos severos (Celada *et al.*, 2004). Contudo, devido a elevados índices de depressão persistente, associados a aumento do risco de suicídio e doenças cardiovasculares, algumas alternativas estão sendo investigadas, tais como: inibidores da recaptação de serotonina, norepinefrina e dopamina (inibidores da recaptação tripla, por exemplo, tesofensina); os antipsicóticos atípicos (risperidona, clozapina, olanzapina, aripiprazol e ziprasidona) e agonistas dos receptores dopaminérgicos D2/D3 (pramipexol e ropinirol) (Rakofsky *et al.*, 2009); antagonistas do receptor do fator de liberação da corticotropina (R121919, que mostrou efeito antidepressivo em modelos animais de depressão); inibição da função de glicocorticóides (o composto mifepristona, antagonista do receptor glicocorticóide 2, apresentou eficácia antidepressiva em pacientes com depressão crônica); antagonistas do receptor NK-1 (as substâncias L-759274 e CP-122721 foram antidepressivas em estudos pilotos clínicos e GR-205171 foi antidepressivo em modelos animais); antagonistas do receptor de glutamato (a infusão de cetamina, um antagonista de receptor NMDA, produziu ação antidepressiva em um paciente resistente aos tratamentos correntes); e agonistas de receptores de melatonina M1 e M2 (aglomantina apresentou atividade antidepressiva em ensaios clínicos) (Rakofsky *et al.*, 2009).

Embora haja diferenças na neurobiologia da ansiedade e depressão, há alguma sobreposição entre estas duas desordens a respeito do envolvimento dos sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos e na relação entre eles na mediação dos sintomas. Alguns sintomas de pacientes com desordem de ansiedade generalizada, como deterioramento da função cognitiva e distúrbios do sono, também são encontrados em pacientes com depressão (Gorman *et al.*, 2002). Outras áreas em avanço no estudo da desordem depressiva envolvem estudos de rotas de sinalização intracelulares (Manji *et al.*, 2001) e neurotransmissão não sináptica (Kiss, 2008).

No Brasil, foram criadas as Diretrizes da Associação Médica Brasileira para o

tratamento da depressão, que tem por objetivo o fornecimento de subsídios para o incremento da possibilidade de diagnóstico de novos casos de depressão; o oferecimento de uma abordagem racional para o tratamento de depressão definindo quais casos tratar, e como tratar; e a conscientização dos profissionais da importância do seu papel na redução do impacto da morbi-mortalidade e na melhoria da qualidade de vida dos pacientes com depressão (Flecka *et al.*, 2003).

3.7 Bomba adenosina trifosfatase sódio e potássio (Na⁺K⁺ATPase)

A enzima Na⁺K⁺ATPase, presente na membrana plasmática de todas células eucarióticas, usa a energia proveniente da hidrólise de uma molécula de ATP para transportar dois íons potássio e três íons sódio (potássio para dentro e sódio para fora da célula) contra seu gradiente eletroquímico (Blanco e Mercer, 1998; Lichtsein e Rosen, 2001). O gradiente eletroquímico gerado por esta enzima é crítico para a manutenção do balanço osmótico da célula, do potencial de membrana de muitos tecidos e das propriedades excitáveis de células musculares e nervosas. Além disso, o gradiente de Na⁺ fornece a energia para os transportadores acoplados a Na⁺, aqueles responsáveis pela translocação de íons (H⁺, Ca²⁺, Cl⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻), substratos (glicose e aminoácidos) e neurotransmissores através da membrana plasmática (Blanco e Mercer, 1998; Goldstein *et al.*, 2006).

A Na⁺K⁺ATPase é um oligômero constituído por três polipeptídeos denominados subunidades α , β e γ ou FXYD. A subunidade α é responsável pelas propriedades catalíticas e transportadoras da enzima, e contém os sítios de ligação para cátions, ATP e para o inibidor ouabaína. A subunidade β é essencial para a atividade normal da enzima e parece estar envolvida na oclusão de K⁺ e na modulação da afinidade da enzima por Na⁺ e K⁺ (Blanco e Mercer, 1998). A subunidade γ ou FXYD parece modular a função enzimática, adaptando as propriedades cinéticas do transporte ativo de Na⁺ e K⁺, conforme as necessidades específicas das diferentes células (Nesher *et al.*, 2007).

São descritas na literatura quatro isoformas α estruturalmente distintas, identificadas como α_1 , α_2 , α_3 e α_4 , três isoformas β , identificadas como β_1 , β_2 , e β_3 e 7 isoformas FXYD (Nesher *et al.*, 2007). A isoforma $\alpha_1\beta_1$ é a principal isoenzima dos rins; a subunidade α_2 predomina nos adipócitos, músculos, coração e cérebro; a subunidade α_3 é abundante nos tecidos nervosos e a subunidade α_4 é encontrada somente nos testículos. Os neurônios são a fonte principal do polipeptídeo α_3 , enquanto as células gliais expressam preferencialmente α_2 . Todas as isoformas β são distribuídas de modo tecido dependente; a isoforma β_2 é encontrada no músculo esquelético, na glândula pineal e no tecido nervoso, enquanto a isoforma β_3 está presente nos testículos, retina, fígado e pulmões (Blanco e Mercer, 1998).

As diferentes afinidades encontradas entre os esteróides cardiotônicos e a enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ são devidas à diversidade estrutural destas substâncias, bem como a heterogeneidade da bomba proveniente da associação das isoformas α e β em diferentes $\alpha\beta$ heterodímeros (Blanco e Mercer, 1998). Foi demonstrado que as subunidades β e FXYD também afetam a ligação dos cardiotônicos, desse modo a complexidade de isoformas (84 possibilidades) determina a natureza de interação entre heterosídeos cardiotônicos e $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (Nesher *et al.*, 2007).

Acúmulos de evidências sugerem que a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ cerebral pode estar envolvida na etiologia das desordens mentais (Nesher *et al.*, 2007). Alguns autores demonstraram que a inibição da bomba por ouabaína, ou por mudanças na composição iônica extracelular, estimulou a liberação de acetilcolina, noradrenalina e GABA em fatias de hipocampo e outras regiões cerebrais. Em contrapartida, a estimulação da atividade enzimática inibiu a liberação de neurotransmissores (Lichstein e Rose, 2001).

Goldstein e colaboradores (2006) levantaram a hipótese de participação da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ e compostos tipos digitálicos endógenos na patogenia de desordens de humor. Foi demonstrada uma redução da ligação de [^3H] ouabaína na subunidade α em frações sinaptossomais de cérebro de indivíduos com transtorno bipolar, quando comparada a indivíduos com depressão e esquizofrenia.

Concomitantemente, foi demonstrado que o nível de substâncias tipo *digitalis* endógenas foi mais elevado no cérebro de pacientes afetados com transtorno bipolar quando comparados aos considerados normais ou afetados de outra doença mental.

O efeito de um modelo de depressão (estresse crônico moderado) na atividade $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ em membranas sinápticas de hipocampo de rato com e sem a administração crônica de fluoxetina foi estudado. A atividade enzimática diminuiu cerca de 20 % nos ratos submetidos ao modelo experimental de depressão. Além disso, a administração de fluoxetina por si só aumentou a atividade da enzima em torno de 20 % e reverteu o decréscimo causado pelo modelo empregado (Gamaro *et al.*, 2003). Seguindo a mesma linha de investigação, Vasconcelos e colaboradores (2005) demonstraram que a administração de lítio em ratos submetidos a modelo experimental de depressão foi capaz de prevenir os efeitos do estresse crônico na atividade $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, bem como os animais estressados cronicamente e tratados com lítio mostraram o mesmo nível de atividade enzimática que os controles.

Além dos compostos digitálicos, clássicos inibidores da atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, estão sob investigação outras substâncias. Dois diterpenos isolados de uma espécie de alga brasileira (*Dictyota cervicornis*) inibiram a atividade $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ em preparações de rim e cérebro de *Cavea aperea* (cobaia) (Garcia *et al.*, 2009). Soluções extrativas hexânicas de duas plantas (*Cyperus rotundus* e *Orthosiphon aristatus*), utilizadas tradicionalmente na Tailândia para tratamento de disúria (dificuldade de urinar), mostraram efeito inibitório sobre a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ em preparados de cérebro de rato (Ngamrojanavanich *et al.*, 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

4.1.1 Identificação botânica

Partes aéreas e subterrâneas de *Valeriana eichleriana*, *V. eupatoria*, *V. glechomifolia*, *V. salicariifolia* e *V. scandens*, nativas do Rio Grande do Sul, foram coletadas na região dos Aparados da Serra – município de São José dos Ausentes, identificadas por Marcos Sobral (Departamento de Botânica – UFMG) e Sérgio Bordignon (Departamento de Botânica - ULBRA); selecionadas, logo após a coleta. As exsiccatas foram depositadas no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS-ICN).

4.1.2 Tratamento do material vegetal

Imediatamente após a coleta, as plantas foram submetidas à secagem, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz direta e umidade, exceto a espécie *V. glechomifolia* que foi congelada e liofilizada. Após secagem, os diferentes órgãos (caules, folhas e inflorescências) foram separados, submetidos à cominuição em moinhos de facas e armazenados em *freezer*.

4.2 Condições extrativas, análise cromatográfica, isolamento

4.2.1 Valepotriatos

O material vegetal, seco e cominuído, foi submetido à maceração com diclorometano (proporção droga vegetal:solvente 1:5), em banho de ultrassom durante trinta minutos, com dez repetições. Após, a solução extrativa foi levada a *secura*, em evaporador rotatório, a temperaturas inferiores a 40 °C para evitar degradação (figura

4.1). Parte desse extrato foi armazenada em *freezer* para posterior uso em ensaios farmacológicos, e o restante, particionado para obtenção de valepotriatos.

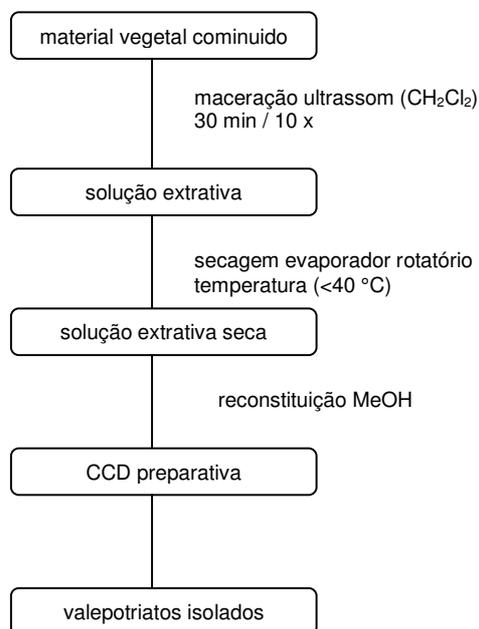


Figura 4.1: esquema do procedimento de extração e isolamento de valepotriatos.

A caracterização química dos valepotriatos nas soluções extrativas de diclorometano obtidas de *V. eichleriana*, *V. eupatoria*, *V. glechomifolia*, *V. salicariifolia* e *V. scandens* foi realizada por CCD analítica, juntamente com substâncias padrões de referência em cromatoplasas revestidas com gel de sílica GF₂₅₄, em cuba saturada. Os sistemas eluentes foram diclorometano:metanol (100:1 v/v), tolueno:acetato de etila:metiletilcetona (80:15:5, v/v) e tolueno:acetato de etila (75:25, v/v). Após a secagem em temperatura ambiente, as placas foram aspergidas com os agentes cromogênicos solução etanólica de vanilina sulfúrica clorídrica a 1 % (m/v), 2,4-dinitrofenil-hidrazina e ácido clorídrico:ácido acético (8:2, v/v), respectivamente, seguido de aquecimento.

Para o isolamento dos valepotriatos a solução extrativa diclorometânica foi reconstituída com metanol e submetida à cromatografia em camada delgada

preparativa (CCD preparativa), em placas de vidro (20 x 20 cm), com adsorvente gel de sílica GF₂₅₄, na espessura de 0,50 mm, preparadas por meio de conjunto DESAGA[®]. O sistema eluente foi diclorometano:metanol (100:1, v/v) e a detecção mediante observação dos cromatogramas sob luz ultravioleta em comprimento de onda de 254 nm. As substâncias foram retiradas da sílica com diclorometano:metanol (95:5, v/v), filtradas através de funil de vidro sinterizado e evaporadas até a secura em evaporador rotatório em temperatura inferior a 40 °C.

Os compostos foram caracterizados por comparação cromatográfica com valepotriatos previamente isolados de *V. glechomifolia* e com valores de R_f de substâncias de referência.

4.2.2 Flavonóides

Para avaliação de flavonóides, a matéria-prima vegetal cominuída foi extraída com metanol, por maceração em banho de ultrassom por trinta minutos, com dez repetições (proporção droga vegetal:solvente 1:5), seguindo-se a secagem em evaporador rotatório. A solução extrativa metanólica foi ressuspensa em água, no menor volume possível, e filtrada para eliminar eventuais partículas em suspensão. O filtrado foi colocado em uma pera de separação, lavado com éter etílico (volume correspondente à metade do volume de água, cinco vezes), para remoção de clorofila, e particionado com acetato de etila (volume correspondente a metade do volume de água, cinco vezes). As fases, etérea e acetato de etila, foram secas em evaporador rotatório, enquanto a fase aquosa foi congelada e liofilizada (figura 4.2).

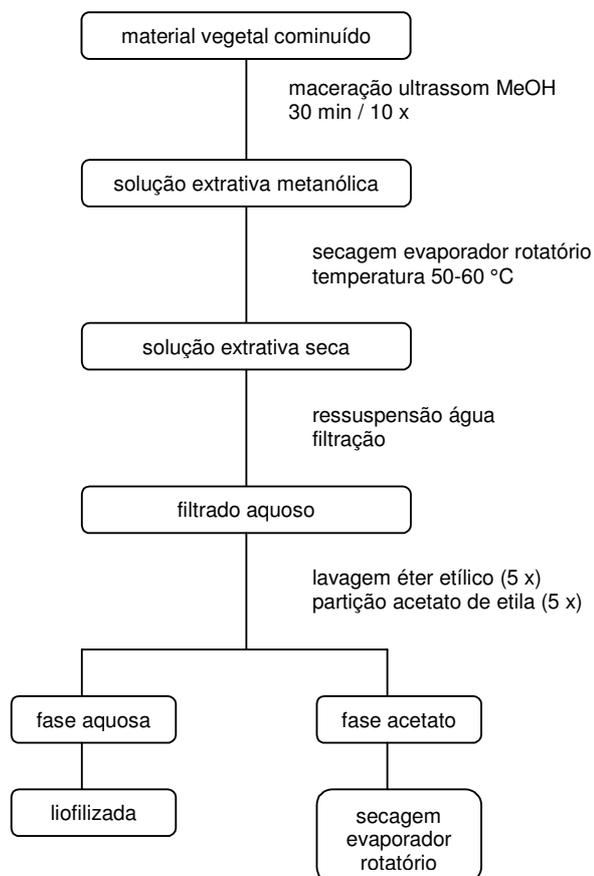


Figura 4.2: esquema de extração dos flavonóides.

A caracterização química dos flavonóides nas diferentes amostras foi realizada por CCD analítica, em cromatoplasas revestidas com gel de sílica GF₂₅₄, com sistema eluente acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10, v/v). Após a secagem em temperatura ambiente, as placas foram aspergidas com reagente natural e observadas sob luz ultravioleta (365 nm).

Para o isolamento de flavonóides, a fase acetato foi submetida à filtração a vácuo sobre sílica gel 60 G e lavada com uma sequência dos solventes, diclorometano, acetato de etila, acetato de etila e metanol (50:50, v/v) e metanol. Todas as frações foram secas em evaporador rotatório em temperaturas não excedentes a 60 °C. Após a avaliação das frações por CCD, submeteu-se a fração com o maior conteúdo de

substâncias (fração acetato de etila:metanol 50:50, v/v) à cromatografia em coluna utilizando como sistema eluente acetato de etila: metanol em misturas de polaridade crescentes e fase fixa sílica gel 60 G (figura 4.3).

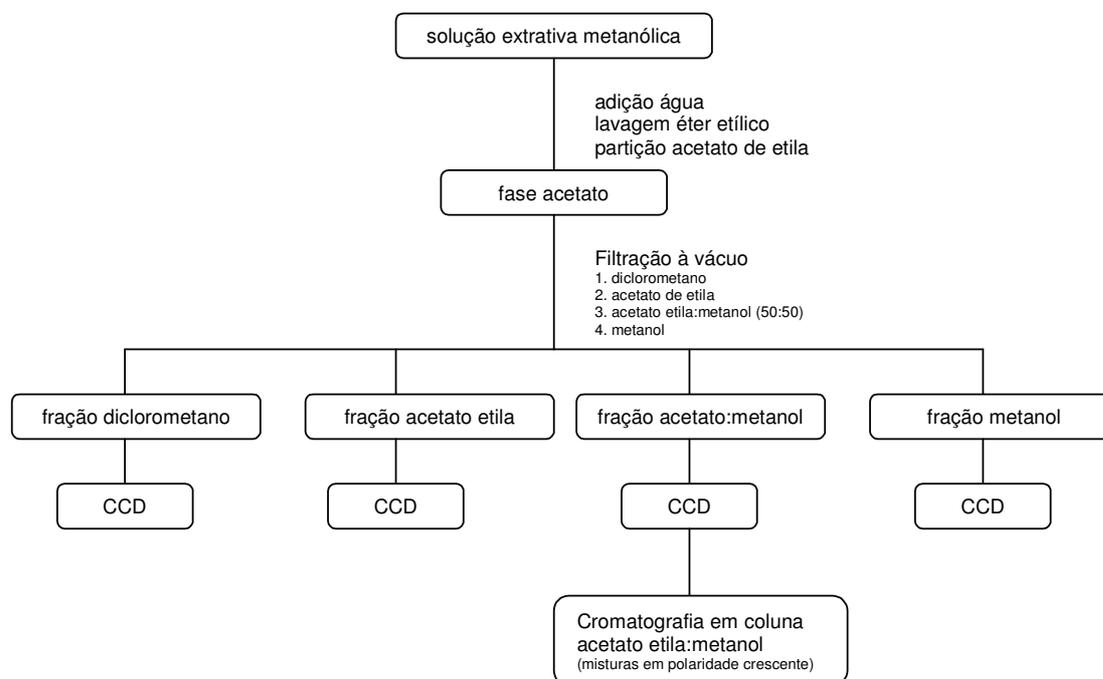


Figura 4.3: esquema do procedimento de isolamento de flavonóides.

Para os ensaios farmacológicos *in vivo* (modelos animais de ansiedade e sedação) foi obtida uma fração metanólica enriquecida em flavonóides. Para tanto, o material vegetal, esgotado previamente com diclorometano, foi submetido à maceração em ultrassom (por trinta minutos, com dez repetições, proporção droga vegetal:solvente 1:5). Os extratos foram reunidos e levados à secura em evaporador rotatório.

4.3 Obtenção de extratos de *V. glechomifolia* com fluido supercrítico e quantificação por CLAE

4.3.1 Obtenção das frações com CO₂ supercrítico

Um extrator por fluido supercrítico consiste de um tanque de fase móvel, geralmente CO₂, uma bomba pressurizadora de gás, um forno contendo o recipiente de extração, um restritor para manter a pressão alta na linha de extração, e um recipiente captor (figura 4.4).

O material vegetal cominuído (cerca de 140 g) foi acondicionado no recipiente de extração, mantido a temperatura de 40 °C, e submetido a quatro extrações sequenciais com CO₂ supercrítico nas pressões de 90, 120, 150 e 200 bar, durante 40 minutos/pressão. A cada 10 minutos, o recipiente captor era removido do equipamento e colocado em estufa de ar circulante (temperatura de 40 °C) para secagem da amostra. Os compostos obtidos nos diferentes tratamentos foram analisados por CCD e CLAE.

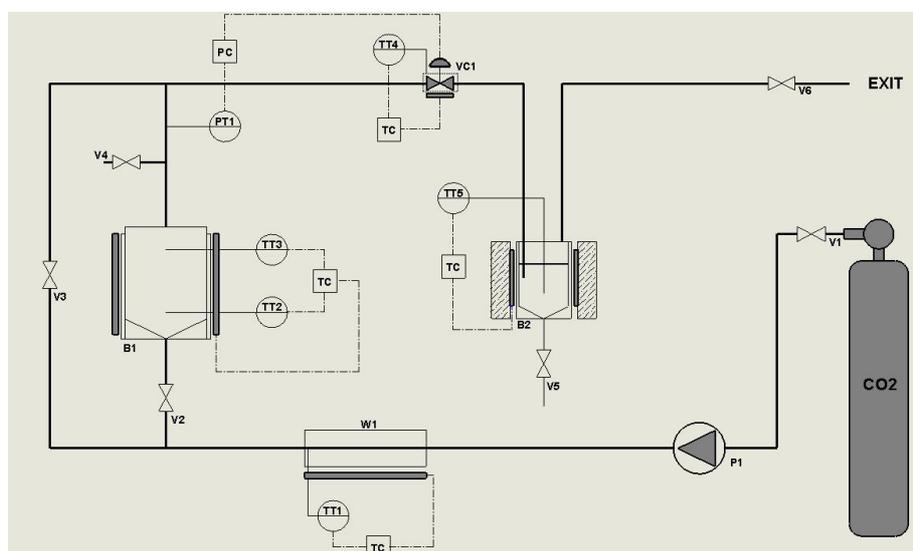


Figura 4.4: esquema do extrator: P1 - bomba de alta pressão; W1 - aquecedor; B1 - vaso extrator; B2 - vaso coletor; VC1 - válvula de controle de pressão; TC - controlador de temperatura; V1 - V6 - válvulas de controle de saída do gás).

4.3.2 Quantificação de valepotriatos por CLAE

Nos extratos obtidos pelos diferentes tratamentos foi determinado o teor de valepotriatos através de CLAE, de acordo com o método validado por Silva (2001). O sistema eluente utilizado foi acetonitrila:água (50:50, v/v), coluna de fase reversa Nova Pack[®] (3,9 x 150 mm; partícula de 4 µm) e detector ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm. Para a quantificação, foram realizados curvas padrão das substâncias de referência valtrato, acevaltrato e 1-β-acevaltrato, previamente isolados da solução extrativa diclorometânica de *V. glechomifolia*. As concentrações das curvas de valtrato e acevaltrato foram: 3,90; 7,81; 15,63; 31,25; 62,50; 125 e 250 µg/mL e de 1-β-acevaltrato foi 15,63; 31,25; 62,50; 125; 250 e 500 µg/mL. As amostras foram adequadamente pesadas, ressuspendidas em metanol (grau HPLC) e filtradas através de membranas de 0,22 µm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 Ensaios Farmacológicos

4.4.1 Material biológico

Para os experimentos comportamentais foram utilizados camundongos CF1, machos, adultos (20-30 g), provenientes da colônia da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Antes dos experimentos, os animais foram ambientados por um período mínimo de 72 horas no biotério de passagem da Faculdade de Farmácia - UFRGS, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura controlada (23 ± 2 °C), sistema de exaustão e umidade monitorada. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (17x28x13 cm) com no máximo oito animais em cada, com livre acesso à água e alimento (ração certificada NUVILAB[®]), exceto nas seis horas precedentes à administração dos tratamentos. Os camundongos foram ambientados à sala de experimentação por um período mínimo de uma hora antes da realização dos experimentos, exceto no teste do labirinto em cruz elevado, onde o período de habituação foi de duas horas. Todos os experimentos comportamentais foram

realizados no período compreendido entre as 10 e 16 horas, em sala climatizada, sob luz difusa (penumbra). Para os ensaios bioquímicos foram utilizados ratos Wistar (*Ratus norvegicus* albinos), machos, adultos, pesando entre 250 - 300 g.

4.4.2 Ética

A manipulação animal foi realizada seguindo os princípios éticos para experimentação animal relatados por Goldim (1995) e as normas do Conselho Canadense de Cuidados com Animais (CCAC, 2003), do *Centre National de la Recherche Scientifique* da França (CNRS, 2000) e da Resolução número 714, de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Imediatamente após a finalização do experimento, um experimentador capacitado efetuou o sacrifício do animal por deslocamento cervical. A carcaça animal foi acondicionada em embalagem plástica apropriada e conservada em *freezer* a -20°C até ser recolhida pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Porto Alegre. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Universidade processo nº 2007818, na reunião nº 21, ata nº 101, de 28/02/2008 e de acordo com a Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP-Universidade Federal do Rio de Janeiro).

O descarte dos resíduos químicos seguiu o procedimento padrão usual da Faculdade de Farmácia – UFRGS. Os resíduos gerados foram devidamente rotulados e entregues à Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT) da Faculdade de Farmácia que, por sua vez, encaminhou ao Instituto de Química da UFRGS para os devidos procedimentos de reciclagem e/ou descarte de material químico.

4.4.3 Tratamentos

O tamanho da amostra foi definido utilizando-se o cálculo amostral do Programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific Corporation®), considerando-se a utilização de Análise

de Variância (ANOVA, uma via) para verificação de diferenças, uma diferença mínima esperada de 30% de desvio padrão de 10 (Marder *et al.*, 2003), α 0,001 e poder do teste de 0,9. Como controles, foram empregadas solução salina misturada a TWEEN 80 1 %, suspensão de diazepam 2 mg/kg e solução de imipramina 20 mg/kg (teste da natação forçada).

As soluções extrativas de valepotriatos e de flavonóides, bem como os fármacos foram dissolvidos em solução salina (0,9 g%) com auxílio de polissorbato 80 1 % (Tween 80[®]) e aparelho de ultrassom. O volume de administração foi de no máximo 1mL/100g.

4.4.4 Ensaios bioquímicos

Foram realizados ensaios de radioligação aos receptores benzodiazepínico e serotoninérgico (5HT_{1A}), em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos, e ensaios de avaliação da atividade enzimática Na⁺K⁺ ATPase *in vitro*. Essa etapa do trabalho foi realizada no laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a supervisão dos professores Drs. François Noel e Luís Quintas.

4.4.4.1. Preparação das membranas sinaptossomais (receptor benzodiazepínico)

Cérebros foram obtidos de ratos machos adultos sacrificados por decaptação. Foram utilizados 4,2116 g de órgão. Em seguida à dissecação, o tecido foi homogeneizado em aparelho motorizado (FISATON[®]), com pistão de teflon em *Potter* com 15 volumes (mililitros de solução por grama de tecido) de solução de sacarose 0,32M. Após várias passagens do pistão em velocidade de grau 3, durante 30 segundos, o *Potter* foi colocado no gelo por 1 minuto. Essa operação foi repetida três vezes. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 1000 g_{max}, por 10 minutos a 4 °C, do qual se obteve o sobrenadante, que foi reservado a 4 °C. O *pellet* foi ressuspensionado em

20 volumes de solução de Krebs e sofreu nova centrifugação a $1000 g_{max}$, por 10 minutos, a $4 ^\circ C$. O novo sobrenadante foi misturado ao da primeira centrifugação para serem submetidos a uma terceira centrifugação a $48000 g_{av}$, durante 20 minutos, a $4 ^\circ C$, para a obtenção do preparado de sinaptossomas, que foi ressuspenso em solução de Krebs ($1,4 mL/g$ tecido), aliqotado para tubos tipo *ependorf* e esses estocados em tanque de nitrogênio líquido até o uso (figura 4.5).

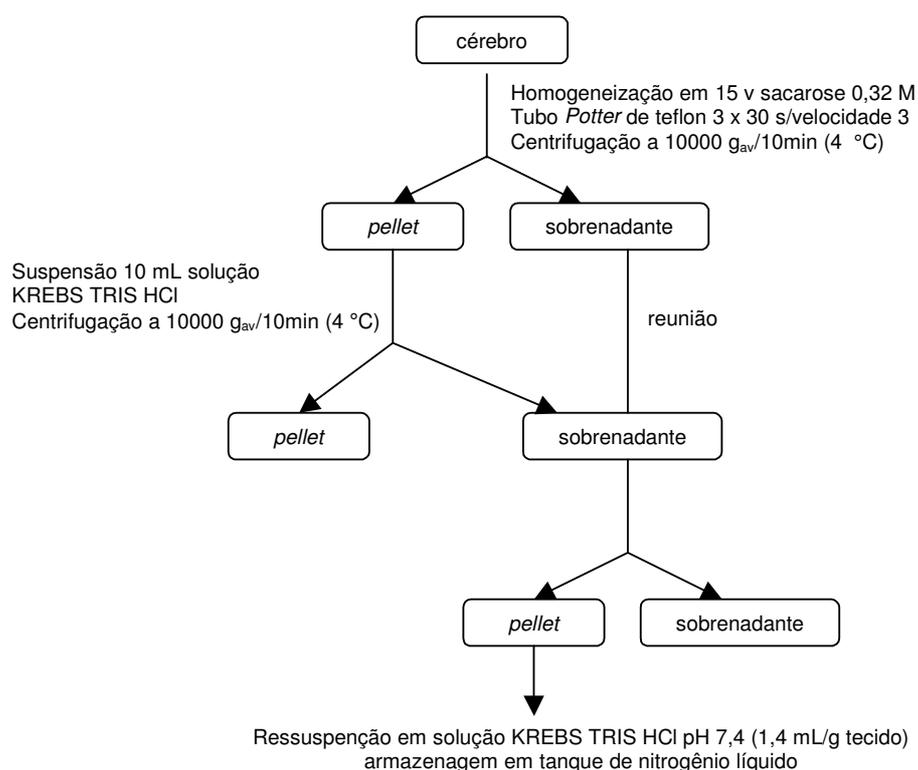


Figura 4.5: esquema da preparação de membranas sinaptossomais de córtex de rato (receptor benzodiazepínico).

4.4.4.2 Doseamento de proteína

O doseamento de proteína foi realizado conforme o Método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Inicialmente, a proteína foi diluída em 75, 100 e 200 vezes. Um volume de $100 \mu L$ de cada diluição foi pipetado para tubos contendo $400 \mu L$ de água. A seguir $2 mL$ da solução B e, 10 minutos após, $100 \mu L$ do reativo de *Folin-Ciocalteu*. Decorridos 45 minutos de incubação, à temperatura ambiente, as amostras foram lidas em

espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm. Uma curva padrão de albumina, nas concentrações de 50, 100, 200, 250 e 300 µg/mL, foi realizada da mesma forma que as amostras, utilizando água como branco, sendo o valor de absorvância obtido descontado das amostras e curva padrão. Todo experimento foi realizado em triplicata.

4.4.4.3 Ensaio de ligação ao receptor benzodiazepínico

Os ensaios de ligação foram realizados com os valepotriatos valtrato, diavaltrato, acevaltrato e 1-β-acevaltrato e com o flavonóide B6. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tubos de ensaio contendo valepotriatos ou flavonóides, em diferentes concentrações (1, 10, 50 e 100 µM em DMSO), 100 µL de proteína (1 µg/1 µL) e [³H] FLU (0,2 nM) em 1 mL de solução de Krebs foram incubados a 4 °C, por 90 minutos. Após a incubação, as amostras foram diluídas em 3,0 mL de tampão Krebs gelado, a pH 7,4, e filtradas a vácuo sobre filtros de fibra de vidro (GMF3, FILTRAK, Alemanha), sendo lavadas mais duas vezes com a mesma solução. Após a secagem, os filtros foram colocados em frascos de vidro contendo 4 mL de líquido de cintilação, e a contagem da radioatividade foi realizada em cintilador, por 10 minutos. A ligação não específica foi determinada na presença de excesso de flunitrazepam não radioativo (50 µM). Subtraindo a ligação não específica da ligação total, foi obtida a ligação específica. Os resultados foram expressos como percentagem da ligação específica em relação ao total (Lopes *et al.*, 2004).

4.4.4.4 Preparação das membranas sinaptossomais (receptor serotoninérgico)

Cérebros de ratos Wistar, machos, adultos, sacrificados por decapitação, foram obtidos por dissecação. Em seguida, o tecido (1,2640 g de hipocampo) foi homogeneizado em aparelho motorizado (FISATON[®]), com pistão de teflon em *Potter* com 20 volumes (mililitros de solução por grama de tecido) de solução de TRIS HCl 50 mM (pH 7,4 a 4 °C) (figura 4.6).

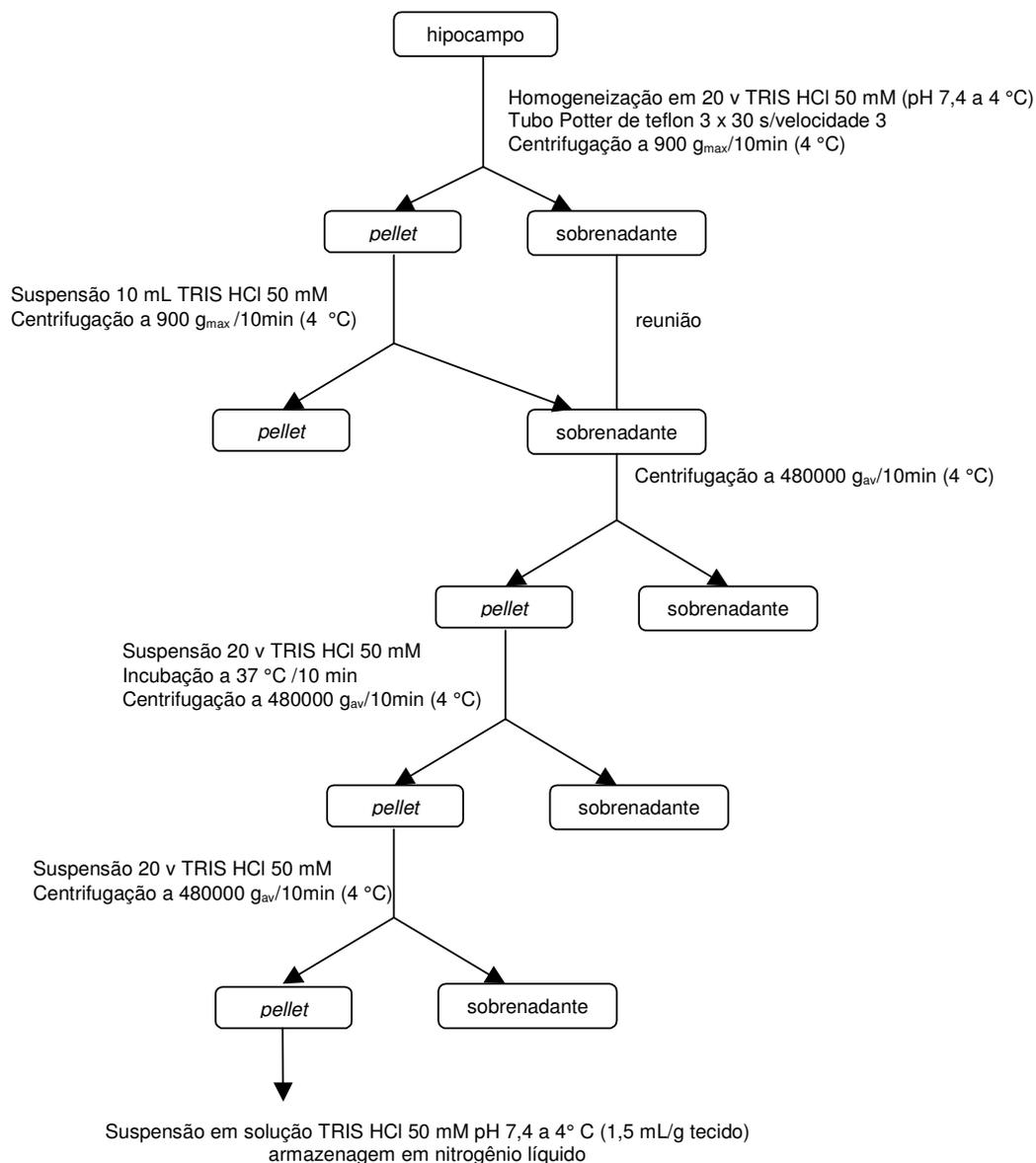


Figura 4.6: esquema da preparação das membranas sinaptossomais de hipocampo de rato (receptor 5HT_{1A}).

Após várias passagens do pistão em velocidade de grau 3, durante 30 segundos, o *Potter* era colocado no gelo por 1 minuto. Essa operação foi repetida três vezes. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 900 g_{max}, por 10 minutos, a 4 °C, do qual foi

obtido o sobrenadante que foi reservado. O *pellet* foi ressuspendido em 10 mL de solução TRIS HCl 50 mM e sofreu nova centrifugação a 900 g_{max} , por 10 minutos, a 4 °C. O novo sobrenadante foi misturado ao da primeira centrifugação para serem submetidos a uma terceira centrifugação a 48000 g_{av} , durante 10 minutos, a mesma temperatura. O *pellet* obtido foi ressuspendido em 20 volumes de TRIS HCl 50 mM (pH 7,4 a 37 °C) e incubado a 37 °C, por 10 minutos. Ao término, foi centrifugado a 48000 g_{av} , durante 10 minutos, a 4 °C. O novo *pellet* obtido foi, novamente, ressuspendido em 20 volumes de TRIS HCl 50 mM (pH 7,4 a 4 °C) e centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente, para a obtenção do preparado de sinaptossomas que foi ressuspendido em solução de TRIS HCl 50 mM (pH 7,4 a 4 °C), na concentração de 1,5 mL/g tecido, aliquotados para tubo tipo *ependorf* e estocados em tanque de nitrogênio líquido até o uso.

4.4.4.5 Doseamento de proteína

O doseamento da proteína seguiu o método desenvolvido por Lowry e colaboradores (1951). Inicialmente, a proteína foi diluída em 75, 100 e 150 vezes. Um volume de 100 μ L de cada diluição foi pipetado para tubos contendo 400 μ L de água. A seguir 2 mL da solução B e, 10 minutos após, 100 μ L do reativo de *Folin-Ciocalteu*. Decorridos 45 minutos de incubação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm. Uma curva padrão de albumina, nas concentrações de 50, 100, 200, 250 e 300 μ g/mL, foi realizada da mesma forma que as amostras, usando água como branco, sendo o valor de absorvância obtido descontado das amostras e curva padrão. Todo experimento foi realizado em triplicata.

4.4.4.6 Ensaio de ligação ao receptor serotoninérgico 5HT_{1A}

Os ensaios de ligação foram realizados com os valepotriatos valtrato, diavaltrato, acevaltrato e 1- β -acevaltrato e com o flavonóide B6. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tubos de ensaio contendo valepotriatos ou flavonóides, em diferentes concentrações (1, 10, 50 e 100 μM em DMSO), 50 μL de proteína (1 $\mu\text{g}/1 \mu\text{L}$) e [^3H]-8-OH-DPAT (1,0 nM) em 400 μL de solução intermediária (SI); composta por TRIS HCl 50 mM (pH 7,4 a 37 $^{\circ}\text{C}$), cloreto de cálcio 1 mM, cloreto de manganês 1 mM e pargilina 10 μM ; foram incubados a 37 $^{\circ}\text{C}$, por 15 minutos. Após a incubação, as amostras foram diluídas em 4,0 mL de tampão TRIS HCl 5 mM (pH 7,4 a 4 $^{\circ}\text{C}$), a pH 7,4 gelado, e filtradas a vácuo sobre filtros de fibra de vidro (GMF3, FILTRAK), sendo lavados mais duas vezes com a mesma solução. Após a secagem, os filtros foram colocados em frascos de vidro contendo 4 mL de líquido de cintilação, e a contagem da radioatividade foi realizada em cintilador, por 10 minutos. A ligação não específica foi determinada na presença de excesso de serotonina não radioativo (10 μM). Subtraindo a ligação não específica da ligação total, foi obtida a ligação específica. Os resultados foram expressos como percentagem da ligação específica em relação ao total (Peroutka, 1986).

4.4.4.7 Avaliação da atividade da enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase *in vitro*

Todas as amostras foram permeabilizadas por tratamento com dodecil sulfato de sódio (0,1 mg SDS / mg proteína, por 2 minutos a temperatura ambiente). Para cada doseamento, a quantidade de proteína foi ajustada para hidrolisar não mais que 10 – 15 % do substrato durante o tempo de incubação. As amostras foram incubadas (1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$) em solução de 20 mM de tampão TRIS-maleato (pH 7,4) contendo 94 mM de cloreto de sódio, 3 mM de cloreto de magnésio, 1,2 mM ATPNa_2 , 10 mM de azida, 1 mM EGTA na presença de 3 mM cloreto de potássio (atividade total) ou 1 mM de ouabaína (inibição total). A atividade enzimática foi avaliada perante a liberação de fosfato inorgânico a partir de ATP, de acordo com o método de Fiske e Subarow (1925). A atividade da enzima foi considerada como sendo a diferença entre a atividade total e a atividade resistente a 1 mM de ouabaína (Lopez *et al.*, 2002). Para realização das curvas de concentração *versus* resposta, foram adicionadas às amostras concentrações crescentes de valepotriatos (1 nM – 1 mM).

4.4.4.7.1 Preparo dos homogenatos

Ratos Wistar, adultos, foram sacrificados por decapitação e seus hemisférios cerebrais e rins foram rapidamente retirados. A seguir, cada grupo de órgãos foi triturado e homogeneizado em aparelho motorizado (FISATON[®]), com pistão de teflon em *Potter*, com 2-3 volumes (mililitros de solução por grama de tecido) de solução gelada de sacarose tamponada 0,25 M (pH 7,4 a 4 °C), contendo 100 µM de fluoreto de fenilmetilsulfonila por grama de órgão. Após 1 hora de centrifugação a 100 000_g, os *pellets* foram ressuspensos, no mesmo tampão, e estocados em nitrogênio líquido até a utilização. O conteúdo de proteína foi medido de acordo com o método de Lowry e colaboradores (1951).

4.4.5 Ensaio de toxicidade aguda

Os animais foram tratados, pela via intraperitoneal e oral (gavage), com a solução extrativa diclorometânica obtida de *V. glechomifolia*, nas doses de 30, 40, 50 e 60 mg/kg (n = 10) e 5, 10, 20, 40 e 80 mg/kg (n = 5), respectivamente. Após o tratamento, os animais foram continuamente observados, na segunda, sexta e décima segunda hora, e diariamente pela manhã, até completar 14 dias de experimento. Também foram avaliados os sinais de toxicidade, como piloereção, ptose palpebral, contorção abdominal, hipotermia, tremor, paralisia do trem posterior, salivação e convulsão (Lapa *et al.*, 2003). A DL₅₀ foi calculada em 24 horas, através do método dos probitos, para via intraperitoneal.

4.4.6 Experimentos comportamentais

As soluções extrativas diclorometânica (enriquecida em valepotriatos) e metanólica (enriquecida em flavonóides), obtidas de *V. glechomifolia*, foram testadas em camundongos através de modelos comportamentais para avaliação da atividade ansiolítica, sedativa e antidepressiva.

4.4.6.1 Teste do labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) baseia-se no fato de que roedores tendem a evitar locais altos e abertos, mas quando tratados com ansiolíticos os animais permanecem mais tempo no braço aberto e exploram mais o labirinto (Pellow *et al.*, 1985). O labirinto empregado nesse estudo é construído de madeira e consiste de dois braços abertos de 30x10 cm, com borda de proteção de 1 cm, e de dois braços fechados com 30x10x15 cm, dispostos perpendicularmente aos braços abertos em forma de cruz grega. A cruz é elevada a 50 cm do chão.

Os animais foram tratados com doses de 10 mg/kg das soluções extrativas enriquecidas de valepotriatos e de flavonóides, pela via oral (gavage) e, 60 minutos após a administração, foram posicionados no centro do labirinto, voltados para o braço aberto e observados durante 5 minutos, por dois observadores independentes (figura 4.7). Foram determinados o número de entradas e o tempo de permanência nos braços (abertos e fechados), e o número de *rearings*. Para análise dos resultados foram considerados os valores absolutos (tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos e fechados), bem como os respectivos valores percentuais, descontando-se o tempo gasto no centro do labirinto. O aparato foi limpo com etanol 70% após a observação de cada animal. Todo procedimento foi realizado em ambiente de penumbra.



Figura 4.7: Esquema empregado para avaliação do efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado em camundongos.

Para análise dos resultados, foram considerados os valores absolutos (tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos e fechados), bem como os respectivos valores percentuais, segundo as fórmulas abaixo (Park *et al.*, 2005):

$$\begin{aligned} \% \text{ tempo no braço aberto} &= (\text{tempo no braço aberto} \times 100) / \text{tempo total} \\ \% \text{ tempo no braço fechado} &= (\text{tempo no braço fechado} \times 100) / \text{tempo total} \\ \% \text{ entradas no braço aberto} &= (\text{entradas no braço aberto} \times 100) / \text{total de entradas} \\ \% \text{ entradas no braço fechado} &= (\text{entradas no braço fechado} \times 100) / (\text{total de} \\ &\quad \text{entradas}) \end{aligned}$$

4.4.6.2 Teste de potenciação do sono barbitúrico

Neste modelo, os animais foram tratados com doses de 10 mg/kg da solução extrativa enriquecida em valepotriatos e em flavonóides, pela via oral (gavage), e decorridos 60 minutos da administração, receberam uma solução de pentobarbital sódico (Cristália[®]), 40 mg/kg, i.p (figura 4.8). Foram, então, determinados o tempo de indução (latência) e a duração do sono barbitúrico, em minutos, pela perda e retomada do reflexo postural. Foram estabelecidos 240 minutos como valor máximo de duração do sono (Willianson *et al.*, 1996).

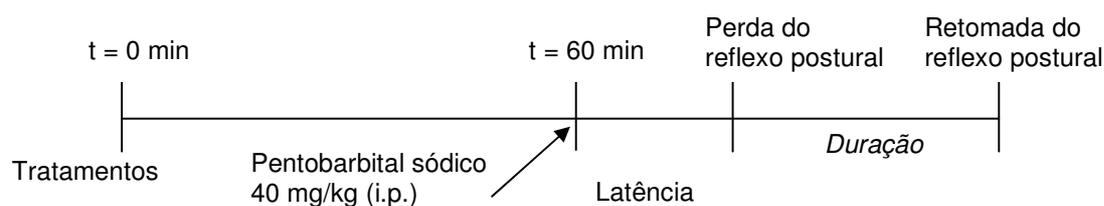


Figura 4.8: Esquema empregado para avaliação do efeito sobre o tempo de sono barbitúrico (pentobarbital sódico, 40 mg/kg, i.p.) em camundongos.

4.4.6.3 Teste da natação forçada

No teste da natação forçada, o paradigma básico consiste em que ratos ou camundongos forçados a nadar de forma inescapável, em um espaço restrito, tornam-se imóveis após vigorosa atividade. Este comportamento de imobilidade é interpretado como perda de motivação ou “desespero comportamental” e é usualmente prevenido pela administração de antidepressivos (Porsolt *et al.*, 1978).

A determinação da atividade do tipo antidepressiva, pelo teste da natação forçada, foi realizada com a solução extrativa enriquecida em valepotriatos obtida através da extração por CO₂ supercrítico. Os animais foram tratados, via gavagem, com 10 mg/kg desta solução e, após 60 minutos da administração, foram colocados a nadar durante 6 minutos, nos quais foi registrado o tempo de imobilidade (figura 4.9). O aparato consiste de cilindros de vidro com 10 cm de diâmetro interno e 25 cm de altura, preenchidos com água a altura de 19 cm e temperatura entre 23 e 25 °C. A água dos cilindros foi trocada a cada dois animais.



Figura 4.9: Esquema empregado para avaliação da atividade antidepressiva no teste da natação forçada em camundongos.

4.4.6.4 Teste da atividade locomotora espontânea

Camundongos receberam a dose 10 mg/kg, via oral, da solução extrativa obtida por fluido supercrítico e, decorridos 60 minutos, foram colocados no centro do aparato, que consiste de uma caixa de acrílico transparente, medindo 40x 30x30 cm, com o fundo dividido em 24 quadrantes iguais. Os parâmetros registrados foram: número de

crossings (cruzamentos entre os quadrantes delimitados no fundo do aparato); número de *rearings* (episódios em que os animais levantam o corpo apoiando-se apenas nas patas traseiras); número de *groomings* (comportamentos de autolimpeza) e número de bolos fecais (fezes expelidas pelo animal durante o período total de observação); durante três períodos consecutivos de 5 minutos (perfazendo um total de 15 minutos de observação) (figura 4.10) (Cooper *et al.*, 1996). O aparato foi limpo com etanol 96 °GL entre um animal e outro. Todo procedimento foi realizado em ambiente de penumbra.

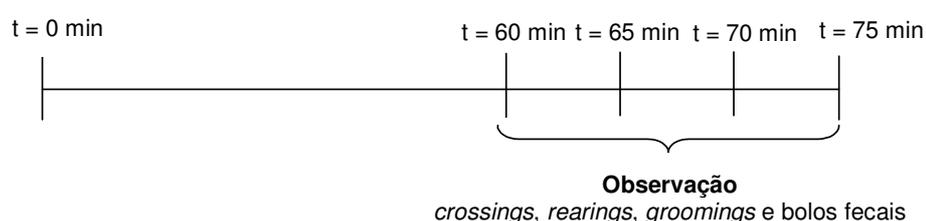


Figura 4.10: esquema empregado para avaliação da atividade locomotora espontânea em camundongos.

4.5 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o *software* Sigma Stat versão 2.0 (Jandel Scientific Corporation®). Nível de significância foi de $p < 0,05$. Foram empregados: Análise de Variância, de um fator ou teste de Kruskal-Wallis; Teste "t" ou Mann-Whitney, dependendo do desenho experimental, distribuição dos dados e tipo de variáveis analisadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, para a obtenção da solução extrativa diclorometânica, foi utilizada a espécie *V. glechomifolia*, que apresenta o maior teor de valepotriatos entre as espécies nativas investigadas até o momento (Silva *et al.*, 2001). Para tanto, o material vegetal foi submetido à extração com diclorometano, por maceração em ultrassom, produzindo soluções extrativas enriquecidas em valepotriatos. Este tipo de extração foi adequado para obtenção dos compostos e mostrou ser um processo fácil e rápido. Diversos métodos de extração e isolamento de valepotriatos são descritos na literatura. Esses produtos podem ser obtidos por refluxo em banho-maria com metanol anidro (Bos *et al.*, 2002), por adição de éter de petróleo (Tang *et al.*, 2002) e por extração sequencial com hexano, metil etil cetona e metanol à temperatura ambiente (Xu *et al.*, 2007).

Para a caracterização química por CCD da solução extrativa diclorometânica, foram utilizados três sistemas cromatográficos: (I) diclorometano:metanol (100:1, v/v) - vanilina, (II) tolueno:acetato de etila:metil etil cetona (85:15:5, v/v/v) – 2,4-dinitrofenil-hidrazina e (III) tolueno:acetato de etila (75:25, v/v) – HCl: ácido acético (80:20, v/v). Todos foram adequados para a separação dos valepotriatos, porém o sistema (I) mostrou melhor resolução, sendo selecionado para as análises posteriores.

Os compostos foram caracterizados por comparação cromatográfica com valepotriatos, previamente isolados de *V. glechomifolia*, e com valores de razão de frente (Rf) de substâncias de referência. Conforme literatura, as substâncias vanilina e anisaldeído podem ser utilizadas como substâncias de referência para acevaltrato e valtrato, respectivamente (Wagner *et al.*, 1984). No desenvolvimento deste trabalho, para as análises quantitativas e estudos bioquímicos, foram isolados valtrato, acevaltrato, 1- β -acevaltrato e diavaltrato através CCD preparativa.

Para a obtenção de flavonóides, das espécies nativas investigadas no presente trabalho, o material vegetal foi submetido à extração com metanol em ultrassom. A solução metanólica obtida foi particionada, produzindo a fração acetato de etila que foi filtrada a vácuo sob sílica, produzindo uma fração enriquecida em flavonóides. Essa fração foi submetida à CC, possibilitando o isolamento de um produto.

A caracterização química por CCD das frações acetato de etila, obtidas de *V. eichleriana*, *V. eupatoria*, *V. glechomifolia*, *V. salicariifolia* e *V. scandens*, foi realizada utilizando-se o sistema cromatográfico acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10, v/v), reagente natural e luz UV como agentes cromogênicos.

Flavonóides aparecem como manchas escuras, quando observados sob luz UV (254 nm) em placas contendo indicador UV de fluorescência. Em 365 nm, dependendo da estrutura química, se mostram com coloração amarelo escuro, verde ou azul fluorescente em presença de reagentes, sendo o reagente natural (*natural products reagent*, solução a 1 % de éster do ácido difenilborico- β -etilamino em metanol) um dos mais utilizados (Brasseur e Angenot, 1986).

Nas espécies nativas de *Valeriana*, foram detectados vários flavonóides de diferentes classes, através da visualização de zonas de coloração amarela, azul, laranja e verde após aspersão do reagente natural. De modo geral, flavonas que possuem OH na posição 4' mostram cor verde fluorescente, e flavonóis com OH em C-3, aparecem na cor castanho-esverdeada. Tom amarelo e laranja, respectivamente, sugerem a presença de hidroxilas nas posições 3' e 4' em flavonas e flavonóis (Brasseur e Angenot, 1986). Substâncias de coloração azul fluorescente podem tratar-se de ácidos fenólicos (Simonovska *et al.*, 2003).

Há relatos na literatura da presença de flavonóis, flavonas e flavanonas em diversas espécies de *Valeriana* (Fursa *et al.*, 1987). Dados mais recentes descrevem a presença da flavona 6-metilapigenina, da flavanona glicosilada 2S (-) hesperidina e de linarina glicosilada (flavona) em *V. officinalis*, *V. wallichii* e *V. edulis*, respectivamente (Marder *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2004; Navarrete *et al.*, 2006). Em relação aos ácidos fenólicos, há poucos dados na literatura, contudo ácido clorogênico foi detectado

em *V. officinalis*, *V. edulis* (Navarrete *et al.*, 2006) e *V. prionophylla* (Piccinelli *et al.*, 2004).

Na análise por CCD, foi verificado que todas as espécies apresentaram flavonóides e que um produto de Rf próximo a 0,5 e coloração verde fluorescente, codificado como B6, estava presente nas frações acetato de etila de todas as espécies. Também foi observado que *V. salicariifolia* e *V. scandens* possuem maior proporção de flavonóides de cor laranja, comum à classe dos flavonóis.

A fração acetato de etila obtida de *V. eupatoria*, em função da maior massa disponível, foi submetida à cromatografia em coluna, visando isolar a substância B6. O produto obtido foi analisado através de métodos espectroscópicos, verificando-se a presença de sinais característicos de flavonóides e a presença de um sinal em δ 5,2 ppm, que pode tratar-se do hidrogênio anomérico de ramnose. Esses dados somados a informação da CCD (coloração esverdeada com reagente natural) indicaram a possibilidade de tratar-se de um derivado de flavona.

O processo de maceração por ultrassom, realizado com diferentes solventes, mostrou-se adequado para a obtenção de soluções extrativas enriquecidas nos produtos de interesse, sendo esses flavonóides e valepotriatos. Contudo, os últimos também foram extraídos através do processo de extração por fluido supercrítico (SCCO₂). A espécie *V. glechomifolia* foi sucessivamente extraída com dióxido de carbono supercrítico, sob as pressões de 90, 120, 150 e 200 bar. A temperatura utilizada foi fixada em 40 °C, considerando a relativa instabilidade térmica dos valepotriatos, e mantida durante todo o tempo de extração.

O produto final da extração a 90 bar foi um extrato de coloração amarela. Esse foi seco em estufa de ar circulante (temperatura 40 °C) e a análise cromatográfica revelou a presença de valepotriatos, que mostraram o mesmo perfil cromatográfico daqueles observados na solução extrativa obtida por maceração em ultrassom com diclorometano. Nas demais pressões (120, 150 e 200 bar), os extratos apresentaram uma coloração alaranjada e, também, a presença de substâncias de mesmo perfil cromatográfico (CCD e CLAE) aos obtidos na pressão de 90 bar.

Os teores de valepotriatos, determinados através de CLAE, foram obtidos com base nas curvas padrão de valtrato, acevaltrato e 1- β -acevaltrato. Para a quantificação de isovaltrato, foi utilizado a curva padrão de seu isômero valtrato. As curvas padrão foram lineares nas faixas de concentração empregadas. As equações das retas correspondentes podem ser visualizadas na figura 5.1.

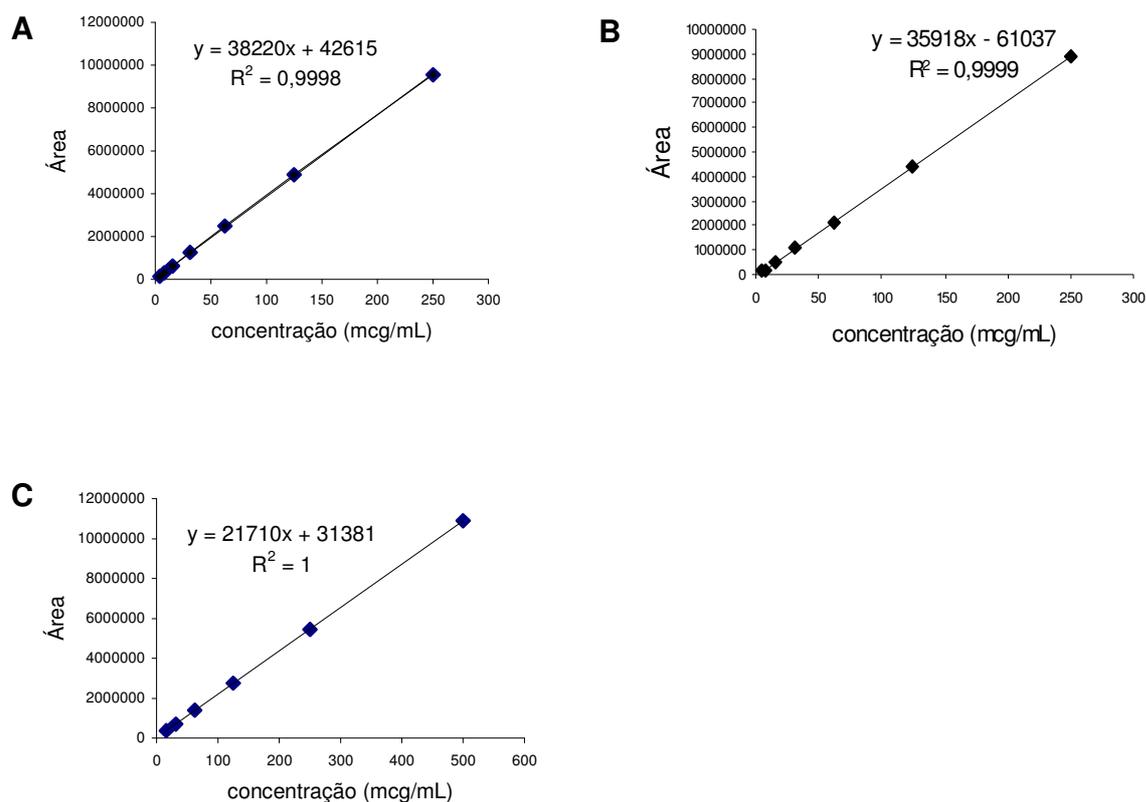


Figura 5.1: **A**:curva padrão de valtrato; **B**:curva padrão de acevaltrato; **C**:curva padrão de 1- β -acevaltrato

Na tabela 5.1 estão expressos (em g%) os teores de valepotriatos, presentes nas diferentes frações obtidas. As extrações foram efetuadas no tempo total de 40 minutos, sendo que a cada 10 min os frascos coletores eram trocados.

Tabela 5.1: teores dos valepotriatos, em cada tempo de extração, nas frações obtidas nas diferentes pressões de trabalho.

Tempo (min)	Pressão (bar)			
	90	120	150	200
Valtrato				
10	35,04 ± 0,6336 g%	15,09 ± 1,0924 g%	26,23 ± 0,0608 g%	23,15 ± 1,4186 g%
20	29,41 ± 3,7316 g%	10,58 ± 0,5336 g%	19,47 ± 0,9822 g%	17,78 ± 1,1660 g%
30	24,89 ± 0,4707 g%	11,65 ± 0,8857 g%	23,87 ± 1,8236 g%	14,89 ± 2,8744 g%
40	23,04 ± 0,9135 g%	-	18,85 ± 0,51845 g%	12,15 ± 0,4837 g%
Isovaltrato				
10	3,82 ± 0,1292 g%	1,43 ± 0,1596 g%	3,11 ± 0,0127 g%	2,30 ± 0,1721 g%
20	3,29 ± 0,3534 g%	1,09 ± 0,0445 g%	2,21 ± 0,1099 g%	1,91 ± 0,1618 g%
30	2,78 ± 0,2385 g%	1,16 ± 0,0760 g%	2,70 ± 0,2738 g%	1,34 g%
40	2,58 ± 0,0509 g%	-	2,04 ± 0,0959 g%	1,21 ± 0,0738 g%
Acevaltrato				
10	23,16 ± 0,5790 g%	8,33 ± 0,5193 g%	19,06 ± 0,0668 g%	15,97 ± 1,3779 g%
20	22,05 ± 1,6588 g%	5,46 ± 0,4010 g%	13,85 ± 0,6902 g%	12,26 ± 1,1706 g%
30	19,29 ± 0,5164 g%	6,55 ± 0,5853 g%	17,24 ± 1,3087 g%	8,27 g%
40	17,71 ± 0,6201 g%	-	13,63 ± 0,3634 g%	8,10 ± 0,0310 g%
1-β-acevaltrato				
10	11,99 ± 0,2238 g%	5,95 ± 0,3723 g%	11,45 ± 0,0244 g%	10,49 ± 0,9874 g%
20	14,78 ± 0,3706 g%	3,68 ± 0,2573 g%	8,29 ± 0,4234 g%	8,35 ± 0,7564 g%
30	14,20 ± 0,2051 g%	4,54 ± 0,3759 g%	12,26 ± 0,9512 g%	5,68 g%
40	13,60 ± 0,6041 g%	-	9,76 ± 0,2935 g%	5,49 ± 0,1003 g%

Resultados expressos em média ± dp.

A extração na pressão de 90 bar mostrou um decréscimo no teor de valepotriatos no tempo, exceto para o produto 1-β-acevaltrato, para o qual o teor no primeiro período de extração foi menor em relação ao segundo. Relação semelhante foi observada na extração a 200 bar, porém para o produto 1-β-acevaltrato foi mantido o perfil de extração. Sob pressão de 150 bar foi observado igual comportamento para todos os valepotriatos, com um decréscimo do teor no segundo período de extração, seguido de aumento e novamente diminuição. A pressão de 120 bar foi a que produziu o menor teor de valepotriatos e, aparentemente, seguiu o comportamento de extração semelhante à pressão de 150 bar (figura 5.2). Na pressão de 120 bar foram efetuados somente três períodos de extração.

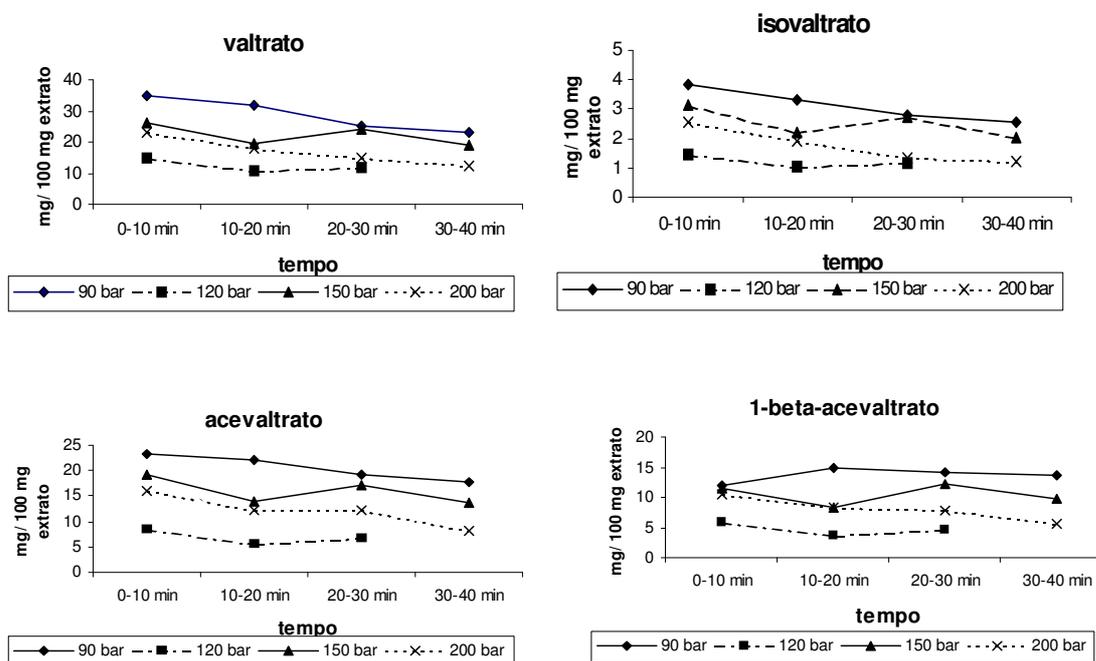


Figura 5.2: perfil de extração dos valepotriatos no tempo de 40 minutos.

Na tabela 5.2 estão expressos (em g%) os teores totais de valepotriatos, presentes nas frações obtidas sob as diferentes pressões utilizadas. Na fração obtida sob pressão de 90 bar, foram encontrados os maiores teores de valepotriatos totais e, de forma decrescente, nas frações de 150, 200 e 120 bar.

Tabela 5.2: teores de valepotriatos encontrados nas frações obtidas por diferentes pressões de extração.

Valepotriatos	Pressão 90 bar	Pressão 120 bar	Pressão 150 bar	Pressão 200 bar
Valtrato	28,65 ± 0,4292 g%	12,38 ± 0,0888 g%	22,55 ± 0,4683 g%	15,05 ± 1,3838 g%
Isovaltrato	3,17 ± 0,0559 g%	1,21 ± 0,0318 g%	2,58 ± 0,0909 g%	1,79 ± 0,4197 g%
Acevaltrato	20,75 ± 0,3153 g%	6,76 ± 0,1186 g%	16,29 ± 0,3597 g%	10,87 ± 1,076 g%
1-β-acevaltrato	13,49 ± 0,06871g%	4,71 ± 0,0786 g%	10,48 ± 0,1503 g%	7,01 ± 1,0311 g%
Total	66,06 g%	25,06 g%	51,9 g%	34,72 g%

Em relação ao teor de cada valepotriato, foi verificado o mesmo perfil de extração, sendo sempre valtrato o componente mais abundante, seguido de acevaltrato, 1-β-acevaltrato e, sempre em menor concentração, isovaltrato. Também foi observado que sob a mesma pressão de extração ocorreu uma diferença de teor entre

os quatro valepotriatos, exceto na pressão de 200 bar para os valepotriatos acevaltrato e 1- β -acevaltrato (figura 5.3).

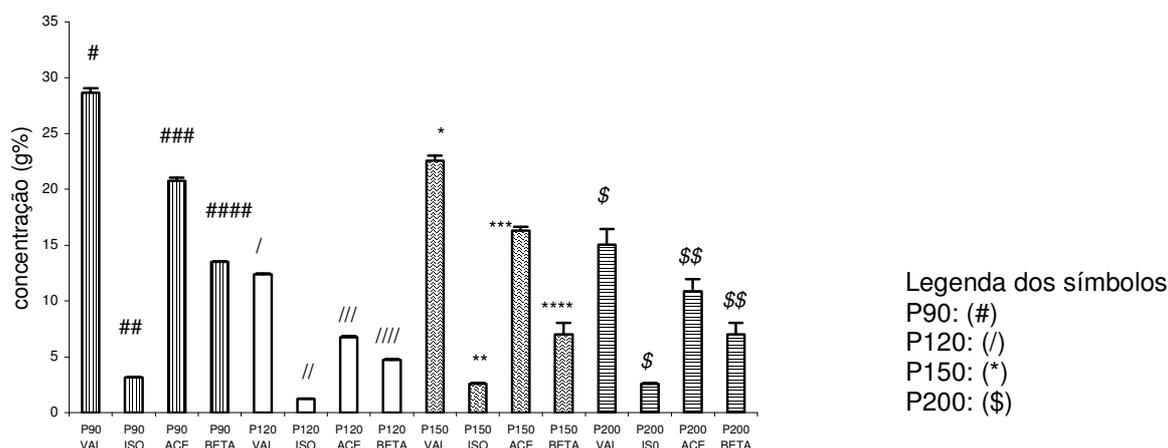


Figura 5.3: teor de cada valepotriato nas quatro pressões de extração. Resultado expresso como média \pm dp. P90: pressão 90 bar; P120: pressão 120 bar; P150: pressão 150 bar; P200: pressão 200 bar; VAL: valtrato; ISO: isovaltrato; ACE: acevaltrato; BETA: 1- β -acevaltrato. Diferenças estatisticamente significativas entre os produtos sob a mesma pressão, determinadas por ANOVA seguida Teste Tukey: # $p < 0,001$ ## $p < 0,001$ ### $p < 0,001$ #### $p < 0,001$; / $p < 0,001$; * $p < 0,001$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,001$; \$ $p < 0,001$; \$\$ $p < 0,001$.

A análise individual de cada valepotriato, nas frações obtidas sob as diferentes pressões, mostrou um comportamento diferenciado para cada substância extraída. Para valtrato e acevaltrato foram observadas diferenças de teor nas frações obtidas sob as quatro pressões de trabalho, sendo que a pressão de 90 bar foi a que propiciou maior concentração dos produtos citados. Comportamento semelhante também foi mostrado entre isovaltrato e 1- β -acevaltrato. Para ambos, não foram encontradas diferenças de teor nos extratos obtidos nas pressões de 90 e 200 bar, bem como entre as pressões de 120 e 150 bar (figura 5.4).

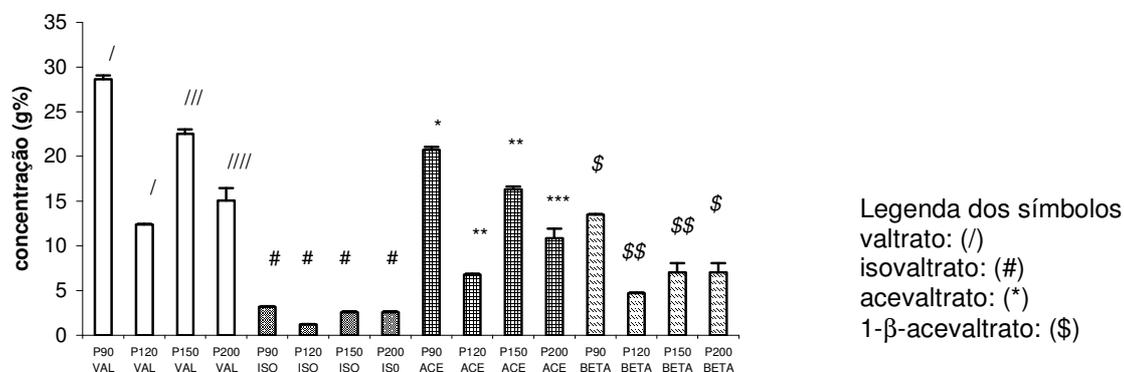


Figura 5.4: teor de cada valepotriato nas quatro pressões de extração. Resultado expresso como média \pm dp. P90: pressão 90 bar; P120: pressão 120 bar; P150: pressão 150 bar; P200: pressão 200 bar; VAL: valtrato; ISO: isovaltrato; ACE: acevaltrato; BETA: 1- β -acevaltrato. Diferenças estatisticamente significativas do mesmo produto nas diferentes pressões: / $p < 0,001$ // $p < 0,001$ /// $p < 0,001$ //// $p < 0,001$ (ANOVA seguida Teste Tukey); # $p < 0,05$ ## $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, $H=9,409$); * $p < 0,001$ ** $p < 0,001$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,001$ (ANOVA seguida Teste Tukey); \$ $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, $H=9,409$).

No procedimento de extração com CO_2 supercrítico é de conhecimento que, de forma geral, o aumento da pressão sob dada temperatura provoca um aumento da densidade do fluido supercrítico e, conseqüentemente, da solubilidade dos solutos contidos em uma matriz (Díaz-Reinoso *et al.*, 2006; Pourmortazavi *et al.*; 2007). Teoricamente, um aumento da pressão corresponderia a um maior teor de produtos extraídos. Contudo, os resultados obtidos neste trabalho não podem ser avaliados desta forma, porque os dados da literatura se referem a extrações realizadas a diferentes pressões com nova amostra de planta. No presente experimento, foi utilizada sempre a mesma amostra, na qual foram aplicados diferentes pressões, com o objetivo de esgotar o material vegetal e obter frações em baixas pressões com elevado grau de pureza.

Na pressão de 90 bar, os valepotriatos apresentaram boa solubilidade e foi obtido um ótimo rendimento. O perfil de extração desenvolvido, representado pela oscilação no teor de valepotriatos nas diferentes pressões, como, por exemplo, no aumento da concentração de valepotriatos no extrato a 150 bar, quando comparado à pressão de 120 bar, pode estar relacionado com o aumento da densidade do SCCO_2 e,

consequente, maior solubilidade dos produtos; com aumento do rompimento de células da matriz pelo aumento de pressão; ou pelas interações matriz-soluto, as quais são de difícil predição e que podem influenciar a difusão do fluido supercrítico dentro da matriz (Pourmortazavi *et al.*, 2007). As frações obtidas foram facilmente recuperadas, visto a alta volatilidade do fluido supercrítico. A operação a baixa temperatura, evitando a degradação térmica, e a ausência de luz e oxigênio, prevenindo reações de oxidação, foram parâmetros satisfatórios para a extração destas substâncias que são bastante instáveis.

A relação de quantidade de massa de extrato obtida por diferentes processos extrativos, também foi analisada. Os resultados obtidos mostraram que o processo de extração por fluido supercrítico foi o que gerou maior massa total de extrato (15,7 %), seguido da extração por maceração (13 %) e pela maceração em ultrassom (8,9 %).

Em relação a cada valepotriato individualmente, a extração por fluido supercrítico, na pressão de 90 bar, foi eficiente obtendo-se 286,5 mg/g extrato, 31,7 mg/g extrato, 207,5 mg/g extrato e 134,9 mg/g extrato de valtrato, isovaltrato, acevaltrato e 1- β -acevaltrato, respectivamente. Esses valores são superiores àqueles obtidos por maceração em ultrassom, que foram 182,9 mg/g extrato, 19,3 mg/g extrato, 123,6 mg/g extrato e 74,8 mg/g extrato dos mesmos produtos acima citados. O processo por ultrassom, por sua vez, forneceu teores superiores aos teores obtidos por maceração (117,8 mg/g extrato, 4,5 mg/g extrato, 82,0 mg/g extrato e 51,0 mg/g extrato) (figura 5.5).

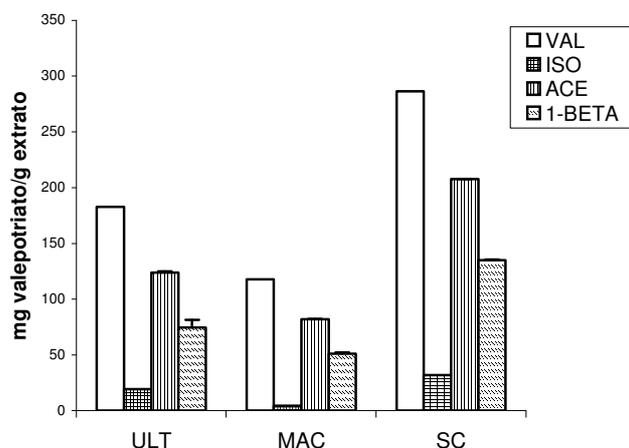


Figura 5.5: comparação entre os rendimentos em valepotriatos extraídos pelos métodos de maceração, maceração em ultrassom e fluido supercrítico. Resultados expressos como média \pm dp. VAL: valtrato; ISO: isovaltrato; ACE: acevaltrato; 1-BETA: 1- β -acevaltrato.

De modo geral, pode-se verificar que valepotriatos foram extraídos do material vegetal pelos três métodos de extração empregados no corrente trabalho, contudo o procedimento de extração por fluido supercrítico foi o que demonstrou maior seletividade para obtenção desses produtos, devido aos maiores teores determinados na quantificação, bem como pelo maior rendimento de extração.

As soluções extrativas enriquecidas em valepotriatos e flavonóides, bem como os produtos isolados a partir das mesmas, foram submetidos à realização de experimentos comportamentais (modelos animais de ansiedade, sedação e depressão) e ensaios bioquímicos (experimentos de radioligação e avaliação da atividade da enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$), respectivamente.

Os ensaios de radioligação foram executados para o sítio benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A e para o receptor serotoninérgico subtipo 5HT_{1A} , com os valepotriatos isolados de *V. glechomifolia* e o flavonóide B6, isolado de *V. eupatoria*.

Os valepotriatos e o flavonóide B6 não apresentaram nenhum, ou baixo percentual de ligação aos receptores benzodiazepínico e serotoninérgico, na faixa de concentração de 1 a 100 μM , ambos reconhecidamente implicados na neurobiologia da ansiedade (tabela 5.3).

Tabela 5.3: percentual de inibição de ligação do flunitrazepam tritiado ao receptor benzodiazepínico e do 8-hidróxi-2-(di-*n*-propilamino) tetralina tritiado ao receptor serotoninérgico 5HT_{1A} por valepotriatos e flavonóides isolados.

Substância	Concentração	% inibição [³ H]FLU (BZD)	% inibição [³ H]-8-OH-DAPT (5HT _{1A})
valtrato	1 μM	15	15
	10 μM	15	15
	50 μM	10	10
	100 μM	16	16
diavaltrato	1 μM	0	5
	10 μM	0	0
	50 μM	0	0
	100 μM	0	0
acevaltrato	1 μM	0	0
	10 μM	0	0
	50 μM	0	0
	100 μM	0	5
1-β-acevaltrato	1 μM	4	0
	10 μM	0	0
	50 μM	0	0
	100 μM	0	0
flavonóide B6	1 μM	1	0
	10 μM	0	0
	50 μM	0	0
	100 μM	13	0

Na literatura são encontrados relatos da afinidade de extratos de valeriana por receptores dopaminérgico (D₁) (Nencine *et al.*, 2006), purinérgico (A₁) (Scumacher *et al.*, 2002; Lacher *et al.*, 2007), serotoninérgico (5HT_{1A}) (Menini *et al.*, 1993) e GABA_A (Bernasconi e Morazzoni, 1993) e da ligação do valepotriato diidrovaltrato ao sítio barbitúrico e ao canal de cloreto do complexo receptor GABA_A, porém esse não ligou ao sítio benzodiazepínico (Bernasconi e Morazzoni, 1993).

Embora os dados publicados variem, nossos resultados estão de acordo com a literatura, que aponta para a ligação em outros sítios do complexo receptor GABA_A, que não o benzodiazepínico. Além disso, a maioria dos trabalhos avaliaram os perfis de ligação de extratos brutos ou semipurificados obtidos de diversas espécies de *Valeriana*, enquanto no presente trabalho foram utilizados produtos isolados. Sabe-se que a concentração de metabólitos secundários varia entre as espécies, bem como o perfil cromatográfico de soluções obtidas com diferentes solventes. Ortiz e

colaboradores (1999) demonstraram que uma solução extrativa hidroalcoólica de *V. officinalis*, nas concentrações 10^{-10} a 10^{-8} mg/mL, aumentou a ligação [3 H]flunitrazepam com EC_{50} de $4,13 \times 10^{-10}$ mg/mL, porém em concentrações mais elevadas ($EC_{50} = 4,82 \times 10^{-1}$ mg/mL) este efeito foi revertido. Segundo os autores, esses resultados foram consistentes com a presença de dois diferentes produtos ativos, que modificaram diferencialmente a ligação do [3 H]flunitrazepam.

Semelhante perfil farmacológico foi demonstrado pelo flavonóide B6, que também não apresentou ligação ao receptor serotoninérgico 5HT $_{1A}$ e ao sítio benzodiazepínico, nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 μ M.

Há poucos dados de literatura mostrando a ligação de flavonóides ou soluções extrativas em receptores serotoninérgicos. Nencine e colaboradores (2006) avaliaram duas soluções extrativas (aquosa e metanólica), obtidas de *V. adscendens*, quanto à ligação aos receptores 5-HT $_{1A}$, 5-HT $_{2A}$ e 5-HT $_{2C}$. A solução extrativa aquosa apresentou fraca afinidade pelo receptor 5-HT $_{1A}$ (35 % inibição), na faixa de concentração de 7,8 a 125 μ g/mL. Marder e colaboradores (2003) demonstraram que a fração éter etílico, proveniente da solução extrativa hidroalcoólica (70 %) de *V. wallichii*, composta por produtos de degradação de valepotriatos (baldrinais), acevaltrato, diidrovaltrato, valtrato e ácido valérico foi capaz de ligar-se aos receptores 5HT $_{1A}$. Da mesma forma que para os resultados discutidos para o complexo GABA-benzodiazepínico, a discrepância com os correntes resultados pode estar relacionada à diferente constituição das amostras testadas. A realização de ensaios de radioligação com uma solução composta por uma mistura de produtos dificulta, ou pode até inviabilizar, a determinação da substância que apresenta capacidade de ligação ao receptor em análise.

O mecanismo de ação mais frequentemente relatado na explicação do efeito ansiolítico de diversos flavonóides é a modulação alostérica positiva do receptor GABA $_A$, via sítio benzodiazepínico (Medina, *et al.*, 1998; Paladini *et al.*, 1999; Griebel *et al.*, 1999; Marder e Paladini, 2002). Diversos flavonóides como, por exemplo, flavona, crisina, apigenina, baicaleína, isoquercitrina ($K_i = 1; 3; 3; 4; 10 \mu$ M) possuem afinidade por esses receptores, enquanto escrofuléina, naringenina, genisteína, floretina e

tectocrisina possuem afinidade intermediária ($K_i = 23$; >25 ; >25 ; >25 ; $50 \mu\text{M}$). Equol, canferol, galangina, luteolina, fisetina, quercetina, rutina, miricetina, morina, crisiliol e acacetina apresentam afinidade, com valores de K_i entre 80 e $>100 \mu\text{M}$ (Paladini *et al.*, 1999).

Assim, o corpo de dados da literatura define a perspectiva de avaliação do perfil de ligação dos valepotriatos e flavonóides, isolados de *V. glechomifolia*, a outros sítios de ligação, tais como receptores GABA_A , barbitúrico, canal de cloreto, de adenosina e dopamina.

Na sequência de realização dos ensaios bioquímicos, foram avaliados os efeitos dos valepotriatos 1- β -acevaltrato, acevaltrato e valtrato (isolados da solução extrativa dicrometânica de *V. glechomifolia*), sobre a atividade enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, presente em homogenatos de rins e hemisférios cerebrais de ratos, fontes das isoformas α_1 , α_2 e α_3 .

Até o momento, não há dados na literatura descrevendo a inibição da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ por valepotriatos. Nossos resultados mostraram que os valepotriatos testados inibiram a atividade enzimática com potência inibitória semelhante, entre 20 e $24 \mu\text{M}$ nos homogenatos de rim, e entre 13 a $44 \mu\text{M}$ nos hemisférios cerebrais (figura 5.6).

São descritas na literatura quatro isoformas α , estruturalmente distintas, identificadas como α_1 , α_2 , α_3 e α_4 . A isoforma α_1 pode ser funcionalmente distinguida das isoformas α_2 e α_3 , com base em sua sensibilidade a inibição pelo glicosídeo cardíaco ouabaína (Blanco e Mercer, 1998; Dvela *et al.*, 2007). A afinidade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ pela ouabaína varia de nM a μM , dependendo da espécie animal. Ratos e camundongos apresentam enzimas resistentes ($\text{CI}_{50} \sim 0,1 \text{ mM}$), enquanto humanos e coelhos apresentam enzimas sensíveis ($\text{CI}_{50} \sim 0,1 \mu\text{M}$) (Bustamante e Féraille, 2008).

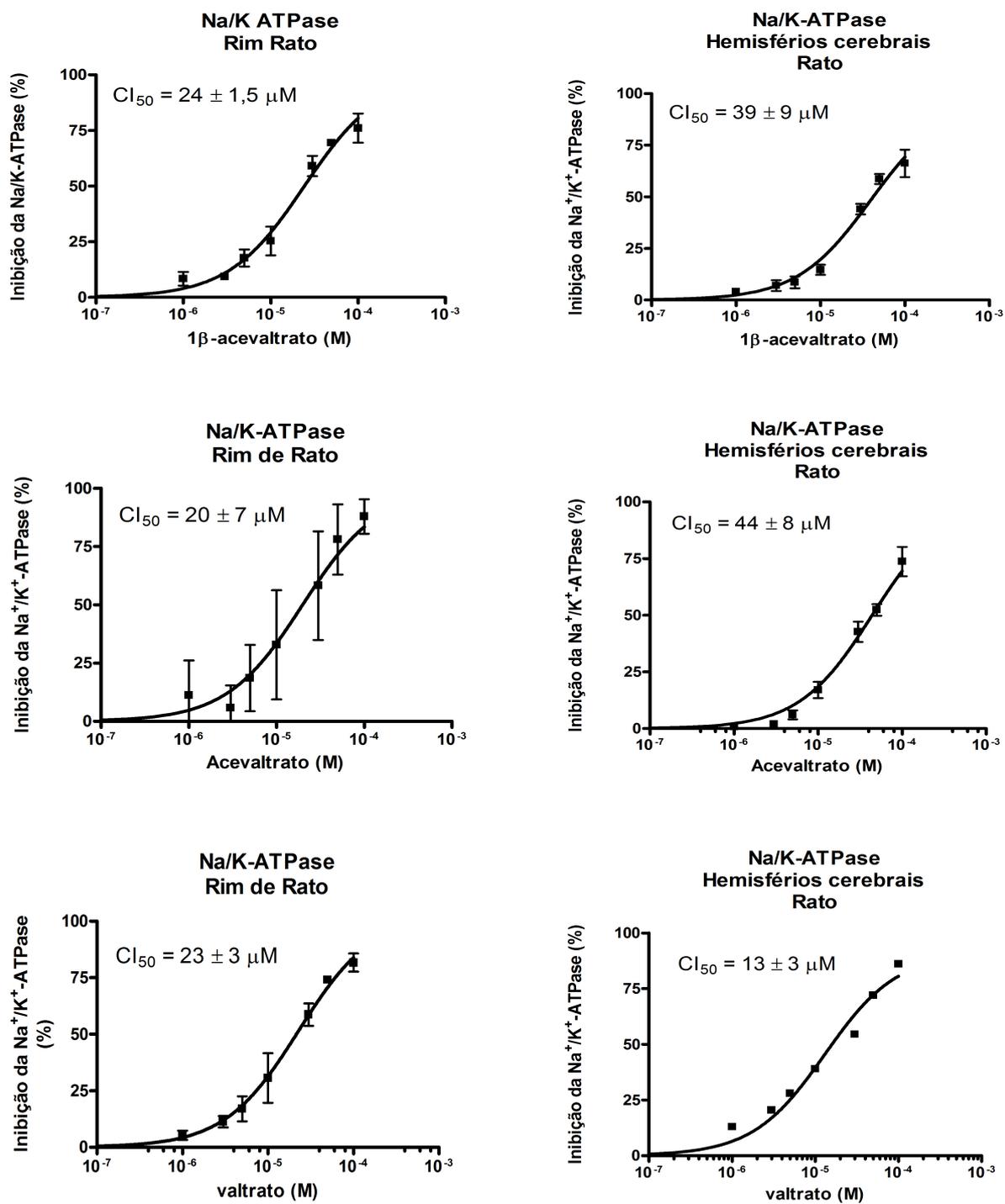


Figura 5.6: curvas de inibição da atividade da enzima Na⁺K⁺ATPase, presente em homogenatos de rim e hemisférios cerebrais de rato, pelos valepotriatos 1-β-acevaltrato, acevaltrato e valtrato.

Essas diferenças de afinidades dos esteróides cardiotônicos pela enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ devem-se à diversidade estrutural dessas substâncias, bem como à heterogeneidade da bomba proveniente da associação das isoformas α e β em diferentes $\alpha\beta$ heterodímeros (Blanco e Mercer, 1998). Os valepotriatos testados também apresentam algumas diferenças estruturais, que são marcadas pelos substituintes ligados ao anel ciclopentanodihidropirano (tabela 5.4) (Salles *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002), porém tais modificações não afetaram a capacidade de ligação à enzima e sua consequente inibição.

Tabela 5.4: substituintes ligados ao núcleo ciclopentanodihidropirano dos valepotriatos testados no ensaio de inibição da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$.

valepotriato	Grupo substituinte - C1	Grupo substituinte - C7	Grupo substituinte - C11
1- β - acevaltrato	β -acetoxi-isovaleroil	Isovaleroxi	Aciloxi
acevaltrato	isovaleroxi	β -acetoxi-isovaleroil	Aciloxi
valtrato	isovaleroxi	Isovaleroxi	Aciloxi

isovaleroxi = $((\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{COO})$

β -acetoxi-isovaleroil = $(\text{CH}_3\text{COOC}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COO})$

aciloxi = $(\text{CH}_2\text{OCOCH}_3)$

A subunidade α é topologicamente arranjada em 10 hélices transmembrana (TM1 a TM10). No lado intracelular, estão localizados os sítios de ligação do ATP e os sítios de fosforilação e no lado extracelular, o sítio de ligação dos glicosídeos cardíacos. Estudos de modelagem molecular e *docking* revelaram que glicosídeos cardíacos ligam-se em um sulco superficial entre as alças TM1-TM2, TM5-TM6 e TM9-TM10 da subunidade α da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. O anel lactona é orientado em direção às alças TM1-TM2, a porção esteróide entre TM2 e TM4, e TM5 e TM6, e as unidades de açúcar em direção à alça TM9-TM10 (Keenan *et al.*, 2005). Nos diferentes glicosídeos cardíacos avaliados, foi observado que a orientação do anel lactônico e da porção açúcar foi altamente conservada através de todas as substâncias, contudo o núcleo esteroidal mostrou apreciável variação de orientação, entretanto foi de pouco impacto na afinidade do ligante pela enzima e sua atividade inibitória (Keenan *et al.*, 2005).

Chen e colaboradores (2009) mostraram que ginsenosídeos contendo a porção açúcar ligada somente ao C3 da estrutura esteroidal, equivalente a posição do açúcar nos glicosídeos cardíacos (ouabaína, digoxina), possuem maior potência inibitória da

Na⁺K⁺ATPase que os monossacarídeos ligados às posições C6 e C20, nos quais a potência inibitória foi reduzida ou até abolida. Modelagem molecular e *docking* no domínio extracelular da subunidade α confirmaram que a diferença na potência inibitória dos ginsenosídeos ocorreu pelo impedimento estérico do açúcar ligado nas posições citadas. Somente ginsenosídeos com 0, 1 e 2 açúcares na posição C3 conseguem acoplar no domínio extracelular da subunidade α . A parte central destas moléculas ficou presa em uma cavidade com dimensões de 10,5 Å superior e 9,2 Å inferior, no domínio extracelular. Com o açúcar ligado às posições C6 e C20 houve um aumento nas dimensões das moléculas para 11,8 Å e 14,6 Å, respectivamente, impedindo a entrada na cavidade. No mesmo experimento, também foi demonstrado que o ácido oleanóico, que possui uma estrutura química similar aos ginsenosídeos, porém não esteroide, inibiu a atividade da enzima.

As evidências de que a flexibilidade de orientação do anel esteroide dos glicosídeos cardiotônicos não influencia a inibição enzimática sugerem a possibilidade de delineamento de novas classes de inibidores, que contenham um grupo alternativo (não esteroide, por exemplo) e que mimetizem o tamanho, a forma e a hidrofobicidade do grupamento esteroide (Keenan *et al.*, 2005).

Os valepotriatos testados são substâncias não glicosiladas, com núcleo principal constituído de oito carbonos (ciclopentanodihidropirano). Não foram encontrados dados na literatura a respeito das dimensões destas estruturas, contudo se comparados às estruturas químicas dos ginsenosídeos, as quais apresentam aumento de suas dimensões com o aumento da ligação de unidades osídicas, pode ser suposto que os valepotriatos possuem menores dimensões. Considerando que os valepotriatos são estruturas menores que os glicosídeos, que são lipofílicas, que apresentam pequenas diferenças estruturais e que inibem a atividade enzimática da Na⁺K⁺ATPase, é possível que os valepotriatos consigam acoplar-se ao sítio extracelular da enzima e, com isso, bloquear a entrada de íons, da mesma forma que ocorre com os ginsenosídeos.

Ação sobre a enzima Na⁺K⁺ATPase pode ter consequências biológicas diversas, entre essas o desenvolvimento de toxicidade, já bem conhecida para os digitálicos, e alterações na liberação de neurotransmissores, com possíveis implicações na gênese

e/ou tratamento de distúrbios psiquiátricos. Alguns estudos destacam a diminuição da atividade enzimática em pacientes com desordem bipolar (Rose *et al.*, 1998; El-Mallakh e Wyatt, 1995). Outros ressaltam uma possível ligação com a depressão maior (Zanatta *et al.*, 2001; Vasconcellos *et al.*, 2005).

Alguns autores demonstraram que a inibição da Na⁺K⁺ATPase modula a liberação de neurotransmissor pelas terminações nervosas (Lichstein e Rose, 2001). A inibição da Na⁺K⁺ATPase por endobaína E aumentou a liberação de norepinefrina em hipotálamo de ratos e inibiu, em torno de 60 %, a recaptação do neurotransmissor (Vatta *et al.*, 2004). A infusão de ouabaína, por microdiálise intraestriatal, aumentou a liberação de dopamina, glutamato e aspartato, e diminuiu a liberação de acetilcolina e glutamina (Westerink *et al.*, 1989).

Neurotransmissores, por sua vez, também regulam a atividade enzimática. Foi demonstrado que dopamina inibiu a atividade da Na⁺K⁺ATPase, porém em presença de glutamato este efeito foi prevenido e estimulou a atividade enzimática (Teixeira *et al.*, 2003).

Como citado anteriormente, os ensaios comportamentais foram realizados com as soluções extrativas enriquecidas em valepotriatos ou em flavonóides, obtidas por maceração em ultrassom e por fluido supercrítico. A escolha da dose utilizada nos ensaios comportamentais foi determinada a partir de um ensaio piloto no modelo do labirinto em cruz elevado, no qual os camundongos foram tratados com 15 mg/kg da solução extrativa diclorometânica pela via intraperitoneal (i.p). Durante o experimento, foi observado que os animais tratados com essa solução apresentaram contorções e morreram, alguns dias após a realização do experimento. Tais observações indicaram a necessidade de realização de um estudo de toxicidade aguda.

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado com a solução enriquecida em valepotriatos nas doses de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mg/kg (n = 10), via intraperitoneal (i.p), e 5, 10, 20,40 e 80 mg/kg (n = 5), via oral (gavage). Os sinais de toxicidade observados foram contorção, diarreia, piloereção, ptose palpebral e redução de massa corporal. A dose letal mediana (DL₅₀) estimada, através do método dos probitos (24

horas), foi de 42 ± 3 mg/kg (i.p). Pela via oral, não foram detectados sinais de toxicidade nem morte, no período de 24 horas, porém na primeira semana, após o tratamento, alguns animais apresentaram uma leve diarreia e nas doses de 20, 40 e 80 mg/kg houve uma morte por dose.

As normativas propostas pela OECD (2001) preconizam que a avaliação da toxicidade aguda, para classificação em categorias farmacológicas e estimativas da DL_{50} , deve ser realizada com doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. Pelas diretrizes 420 e 423, se escolhe a dose inicial, dentre as citadas, utilizando três animais. Se houver zero ou uma morte, segue-se com a dose seguinte e, assim, sucessivamente. Em função dos resultados obtidos no estudo piloto para ansiedade, neste trabalho optou-se por uma faixa mais estreita de doses, com menores valores, para a definição das doses a serem utilizadas nos ensaios farmacológicos *in vivo* subsequentes. Segundo a OECD (2001), que segue classificação determinada pelo *Globally Harmonised System* (GHS), para as substâncias que causam toxicidade aguda, uma substância com DL_{50} de 50 mg/kg, via oral, é considerada como altamente tóxica (classe 2). Para a via intraperitoneal, a toxicidade classe 2 é determinada por uma DL_{50} de 10 mg/kg, enquanto para a classe 3 (moderadamente tóxica), a DL_{50} é de 75 mg/kg. Conforme esta classificação, o valor estimado de DL_{50} de 42 mg/kg (via ip) classifica os valepotriatos em posição intermediária entre as categorias toxicológicas 2 e 3, com toxicidade alta a moderada.

Toxicidade relacionada ao uso de espécies de *Valeriana* tem sido citada na literatura. Alguns pesquisadores demonstraram que os valepotriatos apresentam atividade citotóxica, carcinogênica e mutagênica (Bounthanh *et al.*, 1981; Bounthanh *et al.*, 1983; Hui-Lian *et al.*, 2003; Vo *et al.*; 2003). Bounthanh e colaboradores (1983) consideram que a citotoxicidade dos valepotriatos é devida a ligação dupla entre C5-C6, enquanto outros pesquisadores atribuem a ação ao grupo epóxido ligado ao C8, que atuaria como um agente alquilante (Braun *et al.*, 1982). Al-Majed e colaboradores (2006) demonstraram efeito genotóxico em células hepáticas e testiculares de animais tratados com 2000 mg/kg/dia, durante sete dias, com uma preparação de valeriana padronizada em 0,8 % ácidos valerênicos. Por outro lado, ratas prenhes tratadas com

uma solução extrativa metanólica (2,79 g/kg/dia, por 8 dias, vo) não desenvolveram fetos com malformação (Yao *et al.*, 2007).

Há relatos que os valepotriatos são pobremente absorvidos; também são muito instáveis, sofrendo degradação em meio ácido, o que poderia explicar sua menor toxicidade quando administrados por via oral. Em ensaios *in vivo*, não haviam sido observados sinais de toxicidade, até o momento (Tufik *et al.*, 1994; Yao *et al.*, 2007). Em nosso estudo, os sinais de toxicidade mais intensos foram observados nos animais tratados pela via intraperitoneal. Na primeira semana de observação, após tratamento agudo pela via oral, os animais apresentaram uma leve diarreia. No quinto dia após a administração, ocorreu uma morte entre cinco animais tratados com 20, 40 e 80 mg/kg. Nos nove dias subsequentes, não foram observados sinais de toxicidade e os animais começaram a ganhar peso. Sendo assim, o menor efeito tóxico observado pela via oral pode estar relacionado a questões de metabolismo, bem como questões de estabilidade das moléculas.

Uma hipótese formulada para tentar explicar os efeitos tóxicos desenvolvidos nos animais tratados com a mistura de valepotriatos, foi a existência de uma possível relação com a inibição da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. Cardiotônicos são fármacos de índice terapêutico muito baixo. Atuam aumentando a força contrátil miocárdica (inotropismo positivo), promovendo elevação do volume de sangue ejetado e, conseqüentemente, alterando o aporte de oxigênio e nutrientes que chegam aos tecidos e órgãos periféricos, sendo utilizados no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva. As ações ionotrópicas, bem como as tóxicas das substâncias digitálicas, são mediadas através da inibição do transportador transmembranar de sódio e potássio, sendo a intoxicação meramente um estágio mais avançado do mesmo processo (Chung, 1981). A inibição da enzima causa uma diminuição de íons K^+ e aumento dos níveis intracelulares de íons Na^+ , que por sua vez modulam a atividade de um carreador de membrana envolvido nas trocas de íons Ca^{++} por íons Na^+ , promovendo considerável elevação dos níveis intracelulares de Ca^{++} por influxo, ou pela mobilização de reservatórios sarcoplasmáticos. Este aumento melhora a eficiência da excitação-contracção e aumenta a contratilidade miocárdica. A cardiotoxicidade é resultante do

estágio mais avançado de inibição enzimática e de uma perda excessiva de potássio. Nesse estágio a configuração do potencial de ação é afetada, gerando aumento da automaticidade, depressão da condução e encurtamento do período refratário, predispondo ao desenvolvimento de arritmias (Chung, 1981; Fraga e Barreiro, 1996). Como demonstrado no corrente trabalho, os valepotriatos inibiram a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ e é possível, que como consequência desta inibição, uma toxicidade cardíaca tenha levado os animais à morte.

Frente aos dados observados de toxicidade aguda, foi escolhida a utilização da via oral para a continuação dos experimentos *in vivo*. Para a realização do teste do labirinto em cruz elevado e teste de potenciação do sono barbitúrico, a solução extrativa diclorometânica (enriquecida em valepotriatos) e a solução extrativa metanólica (enriquecida em flavonóides), foram administradas na dose de 10 mg/kg.

O tratamento oral com as soluções diclorometânica (tabela 5.5) e metanólica (tabela 5.6), de *V. glechomifolia*, não aumentou o tempo de permanência, nem o número de entradas nos braços abertos e, também, não alterou o tempo de indução (latência) para o sono barbitúrico, nem o tempo (duração) de sono induzido por pentobarbital sódico (40 mg/kg) (tabela 5.7).

Tabela 5.5: efeito da solução extrativa diclorometânica de *V. glechomifolia* (VAL 10 mg/kg, v.o) no labirinto em cruz elevado (valores absolutos).

Tratamento	Tempo de permanência (s)		Número de Entradas (n)			Rearings (n)
	Braços Abertos	Braços Fechados	Braços Abertos	Braços Fechados	Total	
SAL (n=9)	94,1 ± 65,85	112,7 ± 87,51	6,1 ± 3,55	7,1 ± 5,16	13,8 ± 4,6	5,3 ± 3,9
DZP (n=9)	201,1 ± 70,35*	48,5 ± 61,92**	4,8 ± 4,02 [#]	8,4 ± 8,31 ^{##}	18,6 ± 5,7	2,1 ± 1,8 ^{//}
VAL (n=15)	37,5 ± 34,15	188,7 ± 56,67	4,5 ± 3,91	7,7 ± 4,56	10,4 ± 4,4	3,3 ± 2,9

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA seguida de Teste de Tukey : *p<0,001; ** p<0,001; [#]p<0,001; ^{##}p<0,001; ^{//}p=0,039 quando comparadas aos respectivos grupos controle salina. VAL: solução diclorometânica enriquecida em valepotriatos + TWEEN 1 %; SAL: salina + TWEEN 1 %; DZP: diazepam + TWEEN 1 %.

Tabela 5.6: efeito da solução extrativa metanólica de *V. glechomifolia* (FLA 10 mg/kg, v.o) no labirinto em cruz elevado (valores absolutos).

Tratamento	Tempo de permanência (s)		Número de Entradas (n)			Rearings (n)
	Braços Abertos	Braços Fechados	Braços Abertos	Braços Fechados	Total	
SAL (n=10)	34,3 ± 17,46	142,4 ± 40,68	3,2 ± 1,81	9,3 ± 3,06	14,3 ± 3,53	5,1 ± 3,41
DZP (n=10)	88,4 ± 17,49*	83,9 ± 17,73**	8,5 ± 3,03 [#]	10,3 ± 2,63 ^{##}	16,8 ± 1,53	1,5 ± 0,85
FLA (n=8)	52,12 ± 38,73	153,7 ± 39,78	5,4 ± 3,81	10,1 ± 2,41	15,5 ± 5,18	10,2 ± 8,12 ^{//}

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA seguida de Student Newman Keuls *p=0,003 ($F_{(2,27)}=7,288$); **p=0,007 ($F_{(2,27)}=6,063$); [#]p<0,001 ($F_{(2,27)}=22,606$); ^{##}p<0,001 ($F_{(2,27)}=23,492$); ^{//}p=0,003 ($F_{(2,27)}=7,436$); quando comparadas aos respectivos grupos controle salina. FLA: solução metanólica enriquecida em flavonóides + TWEEN 1 %; SAL: salina + TWEEN 1 %; DZP: diazepam + TWEEN 1 %.

Tabela 5.7: efeito da solução extrativa diclorometânica e metanólica de *V. glechomifolia* no tempo de sono induzido por pentobarbital (40 mg/kg, i.p).

Tratamentos	Latência (min)	Duração (min)
SAL (n=9)	4,0 (4,0-5,0)	33,4 ± 12,65
DZP (n=9)	3,0 (3,0-3,0)**	87,3 ± 24,06 ^{##}
VAL (n=8)	4,0 (3,0-4,0)	27,0 ± 21,98
FLA (n=8)	5,0 (3,5-5,0)	40,2 ± 28,83

Latência: resultados expressos como mediana (intervalo interquartis). Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (SAL) ** p<0,001 (Kruskal-Wallis, H= 16,306); Duração: resultados expressos como média ± dp. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (SAL). ^{##}p<0,001 (ANOVA seguida de Teste de Tukey). VAL: solução diclorometânica enriquecida em valepotriatos + TWEEN 1 %; FLA: solução metanólica enriquecida em flavonóides + TWEEN 1 %; SAL: salina + TWEEN 1 %; DZP: diazepam + TWEEN 1 %.

A solução extrativa diclorometânica, rica em valepotriatos, obtida de *V. glechomifolia*, não apresentou efeito ansiolítico ou sedativo, o que pode ser parcialmente explicado pela falta de afinidade dos valepotriatos isolados pelos receptores benzodiazepínico e serotoninérgico. Diferentes mecanismos de ação são postulados para a atividade ansiolítica, entre eles a modulação de receptores benzodiazepínicos e serotoninérgicos, especialmente o receptor 5HT_{1A}. De modo geral, a redução da atividade serotoninérgica resulta em atividade ansiolítica, enquanto o aumento em atividade ansiogênica (Griebel, 1995). A ação sedativa é regulada por multifatores, estando envolvidos diferentes neurotransmissores como GABA, acetilcolina, noradrenalina, serotonina, histamina e adenosina (Stenberg, 2007). A maioria dos fármacos hipnótico-sedativos utilizados no tratamento da insônia age através da modulação do receptor GABA_A (Sommerer, 2009). Contudo, fármacos que

agem em receptores serotoninérgicos também apresentam atividade sedativa. Atualmente o subtipo 5HT_{2A}, em particular, tem emergido como um importante alvo na busca de novos fármacos para o tratamento da insônia (Landolt e Wehrle, 2009).

Os relatos existentes de ensaios pré-clínicos e clínicos sobre a atividade ansiolítica de extratos de valeriana, padronizados em valepotriatos, são reduzidos. Há um único registro de um estudo piloto controlado, no qual pacientes diagnosticados com distúrbio de ansiedade generalizada receberam, por quatro semanas, a dose de 81,3 mg/dia de valepotriatos (Andreatini *et al.*, 2002). A maioria dos registros sobre a atividade de extratos, obtidos de espécies de *Valeriana*, versa sobre a ação sedativa, sendo os óleos voláteis, valepotriatos, flavonóides e lignanas as substâncias reconhecidas para esta atividade (Hendriks *et al.*, 1981; Morazzoni e Bombardelli, 1995; Marder *et al.*, 2003).

Em ensaios *in vivo*, foi demonstrado que um extrato hidroalcoólico de raízes de *V. edulis*, nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg foi ansiolítico, anticonvulsivante e sedativo (Oliva *et al.*, 2004). Andreatini e colaboradores (1994) reverteram o efeito ansiogênico desenvolvido pela retirada de benzodiazepínicos (ratos tratados com diazepam na dose de 5 mg/kg / 30 dias) com uma mistura de valepotriatos na dose de 12 mg/kg. Uma mistura de valepotriatos contendo 80 % diidrovaltrato, 15 % valtrato e 5 % acevaltrato apresentou efeito sedativo em ratos, na dose de 31 mg/kg (v.o) (Houghton, 1988). A fração éter etílico proveniente da extração com etanol (70 %) de *V. wallichii*, contendo produtos de degradação de valepotriatos (baldrinais), acevaltrato, diidrovaltrato, valtrato e ácido valérico mostrou ligação aos receptores 5HT_{1A} e benzodiazepínico e foi sedativa, em ensaios *in vivo* (Marder *et al.*, 2003).

Os dados de literatura, como pode ser observado, relataram a atividade farmacológica de diferentes extratos (composição variável). A solução extrativa avaliada, no presente trabalho, foi obtida pela utilização de diclorometano como solvente extrator. O diclorometano é um solvente de menor polaridade se comparado ao metanol, etanol ou soluções hidroalcoólicas, portanto apresentado maior seletividade para a extração de valepotriatos que os demais citados. Nas soluções extrativas hidroalcoólicas, avaliadas por outros pesquisadores, substâncias de polaridade

intermediária ou maior que os valepatriatos também podem ter sido extraídas, refletindo em variabilidade na composição química e, conseqüentemente, nos resultados dos ensaios farmacológicos.

Semelhante perfil farmacológico foi observado para a solução extrativa metanólica de *V. glechomifolia* e o flavonóide B6, os quais não apresentaram efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado, nem afinidade importante pelos receptores benzodiazepínico e 5HT_{1A}, respectivamente.

Este resultado foi inesperado, visto que flavonóides estão envolvidos no efeito ansiolítico observado para diversas espécies vegetais como: *Matricaria chamomila*, *Passiflora alata*, *Tilia americana*, *Apocynum venetum*, entre outras (Zanolli *et al.*, 2000; Provensi, 2007; Herrera-Ruiz *et al.*, 2008; Grundmann *et al.*, 2009). Paladini e colaboradores (1998) demonstraram que crisina, apigenina e flavona, via i.p, nas doses de 1, 3 e 3 mg/kg, respectivamente, induziram um aumento no número e no tempo gasto nos braços abertos, no labirinto em cruz elevado, porém para ação sedativa foram necessárias doses acima de 10 e 30 mg/kg. Os flavonóides glicosilados, mircitrina, naringina e gossipina, causaram efeito ansiolítico em camundongos tratados via i.p, com 1 mg/kg (Fernández *et al.*, 2006). Na mesma dose, a flavona 6-metilapigenina, presente em *V. officinalis* e *V. wallichii*, mostrou atividade ansiolítica em camundongos submetidos ao ensaio do labirinto em cruz elevado e afinidade de ligação pelo sítio benzodiazepínico (K_i= 495 nM). Contudo, há também relatos de ação ansiolítica e sedativa de flavonóides isolados, que não se ligam aos receptores benzodiazepínico e serotoninérgico. Hesperidina, isolada de *V. wallichii*, na dose de 4 mg/kg, reduziu a atividade locomotora, a exploração e o número de *rearings* no teste *holeboard* e aumentou o tempo de sono induzido por tiopental, porém não apresentou afinidade de ligação aos receptores benzodiazepínico, serotoninérgico (5HT_{1A}, 5HT₂), AMPA-glutamatérgico e purinérgico (Marder *et al.*, 2003). O flavonóide linarina, isolado de *V. officinalis*, aumentou o tempo de sono induzido por pentobarbital em ratos nas doses de 7 e 14 mg/kg (i.p), porém não ligou ao sítio benzodiazepínico/GABA_A (Fernández, *et al.*, 2004). A flavona luteolina apresentou efeito do tipo ansiolítico, a

despeito de sua fraca afinidade ($K_i = 60,1 \mu\text{M}$) pelo receptor benzodiazepínico (Coleta *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação mais comumente relatado na explicação do efeito ansiolítico de diversos flavonóides é a modulação alostérica positiva do receptor GABA_A , via sítio benzodiazepínico (Medina *et al.*, 1990; Medina, *et al.*, 1998; Paladini *et al.*, 1999; Griebel *et al.*, 1999; Marder e Paladini, 2002). Em contrapartida, Goutman e colaboradores (2003) mostraram que os flavonóides apigenina, quercetina, morina, e flavona antagonizam as correntes iônicas mediadas pelo receptor recombinante $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ GABA_A , não mimetizando o comportamento dos moduladores tipo benzodiazepínicos.

Alguns autores escolhem a utilização da via intraperitoneal, ao invés da via oral, para a administração de flavonóides, pois é de conhecimento que flavonóides administrados pela via oral sofrem metabolismo nos rins e fígado, podendo gerar produtos com reduzida atividade biológica (Walle, 2004). Além disso, quando na forma de heterosídeos, são hidrolisados por glicosidases presentes nas células da mucosa gastrintestinal, ou secretadas pelas bactérias do cólon (Day *et al.*, 1998). Fernández e colaboradores (2006) escolheram a via intraperitoneal para administrar os flavonóides hesperidina, naringina e gossipina, que foram ativos no labirinto em cruz elevado, para minimizar aquele tipo de metabolismo.

Assim, a utilização de outras vias de administração, bem como a investigação de substratos neurobiológicos distintos, na busca de uma ação ansiolítica ou sedativa para *V. glechomifolia* é uma perspectiva interessante para a continuidade deste trabalho. Entre estes diferentes substratos biológicos podemos destacar o sistema de recaptção neuronal de serotonina, dopamina e o sistema purinérgico, bem como outros modelos animais para ansiedade, como o labirinto em T. O aparato é semelhante ao labirinto em cruz elevado, porém sem a presença de um braço aberto, e oferece a medida de duas tarefas comportamentais, denominadas esquiva inibitória e escape, que representam dois tipos de defesa, relacionados à ansiedade e ao medo (pânico), respectivamente. Existe uma boa correlação entre os efeitos dos inibidores da recaptção de serotonina na tarefa esquiva e desordem de ansiedade generalizada, bem como entre a tarefa de escape e desordem de pânico (Pinheiro *et al.*, 2007).

Considerando os relatos do envolvimento da atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ em desordens afetivas, os valepotriatos foram, também, testados em um modelo animal para triagem de antidepressivos. Foram realizados: o teste da natação forçada (figura 5.7) e o teste de atividade locomotora espontânea (tabela 5.8).

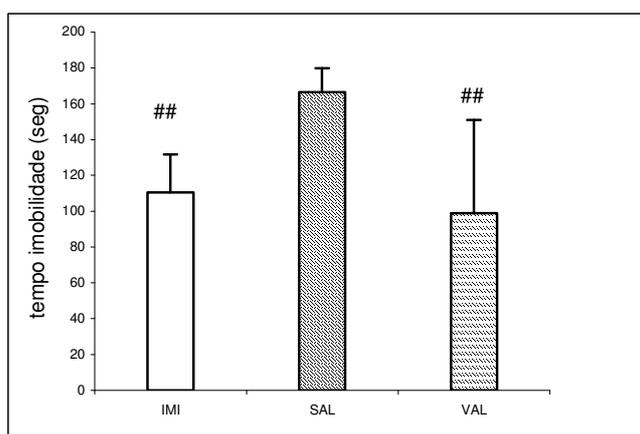


Figura 5.7: efeito da mistura de valepotriatos obtidos por extração em fluido supercrítico (dose 10 mg/kg, v.o) no teste de natação forçada. Resultados expressos como média \pm dp. Diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA seguida de Student Newman Keuls $^{##}p < 0,001$ ($F_{(2,25)} = 10,947$) quando comparada ao controle salina (salina + TEEWN 1 %). IMI: imipramina (n=9); SAL: salina (n=9); VAL: solução extrativa enriquecida em valepotriatos (n=8).

Tabela 5.8: efeito da mistura de valepotriatos obtida por extração em fluido supercrítico (VAL SC) no ensaio de atividade locomotora.

Tratamentos	Número <i>crossings</i>	Número <i>rearings</i>	Número <i>groomings</i>	Número bolos fecais
SAL (n=10)	281,7 \pm 186,22	88,9 \pm 50,72	19,9 \pm 7,45	2,9 \pm 2,33
VAL SC (n=10)	299,8 \pm 62,69	100,4 \pm 25,44	17,0 \pm 8,43	3,8 \pm 2,15

Resultados expressos como média \pm dp. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Teste t). SAL = (salina +TWEEN 1 %)

Os resultados mostraram que, na dose de 10 mg/kg (vo), a mistura de valepotriatos reduziu o tempo de imobilidade dos animais no teste da natação forçada (figura 5.7), sem alterações da atividade locomotora (tabela 5.8), o que demonstra que o efeito antimobilidade na natação não se deve a uma estimulação motora inespecífica, e corrobora, desta forma, com um possível efeito do tipo antidepressivo para a solução extrativa enriquecida em valepotriatos. Este dado é inédito para esse tipo de substância. Em busca realizada na literatura, foi encontrada somente uma publicação

que relaciona atividade do tipo antidepressiva a preparações de *V. officinalis*, (padronizadas em ácidos valerênicos e livres de valepotriatos) (Hattesoehl *et al.*, 2008). Recentemente, foi apresentado por Holzmann e colaboradores (2009), na Reunião da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, que o extrato hidroalcoólico seco, de *V. prionophylla*, apresentou atividade do tipo antidepressivo, em camundongos tratados pela via oral.

Um melhor detalhamento experimental é necessário para que se possa avançar na hipótese de que os valepotriatos tenham atividade antidepressiva. Como perspectiva imediata, é fundamental o estudo de uma relação dose *versus* efeito, no teste da natação forçada, e em outros modelos animais de depressão. Também é necessária a busca do mecanismo de ação, a qual deverá envolver, inicialmente, a investigação da ação dos valepotriatos em sistemas neurotransmissores classicamente envolvidos na depressão, como a neurotransmissão monoaminérgica. Porém, a busca por fármacos com ação antidepressiva tem se expandido para o encontro de diferentes mecanismos de ação, visto que a teoria monoaminérgica da depressão não explica satisfatoriamente, nem a etiologia da depressão, nem o perfil de efeito terapêutico da maioria dos fármacos em uso (Millan, 2006).

No escopo dessa tese, foi identificada a ação inibitória da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, que vem sendo considerada como um novo alvo biológico a ser estudado na etiologia e/ou tratamento de distúrbios do humor, tais como desordem bipolar e depressão. Para a determinação de uma possível ligação entre a modulação da atividade enzimática e a atividade do tipo antidepressiva, determinada no presente trabalho, faz-se necessário à avaliação da atividade enzimática em sinaptossomas de animais previamente submetidos a modelos experimentais de depressão e tratados com valepotriatos.

Foi demonstrada por Zannata e colaboradores (2001) uma reversão da diminuição da atividade $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, em ratos submetidos a estresse crônico, que foram tratados com fluoxetina. Contudo, o resultado foi contrário em animais tratados com imipramina, que causou inibição da atividade enzimática. Vasconcellos e colaboradores (2005), também demonstraram a reversão da diminuição da atividade enzimática, em animais tratados cronicamente com fluoxetina. Seguindo a mesma linha

de trabalho, foi demonstrado que a diminuição da atividade $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ foi prevenida pela administração crônica de lítio. Esses resultados sugeriram que a modulação da atividade enzimática pode ser um dos mecanismos de ação do lítio no tratamento das desordens de humor (Gamaro *et al.*, 2003).

O envolvimento da atividade enzimática em situações de depressão tem sido demonstrado em outras linhas experimentais. A exposição de ratos a baixas concentrações de *malathion*, um organofosforado utilizado na agricultura, levou a uma diminuição da atividade $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ no córtex cerebral, bem como ao aumento do tempo de imobilização, no teste da natação forçada. O tratamento com diselenido de difenila reverteu à inibição enzimática e reduziu o tempo de imobilidade (Acker *et al.*, 2009). Ratos tratados com eletrochoque mostraram aumento da afinidade de ouabaína pela $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, sugerindo que substâncias endógenas do tipo ouabaína estão envolvidas nos efeitos dessa terapia (Bignotto *et al.*, 2006).

A inibição enzimática causada pelos valepotriatos, que são menos seletivos que a ouabaína e que apresentam inibição na faixa de concentração micromolar, pode ter ocorrido em um nível mais superficial, gerando um aumento da excitabilidade da membrana neuronal. Também é possível que a inibição da atividade enzimática possa ter gerado um leve aumento intracelular da concentração de Na^+ , que foi refletida no terminal pré-sináptico por alterações no efluxo de Ca^{2+} , via trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (El-Mallakh e Wyatt, 1995). Portanto, o aumento da excitabilidade aliado a um aumento do cálcio intracelular no terminal dendrítico, pode ter elevado o tempo de liberação de neurotransmissores aminérgicos, bem como reduzido à captação dos mesmos, refletindo na atividade do tipo antidepressiva observada nos experimentos *in vivo*.

Steffens e Feuerstein (2004) demonstraram que a inibição da enzima por ouabaína levou a um decréscimo da captação de serotonina e dopamina, sendo assim os valepotriatos podem ter inibido a recaptação de neurotransmissores aminérgicos, de modo semelhante aos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (Celada *et al.*, 2004).

Além dos diversos ensaios que devem ser desenvolvidos na busca do entendimento das atividades dos valepotriatos, deve-se considerar a investigação dos produtos de degradação dos mesmos. Valepotriatos são substâncias instáveis, que degradam em situações extremas de pH, calor e quando em solução. Entre seus produtos de degradação destaca-se o ácido isovalérico, responsável pelo odor característico das espécies de *Valeriana*. Ribeiro e colaboradores (2007) demonstraram que o ácido isovalérico inibiu a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, presente em homogenatos cerebrais, e essa inibição foi completamente prevenida com o pré-tratamento dos homogenatos com α -tocoferol e creatina, indicando que os radicais peróxidos estão provavelmente envolvidos.

Em suma, foi demonstrado que as soluções extrativas enriquecidas em valepotriatos e flavonóides, obtidas da espécie nativa *Valeriana glechomifolia*, não apresentaram atividade ansiolítica, nem sedativa, na dose de 10 mg/kg, via gavagem, divergindo parcialmente da massa de dados que apontam para ações ansiolítica e hipnótico-sedativa de extratos brutos e frações, obtidos de diferentes espécies de *Valeriana*. A extração por fluido supercrítico com dióxido de carbono mostrou-se eficiente para a obtenção de frações enriquecidas em valepotriatos e, os dados obtidos nesse trabalho, sugerem que essas substâncias possam constituir uma nova classe química com atividade inibitória da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ e com atividade do tipo antidepressiva.

6. CONCLUSÕES

- A partir da solução extrativa diclorometânica de *Valeriana glechomifolia*, foram obtidos os valepotriatos valtrato, acevaltrato, 1- β -acevaltrato e diavaltrato;
- As cinco espécies de *Valeriana*, nativas do Rio Grande do Sul, apresentaram flavonóides; todas mostraram a presença de um produto caracterizado como uma flavona (codificado como B6). As espécies *V. salicariifolia* e *V. scandens* apresentaram, também, compostos com perfil de flavonóis;
- O método de extração utilizando dióxido de carbono em condições supercríticas (SCCO₂), na temperatura de 40 °C e pressões de 90, 120, 150 e 200 bar, se mostrou eficiente para a obtenção de valepotriatos;
- A massa total obtida com SCCO₂ foi superior aquelas obtidas pelos métodos de maceração;
- Valepotriatos foram quantificados nos diferentes extratos, sendo os maiores teores obtidos através da SCCO₂, seguido de maceração por ultrassom e, posteriormente, maceração;
- Em todos os extratos valtrato foi o valepotriato mais abundante, seguido de acevaltrato, 1- β -acevaltrato e isovaltrato;
- Os valepotriatos (valtrato, acevaltrato, 1- β -acevaltrato e diavaltrato) e o flavonóide B6 não ligaram ao sítio benzodiazepínico, do complexo receptor GABA_A, nem ao receptor serotoninérgico (5HT_{1A}), na faixa de concentração de 1-100 μ M;
- A solução extrativa obtida por maceração por ultrassom, com diclorometano, apresentou toxicidade aguda, quando administrada via intraperitoneal, com a dose letal mediana (24h) de 42 \pm 3 mg/kg;

- As soluções extrativas obtidas por maceração por ultrassom, com diclorometano (valepotriatos) e com metanol (flavonóides), na dose de 10 mg/kg, via oral, não demonstraram atividade ansiolítica, no teste do labirinto em cruz elevado, nem sedativa, no tempo de potenciação do sono barbitúrico;
- Os valepotriatos valtrato, acevaltrato e 1- β -acevaltrato inibiram a atividade da enzima Na⁺K⁺ATPase, na faixa de concentração micromolar;
- A fração de valepotriatos, obtidas através de SCCO₂ nas condições 40 °C/90 bar apresentou, na dose de 10 mg/kg, via oral, uma diminuição do tempo de imobilidade no teste da natação forçada, porém não interferiu na locomoção espontânea no teste do campo aberto.

Os resultados mostraram que os valepotriatos não estão envolvidos nas atividades sedativas e ansiolíticas comumente aceitas para as preparações de valeriana. Contudo, demonstraram atividade do tipo antidepressiva e inibição da enzima Na⁺K⁺ATPase, em experimentos *in vitro*. Estes resultados abriram uma nova perspectiva para a continuidade de investigações com essas moléculas, através do estudo de substratos biológicos distintos, como sistemas purinérgicos e dopaminérgicos, bem como a busca do mecanismo de ação envolvido na atividade do tipo antidepressiva observada. Além disso, foi demonstrado que a extração por fluido supercrítico possibilitou a extração de teores mais elevados em relação aos métodos clássicos de extração, promovendo a obtenção de um extrato com menos impurezas, ausência de clorofila e enriquecido nos produtos de interesse.

PERSPECTIVAS

- Utilização de valepotriatos como ferramenta farmacológica em ensaios de avaliação da atividade da enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$.
- Realização de ensaios de atividade enzimática em sinaptossomas de animais previamente submetidos a modelos experimentais de depressão e tratados com valepotriatos.
- Avaliação do perfil de ligação dos valepotriatos e flavonóides, isolados de *V. glechomifolia*, a outros sítios de ligação, tais como receptores GABA_A , barbitúrico, purinérgico, dopaminérgico e canais de cloreto.
- Estudo da relação dose *versus* efeito, no teste da natação forçada e em outros modelos animais de depressão.
- Busca de mecanismo de ação, a qual deverá envolver a investigação da ação dos valepotriatos em sistemas neurotransmissores classicamente envolvidos na depressão, como a neurotransmissão monoaminérgica, no efeito antimobilidade do teste da natação forçada.
- Aprofundamento do estudo de extração de valepotriatos por fluido supercrítico.

7. REFERÊNCIAS

ABOURASHED, E. A.; KOETTER, U., BRATTSTRÖM, A. *In vitro* binding experiments with a valerian, hops and their fixed combination extract (Ze91019) to selected central nervous system receptors. *Phytomedicine*, v.11, p.633–638, 2004.

ACKER, C. A.; LICHESE, C.; PRIGOL, M.; NOGUEIRA, C. W. Antidepressant-like effect of diphenyl diselenide on rats exposed to malathion: involvement of Na⁺K⁺ ATPase activity. *Neuroscience Letters*, v.455, p.168-172, 2009.

AL-MAJED, A. A.; AL-YAHYA, A. A.; AL-BEKAIRI, A. M.; AL-SHABANAH, O. A.; QURESHI, S. Studies on the cytological and biochemical effects of valerian in somatic and germ cells os Swiss albino mice. *Food and Chemical Toxicology*, v.44, p.1830-1837, 2006.

ANDREATINI, R.; LEITE, J. R. Effect of valepotriates on the behavior of rats in the elevated plus-maze during diazepam withdrawal. *European Journal Pharmacology*, v.1; n.260, p.233-235, 1994.

ANDREATINI, R.; SARTORI, V. A.; SEABRA, M. L.; LEITE, J. R. Effect of valepotriates (valerian extract) in generalized anxiety disorder: a randomized placebo-controlled pilot study. *Phytoterapy Research*, v.16, n. 7, p.650-654, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em : <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 9 de agosto de 2009.

ARELLANO, A. H; VILLEGAS, G. L.; URIOSTEQUI, M. L. C.; ALVAREZ, L.; PINEDA, G. V.; ALVAREZ, A. Z.; TORTORIELLO, J. Polysomnographic evaluation of the hypnotic effect of *Valeriana edulis* standardized extract in patients suffering from insomnia. *Planta Medica*, v.67, n.8, p.695-699, 2001.

BACH, K. K.; GHIA, F.; TORSSELL, K. B. G. Valtrates and lignans in *Valeriana microphylla*. *Planta Medica*, v.59, p.478-479, 1993.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, v.38, p.1083-1152, 1999.

BECKER, H.; CHAVADEJ, S.; WEBERLING, F. Valepotriates in *Valeriana thalictroides*. *Planta Medica*, v.49, n.1, p.64,1983.

BENT, S.; PADULA, A.; MOORE, D.; PATTERSON, M.; MEHLING, W. Valerian for sleep: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Medicine*, v.119, p.1005-1012, 2006.

BETTLER, T.; TIAO, J. Y. Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABA_B receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, v.110, n.3, p.533-543, 2006.

BIGNOTTO, M.; BENEDITO, M. A. C. Repeated electroconvulsive shock induces changes in high-affinity [³H]-ouabain binding to rat striatal membranes. *Neurochemical Research*, v.31, p.515-521, 2006.

BLANCO, G.; MERCER, R. W. Isozymes of the Na⁺K⁺ ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Physiological Society*, p.F633-F650, 1998.

BLUMENTHAL, M. *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. Texas: American Botanical Council, 2000.

BORMANN, J. The "ABC" of GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, v.21, n.1, p.16-19, 2000.

BOROS, C.A.; STERMITZ, F.R. Iridoids. An updated review. Part I. *Journal of Natural Products*, v.53, p.1055, 1990.

BORSINI, O. E. Revisión de las Valeraniaceas de Brasil. *Lilloa*, v.31, p.149-170, 1962.

BOS, R.; WOERDENBAG, H. J.; HENDRIKS, H.; ZWAVING, J. H.; De SMET, P. A. G. M.; TITTEL, G.; WIKSTRÖ, H. V.; SCHEFFER, J. J. C. Analytical aspects of phytotherapeutic valerian preparations. *Phytochemical Analysis*, v.7, p.143-151, 1996.

BOS, R.; WOERDENBAG, H. J.; van PUTTEN, F. M. S.; HENDRIKS, H.; SCHEFFER, J. C. Seasonal variation of essential oil, valerenic acid and derivatives, and valepotriates in *Valeriana officinalis* roots and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines. *Planta Medica*, v.64, n.2, p.143-147, 1998.

BOS, R.; WOERDENBAG, H. J.; PRAS, N. Determination of valepotriates. *Journal of Chromatography A*, v.967, p.131-146, 2002.

BOUNTHANH, C.; BERGMANN, C.; BECK, J. P.; HAAG-BERRUER, M.; ANTON, R. Valepotriates, a new class of cytotoxic and antitumor agents. *Planta Medica*, v.41, p.21-28, 1981.

BOUNTHANH, C.; RICHTER, L.; BECK, J. P.; HAAG-BERRUER, M.; ANTON, R. The action of valepotriates on the synthesis of DNA and proteins of cultured hepatoma cells. *Planta Medica*, v.49, p.138-142, 1983.

BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Le mélange diphénylborate de aminoéthanol-PEG 400. Un intéressant réactif de révélation des flavonoïdes. *Journal of Chromatography*, v.351, p.351-355, 1986.

BRUNETON, J. *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Zaragoza: Editoria Acribia, 1991.

BUCKNER, J. D.; BERNERT, R. A.; CROMER, K. R.; JOINER, T. E.; SCHIMIDT, N. B. Social anxiety and insomnia: the mediating role of depressive symptoms. *Depression and Anxiety*, v.25, p.124-130, 2008.

CAPASSO, A.; FEO, V.; SIMONE, F.; SORRENTINO, L. Pharmacological effects of aqueous extract from *Valeriana adscendens*. *Phytotherapy Research*, v.10, p.309-313, 1996.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.75, p.501-512, 2003.

CCAC. *Canadian Council on Animal Care*. 2003. Disponível em: <http://www.ccac.ca/english/gdlines/wildfield/Wildfield.pdf>. Acesso em: junho de 2004.

CELADA, P.; PUIG, M. V.; AMARGÓS-BOSCH, M.; ADELL, A.; ARTIGAS, F. The therapeutic role of 5HT_{1A} and 5HT_{2A} receptors in depression. *Journal Psychiatry Neuroscience*, v.29, n.4, p.252-265, 2004.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução nº 714, de 20/06/2002.

CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. R. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 26, p.937-940, 1999.

CHEN, R. J.; CHUNG, T.; LI, F.; LIN, N.; TC TZEIN, J. Effect of sugar positions in ginsenosides and their inhibitory potency on Na⁺K⁺ ATPase activity. *Acta Pharmacologica Sinica*, v.30, n.1, p.61-69, 2009.

CHEETHAM, S. C.; HEAL, D. J. Antidepressant and anxiolytic drugs. *Biological Psychiatry*, p.511-567, 2000.

CHUNG, D. C. Anaesthetic problems associated with the treatment of cardiovascular disease: I. Digitalis toxicity. *Canadian Anaesthetists Society Journal*, v.28, n.1, p.6-16, 1981.

CIRCOSTA, C.; PASQUALE, R.; SAMPERI, S.; PINO, A; OCCHIUTO, F. Biological and analytical characterization of two extracts from *Valeriana officinalis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.112, p.361-367, 2007.

CNRS. Centre National de la Recherche Scientifique. *Éthique en Sciences de la Vie, Guide Pratique*, v.3, 2000.

COLETA, M.; CAMPOS, M. G.; COTRIM, M. D.; LIMA, T. C.; CUNHA, A. P. Assessment of luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) neuropharmacological activity. *Behavioural Brain Research*, v.189, p.75-82, 2008.

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. 7. ed. New York: Oxford University Press, 1996.

COOPER, J. R.; BLOOM, F. E.; ROTH, R. H. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. 8. ed. New York: Oxford University Press, 2003.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*. 3. ed. Lisboa : Fundação Calouste, 1975, v.1.

CRONQUIST, A. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York: Columbia Univ. Press, 1981.

CURRY, D. T.; EISENSTEIN, R.D.; WALSH, J. K. Pharmacologic management of insomnia: past, present and future. *Psychiatric Clinics of North America*, v.29, p.871-893, 2006.

DAHLGREN, G. The last Dahlgrenogram, System of classification of the dicotyledons. In: Tan. K. ed. *Plant Taxonomy, Phytogeography and Related Subjects*. Edinburgh: Edinburgh Univ.Press, 1989.

DAHLGREN, R. M. T. A revised system of classification of the angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.80, p.91, 1980.

DAMTOFT, S. Biosynthesis of catalpol. *Phytochemistry*, v.31, n.5, p.1187-1189, 1994.

DAMTOFT, S.; JENSEN, S. R.; JENSEN, C. U. Intermediates between 8-*epi*-deoxiloganic acid and 6,10-dideoxyaucubin in the biosynthesis of antirrhinoside. *Phytochemistry*, v.33, n.5, p.1087-1088, 1993^a.

DAMTOFT, S.; JENSEN, S. R.; JENSEN, C. U.; KNUDSEN, T. B. Late stages in the biosynthesis of aucubin in *Scrophularia*. *Phytochemistry*, v.33, n.5, p.1089-1093, 1993^b.

DAY, A. J.; DUPONT, M. S.; RIDLEY, S.; RHODES, M.; RHODES, M. J. C.; MORGAN, M. R. A.; WILLIAMSON, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Letters*, v.436, p. 71-75 1998.

DE CARVALHO C. M. B.; MAURMANN, N.; LUZ, D. I.; FETT-NETO, A. G.; RECH, S. B. Control of development and valepotriate production by auxins in micropropagated *Valeriana glechomifolia*. *Plant Cell Reports*, v.23, p.251–255, 2004.

DÉCIGA-CAMPOS, M.; CRUZ, I. R.; ALBA, M. A.; CORRAL, G. C.; LÓPEZ, G. E. A.; NAVARRETE, A.; MATA, R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v.110, p.334-342, 2007.

DENEE, R.; BOS, R.; HAZELHOFF, B. Isolation and structure elucidation of isovaltral, a decomposition product of isovaltrate. *Planta Medica*, v.37, p.45-48, 1979.

DHARMARATNE, H. R.; NANAYAKKARA, N. P.; KHAN, I. A. (-)-3 beta, 4 beta-epoxyvalerenic acid from *Valeriana officinalis*. *Planta Medica*, v.68, n.7, p.661-662, 2002.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.2441-2469, 2006.

DIETZ, B. M.; MAHADY, G. B.; PAULI, G. F.; FARNSWORTH. Valerian extract and valerenic acid are partial agonists of the 5-HT_{5a} receptor in vitro. *Molecular Brain Research*, v.138, p.191-197, 2005.

DUKE, J.A. *Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton: CRC Press, 1985.

EL-MALLAKH, R. S.; WYATT, R. J. The Na⁺K⁺ ATPase hypothesis for bipolar illness. *Society of Biological Psychiatry*, v.37, p.235-244, 1995.

EL-NAGAR, L.; BEAL, J. Iridoids. A review. *Journal of Natural Products*, v.43, n.6, p.649-707, 1980.

ERIKSEN, B. Notes on generic and infrageneric delimitation in the Valerianaceae. *Nordic Journal of Botany*, v.9, n.2, p.179-187, 1989.

EBRINGEROVA, A.; KARDOSOVA, A.; HROMADKOVA, Z.; HRIBALOVA, V. Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. *Fitoterapia*, v.74, p.52-61, 2003.

FÉRAILLE, E.; BUSTAMANTE, M. Sodium-potassium-ATPase. In: BURNIER, M. *Sodium in health and disease*. New York: Informa Healthcare, 2008.

FERNÁNDEZ, S.; WASOWSKI, C.; PALADINI, A. C.; MAEDRE, M. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.77, p.399-404, 2004.

FERNÁNDEZ, S.; 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.

FERNÁNDEZ, S.; WASOWSKI, C.; LOSCALZO, L. M.; GRANGER, R. E.; JOHNSTON, G. A.; PALADINI, A. C.; MARDER, M. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *European Journal of Pharmacology*, v.539, n.3, p.168-176, 2006.

FIELDS, A. M.; RICHARDS, T. A.; FELTON, J. A.; FELTON, S. K.; BAYER, E. Z.; IBRAHIM, I. N.; KAYE, A. D. Analysis of responses to valerian root extract in the feline pulmonary vascular bed. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. v.9, n.6, p.909-918, 2003.

FILHO, J. M. B. Lignananas, neolignananas e seus análogos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; De MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2007.

FLECKA, M. P. A.; LAFERB, B.; SOUGEYC, E. B.; DEL PORTOD, J. A.; BRASILE, M. A.; JURUENAF, M. F. Diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão (versão integral). *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.25, n.2, p.114-122, 2003.

FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Cardiotônicos: histórico e perspectivas de uma antiga e importante classe de agentes terapêuticos. *Química Nova*, v.19, n.2, p.182-189, 1996.

FRANZYK, H. *An Investigation of the Biosynthesis of Secoiridoid Glucosides in the Olive Family*. Lyngby: The Technical University of Denmark, 1993. Tese de Doutorado.

FREYTAG, W. E. Bestimmung von Valerensäuren und valerenal neben valepotriaten in *Valeriana officinalis* durch HPLC. *Pharmazeutische Zeitung*, v.128, n.52, p.2869-2871, 1983.

FURSA, N. S.; BELYAEVA, L. E.; RYBAL'CHENKO, A. S. Phenolic compounds from aboveground part of valerian. III. Composition of *Valeriana turkestanica*. *Khimija Prirodnikh Soyedineniy*, n.1, p.98, 1981. Abstract

FURSA, N. S.; LITVINENKO, V. I. Flavonoid content of the aboveground organs of *Valeriana coreana*. *Farmatsevtichnyi Zhurnal Kiev*, n.3, p.74, 1981. Abstract

FURSA, N. S. Phenol compounds from the aboveground part of valerian. II. Composition of phenol compounds from *Valeriana amaurensis*. *Khimija Prirodnikh Soyedineniy*, n.3, p.407, 1979. Abstract

FURSA, N. S. Phenolic compound composition in the aboveground organs of *Valeriana turczaninovii* Grub. and *Valeriana capitata* Poll. *Farmatsevtichnyi Zhurnal Kiev*, n.6, p.60, 1980. Abstract

FURSA, N. S. Phenolic compounds, sterols and iridoids of valeriana. VII. Composition of phenolic compounds, β -sitosterol and valepotriates of *Valeriana rossica*. *Khimija Prirodnikh Soyedineniy*, n.4, p.525-526, 1984. Abstract

FURSA, N. S. Phenolic content of flowers of Crimean *Valeriana grossheimii*. *Farmatsevtichnyi Zhurnal Kiev*, n.5, p.76, 1982. Abstract

FURSA, N. S. *Valeriana palustris* Kreyer flavonoids. *Rastitel'nye Resursy*, v.19, n.2, p.216-218, 1983. Abstract

FURSA, N. S.; BELYAEVA, L. E. Flavonoid composition of vegetative and reproductive organs of *Valeriana tuberosa* L. *Ukrains'kyi Botanichnyi Zhurnal*, v.10, n.3, p.36-38, 1983. Abstract

FURSA, N. S.; GOROVOI, P. G.; IVANOVA, L. G. Flavonoid composition of the aerial organs of *Valeriana ajanensis* and *Valeriana fasciculata*. *Farmatsevychnyi Zhurnal Kiev*, n.6, p.66-67, 1987. Abstract

FURSA, N. S.; TRZHETSINSKII, S. D.; ZAITIV, V. G.; GORBUNOV, Y. N. Phenolic compounds of the aboveground part and iridoids of the subsurface part of *Valeriana*. VI. Flavonoids and valepotriates of *Valeriana eriophylla* and *Valeriana cardamines*. *Khimija Prirodnykh Soyedineniy*, n.2, p.249, 1984. Abstract

GAMARO, G. D.; STRECK, E. L.; MATTÉ, C.; PREDIGER, M. E.; WYSE, A. T. S.; DALMAZ, C. Reduction of hippocampal Na⁺K⁺ ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochemical Research*, v.28, n.9, p.1339-1344, 2003.

GARCIA, D. G.; BIANCO, E. M.; SANTOS, M. D.; PEREIRA, R. C.; FARIA, M. V.; TEIXEIRA, V. L.; BURTH, P. Inhibition of mammal Na⁺K⁺ ATPase by diterpenes extracted from the Brazilian brown alga *Dictyota cervicornis*. *Phytotherapy Research*, v.23, p.943-947, 2009.

GILANI, A. H.; KHAN, A-U.; JABEEN, Q.; SUBHAN, F.; GHAFAR, R. Antspasmodic and blood pressure lowering effects of *Valeriana wallichii* are mediated through K⁺ channel activation. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, p.347-352, 2005.

GOLDIM, J. R. *Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais*. Porto Alegre: HCPA, 1995.

GOLDSTEIN, I.; LEVY, T.; GALILI, D.; OVADIA, H.; YRMIYA, R.; ROSEN, H.; LICHTSTEIN. Involvement of Na⁺K⁺ ATPase and endogenous digitalis-like compounds in depressive disorders. *Society of Biological Psychiatry*, v.60, p.491-499, 2006.

GORMAN, J. M.; HIRSCHFELD, R. M. A.; NINAN, P. T. New developments in the neurobiological basis of anxiety disorders. *Psychopharmacology*, v.36, n.2, p.49-67, 2002.

GOUTMAN, J. D.; WAXEMBERG, M. D.; DOÑATE-OLIVER, F.; POMATA, P. E.; CALVO, D. J. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA_A and GABA_C receptors. *European Journal of Pharmacology*, v.461, p.79-87, 2003.

GRIEBEL, G.; PERRAULT, G.; TAN, S.; SHOEMAKER, H.; SANGER, D. J. Pharmacological studies on synthetic flavonoids: comparison with diazepam. *Neuropharmacology*, v.38, p.965-977, 1999.

GROSS, C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, v.5, p.545-552, 2004.

GRUNDMANN, O.; NAKAJIMA, J-I.; KAMATA, K.; SEO, S.; BUTTERWECK, V. Kaempferol from the leaves of *Apocynum venetum* possesses anxiolytic activities in the elevated plus maze test in mice. *Phytomedicine*, v.16, n.4, p.295-302, 2009.

GUTIERREZ, S.; ANG-LEE, M. K.; WALKER, D. J.; ZACNY, J. P. Assessing subjective and psychomotor effects of the herbal medication valerian in healthy volunteers. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.78, n.1, p.57-64, 2004.

GYLLENHAAL, C.; MERRITT, S. L.; PETERSON, S. D.; BLOCK, K. I.; GOCHENOUR, T. Efficacy and safety of herbal stimulants and sedatives in sleep disorders. *Sleep Medicine Reviews*, v.4, n.3, p.229-251, 2000.

HANDJIEVA, N.; POPOV, S.; MAREKOV, N. AHD-Valtrate, a new valepotriate from *Centranthus ruber*. *Phytochemistry*, v.17, p.561-563, 1978.

HANDJIEVA, N.; ZAIKIN, V.G. DIA-Valtrate, a new valepotriate from *Centranthus ruber* (L.) DC. *Planta Medica*, v.34, p.203-206, 1978.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. *The flavonoids*. New York: Academic Press, 1975.

HATTESOHL, M.; FEISTEL, B.; SIEVERS, H.; LEHNFELD, R.; HEGGER, M.; WINTERHOFF, H. Extracts of *Valeriana officinalis* L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. *Phytomedicine*, v.15, p.2-15, 2008.

HENDRIKS, H.; BOS, R.; ALLERSMA, D. P.; MALINGRÉ, Th. M.; KOSTER, A. S. Pharmacological screening of valeranal and some other components of essential oil of *Valeriana officinalis*. *Planta Medica*, v.42, p.62-68, 1981.

HERRERA-RUIZ, M.; RÓMAN-RAMOS, R.; ZAMILPA, A.; TORTORIELLO, J.; JIMÉNEZ-FERRER, J. E. Flavonoids from *Tilia americana* with anxiolytic activity in plus maze test. *Journal Ethnopharmacology*, v.118, n.2, p.312-317, 2008.

HILLER, K.O.; ZETLER, G. Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L.: behavioural and anticonvulsant properties. *Phytotherapy Research*, v.10, n.2, p.145-151, 1996.

HOBBS, C. Valerian. *Herbalgram*, v.21, p.19-34, 1989.

HÖLZ, J.; KOCH, U. Über die Inhaltsstoffe von *Valeriana alliariifolia*. *Planta Medica*, v.50, p.458, 1984.

HOLZMANN, I.; CECHINEL, F. V.; CRUZ, S. M.; MARTÍNEZ, J. V.; SANTIZO, A.; CÁCERES, A.; SOUZA, M. M. Avaliação do efeito ansiolítico, antidepressivo e hipnótico de *Valeriana prionophylla* Standl. em modelos farmacológicos específicos. 41º

Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009. Resumo 03033.

HOUGHTON, P.J. The biological activity of valerian and related plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.22, p.121-142, 1988.

HOUGHTON, P.J. Valerian. *The Pharmaceutical Journal*, v.253, p.95-96, 1994.

HOYER, D.; HANNON, J. P.; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.71, p.533–554, 2002.

HUI-LIAN, W.; DONG-FANG, Z.; ZHAO-FENG, L; YANG, L.; QIAN-RONG; YU-ZHEN, W. *In vitro* study on the genotoxicity of dichloromethane extracts of valerian (DEV) in human endothelial ECV304 cells and the effect of vitamins E and C in attenuating the DEV-induced DNA damages. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.188, p.26-41, 2003.

INOUYE, H. Iridoids, In: CHARLWOOD, B.V.; BANTHORPE, D.V. (ed.). *Methods in Plant Biochemistry*. London: Academic Press, 1991.

JACOBO-HERRERA, N. J.; VARTIAINEN, N.; BREMNER, P.; GIBBONS, S.; KOISTINAHO, J.; HEINRICH, M. NF- κ B modulators from *Valeriana officinalis*. *Phytotherapy Research*, v.20, p. 917–919, 2006.

JANSSON-FRÖJMARK, M.; LINDBLÖM, K. A bidirectional relationship between anxiety and depression, and insomnia? A prospective study in the general population. *Journal of Psychosomatic Research*, v.64, p.443-449, 2008.

JENSEN, S. R. Plants iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms. In: HARBORNE, J. B.; TOMAS-BARBERAN, F. A. (ed.). *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*. Oxford: Clarendon Press, 1991.

JENSEN, S.R. Systematic implication of the distribution of iridoids and other chemical compounds in the Loganiaceae and other families of the Asteridae. *Annals Missouri Botanical Garden*, v.79, p.284, 1992.

JENSEN, S.R.; NIELSEN, B.J.; DAHLGREN, R. Iridoid compounds, their occurrence and systematic importance in the angiosperms. *Botaniska Notiser*, v.128, p.148-180, 1975.

KEENAN, S. M.; DELISLE, R. K.; WELSH, W. J.; PAULA, S.; BALL Jr., W. J. Elucidation of the Na⁺K⁺ ATPase digitalis binding site. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v.23, p.465-475, 2005.

KISS, J. P. Theory of active antidepressants: a nonsynaptic approach to the treatment of depression. *Neurochemistry International*, v.52, p.34-39, 2008.

KOCH, U.; HÖLZ, J. Über die Inhaltsstoffe von *Valeriana alliariifolia*. Valepotriatydine. *Planta Medica*, n.2, p.172-173, 1985.

KORNIEVSKII, Y .I.; FURSA, N. S.; RYBAL'CHENKO, A. S.; KORESCHUK, K. E. Composition of flavonoids of common valerian from southern and central regions of the Ukraine. *Farmatsevychnyi Zhurnal Kiev*, n.4, p.71-72, 1979. Abstract

KUCABA, W.; THIES, P. W.; FINNER, E. Isodidrovaltratum, ein neues valepotriat aus *Valeriana vaginata*. *Phytochemistry*, v.19, p.575-77, 1980.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M. *Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Mediciniais*. Porto Alegre: Metrópole, 2003.

LANDOLT, H. P.; WEHRLE, R. Antagonism of serotonergic 5-HT_{2A/2C} receptors: mutual improvement of sleep, cognition and mood? *European Journal of Neuroscience*, v.29, p. 1795–1809, 2009.

LARCHER, S. K.; MAYER, R.; SICHARDT, K.; NIEBER, K.; MÜLLER, C. E. Interaction of valerian extracts of diferente polarity with adenosine receptors: identification of isovaltrate as an inverse agonist at A₁ receptors. *Biochemical Pharmacology*, v.73, p.248-258, 2007.

LETCHAMO, W.; WARD, W.; HEARD, B.; HEARD, D. Essential oil of *Valeriana officinalis* L. cultivars and their antimicrobial activity as influenced by harvesting time under commercial organic cultivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.3915-3919, 2004.

LICHSTEIN, D.; ROSEN, H. Endogenous digitalis-like Na⁺K⁺ ATPase inhibitors, and brain function. *Neurochemical Research*, v.26, n.8/9, p.971-978, 2001.

LIN, S.; SHEN, Y-H; LI, H-L.; YANG, X-W.; CHEN, T.; LU, L-H.; HUANG, Z-S; LIU, R-H; XU, X-K.; ZHANG, W-D; WANG, H. Acylated iridoids with cytotoxicity from *Valeriana jatamansi*. *Journal Natural Products*, v.72, p.650-655, 2009.

LOPES, D. V. S.; CARUSO, R. R. B.; CASTRO, N. G.; COSTA, P. R. R.; SILVA, A. J. M.; NOËL F. Characterization of a new synthetic isoflavonoid with inverse agonist activity at the central benzodiazepine receptor. *European Journal of Pharmacology*, v.502, n. 1-2, p.157-157, 2004.

LOPEZ, L. B.; QUINTAS, L. E. M.; NOËL, F. Influence of development on Na⁺K⁺ ATPase expression: isoform- and tissue-dependency. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v.131, p. 323-333, 2002.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265-275, 1951.

MACÚ, E. M. C. Tamizaje antibacteriano *in vitro* de los extractos etanólicos de las hojas y raíces de especímenes de *Valeriana prionophylla* Standl. procedentes de tres regiones del altiplano guatemalteco. Dissertação (Mestrado) – Escuela de Estudios de Postgrado . Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 2007.

MALVA, J. O.; SANTOS, S.; MACEDO, T. Neuroprotective properties of *Valeriana officinalis* extracts. *Neurotoxicity Research*, v.6, n.2, p.131-140, 2004.

MANJI, H. K.; DREVETS, W. C.; CHARNEY, D. S. The cellular neurobiology of depression. *Nature Medicine*, v.7, p.541-547, 2001.

MARDER, M.; PALADINI, A. C. GABA_A-receptor ligands of flavonoid structure. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.2, p.853-867, 2002.

MARDER, M.; VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; FERNÁNDEZ, S.; MEDINA, J. H.; PALADINI, A. C. 6-methylapigenin and hesperidin: new *Valeriana* flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.75, p.537-545, 2003.

MAURMANN, N.; RECH, S. B.; FETT-NETO, A. G. Improved nutrient medium for biomass and valepotriate production in extended period stock cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 44, p.209–215, 2008.

MEDINA, J. H.; PALADINI, A. C.; WOLFMAN, C.; LEVI, M.; CALVO, D.; DIAZ, L. E.; PEÑA, C. Chrysin, a naturally occurring monoflavonoid, recognizes benzodiazepine receptors and posses anticonvulsivant properties. *Biochemical Pharmacology*, v.40, p.2227-232, 1990.

MEDINA, J. H.; VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; MARDER, M.; WASOWSKI, C.; CALVO, D.; PALADINI, A. C. Neuroactive flavonoids: new ligands for the benzodiazepine receptors. *Phytomedicine*, v.5, n.2, 235-243, 1998.

MCENANY, G. Herbal psychotropics. Part 3: focus on kava, valerian and melatonin. *Journal of the American Psychiatric Nurses Association*, v.6, n.4, p.126-130, 2000.

MENINI, T.; BERNASCONI, P.; BOMBAEDELLE, E.; MORAZZONI, P. *In vitro* study on the ineration of extracts and pure compounds from *Valeriana officinalis* roots with GABA, benzodiazepine and barbiturate receptors in rat brain. *Fitoterapia*, v. LXIV, n. 4, p. 291-300, 1993.

MILLAN, M. J. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states. Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacology and Therapeutics*, v.110, p.153-370, 2006.

MÖHLER, H. GABA_A receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Research*, v.326, p. 505-516, 2006.

MÖHLER, H.; KNOFLACH, F.; PAYSAN, J.; MOTEJLEK, K.; BENKE, D.; LUSCHER, B.; FRISCHY, J. M. Heterogeneity of GABA_A receptors: cell-specific expression, pharmacology, and regulation. *Neurochemistry Research*, v.20, n.5, p.631-636, 1995.

MORAZZONI, P; BOMBARDELLI, E. *Valeriana officinalis*: traditional use and recent evaluation of activity. *Fitoterapia*, v. LXVI, n.2, p.99-112, 1995.

MÜLLER, C. E.; SCHUMACHER, B., BRATTSTRÖM, A.; ABOURASHED, E. A.; KOETTER, U. Interactions of valerian extracts and a fixed valerian-hop extract combination with adenosine receptors. *Life Sciences*, v.71, p.1939-1949, 2002.

NAVARRETE, A.; AVULA, B.; CHOI, Y-W.; KHAN, I. Chemical fingerprinting of valeriana species: simultaneous determination of valerenic acids, flavonoids, and phenylpropanoids using liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of AOAC International*, v.89, n.1, p.8-15, 2006.

NENCINI, C.; CAVALLO, F.; COPASSO, A.; FEO, V.; MARTINO, L.; BRUNI., G.; GIORGI, G.; MICHELI, L. Binding studies for serotonergic, dopaminergic and noradrenergic receptors of *Valeriana adscendens* Trel. extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v.108, p.185-187, 2006.

NESHER, M.; SHPOLANSKY, U.; ROSEN, H.; LICHTSTEIN, D. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. *Life Sciences*, v.80, p.2093-2107, 2007.

NGAMROJANAVANICH, N.; MANAKIT, S.; PORNPAKAKUL, S.; PETSOM, A. Inhibitory effects of selected Thai medicinal plants on Na⁺K⁺ATPase. *Fitoterapia*, v.77, p.481-483, 2006.

NISHYIA, K.; TSUJIYAMA, T.; KIMURA, T.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; IITAKA, Y. Sesquiterpenoids from *Valeriana fauriei*. *Phytochemistry*, v.39, n.3, p.713-714, 1995.

NUTT, D. J.; MALIZIA, A. L. New insights into the role of GABA_A-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *British Journal of Psychiatry*, v.179, p.390-396, 2001.

OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT. N.24. *Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing*, 2001.

OLIVA, I.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E.; ARRIETA, J.; ENCISO-RODRÍGUEZ, R.; NAVARRETE, A. Neuropharmacological profile of hydroalcohol extract of *Valeriana edulis* ssp. *procera* roots in mice. *Phytoterapy Research*, v.18, n.4, p.290-296, 2004.

ORTIZ, J. G.; NIEVES-NATAL, J.; CHAVEZ, P. Effects of *Valeriana officinalis* extracts on [³H]flunitrazepam binding, synaptosomes [³H]GABA uptake, and hippocampal [³H]GABA release. *Neurochemical Research*, v.24, n.11, p.1373-1378, 1999.

PALADINI, A. C.; MARDER, M.; VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; WASOWSKI, C.; MEDINA, J. H. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.51, p.519-526, 1999.

PARK, J.H.; CHA, W.Y.; SEO, J.J.; HONG, J.T.; HAN, K.; OH, K.W. Anxiolytic-like effects of ginseng in the elevated plus-maze model: Comparison of red ginseng and sun ginseng. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v.29, n.6, p.895-900, 2005.

PAUL, C.; KÖNIG, W. A.; MUHLE, H. Pacificoriganines and tamariscene as constituents of *Furnallia tamarisci* and *Valeriana officinalis*. *Phytochemistry*, v.57, p.307-313, 2001.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, v.14, p.149-167, 1985.

PEROUTKA, S. J. Pharmacological differentiation and characterization of 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{1C} binding sites in rat frontal cortex. *Journal of Neurochemistry*, v.47, n.2, p.529-540.

PERRY, N. B.; BURGESS, E. J.; LORIMER, S. D.; van KLINK, J. W. Fatty acid anilides as internal standards for high performance liquid chromatographic analyses of *Valeriana officinalis* L. and other medicinal plants. *Phytochemical Analysis*, v.7, p.263-268, 1996.

PICCINELLI, A. LI; ARANA, S.; CACERES, A.; BIANCA, R. E. V. New lignans from the roots of *Valeriana prionophylla* with antioxidative and vasorelaxant activities. *Journal Natural Products*, v.67, p.1135-1140, 2004.

PINHEIRO, S. H.; ZANGROSSI-Jr. H.; DEL-BEM; C. M.; GRAEFF, F. G. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.79, n.1, p.71-85, 2007.

PINTO, G. M. F.; PINTO, J. F.; JARDIM, I. C. S. F. Extração com fluido supercrítico. <http://chemkeys.com/br/2006/04/18/extracao-com-fluido-supercritico/> Acesso em 20 de setembro de 2009.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JAFRE, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology*, v.47, p.379-391, 1978.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJMIRSADEGHI, S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, v.1163, p.2-24, 2007.

POYARES, D. R.; GUILLEMINAULT, C.; OHAYON, M. M.; TUFIK, S. Can valerian improve the sleep of insomniacs after benzodiazepine withdrawal? *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v.26, p.539- 545, 2002.

PROVENSI, G. Investigação da atividade ansiolítica de *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

RAKOFSKY, J. J.; HOLTZHEIMER, P. E.; NEMEROFF, C. B. Emerging targets for antidepressant therapies. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.13, p.291-302, 2009.

REVERCHON, E.; De MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, v.38, p.146-166, 2006.

RIBEIRO, C. A. J.; BALESTRO, F.; GRANDO, V.; WAJNER, M. Isovaleric acid reduces Na⁺ K⁺ ATPase activity in synaptic membranes from cerebral cortex of young rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v.27, n.4, p. 529-540, 2007.

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOJER, C.; BRINKMAN, U. A. Th. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, v.1112, n.1/2, p.31-63, 2006.

RIMPLER, H. Sequestration of iridoids by insects. In: HARBORNE, J.B. TOMAS-BARBERAN, F.A. (ed.). *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*. Oxford: Clarendon Press, 1991.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.21, n.6, p.801-810, 1997.

ROSE, A. M.; MELLET, B. J.; VALDES, R.; KLEINMAN, J. E.; HERMAN, M. M.; LI, R.; EL-MALLAKH, R. S. Alpha 2 isoform of the Na,K-adenosine triphosphatase is reduced in temporal cortex of bipolar individuals. *Society of Biological Psychiatry*, v.44, p.892-897, 1998.

RUSSOWISKI, D. Produção de valepotriatos em culturas líquidas de plantas de *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae). Tese de Doutorado - Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SAFARALIE, A.; FATEMI, S.; SEFDKON, F. Essential oil composition of *Valeriana officinalis* L. roots cultivated in Iran. Comparative analysis between supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation. *Journal of Chromatography A*, v.1180, p.159-164, 2008.

SAJID, T. M.; RASHID, S.; AHMAD, M.; KHAN, U. Estimation of cardiac depressant activity of ten medicinal plant extracts from Pakistan. *Phytotherapy Research*, v.10, p.178-180, 1996.

SALLES, L. A. Estudo fitoquímico e estabelecimento de cultura de calos de *Valeriana glechomifolia* Meyer. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

SALLES, L. A.; SILVA, A. L.; RECH, S. B.; ZANATTA, N.; von POSER, G. L. Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.28, p.907-910, 2000.

SALLES, L. A.; SILVA, A. L.; FETT-NETO, A. G.; von POSER, G. L.; RECH, S. B. *Valeriana glechomifolia*: *in vitro* propagation and production of valepotriates. *Plant Science*, v.163, p.165-168, 2002.

SCHUMACHER, B.; SCHOLLE, S.; HÖLZL, J.; KHUDEIR, N.; HESS, S.; MÜLLER, C. E. Lignans isolated from valerian: identification e characterization a new olivil derivative with partial agonistic activity at A₁ adenosine receptors. *Journal of Natural Products*, v.65, p.1479-1485, 2002.

SILVA, A. L. Quantificação de valepotriatos em espécies de *Valeriana* e em culturas de calos e suspensões celulares de *Valeriana glechomifolia* Meyer. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

SILVA, A. L.; RECH, S. B.; von POSER, G. L. Quantitative determination of valepotriates from valeriana native to south Brazil. *Planta Medica*, v.68, p.570-572, 2002.

SIMONOVSKA, B.; VOVK, I.; ANDRENŠEK, S.; VALENTOVÁ, K.; ULRICHOVÁ, J. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography A*, v.1016, p.89–98, 2003.

SOBRAL, M. Flora ilustrada do Rio Grande do Sul/25: Valerianaceae. *Boletim do Instituto de Biociências*, n.58, p.1-61, 1999^a.

SOBRAL, M. *Valeriana tajuvensis* (Valerianaceae). A new species from southern Brazil. *Novon*, v.9, n.1, p.114-117, 1999^b.

SOBRAL, M. *Valeriana eupatoria* (Valerianaceae). A new species from Rio Grande do Sul. *Novon*, v.10, n.2, p.149-152, 1999^c.

STAHL, E.; SCHILD, W. Über die verbreitung der aequilibrierend wirkenden valepotriate in der familie der valerianaceen. *Phytochemistry*, v.10, p.147-153, 1971.

STAHL, S. M. *Essential Psychopharmacology – Neuroscientific Basis and Practical Applications*. (2 ed.) California: Cambridge University Press, 2000.

STEFFENS, M.; FEUERSTEIN, T. J. Receptor-independent depression of DA and 5-HT uptake by cannabinoids in rat neocortex - involvement of Na⁺K⁺ ATPase. *Neurochemistry International*, v.44, n.7, p.529-538, 2004.

STENBERG, D. Neuroanatomy and neurochemistry of sleep. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 64, p.1187–1204, 2007.

STEVINSON, C.; ERNST, E. Valerian for insomnia: a systematic review of randomized clinical trials. *Sleep Medicine*, v.1, p.91-99, 2000.

SUDATI, J. H. ; FACHINETTO, R.; PEREIRA, R. P.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; SOARES, F. A.; BARBOSA N. B. V.; ROCHA J. B.T. *In vitro* antioxidant activity of *Valeriana officinalis* against different neurotoxic agents. *Neurochemical Research*, v.34, p.1372–1379, 2009.

TAIBI, D. M.; LANDIS, C. A.; PETRY, H.; VITIELLO, M. V. A systematic review of valerian as a sleep aid: safe but not effective. *Sleep Medicine Reviews*, v.11, p.209-230, 2007.

TANG, Y; LIU, X.; YU, B. Iridoids from the rhizomes and roots of *Valeriana jamantasi*. *Journal of Natural Products*, v.65, p.1949-1952, 2002.

TARIQ, S. H.; PULISETTY, S. Pharmacotherapy for insomnia. *Clinics in Geriatric Medicine*, v.24, p.93-105, 2008.

TEIXEIRA, V. L.; KATZ, A. I.; PEDEMONTE, C. H.; BERTORELLO, A. M. Isoform-specific regulation of Na⁺K⁺ ATPase endocytosis and recruitment to the plasma membrane. *Annals New York Academy of Sciences*, v.986, p.587-594, 2003.

TITTEL, G.; CHARI, V. M.; WAGNER, H. HPLC-Analyse von *Valeriana mexicana* extrakten. *Planta Medica*, v.34, p.305-310, 1978.

TORI, M.; YOSHIDA, M.; YOKOYAMA, M.; ASAKAWA, Y. A guaiane-type sesquiterpene, valeracetate from *Valeriana officinalis*. *Phytochemistry*, v.41, n.3, p.977-979, 1996.

TUFIK, S.; FUJITA, K.; SEABRA, M. L. V.; LOBO, L. L. Effects of a prolonged administration of valepotriates in rats on the mothers and their offspring. *Journal of Ethnopharmacology*, v.41, p.39-44, 1994.

VAN MEER, J. H.; LABADIE, R. P. Straight-phase and reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of valepotriate isomers and homologues. *Journal of Chromatography*, v.205, p.206-212, 1981.

VASCONCELLOS, A. P. S.; ZUGNO, A. I.; SANTOS, A. H. D. P.; NIETTO, F. B.; CREMA, L. M.; GONÇALVES, M.; FRANZON, R.; WYSE, A. T. S.; ROCHA, E. R.; DALMAZ, C. Na⁺K⁺ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an

experimental model of depression: effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits. *Neurobiology of Learning and Memory*, v.84, p.102-110, 2005.

VATTA, M.; PEÑA, C.; FERNÁNDEZ, B. E.; RODRÍGUEZ, G.; ARNAIZ, R. L. Endobain E, a brain Na⁺K⁺ ATPase inhibitor, decreases norepinephrine uptake in rat hypothalamus. *Life Sciences*, v.76, p.359-365, 2004.

VO, L. T.; CHAN, D.; KING, R. G. Investigation of the effects of peppermint oil and valerian on rat liver and cultured human liver cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v.30, p.799-804, 2003.

von POSER, G. L. *Iridóides carbocíclicos: importância taxonômica e biossíntese*. Porto Alegre: Faculdade de Farmácia (UFRGS). Tese (Doutorado). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

WALLE, T. Serial Review: Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radical Biology & Medicine*, v.36, n.7, p.829–837, 2004.

WAGNER, H.; BLAD, S.; ZGAINSKI, E. M. *Plants Drugs Analysis*. New York: Springer-Verlag, 1984.

WANG, R.; XIAO, D.; BIAN, Y-H.; ZHANG, X-Y., LI, B-J.; DING, L-S.; PENG, S-L. Minor iridoids from the roots of *Valeriana wallichii*. *Journal Natural Products*, v.71, p.1254-1257, 2008.

WASOWSKI, C.; MARDER, M.; VIOLA, H.; MEDINA, J. H.; PALADINI, A. C. Isolation and identification of 6-methylapigenin, a competitive ligand for the brain GABA_A receptors from *Valeriana wallichii*. *Planta Medica*, v.28, p.932-934, 2002.

WESTERINK, B. H. C.; DAMSMA, G.; VRIES, J. B. Effect of ouabain applied by intrastriatal microdialysis on the *in vivo* release of dopamine, acetylcholine, and amino acids in the brain of conscious rats. *Journal of Neurochemistry*, v.52, n.3, p.705-712, 1989.

WILLIANSO, E.; OKPAKO, D.; EVANS, F.J. *Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material*. Chichester: John Wiley & Sons, 1996.

WINKELMAN, J. W.; BUXTON, O. M.; JENSEN, E.; BENSON, K. L.; O'CONNOR, S. P.; WANG, W.; RENSHAW, P. F. Reduced brain GABA in primary insomnia: preliminary data from 4T proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS). *Sleep*, v.31, n.11, p.1499-1506, 2008.

WINSKY-SOMMERER, R. Role of GABA_A receptors in the physiology and pharmacology of sleep. *European Journal of Neuroscience*, v. 29, p.1779–1794, 2009.

WHO, World Health Organization. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants*, v. 1. Malta: WHO Graphics, 1999.

YAO, M.; RITCHIE, H. E.; BROWN-WOODMAN, P. D. A developmental toxicity-screening test of valerian. *Journal of Ethnopharmacology*, v.113, p.204-209, 2007.

XU, Y-M.; McLAUGHLIN, S. P.; GUNATILAKA, A. L. Sorbifolivaltrates A-D, diene valepotriates from *Valeriana sorbifolia*. *Journal Natural Products*, v.70, p.2045-2048, 2007.

ZANATTA, L. M.; NASCIMENTO, F. C.; BARROS, S. V. T.; SILVA, G. R. R. S.; ZUGNO, A I.; NETTO, C. A; WYSE, A. T. S. *In vivo* and *in vitro* effect of imipramine and fluoxetine on Na⁺K⁺ ATPase activity in synaptic plasma membranes from the cerebral cortex of rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.34, p.1265-1269, 2001.

ZANOLLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. Behavioural characterization of the flavonoids apigenin and chrysin. *Fitoterapia*, v.71, p.5117-5123, 2000.

ZIZOVIC, I.; STAMENIC, M.; IVANOVIC, J.; ORLOVIC, A.; RISTIC, M.; DJORDJEVIC, S.; PETROVIC S. D.; SKALA, D. Supercritical carbon dioxide extraction of sesquiterpenes from valerian root. *Journal of Supercritical Fluids*, v.43, p.249–258, 2007.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; De MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2007.



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO

pro.pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2007818

Título : Estudo fitoquímico de espécies nativas de Valeriana e avaliação da atividade ansiolítica e hipnótico-sedativa de Valeriana glechomifolia Meyer

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
GILSANE LINO VON POSER	PESQ RESPONSÁVEL	00007773@ufrgs.br	33085313
LUISA DE ANDRADE SALLES	PESQUISADOR	luisal@pop.com.br	33085313

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 21 , ata nº 101 , de 28/2/2008 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quarta-feira, 5 de março de 2008


 ILMA SIMONI BRUM DA SILVA
 Coordenador do CEP-UFRGS