



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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO HIPNÓTICO/SEDATIVO E ANSIOLÍTICO DE
UM EXTRATO SECO NEBULIZADO DE *Passiflora alata* Curtis
(PASSIFLORACEAE)**

*Dissertação apresentada por **Raquel Fenner**
para obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas*

Orientador: Prof. Dr. Stela Maris Kuze Rates
Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Kapczinski

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 14.06.2006, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Jaqueline Nascimento Picada
Universidade Luterana do Brasil – ULBRA

Profa. Dr. Márcia Maria de Souza
Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI

Profa. Dr. Tania Alves Amador
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Fenner, Raquel

Avaliação do efeito hipnótico/sedativo e ansiolítico de um extrato seco nebulizado de *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae)/ Raquel Fenner – Porto Alegre: UFRGS, 2006. – 105 p.: il., gráf., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Passiflora alata*. 2. efeito hipnótico. 3. efeito ansiogênico. 4. genotoxicidade. I. Rates, Stela Maris Kuze. II. Avaliação do efeito hipnótico/sedativo e ansiolítico de um extrato seco nebulizado de *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae).

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Agradecimentos à CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e ao Laboratório de Psicofarmacologia da Faculdade de Farmácia, que disponibilizou todos os equipamentos e material necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dr. Stela, pela orientação, amizade, dedicação, paciência e por me ajudar a crescer como pessoa e profissional, desde meu primeiro semestre de faculdade.

Ao Dr. Flávio, Dr. Suzana e Dr. Keila, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela orientação e ajuda no planejamento do estudo clínico.

À Prof. Dr. Grace pela orientação na parte fitoquímica.

Aos meus colegas do Laboratório de Psicofarmacologia da Faculdade de Farmácia – UFRGS, Andresa, Gustavo, Leonardo, Alice, Michele, Ana Paula, Cássia e Ênio, pela amizade e ajuda nos experimentos pré-clínicos.

Aos Prof. Dr. David Driemeier e Dr. Félix González e à mestranda Luciana Lacerda, da Faculdade de Veterinária – UFRGS, pela colaboração nos ensaios de toxicidade.

À Dr. Jane Boeira e suas alunas, da Faculdade de Farmácia – URI, pela colaboração nos experimentos de genotoxicidade.

À Prof. Dr. Sílvia e às suas alunas, por ceder o Spray-drier e pela ajuda na nebulização do extrato. Ao Prof. Dr. Pedro Petrovick e à mestranda Bárbara (LDG), pelo auxílio no teste de desintegração das cápsulas. Ao Prof. Dr. Martin e ao pessoal do Laboratório de Controle de Qualidade, pela ajuda no teste de controle microbiológico.

À minha mãe, Isoldi que, apesar de estar longe, sempre me deu muita força, coragem e determinação para alcançar meus objetivos e ao Jaime, por todo apoio. Ao meu querido irmão Flávio, pelo apoio, confiança e companhia neste período, que foram sempre muito importantes.

Às minhas eternas amigas, que estão sempre presentes, nos bons e maus momentos. A todos os meus amigos, pelo apoio e disposição em participar do ensaio clínico.

A todos que, de uma maneira ou de outra, estiveram presentes neste período e que participaram e ajudaram nessa conquista.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	07
2.1 Objetivos Gerais.....	09
2.2 Objetivos Específicos.....	09
3. REVISÃO.....	11
3.1 Ansiedade.....	13
3.2 Insônia.....	17
3.3 Medicamentos obtidos a partir de plantas para o tratamento de transtornos de ansiedade e transtornos do sono.....	21
3.4 Química e farmacologia do gênero <i>Passiflora</i>	22
3.4.1 <i>Passiflora alata</i>	26
3.5 Flavonóides.....	27
3.6 Saponinas.....	33
3.7 Alcalóides β -carbolínicos.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Material vegetal.....	41
4.2 Preparação e caracterização do extrato.....	41
4.3 Estudo pré-clínico.....	42
4.3.1 Animais.....	42
4.3.2 Tratamentos.....	43
4.3.3 Avaliação sobre o Sistema Nervoso Central.....	43
4.3.3.1 Teste de potenciação do sono barbitúrico.....	43
4.3.3.2 Avaliação da atividade locomotora espontânea.....	43
4.3.3.3 Avaliação da coordenação motora em aparelho de rota-rod.....	44
4.3.3.4 Indução de catatonia.....	45
4.3.3.5 Avaliação do efeito sobre a temperatura corporal.....	46
4.3.3.6 Labirinto em cruz elevado.....	46
4.3.3.7 Proteção a convulsões induzidas por pentilenotetrazol.....	47
4.3.4 Ensaio de Toxicidade.....	48

4.3.4.1 Toxicidade aguda.....	48
4.3.4.2 Toxicidade de doses repetidas.....	49
4.3.4.3 Genotoxicidade: ensaio cometa alcalino.....	49
4.3.5 Análise Estatística.....	50
4.3.6 Ética.....	50
4.4 Planejamento do estudo clínico.....	51
5. RESULTADOS.....	53
5.1 Caracterização do extrato.....	55
5.2 Ensaio pré-clínicos.....	55
5.2.1 Avaliação sobre o Sistema Nervoso Central.....	55
5.2.1.1 Teste de potenciação do sono barbitúrico.....	55
5.2.1.2 Avaliação da atividade locomotora espontânea.....	56
5.2.1.3 Avaliação da coordenação motora em aparelho de rota-rod.....	56
5.2.1.4 Indução de catatonia.....	58
5.2.1.5 Avaliação do efeito sobre a temperatura corporal.....	58
5.2.1.6 Labirinto em cruz elevado.....	59
5.2.1.7 Proteção a convulsões induzidas por pentilenotetrazol.....	63
5.2.2 Ensaio de Toxicidade.....	65
5.2.2.1 Toxicidade aguda.....	65
5.2.2.2 Toxicidade de doses repetidas.....	66
5.2.2.3 Genotoxicidade.....	68
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÃO.....	83
8. REFERÊNCIAS.....	87
9. ANEXOS.....	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas dos flavonóides descritos para <i>P. alata</i>	23
Figura 2: Estruturas químicas das saponinas isoladas das folhas de <i>P. alata</i>	24
Figura 3: Avaliação da atividade locomotora espontânea em camundongos.....	44
Figura 4: Avaliação da coordenação motora de camundongos em aparelho de rota-rod.....	45
Figura 5: Teste de indução de catatonía em camundongos.....	45
Figura 6: Teste de aferição da temperatura retal de camundongos.....	46
Figura 7: Labirinto em cruz elevado para camundongos.....	47
Figura 8: Efeito de PA na latência para o sono induzido por pentobarbital.....	55
Figura 9: Efeito de PA na duração do sono induzido por pentobarbital.....	56
Figura 10: Efeito de PA no teste de avaliação da coordenação motora em aparelho de rota-rod. Parâmetro: maior tempo de permanência.....	57
Figura 11: Efeito de PA no teste de avaliação da coordenação motora em aparelho de rota-rod. Parâmetro: número de quedas.....	57
Figura 12: Efeito de PA no teste de indução de catatonía.....	58
Figura 13: Efeito de PA sobre a temperatura retal de camundongos.....	59
Figura 14: Efeito de PA sobre desenvolvimento ponderal de camundongos após a administração aguda.....	65
Figura 15: Efeito de PA sobre desenvolvimento ponderal de ratos durante a administração de doses repetidas.....	68
Figura 16: Distribuição das classes de danos de DNA no ensaio cometa para células de cérebro, fígado e sangue periférico.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições de secagem para obtenção de extrato seco por nebulização de <i>Passiflora alata</i>	42
Tabela 2: Efeito de PA na atividade locomotora espontânea.....	56
Tabela 3: Efeito da administração aguda de PA (em valores percentuais) no labirinto em cruz elevado, em camundongos.....	60
Tabela 4: Efeito da administração aguda de PA (em valores absolutos) no labirinto em cruz elevado, em camundongos.....	60
Tabela 5: Efeito da administração aguda de PA (em valores percentuais) no labirinto em cruz elevado, em ratos.....	61
Tabela 6: Efeito da administração aguda de PA (em valores absolutos) no labirinto em cruz elevado, em ratos.....	62
Tabela 7: Efeito da administração de doses repetidas de PA (em valores percentuais) no labirinto em cruz elevado, em ratos.....	63
Tabela 8: Efeito da administração de doses repetidas de PA (em valores absolutos) no labirinto em cruz elevado, em ratos.....	63
Tabela 9: Efeito de PA no teste de proteção a convulsões induzidas por pentilenotetrazol após administração aguda e administração de doses repetidas.....	64
Tabela 10: Parâmetros hematológicos avaliados em ratos após administração de doses repetidas de PA.....	66
Tabela 11: Parâmetros bioquímicos séricos avaliados em ratos após administração de doses repetidas de PA.....	67
Tabela 12: Parâmetros urinários avaliados em ratos após administração de doses repetidas de PA.....	67
Tabela 13: Ensaio cometa em células de cérebro, fígado e sangue periférico de camundongos tratados agudamente com PA.....	70

ABREVIATURAS

ALT – alanine aminotransferase

AST – aspartate aminotransferase

ATC – antidepressivos tricíclicos

β-CCt – β-carbolina-3-carboxilato-t-butil-éster

BHC – British Herbal Compendium

CCAC – Canadian Council on Animal Care

CCD – cromatografia em camada delgada

CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular ou globular média

CNRS – Centre National de la Recherche Scientifique

DMCM – metil-6,7-dimetóxi-4-etil-β-carbolina-3-carboxilato

DSM-IV-TR™ – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

DZP – diazepam

ESCOP – European Scientific Cooperative on Phytotherapy Monograph on the Medicinal Uses of Plant

FEPPS – Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

FG 7142 – N-metil-β-carbolina-3-carboxamida

GABA – ácido γ-aminobutírico

HDL – high density lipoprotein

IMAO – inibidores da monoamino oxidase

ISRS – inibidores seletivos da recaptação de serotonina

LDL – low density lipoprotein

OMS – Organização Mundial da Saúde

PA – extrato seco nebulizado de *Passiflora alata*

SAL – solução salina

SNC – sistema nervoso central

SOD – enzima superóxido dismutase

SRAA – sistema reticular ativador ascendente

VCM – volume corpuscular ou globular médio

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade e ação hipnótico/sedativa e ansiolítica de um extrato seco nebulizado de *Passiflora alata* (PA) (2,6 % flavonóides totais), administrado pela via oral, nos testes de potenciação do sono barbitúrico, locomoção espontânea, coordenação motora, indução de catatonía, labirinto em cruz elevado, convulsões induzidas por pentilenotetrazol e temperatura corporal. PA foi administrado agudamente nas doses de 300, 600 e 900 mg/kg e por 14 dias, 300 mg/kg. Para avaliação da toxicidade aguda, foram empregadas doses de 600 a 4800 mg/kg. A genotoxicidade foi avaliada em camundongos (150, 300 e 600 mg/kg), pelo ensaio cometa alcalino. PA 300 mg/kg reduziu a latência e potenciou o tempo de sono barbitúrico. Em nenhuma das doses testadas, PA causou redução na locomoção espontânea, efeito catatônico ou prejuízos no desempenho em aparelho de rota-rod. O extrato (300 e 600 mg/kg) apresentou efeito hipotérmico. A administração aguda de PA não foi ativa no labirinto em cruz elevado e a administração repetida (300 mg/kg) provocou efeito ansiogênico. A administração aguda (300 e 600 mg/kg) ou repetida (300 mg/kg) de PA não alterou o número e a severidade das convulsões induzidas por pentilenotetrazol. Na avaliação da toxicidade aguda, não ocorreram mortes até a dose de 4800 mg/kg. Ratos tratados repetidamente com PA não apresentaram alterações significativas em parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos, mas apresentaram sinais de irritabilidade e não mostraram ganho de massa corporal. A administração aguda de PA provocou danos no DNA (classe 4), determinados pelo ensaio cometa, em células do cérebro, fígado e sangue periférico. Os resultados obtidos para o extrato demonstram que PA administrado agudamente apresenta efeito hipnótico desprovido de efeito ansiolítico, sedativo ou comprometimento das funções motoras. Estes resultados podem explicar o efeito relatado pela população como agente indutor de sono, mas não apóiam o uso popular como calmante. Pelo contrário, o efeito ansiogênico e a toxicidade genética observados determinam à necessidade de cautela e a realização de mais estudos para a utilização de *P. alata* como matéria-prima para a produção de medicamentos.

Palavras-chaves: *Passiflora alata*, efeito hipnótico, efeito ansiogênico, genotoxicidade.

ABSTRACT

Evaluation of hypnotic/sedative and anxiolytic effects of a spray-dried extract from *Passiflora alata* Curtis (PASSIFLORACEAE)

The aim of this work was to evaluate the toxicity and hypnotic/sedative and anxiolytic effects of an aqueous spray-dried extract of *P. alata* (PA) (2.6% flavonoids), administered by oral route, on barbiturate sleeping time, spontaneous locomotion, motor coordination, catalepsy induction, elevated plus-maze, pentilenotetrazole-induced convulsions and body temperature tests. In the acute treatment the doses ranged from 300 to 900 mg/kg; 300 mg/kg was used as repeated treatment. Genotoxicity was evaluated by ex vivo alkaline comet assay in mice (150, 300 and 600 mg/kg). PA 300 mg/kg decreased the latency and increased the barbiturate sleeping time. None of the tested doses of PA reduced spontaneous locomotion, induced catalepsy or performance deficit in rota-rod apparatus. Hypothermic effect was observed after administering PA 300 and 600 mg/kg. The acute administration was not active on elevated plus-maze while repeated treatment (300 mg/kg) showed anxiogenic effect in this test. The acute (300 and 600 mg/kg) or repeated (300 mg/kg) administration of PA did not modify the number and severity of pentilenotetrazole-induced convulsions. In acute toxicity evaluation, mice deaths were not observed up to 4800 mg/kg. Rats repeatedly treated with aqueous extract did not present biochemical, hematological or histopathological significant alterations. However, the animals showed signs of irritability and did not increase body weight. In addition, mice acutely treated with PA presented DNA damage (class 4) determined by alkaline comet assay in brain, liver and peripheral blood cells. In conclusion, PA acute administration provokes hypnotic effect, destitute of anxiolytic and sedative effects and without concerning to motor functions. These results could explain the popular use as agent sleeping inductive, but they do not support the popular use, or commercialization, as tranquilizer/anxiolytic. On the contrary, the observed anxiogenic effect and genotoxicity request prudence and more studies in order to assure the efficacy and safety of utilization of *P. alata* with medicinal purposes.

Keywords: *Passiflora alata*, hypnotic effect, anxiogenic effect, genotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

Até o final do século XIX os distúrbios de ansiedade raramente eram encarados como problemas médicos. No século XX, Sigmund Freud estabeleceu o conceito de neurose, distinguindo a neurose crônica dos ataques de ansiedade, correspondendo ao que hoje se entende por transtorno de ansiedade generalizada e transtorno de pânico, além de notar a associação entre estes e a agorafobia. Na década de 60, Donald Klein evidenciou a resposta favorável aos ataques de pânico pelo tratamento com antidepressivos tricíclicos o que favoreceu a distinção entre o transtorno de ansiedade generalizada e o transtorno de pânico, consolidada no *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders III* (DSM-III) em 1980 (GRAEFF, 1999).

Atualmente os distúrbios de ansiedade podem ser classificados, segundo o DSM-IV-TR™ (“Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders”, 4ª edição, 2002) em: ansiedade generalizada, fobias, distúrbio obsessivo-compulsivo, síndrome do pânico e síndrome de estresse pós-traumático. Entre as desordens de ansiedade, o distúrbio de ansiedade generalizada é a mais comum, de incidência anual que varia entre 3,1 e 3,6% e com uma prevalência de aproximadamente 5% (LYDIARD, 2000; KAPCZINSKI *et al.*, 2004; BALDWIN *et al.*, 2005).

Outros transtornos importantes que afetam um número cada vez maior de pacientes são os transtornos do sono. Neste século, até quase o fim da década de 1950, predominou a idéia do sono como um estado passivo, decorrente da diminuição da estimulação sensorial. Por essa época, o acúmulo de evidências experimentais levou à mudança radical nessa visão. O sono passou, então, a ser encarado como processo ativo do sistema nervoso central (SNC), caracterizado pela sucessão cíclica de diversas alterações psicofisiológicas (GUIMARÃES, 1999).

A insônia é uma queixa comum que, para muitos pacientes persiste cronicamente e pode resultar de causas diversas, simultâneas ou não (STAHL, 2000; NEUBAUER, 2003). A maioria dos estudos estima que a insônia crônica ocorra em aproximadamente 10% da população adulta (ROTH; ROEHRS, 2003).

Apesar do grande número de medicamentos para o tratamento de transtornos de ansiedade, a maior limitação de esforços para desenvolver novos agentes é o fato de que os fármacos atuais são sintetizados a partir de imitação ou modificação estrutural de outros fármacos com atividade comprovada e não pela descoberta de novas substâncias (BALDESSARINI, 2001). Para os hipnóticos, a principal

preocupação está no fato do abuso potencial desses medicamentos, o que faz com que os médicos evitem sua prescrição e limita seu uso no tratamento de transtornos do sono (NEUBAUER, 2003).

Neste contexto, as plantas medicinais podem se tornar uma fonte de moléculas inovadoras com mecanismos de ação diferenciados dos atuais e ainda com melhor relação risco/benefício que os fármacos atualmente disponíveis no mercado (CALIXTO, 2001). A diversidade estrutural encontrada na natureza é fundamental na pesquisa para atingir diferentes alvos biológicos e os produtos naturais constituem uma fonte inestimável para a obtenção de novos fármacos e/ou protótipos farmacológicos (YUNES; FILHO, 2001). Uma das principais ferramentas na busca destes novos modelos moleculares é a informação de como as plantas são utilizadas por diferentes grupos étnicos e o estudo farmacológico das preparações utilizadas, abordados respectivamente no âmbito da etnobotânica e da etnofarmacologia (RATES, 2001).

Entre as plantas medicinais de uso tradicional importante no tratamento da ansiedade, destacam-se as espécies de *Passiflora*, conhecidas popularmente no Brasil como maracujás (CORREA, 1984). As espécies mais citadas na literatura são *P. alata* Curtis, *P. edulis* Sims e *P. incarnata* Linneaus, para as quais existem dados experimentais relativos à investigação da atividade central reputada na medicina popular. *P. alata* é a única espécie citada pela Farmacopéia Brasileira, nas suas 1ª, 2ª e 3ª edições e é constituinte de diversos medicamentos fitoterápicos, com a indicação de calmante, comercializados no Brasil (ANVISA, 2005; DEF, 2004). No entanto, *P. incarnata* é a espécie que consta na maioria das farmacopéias européias: Alemã, Britânica, Francesa e Suiça. Além disso, consta na Comissão E (BLUMENTHAL *et al.*, 2000), European Scientific Cooperative on Phytotherapy Monograph on the Medicinal Uses of Plant (ESCOP, 1997) e Martindale (1999). A espécie *P. edulis* não consta em códigos farmacêuticos oficiais.

A importância do uso de espécies de *Passiflora* para a produção de fitomedicamentos ou como fonte de moléculas ansiolíticas pode ser evidenciada pelo crescente número de trabalhos desenvolvidos com o gênero *Passiflora*. Os estudos pré-clínicos existentes para esse gênero não parecem contradizer seu uso tradicional. Porém, os dados existentes até o momento não permitem uma

conclusão definitiva sobre a identidade da(s) substância(s) ativa(s) e o mecanismo de ação (DHAWAN *et al.*, 2004; CONRADO *et al.*, 2003).

O estágio do conhecimento atual sobre a farmacologia do gênero *Passiflora* indica seu potencial para o desenvolvimento de medicamentos ansiolíticos e hipnótico/sedativos seguros e eficazes. Grupos ligados à Faculdade de Farmácia – UFRGS já vinham desenvolvendo uma investigação química e farmacológica em espécies de *Passiflora* de ocorrência no Rio Grande do Sul, especialmente *P. alata* e *P. edulis*, com resultados promissores na avaliação da atividade ansiolítica, para extratos aquosos e hidroetanólicos dessas espécies (PETRY *et al.*, 2001; DE PARIS *et al.*, 2002). Dando continuidade à esta linha de investigação, nosso grupo vem trabalhando com a espécie de *P. alata*, oficial da Farmacopéia Brasileira, visando a obtenção de novas moléculas com potencial atividade ansiolítica e/ou hipnótico/sedativa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito hipnótico/sedativo e ansiolítico e a toxicidade, em roedores, de um extrato seco nebulizado, quimicamente caracterizado, obtido a partir das folhas de *Passiflora alata*, e, a partir desses resultados, planejar um ensaio clínico para comprovação do efeito observado em animais.

2.2 Objetivos Específicos

Foram objetivos específicos desta dissertação:

- Determinar o teor de flavonóides totais no extrato seco nebulizado de *P. alata*, através da técnica de complexação com cloreto de alumínio;
- Avaliar o extrato seco nebulizado de *P. alata* em modelos animais de avaliação da atividade geral sobre o sistema nervoso central;
- Avaliação do extrato quanto ao efeito ansiolítico, no modelo labirinto em cruz elevado, e efeito anticonvulsivante, no teste de proteção a convulsões induzidas por pentilenotetrazol, ambos os modelos preditivos de ação mediada pelo sistema GABAérgico;
- Realizar um estudo de toxicidade aguda, de doses repetidas e genotoxicidade do extrato seco nebulizado de *P. alata*;
- Planejar um ensaio clínico para avaliação do efeito observado nos roedores.

3.1 Ansiedade

A ansiedade constitui uma resposta normal do indivíduo, que se manifesta geralmente sob circunstâncias de ameaça ou perigo. Porém, há muitas circunstâncias em que a ansiedade deixa de ser uma resposta adaptativa e constitui um distúrbio psiquiátrico, tornando-se objeto de tratamento psicológico e/ou farmacológico (STAHL, 2000; BALDESSARINI, 2001). Segundo classificação do DSM-IV-TR™ (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4ª edição) os distúrbios de ansiedade podem ser divididos em: ansiedade generalizada, fobias, distúrbio obsessivo-compulsivo, síndrome do pânico e síndrome de estresse pós-traumático.

Os distúrbios de ansiedade são a forma mais comum de doenças mentais nos Estados Unidos e representam um desafio clínico para a comunidade psiquiátrica. Somente cerca da metade dos distúrbios de ansiedade e depressão são diagnosticados e uma proporção ainda menor é tratada adequadamente (LYDIARD, 2000).

A ansiedade e os distúrbios afetivos ainda representam grandes custos para a sociedade em morbidade, incapacidade e mortalidade prematura (BALDESSARINI, 2001). Os custos totais associados com transtornos de ansiedade nos Estados Unidos têm sido estimados entre 42,3 e 46,6 bilhões de dólares, que representaram 31,5% do total de gastos com tratamentos de doenças mentais e 47,3% do total de custos indiretos com doenças mentais (LYDIARD, 2000; DE VANE *et al.*, 2005).

Além disso, os transtornos de ansiedade não podem ser desvinculados totalmente de outros distúrbios psiquiátricos, já que estão associados, com grande frequência, à depressão. Esta situação de comorbidade ocorre de 20 a 60% dos casos de desordens psiquiátricas e, no entanto, na maioria das vezes, ainda são diagnosticados e tratados como distúrbios paralelos (SHORTER; TYRER, 2003; FOLKS, 2004).

Nas desordens associadas à ansiedade, enquanto a habilidade de compreender a realidade é mantida, o sofrimento e a incapacidade algumas vezes são severos. Distúrbios de ansiedade podem ser agudos e passageiros, porém, geralmente, são recorrentes ou persistentes. Os sintomas podem incluir mudanças

do humor, como: medo, pânico, disforia; anormalidades de pensamento, como obsessão, medo irracional ou fobias; ou anormalidades de comportamento, por exemplo: esquiva, compulsões ou fixação em sintomas físicos imaginados ou exagerados (BALDESSARINI, 2001). Além de manifestações psicológicas, a ansiedade produz mudanças fisiológicas relacionadas com hiperatividade autonômica, tais como: palpitação, taquicardia, tremores e sudorese, particularmente nas mãos; hipersecreção gástrica e aumento da motilidade intestinal; sensação de falta de ar e sufocação, acompanhada de hiperventilação e parada respiratória (DE ABREU; CORDIOLI, 1996; GRAEFF, 1999).

Entre as desordens de ansiedade, o distúrbio de ansiedade generalizada é a mais comum, de incidência anual que varia entre 3,1 e 3,6% e com uma prevalência de aproximadamente 5% (LYDIARD, 2000; KAPCZINSKI *et al.*, 2004). Estudos sugerem que o distúrbio de ansiedade generalizada pode ser mais importante do que se imaginava porque, muitas vezes, representa um estado de recuperação incompleta de outros subtipos de transtornos de ansiedade, bem como de distúrbios afetivos, especialmente a depressão (STAHL, 2000).

Vários são os sistemas neuroanatômicos e funcionais envolvidos na neurobiologia da ansiedade. Diferentes estruturas cerebrais parecem estar envolvidas. Estas estruturas incluem áreas corticais, que reconhecem e avaliam as ameaças potenciais, e o sistema límbico, que gera os componentes afetivos do estímulo e, concomitantemente, ativa os sistemas autônomo e endócrino (KAPCZINSKI, 1995; KUHAR, 1996). A amígdala, o hipocampo, o *locus coeruleus*, os núcleos da rafe, a substância periaquedutal cinzenta e suas interconexões estão particularmente envolvidas na ansiedade (GRAEFF, 2004).

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central (SNC) e está amplamente distribuído em todas as regiões cerebrais. Há dois subtipos de receptores GABA conhecidos, GABA_A e GABA_B. O receptor do subtipo GABA_A é acoplado a um canal iônico de cloreto, modulado alostericamente por outros receptores, que fazem parte de um mesmo complexo macromolecular. Este complexo receptor media várias atividades do SNC e é o alvo de ação de vários fármacos, tais como: anticonvulsivantes e efeitos comportamentais do álcool, como também os efeitos ansiolítico, hipnótico/sedativo e relaxante muscular dos benzodiazepínicos (STAHL, 2000; KAPCZINSKI *et al.*, 2004).

Outros sistemas também podem estar envolvidos na neuroanatomia da ansiedade e hipóteses contemporâneas relacionam os distúrbios de ansiedade à superatividade de sistemas adrenérgicos ou alteração no equilíbrio do funcionamento do sistema serotoninérgico (BALDESSARINI, 2001).

O tratamento dos transtornos de ansiedade é conduzido com diferentes fármacos, com mecanismos de ação bastante distintos, dependendo do subtipo de ansiedade tratada (STAHL, 2000; RATES; SALLES, 2004).

Os fármacos da classe dos benzodiazepínicos possuem atividade ansiolítica e hipnótico/sedativa, além de ação anticonvulsivante e relaxante muscular. Sua atividade ansiolítica se deve à modulação alostérica de receptores GABA_A, aumentando a transmissão nervosa mediada pelo GABA (STAHL, 2000).

Atualmente, o uso considerado mais racional para os esses fármacos é a utilização para o alívio de estados ansiosos agudos. Alguns benzodiazepínicos de alta potência (alprazolam, clonazepam e lorazepam) são empregados em estados ansiosos com fortes sintomas autonômicos, como em ataques de pânico (RATES; SALLES, 2004). Porém, são relatados efeitos adversos importantes para estes fármacos, como sedação, amnésia, prejuízos de cognição e funções motoras hábeis, particularmente em idosos, além de provocarem tolerância e dependência (STAHL, 2000; BALDESSARINI, 2001). Além disso, o risco de dependência e sobredose com benzodiazepínicos está particularmente aumentado em pacientes com distúrbios de personalidade ou história de abuso de sedativos ou álcool. (BALDESSARINI, 2001).

Outra classe de fármacos utilizada no tratamento de distúrbios de ansiedade são os antidepressivos. Alguns antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoamino oxidase (IMAO) foram apontados como efetivos no tratamento de distúrbios de pânico e um antidepressivo tricíclico (clomipramina) foi apontado como efetivo no tratamento de transtorno obsessivo-compulsivo. Os antidepressivos tricíclicos têm início de ação mais lento, porém, parecem ser mais eficazes do que os benzodiazepínicos para o tratamento de ansiedade generalizada (STAHL, 2000). Os antidepressivos da classe dos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) são tratamentos de primeira escolha para o transtorno obsessivo-compulsivo (RATES; SALLES, 2004). Estes fármacos são responsáveis por avanços recentes no diagnóstico e tratamento de distúrbios de ansiedade (BALDESSARINI, 2001). A

venlafaxina XR foi o primeiro fármaco a ser aprovado nos Estados Unidos para o tratamento de depressão e ansiedade generalizada (STAHL, 2000).

A buspirona, originalmente desenvolvida como um potente agente antipsicótico com fraca atividade antidopaminérgica, tem efeitos benéficos em pacientes ansiosos. Este fármaco é utilizado principalmente para aqueles pacientes com ansiedade generalizada de severidade leve ou moderada, mas não é eficaz no tratamento de outros subtipos de transtornos de ansiedade, bem como da depressão (BALDESSARINI, 2001; RATES; SALLES, 2004). É um agonista parcial de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}. Sua desvantagem, se comparada com benzodiazepínicos, é o retardo do início da ação, que é similar ao retardo da ação terapêutica para os antidepressivos, portanto, seu uso não é apropriado em situações que requerem alívio rápido. Este ansiolítico não tem ação anti-convulsivante, não parece causar tolerância ou síndrome de retirada e não apresenta tolerância cruzada com benzodiazepínicos e outros sedativos (STAHL, 2000; BALDESSARINI, 2001).

A utilização da buspirona no tratamento da ansiedade pode ser especialmente relevante para pacientes que não necessitam de efeito sedativo, para pacientes com história prévia de abuso de álcool ou outras drogas e para idosos, visto que costuma ser bem tolerada e apresenta um perfil restrito de interações farmacológicas. Os principais efeitos adversos da buspirona relacionados à utilização são: náusea, tonturas, cefaléia, nervosismo e excitação, mas estes efeitos não são muito freqüentes (RATES; SALLES, 2004).

Outros fármacos também têm sido usados no tratamento de ansiedade, tais como anticolinérgicos e anti-histamínicos. Entre estes, está a hidroxizina, um anti-histamínico que somente é um ansiolítico efetivo quando utilizado em doses que também produzem marcada sedação (BALDESSARINI, 2001). O propranolol e outros antagonistas de receptores β -adrenérgicos podem reduzir os sintomas autonômicos relacionados à ansiedade, tais como: taquicardia, dilatação das pupilas, sudorese e tremor, associados com fobias social ou situacional específica, mas não parecem ser efetivos na ansiedade generalizada ou desordens de pânico. Similarmente, outros agentes antiadrenérgicos, incluindo clonidina (agonista α_2 pré-sináptico), também podem diminuir manifestações autonômicas da ansiedade mas sua relevância clínica no tratamento de desordens de ansiedade severa e no bloqueio de aspectos subjetivos e emocionais da ansiedade é discutível. A utilização mais freqüente da

clonidina é para o alívio de sintomas autonômicos durante o processo de desintoxicação do álcool, barbituratos, heroína e benzodiazepínicos (STAHL, 2000; BALDESSARINI, 2001).

3.2 Insônia

A insônia é uma queixa comum que, para muitos pacientes persiste cronicamente e pode resultar de causas diversas, simultâneas ou não (STAHL, 2000; NEUBAUER, 2003). Segundo do DSM-IV-TR, os transtornos do sono são organizados em quatro seções principais, de acordo com a etiologia presumida: transtornos primários do sono, transtorno do sono relacionado a outro transtorno mental, transtorno do sono devido a uma condição médica geral e transtorno do sono induzido por substância. Os *transtornos primários do sono* supostamente decorrem de anormalidades endógenas nos mecanismos de geração ou nos horários de sono/vigília e freqüentemente são complicados por fatores de condicionamento. Esses transtornos são, ainda, subdivididos em *dissonias*, caracterizadas por anormalidades na quantidade, qualidade ou tempo de sono, e *parassonias*, que são eventos comportamentais ou fisiológicos anormais ocorrendo em associação com o sono, estágios específicos do sono ou transições de sono/vigília. Os transtornos do sono também podem ocorrer como uma condição secundária a outras doenças, como é o caso do *transtorno do sono relacionado a outro transtorno mental*, no qual os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo transtorno mental, presumivelmente, também afetam a regulação do ciclo de sono-vigília. O *transtorno do sono devido a uma condição médica geral* resulta de efeitos fisiológicos diretos de uma condição clínica sobre o sistema sono-vigília e, além disso, o *transtorno do sono induzido por substância* envolve queixas proeminentes de distúrbio do sono resultante do uso atual ou da descontinuação recente do uso de uma substância, inclusive medicamentos.

A insônia também pode ser classificada com relação ao seu tempo de duração como sintoma. A *insônia transiente* ocorre em pessoas que normalmente dormem bem, mas que se deslocaram para regiões com diferente fuso horário, ou que estão dormindo em ambientes não-familiares ou estão sob situação de estresse agudo. Nestes casos, freqüentemente não é necessário tratamento. A *insônia de curta duração* ocorre em indivíduos com sono normal, mas que estão sob estresse

importante, por tempo prolongado, como, por exemplo, divórcio, desemprego ou luto. Dependendo da intensidade do problema, esses indivíduos podem necessitar do uso temporário de medicamentos para ajustarem-se às novas situações. Finalmente, a *insônia de longa duração* é um estado de dificuldade permanente para dormir, que prejudica a habilidade do indivíduo para suas atividades normais e, além disso, possui pouca remissão espontânea. Estudos sugerem que a maioria destes indivíduos apresenta também uma doença psiquiátrica, história de abuso de drogas ou alguma outra doença associada. O tratamento dessas condições associadas pode ser suficiente para resolver o problema da insônia, porém às vezes faz-se necessário o uso de medicamentos para induzir o sono até que o tratamento da causa primária alcance sua efetividade (STAHL, 2000; ROTH; ROEHRS, 2003; RATES; SALLES, 2004).

Estudos epidemiológicos recentes demonstram que a insônia ocorre com uma prevalência de 5 - 35%, nos Estados Unidos (SATEIA; NOWELL, 2004), e os custos diretos com insônia são estimados em mais de 13,9 bilhões de dólares, representando um ônus substancial para a sociedade (ROSENBERG *et al.*, 2005).

Entre as principais conseqüências para os pacientes insones, pode-se destacar: maior porcentagem de ausências no trabalho, aumento no número de acidentes, diminuição de produtividade, decréscimo da qualidade de vida e prejuízos de memória. Além disso, a queixa mais comum relatada pelos pacientes é a fadiga (ROTH; ROEHRS, 2003).

Em termos gerais, os centros moduladores do sono encontram-se no tronco cerebral e no diencéfalo. Neurônios noradrenérgicos e serotonérgicos estão ativos durante o estado de vigília e aumentam a vigília quando estimulados (BIANCHIN *et al.*, 2004). Quanto à neuroanatomia dos distúrbios de sono, foi sugerido o envolvimento de estruturas como os núcleos da rafe, o *locus coeruleus* e o hipotálamo (GUIMARÃES, 1999). O sistema reticular ativador ascendente (SRAA) é uma área específica do tronco cerebral, responsável pelo início da vigília, formado por neurônios noradrenérgicos, catecolaminérgicos, serotonérgicos, glutamatérgicos e GABAérgicos. Os neurônios promotores do sono tornam-se ativos, diminuindo a atividade cortical pela inibição dos neurônios do SRAA (BIANCHIN *et al.*, 2004).

Entre os neurotransmissores relacionados com o controle do ciclo sono-vigília estão, principalmente, a serotonina, noradrenalina, histamina, ácido γ -aminobutírico

(GABA) e neuropeptídeos (GUIMARÃES, 1999). Entretanto, estudos mais aprofundados ainda são necessários para entender a evolução da insônia crônica e as causas, que não são totalmente entendidas (ROTH; ROEHR, 2003).

Em relação ao tratamento de transtornos do sono, os benzodiazepínicos são os medicamentos mais empregados. Sua atividade e efeitos adversos já foram relatados anteriormente. Além dos efeitos adversos já mencionados, a retirada de benzodiazepínicos em pacientes que fazem uso prolongado para o tratamento de transtornos do sono pode causar um estado chamado de insônia rebote, no qual a insônia do paciente piora quando os benzodiazepínicos são retirados (STAHL, 2000).

Os hipnóticos/sedativos não-benzodiazepínicos como zaleplon, zopiclona e zolpidem são fármacos mais novos e que estão se tornando tratamentos de primeira escolha para insônia. Estes fármacos têm tanto vantagens farmacodinâmicas quanto farmacocinéticas quando comparados aos benzodiazepínicos (STAHL, 2000). Zaleplon e zolpidem atuam seletivamente sobre receptores benzodiazepínicos tipo 1 (BZP- ω 1), que correspondem aos receptores GABA_A que contêm a subunidade α 1, envolvidos na sedação, mas não atuam sobre os receptores que contêm a subunidade α 2, concentrados em áreas cerebrais reguladoras da cognição, memória e função motora. Além disso, esses três fármacos possuem um perfil ideal de um fármaco sedativo-hipnótico, ou seja, rápido início de ação e curta duração (STAHL, 2000; LESLIE *et al.*, 2004;).

As reações adversas mais comuns relatadas para esses fármacos são: dor de cabeça, vertigem, sonolência e náusea (NEUBAUER, 2003). Porém, já são relatados efeitos adversos mais graves. O zaleplon, por exemplo, pode causar amnésia e alucinações; zolpidem tem, entre suas reações adversas mais comuns, a ocorrência de amnésia, diminuição dos reflexos e do desempenho psicomotor, alucinações e pesadelos. Zopiclona pode causar amnésia, dificuldade para acordar, insônia rebote e pesadelos (CORDIOLI *et al.*, 2005).

Além dos fármacos descritos anteriormente, utilizados sob prescrição médica, inúmeros medicamentos sem prescrição são utilizados pela população. Esses medicamentos contêm essencialmente uma ou mais substâncias pertencentes a estas três categorias farmacológicas: anticolinérgicos, anti-histamínicos e analgésicos (STAHL, 2000). Os mais empregados contêm anti-histamínicos,

principalmente difenilidramina. Esses medicamentos são também disponíveis em apresentações a serem dispensadas sob prescrição médica para outras indicações, incluindo reações alérgicas. Esses fármacos têm eliminação relativamente longa e, por isso, podem causar sedação residual pela manhã. Podem ocorrer também alguns graus de tolerância aos seus efeitos sedativos. Anti-histamínicos também apresentam efeitos anticolinérgicos potenciais, especialmente em pacientes idosos e em pacientes que já fazem uso de medicamentos com efeitos anticolinérgicos, como antidepressivos e antipsicóticos. A atividade anticolinérgica excessiva pode causar visão borrada, constipação, retenção urinária, confusão e delírio, sendo que todos esses efeitos têm sido associados à difenilidramina em monoterapia ou em combinação com outros fármacos (NEUBAUER, 2003).

Outros fármacos também são conhecidos por sua utilização como sedativos-hipnóticos, entre eles: barbituratos e compostos relacionados, hidrato de cloral e derivados de piperidinadiona. Atualmente, barbituratos e derivados de piperidinadiona não são prescritos, em razão dos problemas de tolerância, abuso, dependência, sobredose e síndrome de retirada, mais severos do que aqueles associados aos benzodiazepínicos. O hidrato de cloral ainda é utilizado, pois é um sedativo-hipnótico efetivo a curto prazo e tem custo reduzido. Porém, deve ser evitado em pacientes com doença renal, hepática e cardíaca e naqueles que utilizam diversos medicamentos, em razão da possibilidade de afetar enzimas hepáticas envolvidas com o metabolismo de fármacos (STAHL, 2000).

Alguns antidepressivos são sedativos em razão de suas ações anticolinérgicas e anti-histamínicas. Os antidepressivos tricíclicos (ATC) são úteis para induzir o sono em alguns pacientes. Desta forma, o uso de ATC em pacientes depressivos com insônia pode tornar um efeito adverso em um recurso para o alívio da insônia se os ATC são administrados antes de dormir (STAHL, 2000).

A trazodona também possui importante propriedade sedativa. Isto pode ser devido a sua atividade antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A}, que pode atuar para induzir e restabelecer o sono de ondas lentas. A trazodona pode ser utilizada juntamente com outros fármacos psicotrópicos, tornando-se uma alternativa para pacientes que utilizam outros medicamentos que causam problemas no sono, como os antidepressivos inibidores da recaptção de serotonina. Outros antidepressivos sedativos que bloqueiam receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} incluem

mirtazapina e nefazodona, sendo ocasionalmente utilizados por suas propriedades hipnótico-sedativas (STAHL, 2000).

3.3 Medicamentos obtidos a partir de plantas para o tratamento de transtornos de ansiedade e transtornos do sono

Além dos fármacos sintéticos convencionais, medicamentos obtidos a partir de plantas também estão sendo utilizados como recurso terapêutico na ansiedade e insônia. A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera que a espécie *Valeriana officinalis* pode ser utilizada, *in natura* ou na produção de medicamentos fitoterápicos, como alternativa aos benzodiazepínicos (OMS, 1999). Suas principais indicações de uso são como sedativo leve, no alívio de estados de excitação nervosa, tensão, irritabilidade e ansiedade indutora de distúrbios do sono (ESCOP, 1997; OMS, 1999; BLUMENTHAL *et al.*, 2000). O mecanismo de ação da valeriana não está completamente elucidado, mas estudos demonstram que a ação sedativa observada para as preparações de valeriana é mediada pelo complexo receptor GABA/benzodiazepínico (BELLO *et al.*, 2002). Além disso, a fração lipofílica mostrou afinidade por receptores de barbituratos e receptores periféricos de benzodiazepínicos (MORAZZONI; BOMBARDELLI, 1995). Os efeitos adversos parecem ser leves e pouco frequentes, com relatos ocasionais de náuseas, dor de cabeça, tonturas e cansaço, excitabilidade e insônia. Entretanto, altas doses podem causar bradicardia, arritmias e diminuição da motilidade intestinal (OMS, 1999).

Outra espécie utilizada é *Piper methysticum*. Conhecida popularmente como cava, tem usos terapêuticos como ansiolítico e sedativo, respaldados por ensaios clínicos (AMARAL *et al.*, 2002). Essas atividades são atribuídas a uma mistura de cavalactonas presentes no extrato, principalmente cavaína e iangonina (BRUNETON, 1991). É possível que as cavalactonas, devido a sua característica lipofílica, atuem sobre a fluidez da membrana lipídica celular, alterando a conformação dos receptores, agindo de maneira não seletiva. Também existem evidências importantes de ação antagonista sobre canais de sódio, canais de cálcio tipo L, relacionadas às ações anticonvulsivante e estabilizadora do humor, efeitos sobre os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico nos circuitos neuronais límbicos e uma ação modulatória sobre receptores GABA_A, que podem ser o substrato neural do efeito ansiolítico e sedativo (AMARAL *et al.*, 2002). A cava potencia a ação de outros

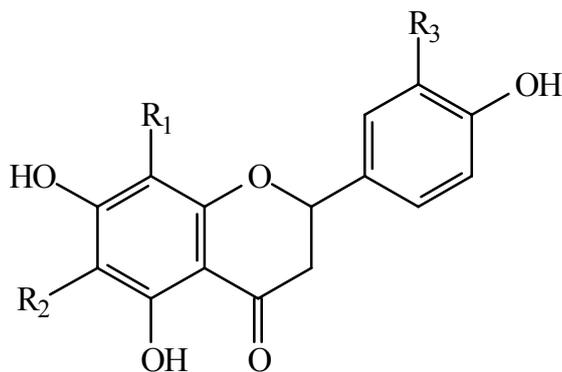
depressores do sistema nervoso central, não devendo ser utilizada concomitante com estas substâncias. Esta espécie merece bastante atenção no que diz respeito aos efeitos adversos, pois, já foram relatados sérios casos de hepatotoxicidade associados ao uso de fitoterápicos à base da cava na Suíça e Alemanha (AMARAL *et al.*, 2002).

3.4 Química e farmacologia do gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora* é considerado o mais importante da família Passifloraceae e consiste de cerca de 400 espécies (CRONQUIST, 1981). Conhecidas popularmente como maracujá, essas plantas crescem principalmente em regiões tropicais do mundo (CORREA, 1984). Diversos são os efeitos atribuídos às espécies do gênero *Passiflora*, porém o uso popular mais difundido e investigado cientificamente é como sedativo e para o tratamento de distúrbios de ansiedade, comum a vários países (BLUMENTHAL *et al.*, 2000; CONRADO *et al.*, 2003).

Os flavonóides são considerados o grupo de metabólitos secundários de distribuição mais homogênea no gênero. No entanto, foram relatadas tanto diferenças qualitativas como quantitativas nos flavonóides das espécies de *P. alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* e *P. caerulea* (PEREIRA *et al.*, 2004).

Para a espécie oficial da Farmacopéia Brasileira, *P. alata*, há relatos na literatura da presença de vitexina, isovitexina, 2''-xilossil-vitexina e orientina, (ULUBELEN *et al.*, 1982), 2''-ramnosil-vitexina, 2''-ramnosil-escoparina, 2''-ramnosil-orientina, isoorientina (DOYAMA *et al.*, 2005), apresentados na figura 1. MÜLLER *et al.* (2005) verificaram a presença de isovitexina (1,137 g%) e vitexina (traços), contudo os autores pontuam que estes dois compostos não são majoritários na fração flavonoídica da espécie, diferentemente de *P. incarnata*, cuja flavona majoritária é isovitexina.



	R1	R2	R3
Vitexina	glicose	H	H
Isovitexina	H	glicose	H
Orientina	glicose	H	OH
2'-xilosil-vitexina	glicose(1→2)xilose	H	H
2''-ramnosil-vitexina	glicose(1→2)ramnose	H	H
2''-ramnosil-escoparina	glicose(1→2)ramnose	H	O-CH ₃
2''-ramnosil-orientina	glicose(1→2)ramnose	H	OH
Isoorientina	H	glicose	OH

Figura 1: Estruturas químicas dos flavonóides descritos para *P. alata*.

A espécie de *P. alata* apresenta saponinas como metabólitos secundários majoritários, diferindo das demais espécies do gênero, onde os flavonóides são os metabólitos principais (BIRK *et al.*, 2005). A partir das folhas dessa espécie cinco saponinas foram isoladas e identificadas (Figura 2): 1 esteroidal (**1**) e 4 triterpênicas (**2-5**) (REGINATTO *et al.*, 2001). O teor da saponina majoritária, quadrangulosídeo (**5**), foi determinado como 22,2 % (m/m) do extrato aquoso, correspondendo a 8,2% (m/m) das folhas secas (REGINATTO *et al.*, 2004).

Além disso, foi relatada a presença de alcalóides do tipo β -carbolínicos na espécie de *P. alata* em concentração de 0,217 mg% (OGA *et al.*, 1984).

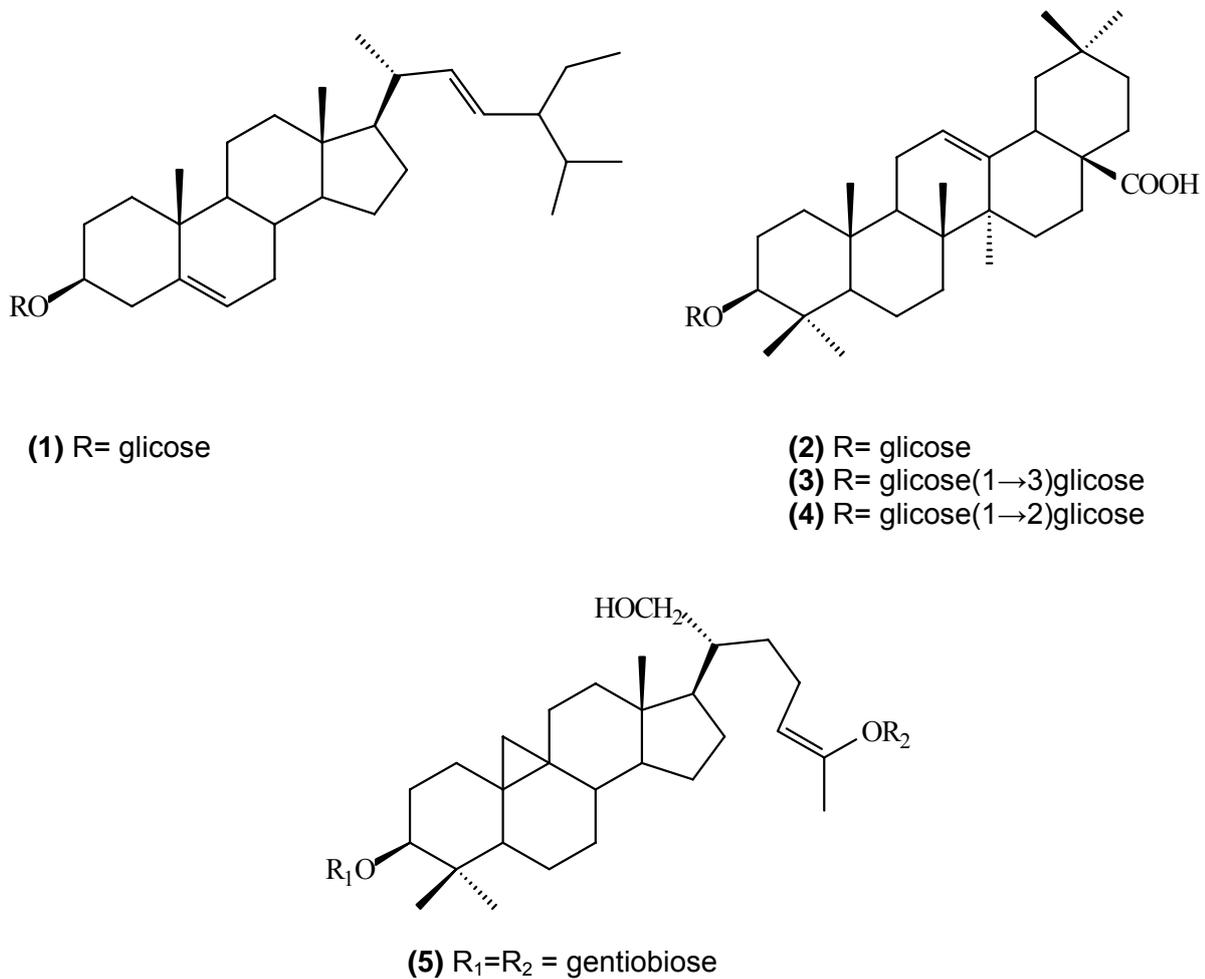


Figura 2: Estruturas químicas das saponinas isoladas das folhas de *P. alata*. 3-O-β-D-glicopiranosil-estigmasterol (1), ácido 3-O-β-D-glicopiranosil-oleanólico (2), ácido 3-O-β-D-glicopiranosil-(1→3)-β-D-glicopiranosil-oleanólico (3), ácido 3-O-β-D-glicopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosil-oleanólico(4), 9,19-ciclolanost-24Z-en-3β,21,26-triidróxi-3,26-di-O-gentiobiose (5).

Entre as espécies do gênero *Passiflora* citadas, a espécie de *P. incarnata* é a que apresenta maior número de estudos quanto à ação central. Esta espécie é aprovada pela Comissão E (BLUMENTHAL *et al.*, 2000) para uso interno no tratamento de insônia nervosa e, pelo British Herbal Compendium (BHC, 1992) e European Scientific Cooperative on Phytotherapy Monograph on the Medicinal Uses of Plant (ESCOP, 1997), para distúrbios do sono, estresse, ansiedade e tensão.

Estudos pré-clínicos realizados com *P. incarnata* demonstraram que extratos etanólicos das partes aéreas (65 – 250 mg/kg, i.p.) reduziram a atividade motora espontânea e provocaram um aumento na duração do sono induzido por pentobarbital, em camundongos (SPERONI *et al.*, 1996). SOULIMANI *et al.* (1997) observaram, em camundongos, efeito ansiolítico para o extrato hidroetanólico e efeito sedativo para o extrato aquoso, na dose de 400 mg/kg, i.p., indicando diferenças no efeito farmacológico observado em função do solvente utilizado na preparação do extrato.

DHAWAN *et al.* (2001a) observaram que o extrato metanólico de *P. incarnata* apresentou ação ansiolítica dose-dependente, com efeito máximo na dose de 125 mg/kg, v.o., no labirinto em cruz elevado, em camundongos. O aumento da dose resultou na redução do efeito, sendo que os autores sugeriram que o efeito ansiolítico pode estar sendo mascarado por um efeito sedativo do extrato, impedindo que esse seja detectado.

Através do fracionamento do extrato metanólico de *P. incarnata*, guiado pela avaliação da atividade ansiolítica em camundongos, no labirinto em cruz elevado, foi isolado um derivado benzoflavônico tri-substituído, o qual foi ativo na dose de 10 mg/kg, v.o., nesse modelo (DHAWAN *et al.*, 2001b). Esta benzoflavona é apontada como provável responsável pelas atividades biológicas desta espécie. Para esta substância, foram também relatadas ações na reversão da tolerância e dependência de fármacos psicotrópicos, como morfina, nicotina, álcool, diazepam e Δ -9-tetrahydrocannabinol. Além disso, a benzoflavona demonstrou propriedades afrodisíacas, de aumento da libido e da virilidade em ratos machos, de dois anos de idade. Essa benzoflavona é um derivado trissubstituído da alfa-naftoflavona (7,8-benzoflavona), um inibidor da enzima aromatase e, por isso, sugere-se que o mecanismo de ação da benzoflavona seja um mecanismo neuroesteroidal em que a benzoflavona previne a degradação metabólica da testosterona e faz uma *up-regulation* dos níveis sanguíneos de testosterona no organismo (DHAWAN, 2003; DHAWAN *et al.*, 2004).

Recentemente, um estudo demonstrou que a combinação de extratos de *P. incarnata* e *Piper methysticum* diminui a hipermotilidade induzida por anfetamina e prolonga o tempo de sono induzido por barbitúricos, em camundongos. O efeito da

associação entre os extratos foi superior aos resultados obtidos com cada extrato separadamente (CAPASSO; SORRENTINO, 2005).

Estudos clínicos demonstraram a eficácia ansiolítica de um extrato de *P. incarnata*, comparável ao oxazepam, no tratamento de ansiedade generalizada. O extrato apresentou um início de ação mais lento, porém, não foram relatadas diminuição das funções cognitivas e do desempenho no trabalho durante o uso, ao contrário do oxazepam (AKHONDZADEH *et al.*, 2001a). Outro estudo, que avaliou a melhora de sintomas de ansiedade durante a detoxificação de drogas opiáceas, demonstrou que pacientes tratados com associação de *P. incarnata* e clonidina tiveram sintomas de ansiedade mais leves do que aqueles tratados somente com clonidina (AKHONDZADEH *et al.*, 2001b).

Quanto à espécie de *P. edulis*, estudos demonstraram que os extratos hidroalcoólico e aquoso, nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg i.p., apresentaram efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado, em ratos (PETRY *et al.*, 2001; DE PARIS *et al.*, 2002). Outro estudo verificou o efeito ansiolítico do extrato metanólico (75, 200 e 300 mg/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado, em camundongos (DHAWAN *et al.* 2001a).

3.4.1 *Passiflora alata*

Apesar de seu caráter oficial, *P. alata* apresenta poucos estudos tanto em aspectos químicos, quanto farmacológicos. Extratos fluidos das folhas dessa espécie (75 e 150 mg/kg i.p.) prolongaram o tempo de sono induzido por pentobarbital, reduziram a atividade motora espontânea e apresentaram discreto efeito anticonvulsivante em camundongos, demonstrando ação depressora do sistema nervoso central (OGA *et al.*, 1984). Também foi verificada a ação ansiolítica de extratos aquosos e hidroetanólicos das folhas de *P. alata* (100 e 150 mg/kg, i.p.), em ratos (PETRY *et al.*, 2001; DE PARIS *et al.*, 2002).

Além da avaliação sobre o SNC, foi avaliado o efeito de um extrato aquoso de *P. alata* (1000 mg/kg, v.o.), administrado três vezes por semana, sobre parâmetros bioquímicos, em ratos. Neste estudo, não foram observadas alterações nas concentrações séricas de triglicerídeos, glicose e proteínas totais. Também não foram observadas diferenças significativas nas atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutationala peroxidase e, além disso, o extrato não modificou

significativamente os níveis de colesterol LDL, mas alterou o metabolismo lipídico, aumentando significativamente os níveis de colesterol HDL sem alterar a concentração de colesterol total (DOYAMA *et al.*, 2005).

Em relação a estudos de toxicidade, um extrato fluido da espécie de *P. alata* apresentou DL₅₀ de 456 mg/kg i.p., em camundongos (OGA *et al.*, 1984). Além disso, essa espécie não apresentou toxicidade reprodutiva quando administrado um extrato aquoso liofilizado, na dose de 800 mg/kg/dia v.o., durante a gestação em ratas (AMARAL *et al.*, 2001).

3.5 Flavonóides

Flavonóides são polifenóis sintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, podendo ser encontrados na forma de aglicona livre ou conjugados com açúcares (HARBORNE *et al.*, 1975).

Mais de 5000 diferentes flavonóides estão descritos e muitas são as ações biológicas a eles atribuídas, destacando-se antioxidante, antialérgica, antiinflamatória, hepatoprotetora, inibidora de enzimas, antitumoral, antiviral, espasmolítica e estrogênica (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Também são relatadas atividades no sistema nervoso central, tais como analgésica, moduladora do metabolismo oxidativo neuronal, anticonvulsivante, pró-convulsivante, sedativa e ansiolítica (GOUTMANN *et al.*, 2003).

De particular interesse neste trabalho é a atividade sobre o sistema nervoso central. Dois flavonóides isolados das flores de *Albizzia julibrissin*, quercetrina e isoquercetrina, aumentaram o tempo de sono induzido por pentobarbital de maneira dose-dependente quando administrados intraperitonealmente (10, 25 e 50 mg/kg) em camundongos (KANG *et al.*, 2000).

Estudos demonstraram que o equol, uma isoflavona isolada da urina bovina (LUCK *et al.*, 1983) e do conteúdo ruminal de bovinos (MEDINA *et al.*, 1991), liga-se ao receptor benzodiazepínico ($K_i = 100 \mu\text{M}$), sendo este o primeiro relato de um flavonóide como ligante benzodiazepínico. Porém, a afinidade é considerada baixa e o equol não apresentou atividade ansiolítica (MEDINA *et al.*, 1997).

Em 1988, NIELSEN *et al.* descreveram o isolamento de um biflavonol, amentoflavona, o primeiro composto sem átomos de nitrogênio na molécula, com alta afinidade *in vitro* pelo receptor benzodiazepínico ($K_i = 7$ nM). No entanto, não houve mudanças na ligação de $[H^3]$ -diazepam *ex-vivo*, quando a amentoflavona foi administrada intraperitonealmente, sugerindo que esta não ultrapassa a barreira hematoencefálica. De fato, a permeabilidade da amentoflavona é inferior a 2% em células de capilar cerebral de porco (GOUTMANN *et al.*, 2003). Além disso, HANRAHAN *et al.* (2003) demonstraram que a amentoflavona exerce uma ação moduladora negativa em receptores $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ GABA_A recombinantes, expressos em oócitos de *Xenopus leavis*, e que esta ação não está relacionada ao receptor benzodiazepínico uma vez que a presença de altas doses de flumazenil, um antagonista benzodiazepínico, não bloqueou esse efeito.

A crisina, isolada de *Passiflora caerulea*, inibiu a ligação de $[H^3]$ -flunitrazepam ao receptor benzodiazepínico ($K_i = 3$ μ M) e não apresentou afinidade por α e β adrenorreceptores, receptor muscarínico ou receptor GABAérgico. Este composto apresentou efeito ansiolítico em camundongos (1 mg/kg, i.p.), que foi completamente revertido pela co-administração de RO 15-1788 (um antagonista benzodiazepínico), indicando que esta ação esteja vinculada à modulação do complexo receptor GABA_A, via ligação com o sítio benzodiazepínico. Contudo, não foi verificado efeito miorrelaxante e somente em doses muito elevadas observou-se efeito sedativo (30 mg/kg, i.p.). A soma dos dados obtidos permitiu aos autores postular que a crisina atue como um agonista parcial do sítio benzodiazepínico (WOLFMAN *et al.*, 1994; ZANOLI *et al.*, 2000).

Em um estudo de fracionamento bioguiado realizado a partir do extrato de *Matricaria recutita* foram identificadas diversas frações com afinidade pelo sítio benzodiazepínico. Dessas frações foi isolada apigenina que, de forma semelhante à crisina, apresentou afinidade pelo sítio benzodiazepínico ($K_i = 3$ μ M) e também apresentou efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado quando administrada a camundongos na dose de 3 mg/kg, i.p. Um discreto efeito sedativo foi observado apenas em doses elevadas (30 mg/kg, i.p.). Também não foram observados efeitos miorrelaxante e anticonvulsivante (VIOLA *et al.*, 1994a). No entanto, esses dados não foram confirmados por AVALLONE *et al.* (2000) e ZANOLI *et al.* (2000). Estes autores testaram a apigenina (1 – 25 mg/kg, i.p.) em dois modelos animais de ansiedade:

labirinto em cruz elevado e distinção claro-escuro, sendo que em nenhum dos modelos foi verificado efeito ansiolítico. Este flavonol apenas reduziu a atividade motora espontânea na dose de 25 mg/kg, indicando um possível efeito sedativo, que não foi bloqueado pela pré-administração de flumazenil, indicando que este efeito não é mediado pela modulação alostérica exercida pelo receptor benzodiazepínico.

Outro estudo relatou que uma fração enriquecida em flavonóides obtida do extrato de *Tilia tormentosa* apresentou atividade ansiolítica em camundongos. O flavonol canferol, isolado desta fração apresentou baixa afinidade pelo receptor benzodiazepínico ($K_i = 93 \mu\text{M}$) e não apresentou efeito ansiolítico ou sedativo (VIOLA *et al.*, 1994b). Cirsiliol, isolado de *Salvia guaranitica*, também destituído de ação ansiolítica, apresentou baixa afinidade pelo receptor benzodiazepínico ($K_i = 200 \mu\text{M}$) (MARDER *et al.*, 1996a).

HABERLEIN *et al.* (1994) isolaram de *Leptospermum scoparium* quatro derivados flavônicos (5,7-dimetoxiflavona; 5-hidróxi-7-metóxi-6-metilflavona; 5-hidróxi-7-metóxi-6,8-dimetilflavona e 5,7-dimetóxi-6-metilflavona) com diferentes afinidades pelo sítio benzodiazepínico ($K_i = 2\text{-}50 \mu\text{M}$). Os autores acreditam que estes possam atuar como agonistas totais ou parciais do sítio de ligação de benzodiazepínicos, contudo, sua atividade central não foi investigada *in vivo*.

Também foi relatado que dois flavonóides C-glicosilados (orientina e isoorientina) isolados do extrato de *Jatropha cillata* apresentaram um efeito ansiolítico discreto no teste anti-conflito em camundongos (OKUYAMA *et al.*, 1996).

Estudos demonstraram que, do extrato hidroetanólico de *Artemisia herba-alba* foram isolados dinatina, hispidulina, escrofuléina e cirsilineol, que inibiram a ligação de [H^3]-flunitrazepam ao sítio de ligação benzodiazepínico com K_i 's de 1,3; 8; 23 e 104 μM , respectivamente (SHEN *et al.*, 1994; SALAH; JÄGER, 2005).

Das raízes de *Scutellaria baicalensis* foram isolados 26 flavonóides com diferentes afinidades pelo sítio benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A e alguns destes compostos (vogonina, baicaleína, baicalina, 5,7,2'-triidróxi-6,8-dimetóxi-flavona, oroxilina A) foram submetidos a ensaios bioquímicos e farmacológicos. Em estudos comportamentais, realizados em camundongos, foi observado efeito ansiolítico para vogonina (1–30 mg/kg, v.o.), o qual foi completamente abolido pela pré-administração do antagonista benzodiazepínico RO

15-1788. No regime de doses empregado não foram detectados efeito sedativo ou miiorrelaxante. A dose letal mediana determinada para o composto foi 3,9 g/kg. Em ensaios eletrofisiológicos verificou-se que a vogonina exerce uma modulação alostérica positiva em receptores GABA_A recombinantes. Esse efeito foi parcialmente revertido na presença RO 15-1788. O efeito modulador positivo não foi detectado em receptores recombinantes que não apresentavam a subunidade γ . Sabe-se que o sítio de ligação de benzodiazepínicos é expresso no complexo receptor GABA_A na interface entre as subunidades α e γ . Dessa maneira, o conjunto de dados obtidos permite inferir que a vogonina atue como um agonista parcial desse sítio de ligação (Hui *et al.*, 2002).

Baicaleína e seu glicuronídeo, baicalina, apresentaram atividade ansiolítica, em camundongos, no teste de conflito de Vogel, nas doses de 10 e 20 mg/kg, respectivamente. Este efeito foi bloqueado pela co-administração do antagonista benzodiazepínico flumazenil, mas não por pindolol, um antagonista 5-HT_{1A}, indicando que o efeito ansiolítico seja mediado pelo sistema GABA/benzodiazepínico e não pelo sistema serotoninérgico (LIAO *et al.*, 2003).

O flavonóide 5,7,2'-triidróxi-6,8-dimetóxi-flavona (K36), apresentou afinidade pelo sítio benzodiazepínico ($K_i = 6,4$ nM). Foi verificada atividade ansiolítica para K36 na dose de 4 mg/kg v.o., e não foram observados efeitos sedativo, miiorrelaxante ou de incoordenação motora em aparelho rota-rod (1-8 mg/kg) em camundongos. Os resultados dos estudos eletrofisiológicos para K36 foram semelhantes aos encontrados para vogonina (HUEN *et al.*, 2003a).

Oroxilina A (3,75 – 60 mg/kg) não apresentou atividade alguma, *per se*, em diferentes modelos animais em camundongos. Contudo, na dose de 60 mg/kg, v.o. esse composto bloqueou a ação ansiolítica, miiorrelaxante e de incoordenação motora causada pela administração de diazepam (3 mg/kg, v.o.). Os efeitos sedativo e anticonvulsivante do diazepam não foram abolidos por esse esquema de tratamento. Esses dados corroboram os achados bioquímicos que revelaram uma “razão GABA” (determinada pela razão entre a IC₅₀ de um ensaio de ligação na presença GABA pela IC₅₀ de um ensaio na ausência de GABA) de $1,09 \pm 0,04$, característica de antagonistas benzodiazepínicos. A totalidade dos dados permitiu caracterizar oroxilina A como o primeiro composto natural com ação antagonista benzodiazepínica seletiva (HUEN *et al.*, 2003b).

Os resultados promissores obtidos com *S. baicalensis* despertaram o interesse na investigação de outras espécies do gênero *Scutellaria*. AWAD *et al.* (2003) iniciaram uma linha de investigação com *S. laterifolia* L., uma planta usada tradicionalmente na América do Norte como sedativa e no tratamento de diversas desordens nervosas, como a ansiedade. O extrato hidroalcoólico das raízes desta espécie administrado oralmente a camundongos na dose de 100 mg/kg, apresentou efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado e aumentou a exploração da “zona ansiogênica” do *open-field*. Na análise química inicial desta espécie foram detectados os flavonóides baicalina (40 mg/g) e baicaleína (33 mg/g), cuja atividade ansiolítica havia sido determinada anteriormente. Também foi constatada a presença do próprio GABA (aproximadamente 1,6 mg/g). Os autores acreditam que estes compostos possam ser os responsáveis pelo efeito observado para o extrato.

Flavonóides também têm sido relacionados como componentes ativos em espécies de *Valeriana*, plantas tradicionalmente usadas como sedativas. Da espécie *V. walichii* foi isolada 6-metilapigenina, um composto inédito que foi capaz de inibir a ligação de [H^3]-flunitrazepam em membranas corticais de ratos com $K_i = 0,5 \mu M$. Também foi verificada sua ação ansiolítica, em camundongos, na dose de 1 mg/kg, i.p. Contudo, alterações na atividade locomotora (0,3–1 mg/kg, i.p.) e efeito sedativo não foram observados (10 mg/kg, i.p.) (WASOWSKI *et al.*, 2002; MARDER *et al.*, 2003).

Da espécie de *V. officinalis* foram isolados linarina e hesperidina. No entanto, nenhum destes flavonóides apresentou atividade ansiolítica ou afinidade pelo receptor benzodiazepínico, mas produziram marcado efeito sedativo em camundongos, na dose de 4 mg/kg, i.p. Apesar de não atuarem como ligantes benzodiazepínicos estes compostos têm o seu efeito sedativo potencializado por agonistas benzodiazepínicos (MARDER *et al.*, 2003; FERNÁNDEZ *et al.*, 2004). Em uma análise isobolar foi determinada uma interação sinérgica entre diazepam e hesperidina. Os autores sugerem que este flavonol possa ser usado em associação aos benzodiazepínicos com a finalidade de reduzir as doses necessárias desses últimos compostos na terapêutica (FERNÁNDEZ *et al.*, 2005).

Os dados da atividade central de diversos flavonóides naturais motivaram estudos de química medicinal, através da modificação estrutural da flavona, esqueleto básico de uma grande variedade de flavonóides com ação no SNC, visando a obtenção de derivados sintéticos com atividade superior. Empregando a

técnica de química combinatória, mais de 60 derivados foram isolados. A estratégia empregada levou à obtenção de compostos com maior afinidade pelo sítio benzodiazepínico que o composto protótipo (MARDER *et al.*, 1998). Outro achado interessante foi o de que as modificações propostas resultaram em substâncias com ação ansiolítica seletiva, pois em muitos casos não foram detectados outros efeitos comumente observados para os benzodiazepínicos. Exemplificando, o efeito sedativo dos derivados somente foi observado em doses de 10 a 1000 vezes superiores à dose que apresentou atividade ansiolítica. Outro efeito importante, o relaxamento muscular, somente foi observado para um dos compostos e em uma dose 20 vezes superior a dose ansiolítica. Somente um dos compostos alterou a atividade locomotora dos animais, em uma dose que também provocou efeito sedativo, o que pode explicar a redução da atividade motora. Os compostos 6,3'-dinitroflavona e 6-bromo-3'-nitroflavona também não tiveram efeito amnésico quando testados em ratos (1 mg/kg, i.p.) no teste de esQUIVA inibitória (SALGUEIRO *et al.*, 1997; VIOLA *et al.*, 2000a).

Autores sugerem que alguns desses compostos sintetizados possuem potência ansiolítica superior ao diazepam, usado como controle positivo durante os ensaios. Com base nessa hipótese, GRIEBEL *et al.* (1999) realizaram uma bateria de testes a fim de comparar a potência do composto 6-bromo-3-nitroflavona com diazepam ($K_i = 7$ nM). Os achados bioquímicos revelaram que o composto semi-sintético apresentou diferentes afinidades pelo sítio benzodiazepínico em regiões distintas do SNC, com $IC_{50} = 31$ nM no cerebelo e $IC_{50} = 120$ nM na medula espinhal, indicando uma certa seletividade para receptores benzodiazepínicos tipo I (BZP- ω 1), uma vez que estes são prevalentes no cerebelo. Na avaliação do efeito ansiolítico esse composto apresentou atividade nos testes de conflito de Vogel e no labirinto em cruz elevado, porém nos testes de discriminação claro/escuro e no teste de conflito de Geller não foi observado esse efeito. A atividade ansiolítica desse composto foi revertida pela co-administração de flumazenil no labirinto em cruz elevado, porém não foi revertida no teste de conflito. Na bateria de ensaios de defesa, quando os camundongos foram expostos a um predador natural (rato) esse composto não alterou o comportamento dos animais. Analisando conjuntamente os dados obtidos concluiu-se que o composto possui atividade ansiolítica, porém com um perfil diferenciado do diazepam.

As modificações realizadas também levaram a compostos com atividades diferentes da flavona original: 6-metil-3'-bromoflavona e 6-cloro-3'-nitroflavona, por exemplo, foram caracterizados como antagonistas benzodiazepínicos, pois não apresentaram nenhum efeito intrínseco nos testes realizados, porém foram capazes de reverter os efeitos ansiolítico, anticonvulsivante, miorelaxante e de incoordenação motora causados pelo diazepam (VIOLA *et al.*, 1999; VIOLA *et al.*, 2000b).

O 2-metóxi-3,8,9-trihidróxi coumestano (PCALC36), um isoflavonóide sintético, age como agonista inverso do sítio benzodiazepínico no complexo receptor GABA_A. PCALC36 deslocou a ligação de [H³]-flunitrazepam em sinaptossomas cerebrais de ratos (IC₅₀ = 13,8 µM) e a adição de 20 µM de GABA deslocou para a direita a curva de inibição de PCALC36 na ligação do [H³]-flunitrazepam (IC₅₀ razão de 0,68), o que é característico de moléculas com perfil agonista inverso (LOPES *et al.*, 2004).

3.6 Saponinas

Saponinas são glicosídeos de alto peso molecular formados por um núcleo triterpênico ou esteroidal, chamado de aglicona, e por uma ou mais porções de açúcares ligadas a esta. As saponinas são chamadas de monodesmosídicas quando apresentam um açúcar ou uma cadeia de açúcares ligados à aglicona. Por sua vez, saponinas bidesmosídicas apresentam duas cadeias de açúcares ligadas a diferentes carbonos da aglicona. Raramente ocorrem saponinas tridesmosídicas (HOSTETTMAN; MARSTON, 1995).

As principais atividades biológicas relatadas para saponinas são hemolítica, antiinflamatória, antimicrobiana, analgésica, antitumoral, antiviral, ictiotóxica, capacidade de complexar com colesterol e molusquicida (HOSTETTMAN; MARSTON, 1995).

Quanto a ações das saponinas no sistema nervoso central, a grande maioria dos estudos refere-se às saponinas do ginseng, principalmente da espécie *Panax ginseng*. O termo ginseng pode se referir a plantas diferentes, cujos rizomas e raízes são utilizados em preparações classificadas como adaptógenas, isto é, contêm substâncias com ação não-específica, normalizadora das funções do organismo

(RATES; GOSMANN, 2001). Muitos compostos foram isolados das partes subterrâneas do ginseng, principalmente saponinas derivadas do damarano ou do ácido oleanólico, conhecidas como ginsenosídeos (HOSTETTMAN; MARSTON, 1995; SCHENKEL *et al.*, 2003).

Em estudos neuroquímicos realizados com os ginsenosídeos isolados de *Panax ginseng* foi verificado que Rb1, Rb2, Rc, Re, Rf e Rg1 inibiram a ligação de [³H]-muscimol ao receptor GABAérgico. Os ginsenosídeos Re e Rf aumentaram a ligação de [³H]-flunitrazepam ao sítio de ligação benzodiazepínico. O ginsenosídeo Rc inibiu a ligação de [³H]-baclofeno ao receptor GABA_B (KIMURA *et al.*, 1994). Este último também potencializou as correntes iônicas estimuladas por GABA, em receptores GABA_A α₁β₁γ_{2s} recombinantes expressos em oócitos de *Xenopus*, de maneira dose-dependente. Esse efeito foi bloqueado por muscimol, um antagonista GABA, e por picrotoxina, um bloqueador do canal GABA_A (CHOI *et al.*, 2003).

ATTELE *et al.* (1999) demonstrou que uma mistura dos ginsenosídeos Rb₁, Rb₂ e Rc prolongou o tempo de sono induzido por hexobarbital e reduziu a atividade locomotora espontânea em camundongos, ações características de substâncias depressoras do sistema nervoso central. Além disso, o extrato bruto de *Panax ginseng* também apresentou atividade ansiolítica e esta atividade foi correlacionada com a presença dos ginsenosídeos Rb1 (10-50 mg/kg, v.o.), Rg1 (10-50 mg/kg, v.o.) e as misturas Rg5 (25-50 mg/kg, v.o.) e Rk (10-50 mg/kg, v.o.), que apresentaram efeito ansiolítico, em camundongos, no labirinto em cruz elevado (CHA *et al.*, 2005).

TACHIKAWA *et al.* (1999) verificaram a redução causada pelo ginsenosídeo Rg2 (1-100 μM) na secreção de catecolaminas estimulada por acetilcolina e GABA em células adrenais bovinas. De forma semelhante, o ginsenosídeo Rg3 (1-100 μM) também reduziu a secreção induzida por acetilcolina, GABA e neurotensina e, em altas concentrações (100 μM), reduziu as secreções induzida por angiotensina II, bradicinina e histamina. Esta mesma saponina também inibiu significativamente as contrações em íleo isolado de cobaio induzidas por muscarina e histamina. Estes resultados sugerem fortemente que Rg2 é um bloqueador seletivo de receptores ionotrópicos enquanto Rg3, além dessa ação, seja também um antagonista de receptores muscarínico e histamínico.

Um estudo demonstrou que o majonosídeo-R2 (M-R2), uma saponina do tipo ocotilol, constituinte majoritário de *Panax vietnamensis*, atenuou o efeito

antinociceptivo induzido por estresse psicológico e por choque nas patas na dose de 6,2 mg/kg, v.o. (HUONG *et al.*, 1995). Esta mesma saponina (3,1-12,5 mg/kg, v.o.) reverteu a redução do sono barbitúrico causada por estresse psicológico ao nível do sono apresentado pelos animais não-estressados. Esse efeito foi bloqueado por flumazenil (1 mg/kg, i.v.), indicando o envolvimento do receptor benzodiazepínico. M-R2 (6,2-12,5 mg/kg, v.o.) ainda reduziu a formação de lesões gástricas em animais submetidos a 16 horas de estresse psicológico (HUONG *et al.*, 1996).

Outro estudo demonstrou que o tratamento com M-R2 (3,1-12 mg/kg, i.p. ou 5-10 µg, i.c.v.) reverteu, de maneira dose-dependente a redução no sono causada pela pelo isolamento social. Esse efeito foi significativamente atenuado pela administração de sulfato de pregnenolona (10 µg, i.c.v.), um neuroesteróide modulador alostérico negativo de receptores GABA_A. Além disso, quando injetados i.c.v. M-R2, allo-tetraidro-desoxicorticosterona (modulador alostérico positivo de receptores GABA_A) e α-helical-corticotrofina (antagonista do fator de liberação de corticotrofina - CRF) houve uma reversão na redução do sono barbitúrico induzida por prenenolona e CRF em animais não-estressados. Os resultados sugerem que o efeito de M-R2 seja mediado pelo sítio neuroesteróide do complexo receptor GABA_A. Contudo, os autores pontuam que esse efeito não deve ser exercido de forma direta, uma vez que M-R2 não apresenta um grupamento 3-α-hidroxila, uma característica necessária para esta atividade. Dessa forma, sugere-se que esta saponina possa atuar aumentando os níveis de agonistas neuroesteróides GABA_A (HUONG *et al.*, 1997).

PARK *et al.* (2005a) realizaram uma comparação do efeito ansiolítico em camundongos entre *red ginseng* (RG) e *sun ginseng* (SG), duas matérias-primas, derivadas de *P. ginseng*, estabilizadas de maneiras diferentes. O extrato total SG (50 mg/kg, v.o.) bem como sua fração butanólica (25 e 50 mg/kg, v.o.) apresentaram atividade ansiolítica superior à fração butanólica RG (100 mg/kg, v.o.). Tanto o extrato e as frações butanólicas são ricas em ginsenosídeos (SG-butanol com teor de 63,8 % e RG-butanol de 56,3 %) o que indica que estes parecem estar relacionados com o efeito observado uma vez que a fração com maior teor destes compostos apresentou maior atividade.

Finalmente, a fração butanólica de *Albizzia lebbbeck*, enriquecida em saponinas, mostrou atividade ansiolítica (25 e 50 mg/kg, v.o.) e nootrópica (10 e 25

mg/kg, v.o.) em camundongos. No teste de toxicidade aguda, os animais que receberam 50 e 75 mg/kg da fração butanólica demonstraram sinais de depressão do SNC como redução da atividade motora e secretória, de forma dose dependente. Esta fração também reverteu a hipotermia e passividade causada por baclofeno (10 mg/kg), um agonista de receptores GABA_B, sugerindo que a modulação deste tipo de receptores esteja envolvida nos efeitos observados (UNE *et al.*, 2001).

3.7 Alcalóides β -carbolínicos

As β -carbolinas (harmano, harmina, harmalina) são alcalóides indólicos derivados do metabolismo do triptofano. Esses alcalóides são um grupo de metabólitos secundários conhecidos por suas propriedades alucinógenas e, inclusive, plantas conhecidas por conterem esses compostos são utilizadas em cerimônias religiosas (BRUNETON, 1991). Os alcalóides do tipo harmano interagem como os receptores de serotonina, o que poderia estar relacionado às propriedades alucinógenas (AIRAKSINEN; KARI, 1981; SCHRIPEMA *et al.*, 2003). Além disso, é conhecido que esses alcalóides, especialmente a harmina, apresentam atividade inibidora da monoamino oxidase (SLOTKIN; DOSTEFANO, 1970; AIRAKSINEN; KARI, 1981). Porém, a maioria dos estudos com β -carbolinas relaciona-se com atividade ansiolítica/ansiolítica e anticonvulsivante/pró-convulsivante.

Um estudo demonstrou que a administração de harmano em altas doses (20 mg/kg i.p.) antagoniza o efeito ansiolítico de diazepam e, em baixas doses (1 mg/kg i.p.), harmano potencia esse efeito (ZIN'KOVSKAIA *et al.*, 1985). Outro trabalho mostrou que esse alcalóide diminuiu o tempo de imobilidade no teste de natação forçada e aumentou o tempo de exploração no braço aberto do labirinto em cruz elevado, em ratos. Os autores sugerem efeito antidepressivo e ansiolítico de harmano (ARICIOGLU; ALTUNBAS, 2003). Porém, o teste da natação forçada também é sensível à estimulantes (PORSOLT *et al.*, 1978).

Em 2005, HILBER E CHAPILLON demonstraram que, no labirinto em cruz elevado, doses baixas de harmalina (5 – 10 mg/kg i.p.) provocaram efeito ansiogênico em camundongos e, em doses mais altas (20 mg/kg i.p.) apresentaram ação ansiolítica. Esses autores referem, ainda, que a harmalina pode atuar como um

agonista fraco ou parcial de receptores benzodiazepínicos e que suas atividades podem ser, em parte, influenciadas pela interação com esses receptores.

Outro estudo revelou que o tratamento com harmano nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg i.p. aumentou o limiar de convulsões no teste de convulsões induzidas por eletrochoque de maneira dose-dependente. Baixas doses de harmano (2,5 mg/kg) diminuíram as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), mas altas doses (10 mg/kg) resultaram em uma piora nas convulsões de grau V, seguidas de maior letalidade, comparadas com o grupo tratado somente com PTZ (ARICIOGLU *et al.*, 2003).

Além dos alcalóides de ocorrência natural, também existem relatos sobre β -carbolinas sintéticas com atividades bem estabelecidas na literatura. Uma dose de 30 mg/kg de β -carbolina-3-carboxilato-t-butil-éster (β -CCt) reduziu em 84% a ligação de [H^3]-diazepam, uma hora após sua administração intraperitoneal. Essa dose também retardou o início do sono, diminuiu o sono não-REM e total nas primeiras duas horas após a administração e retardou o aparecimento do sono REM após o início do sono. Os autores demonstraram que a dose e o tempo de ação *in vivo* foram correspondentes aos ensaios de ligação *ex-vivo* com medidas de afinidade e número de receptores (MARTIN *et al.*, 1989).

COLE *et al.* (1995) demonstraram que os agonistas inversos parciais de receptores benzodiazepínicos, N-metil- β -carbolina-3-carboxamida (FG 7142) e (RO 15-4513), apresentaram efeito ansiogênico. A substância FG 7142 apresentou atividade nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg enquanto que RO 15-4513 foi efetiva somente em uma dose mínima de 30 mg/kg. Outro estudo demonstrou que o tratamento com 10 mg/kg i.p. de FG 7142 diminuiu o tempo de sono induzido por pentobarbital e não apresentou efeito na redução do tempo de sono provocada por metoxamina e yohimbina (MATSUMOTO *et al.*, 1997). Além disso, FG 7142 (5 – 10 mg/kg i.p.) diminuiu o tempo de sono em camundongos mantidos com outros animais e não alterou o tempo de sono em animais isolados (OJIMA *et al.*, 1997).

Outro derivado β -carbolínico, metil-6,7-dimetóxi-4-etil- β -carbolina-3-carboxilato (DMCM), avaliado no labirinto em cruz elevado, em ratos, em doses que variaram de 1,0 – 2,5 mg/kg, demonstrou atividade ansiogênica (COLE *et al.*, 1995; SAVIC *et al.*, 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Para a preparação do extrato as partes aéreas de *P. alata* foram coletadas maio de 2004, na cidade Canoas (RS), e identificadas pela Profa. Dra. Lilian Auler Mentz (Programa de Pós-Graduação em Botânica – UFRGS). Uma *voucher specimen* está depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN133727).

4.2 Preparação e caracterização do extrato

O material vegetal foi seco em estufa de ar circulante, durante quatorze dias, sob temperatura não superior a 40 °C. Decorrido este período, as folhas foram separadas do restante do material e trituradas em triturador de facas.

O material vegetal, previamente seco e triturado, foi submetido à extração com água (1:10 m/v) sob refluxo a 100 °C, por 1 hora. A solução extrativa obtida foi filtrada e após arrefecer, armazenada em frascos âmbar e congeladas até o processo de nebulização.

Os extratos foram secos por nebulização em torre de secagem por aspersão em aparelho Spray Dryer LM_{MSD 1.0}, a partir das soluções extrativas. As condições de secagem empregadas na preparação do nebulizado foram estabelecidas por DE SOUZA (1997) e estão apresentadas na tabela 1.

O extrato seco, denominado PA foi coletado na base de um ciclone e acondicionado em recipientes fechados e mantidos ao abrigo da luz em dessecador provido de sílica.

Os extratos foram caracterizados quanto ao seu perfil em saponinas e flavonóides através de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como sistema eluente butanol: ácido acético: água (5:1:2, V/V) para saponinas (PROVENSI *et al.*, 2003) e acetato de etila: acetona: ácido acético: água (60:20:10:10, V/V) para flavonóides (REGINATTO *et al.*, 2001). Foi realizada a determinação de flavonóides totais, utilizando a técnica de complexação com cloreto de alumínio e posterior leitura da absorvância a 400 nm (PETRY *et al.*, 1998; PROVENSI *et al.*, 2003). Além

disso, a presença de alcalóides foi testada através do teste de Mayer (SCHRIPEMA *et al.*, 2003).

Tabela 1: Condições de secagem para obtenção de extrato seco por nebulização de *Passiflora alata*.

Temperatura de entrada	150 ± 1° C
Temperatura de saída	100 ± 1° C
Sistema de secagem	Co-corrente
Alimentação	Bomba peristáltica
Fluxo de alimentação	3 mL/min
Pressão de ar comprimido	4,0 bar
Atomizador	Tipo bocal pneumático
Diâmetro do atomizador	0,7 mm

4.3 Estudo pré-clínico

4.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos CF1, machos e adultos (20 – 30 g) e ratos Wistar, machos e adultos (200 – 300 g), provenientes da colônia da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Antes dos experimentos, os animais foram adaptados por um período mínimo de 72 horas no biotério de passagem da Faculdade de Farmácia - UFRGS. Os camundongos foram mantidos em caixas plásticas de 17x28x13 cm com no máximo 10 animais por caixa e os ratos foram mantidos em caixas plásticas de 28x42x16 cm em grupos de, no máximo 5 animais por caixa. Os animais foram mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura constante (23 ± 1°C), sob sistema de exaustão e umidade monitorada. Os animais tiveram livre acesso à água e alimento (ração certificada Nuvilab®). Para o ensaio cometa foram utilizados camundongos obtidos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI, Erechim, RS) e mantidos sob as mesmas condições já descritas.

Todos os experimentos foram realizados no período das 12:00 às 16:00 horas e os animais foram adaptados à sala de experimentação por, pelo menos, uma hora antes do início dos testes.

4.3.2 Tratamentos

Os animais receberam os tratamentos pela via oral (gavage) e o volume de administração foi de 1 mL/100g, para camundongos e 1 mL/1000g, para ratos. Todos os grupos experimentais foram constituídos de, no mínimo, 6 animais. Para cada experimento, foi retirada a comida dos animais 6 horas precedentes à administração dos tratamentos.

O PA foi dissolvido em solução salina, em concentrações que variaram de 30 mg/mL a 600 mg/mL, dependendo do experimento. Os fármacos utilizados como controle positivo (diazepam e haloperidol) foram suspensos em solução salina com auxílio de polissorbato 80 (Tween 80®) e aparelho de ultra-som, quando necessário.

4.3.3 Avaliação sobre o Sistema Nervoso Central

4.3.3.1 Teste de potenciação do sono barbitúrico

Camundongos foram tratados com PA nas doses de 300 e 600 mg/kg e, decorridos 60 minutos, receberam uma solução de pentobarbital sódico (Cristália®), 40 mg/kg, i.p. Foram avaliados o tempo de indução (latência) e duração do sono barbitúrico, em minutos, determinados pela perda e retomada do reflexo postural. Foi estabelecido 240 minutos como valor máximo de duração do sono (DE PARIS *et al.*, 2000). Como controle negativo foi utilizada solução salina 1 mL/100 g, e como controle positivo diazepam 2 mg/kg.

4.3.3.2 Avaliação da atividade locomotora espontânea

Camundongos receberam os tratamentos e, após 60 minutos, foram colocados em uma caixa de acrílico transparente (45x30x30 cm), com o fundo preto dividido em 24 quadrantes iguais (Figura 3). Os animais foram observados por 5 minutos, onde foram registrados manualmente o número de cruzamentos entre os

quadrantes (*crossings*), o número de episódios em que os animais levantaram o corpo apoiados apenas pelas patas traseiras (*rearings*) e o número de comportamentos de auto-limpeza (*groomings*). Todo procedimento foi realizado em ambiente de penumbra (NEVES, 2003). Os tratamentos administrados foram: PA, nas doses de 300 e 600 mg/kg e solução salina, 1 mL/100 g como controle negativo.



Figura 3: Avaliação da atividade locomotora espontânea em camundongos.

4.3.3.3 Avaliação da coordenação motora em aparelho de rota-rod

Este experimento foi realizado em dois dias. No primeiro dia, foi realizada apenas adaptação dos animais ao aparelho de rota-rod. Para isso, os camundongos foram posicionados no rota-rod, sob rotação de 5 rpm, por 5 minutos (Figura 4). No segundo dia, após 24 horas dessa adaptação, os animais passaram por um processo de seleção em que foram posicionados no aparelho e observados por 5 minutos (T0). Os parâmetros avaliados foram: o maior tempo de permanência no aparato e o número de quedas. Quando os animais caem do rota-rod, eram recolocados até completarem os 5 minutos (LÓPEZ-RUBALCAVA *et al.*, 2000). Os animais que não obtiveram o maior tempo de permanência de, no mínimo, 90 segundos nesse processo de seleção, foram excluídos do experimento e, aos animais que obtiveram o tempo de permanência superior a 90 segundos, foi administrado o tratamento. Decorridos 60 minutos da administração, os animais foram posicionados novamente no rota-rod (T60) e os mesmos parâmetros foram observados, durante 5 minutos. PA foi administrado nas doses de 300 e 600 mg/kg. Foi utilizado como controle negativo solução salina, 1 mL/100g e, como controle positivo, diazepam 5 mg/kg.

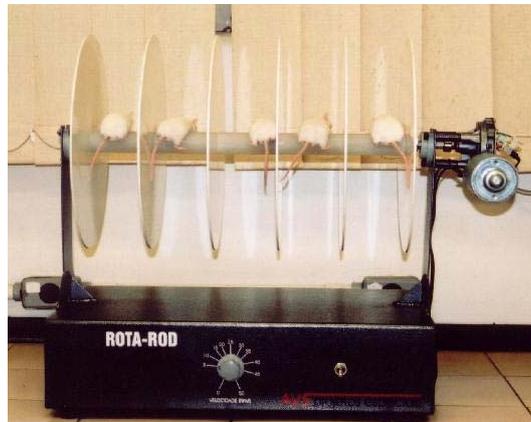


Figura 4: Avaliação da coordenação motora de camundongos em aparelho de rota-rod.

4.3.3.4 Indução de catatonia

Os camundongos receberam os tratamentos e nos intervalos de 30, 60 e 90 minutos após a administração, foram delicadamente posicionados sobre uma barra de madeira elevada 6,5 cm do chão, apoiados apenas pelas patas dianteiras (Figura 5). Foi medido o tempo de permanência dos animais nesta posição incômoda nesses intervalos (CARLINI, 1973). PA foi administrado nas doses de 300 e 600 mg/kg. Foram utilizados como controle negativo solução salina, 1 mL/100g, e como controle positivo haloperidol 4 mg/kg.



Fonte: Carlini, 1973.

Figura 5: Teste de indução de catatonia em camundongos.

4.3.3.5 Avaliação do efeito sobre a temperatura corporal

A temperatura retal (°C) de camundongos foi determinada por um termômetro digital (ProCheck®), inserido delicadamente de 1,5 cm no reto dos animais com auxílio de vaselina líquida (Figura 6). Os animais receberam o tratamento imediatamente após a medida da temperatura basal (T₀) e as medidas posteriores da temperatura foram realizadas 15, 30, 60 e 90 min após a administração dos tratamentos (LAPA *et al.*, 2003). PA foi administrado nas doses de 300 e 600 mg/kg, sendo administrado como controle negativo solução salina, 1 mL/100g.



Figura 6: Teste de aferição da temperatura retal de camundongos.

4.3.3.6 Labirinto em cruz elevado

Para este teste, foram utilizados ratos e camundongos. Os labirintos são construídos de madeira e consistem de dois braços abertos e dois braços fechados. Para o teste com ratos, o aparato tem as seguintes medidas: braços abertos 50x10 cm e braços fechados 50x10x40 cm posicionados a 50 cm do chão. Para o labirinto de camundongos os braços abertos tem 30x10 cm com borda de proteção de 1 cm e os braços fechados com 30x10x15 cm, posicionado a 50 cm do chão (Figura 7).

Em ambos os testes, os animais foram tratados e, 60 minutos depois, foram posicionados no centro do labirinto, voltados para o braço aberto e observados durante 5 minutos por 2 observadores independentes. Foram determinados o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados, o número de *rearings* e o número de comportamentos de avaliação de risco (quando o

animal encontra-se no braço fechado, mas estica o corpo e direciona a cabeça em direção ao braço aberto do labirinto, podendo colocar uma, duas ou até três patas no braço aberto e voltando à posição original) (RODGERS; DALVI, 1997; DE PARIS *et al.*, 2000). 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 (Hui *et al.*, 2002).

PA foi administrado nas doses de 300 e 600 mg/kg, tanto para ratos quanto para camundongos. Como controle negativo foi administrada solução salina, 1 mL/1000g para ratos e 1 mL/100g para camundongos. Como controle positivo, utilizou-se diazepam nas doses de 1 mg/kg para ratos e 2 mg/kg para camundongos.

O experimento com ratos foi realizado também após uma administração diária do tratamento, durante 14 dias. Os tratamentos administrados foram: PA 300 mg/kg, solução salina, 1 mL/1000g (controle negativo) e diazepam 1 mg/kg (controle positivo). No dia do teste, os ratos foram tratados e, após 60 minutos, foi realizado o teste, utilizando-se os mesmos procedimentos já descritos para a administração aguda.



Figura 7: Labirinto em cruz elevado para camundongos.

4.3.3.7 Proteção a convulsões induzidas por pentilenotetrazol

Camundongos foram tratados com os diferentes tratamentos-teste e, após 60 minutos, todos os animais receberam uma injeção de pentilenotetrazol (Sigma®), 80 mg/kg, i.p. Foram avaliados a latência para a primeira convulsão e o comportamento

dos animais foi classificado, em graus, de acordo com LAPA *et al.* (2003): grau 0 – nenhum comportamento convulsivo; grau 1 - abalos mioclônicos, caracterizados por movimentação anormal das orelhas, vibrissas, patas anteriores ou posteriores, contrações arrítmicas e assimétricas; grau 2 - abalos clônicos, mais severos que os mioclônicos, onde o animal apresenta perda do reflexo de endireitamento; grau 3 - abalos tônicos, onde o animal apresenta uma fase de flexão, seguida por uma fase de extensão característica; e grau 4 - abalos tônicos, levando à morte. Os tratamentos-teste administrados foram: PA, nas doses de 300 e 600 mg/kg, solução salina, 1 mL/100g como controle negativo e diazepam 2 mg/kg, como controle positivo.

Para este teste, os camundongos também foram tratados diariamente, por 14 dias, com PA na dose de 300 mg/kg e solução salina, 1 mL/100g, como controle negativo. No dia do experimento, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento descrito para administração aguda.

4.3.4 Ensaios de Toxicidade

4.3.4.1 Toxicidade aguda

Com o objetivo de determinar a dose letal mediana do PA, foram administradas doses compreendidas entre 600 e 4800 mg/kg, a 4 diferentes grupos de 8 camundongos cada. Os animais receberam os tratamentos e foram observados, individualmente, durante 2 horas, sem interrupções. Decorrido esse período, os animais foram observados nos tempos 6 e 12 horas após a administração dos tratamentos e, a cada dia, por um período de 14 dias, na parte da manhã. Foi computada a frequência de mortes e observada a possibilidade de ocorrência de sinais de toxicidade: piloereção, ptose palpebral, contorções abdominais, locomoção, hipotermia (animais amontoados no canto da caixa), tônus muscular, tremores, paralisia do trem posterior, salivação, secreção brônquica, convulsões e outras manifestações (LAPA *et al.*, 2003). Também foi realizado um controle de ganho de massa corporal durante o período de 14 dias. Como controle foi utilizada solução salina, 1 mL/100g.

4.3.4.2 Toxicidade de doses repetidas

Ratos foram tratados diariamente com PA (300 mg/kg), solução salina (SAL, 1 mL/kg) e diazepam (DZP, 1 mg/kg), durante o período de 14 dias. No 15º dia, os animais foram sacrificados para retirada de amostras de sangue e urina e dos seguintes órgãos: coração, fígado, rins e pulmões. As amostras de sangue e urina foram enviadas para o Laboratório de Análise Clínicas Veterinárias da Faculdade de Veterinária (FAVET) da UFRGS, para a realização de exames hematológicos e bioquímicos. Os órgãos foram enviados ao Laboratório de Patologia da FAVET-UFRGS, para a realização de exames histopatológicos. Estes exames foram realizados seguindo as normas determinadas pela Portaria n.º 116, SVS/MS, de 08/08/1996, para registro de medicamentos fitoterápicos.

4.3.4.3 Genotoxicidade: ensaio cometa alcalino

Camundongos foram tratados com PA (150 mg/kg, 300 mg/kg e 600 mg/kg), solução salina (SAL, 1 mL/100g) como controle negativo e metilmetanosulfonato (MMS, 40 mg/kg) como controle positivo. Os animais foram sacrificados por decapitação 3 horas após o tratamento para coleta de amostras do cérebro, fígado e sangue periférico de cada animal (TICE *et al.*, 2000).

Cada parte do cérebro e fígado foi colocada em 0,5 mL solução salina tamponada (PBS – *phosphate buffer saline*) gelada e triturada em pequenos pedaços a fim de se obter uma suspensão de células. Uma alíquota das células de cérebro, fígado e sangue periférico (5-10 µL) foi adicionada a 95 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP 0,75% *low point melting*) e a mistura (células/agarose) foi espalhada em lâminas de microscópio pré-cobertas com agarose 1,5%. Após solidificação, as lâminas foram colocadas em solução de lise gelada (2.5M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10.0, com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) por, no mínimo, 1 hora e, no máximo, 2 semanas a 4 °C. Para a eletroforese, as lâminas foram colocadas em cuba horizontal, cobertas com solução tampão (300mM NaOH e 1 mM EDTA, pH ~ 13) por 20 minutos. A eletroforese foi realizada em condições alcalinas (pH>13) a 25V e uma corrente de 300 mA por 15 minutos. As lâminas foram então neutralizadas (0.4 M Tris, pH 7,5), coradas com solução de Prata (0,1%

nitrato de amônia; 0,1% nitrato de prata; 0,25% ácido tungstosilícico; 0,15% formaldeído e 500 ml água destilada) e analisadas em microscópio óptico.

As imagens de 100 células selecionadas randomicamente (50 células de cada lâmina da duplicata) foram analisadas. As células foram classificadas visualmente, de acordo com o tamanho da cauda, em 5 classes, variando de (0) - sem dano a (4) - máximo de dano. Dessa forma, o índice de dano (ID) varia de 0 (completamente sem dano, 100 células x 0) à 400 (máximo de dano: 100 células x 4). A frequência de dano (%) foi calculada baseada no número de células com cauda versus número de células sem cauda (BOEIRA *et al.*, 2001; COLLINS *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2000).

4.3.5 Análise Estatística

Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o *software* Sigma Stat versão 2.03 (Jandel Scientific Corporation ®). O nível mínimo de significância aceito foi de $p < 0,05$. O teste utilizado em cada ensaio será especificado no item resultados.

4.3.6 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). Com exceção dos testes de toxicidade, imediatamente após a finalização dos experimentos, realizou-se o sacrifício dos ratos em câmara de CO₂ e dos camundongos pelo método de 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 2005453, aprovado na reunião 43/2005, ata nº 64, de 24/11/2005 – Anexo 1) e pelo Comitê de Ética da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI (055-1/PIA/05).

4.4 Planejamento do estudo clínico para avaliação de PA sobre a qualidade de sono em voluntários sadios

O estudo clínico seria realizado no Laboratório do Sono do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), sob orientação do Prof. Dr. Flávio Kapczinski e colaboração da Dr. Suzana Veiga Schonwald do Serviço de Neurologia do HCPA.

O planejamento do estudo clínico para a avaliação de PA sobre a qualidade de sono foi realizado em paralelo ao estudo pré-clínico e está descrito com mais detalhes posteriormente (Anexos 2, 3, 4 e 5). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (processo nº 05304, Anexo 6).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização do extrato

O rendimento do extrato seco nebulizado de *P. alata* (PA) foi de aproximadamente 10% em relação ao pó das folhas secas. O teor de flavonóides totais, determinado através da técnica de complexação com cloreto de alumínio, foi de $2,6 \pm 0,05\%$. Não foi detectada a presença de alcalóides em PA, quando empregado o teste de Mayer.

5.2 Ensaio pré-clínicos

5.2.1 Avaliação sobre o Sistema Nervoso Central

5.2.1.1 Teste de potenciação do sono barbitúrico

Os animais tratados com PA na dose de 300 mg/kg reduziram significativamente a latência (Figura 8) e apresentaram um aumento significativo na duração do sono (Figura 9) induzido por pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). Quando a dose foi aumentada para 600 mg/kg, esses efeitos não foram observados.

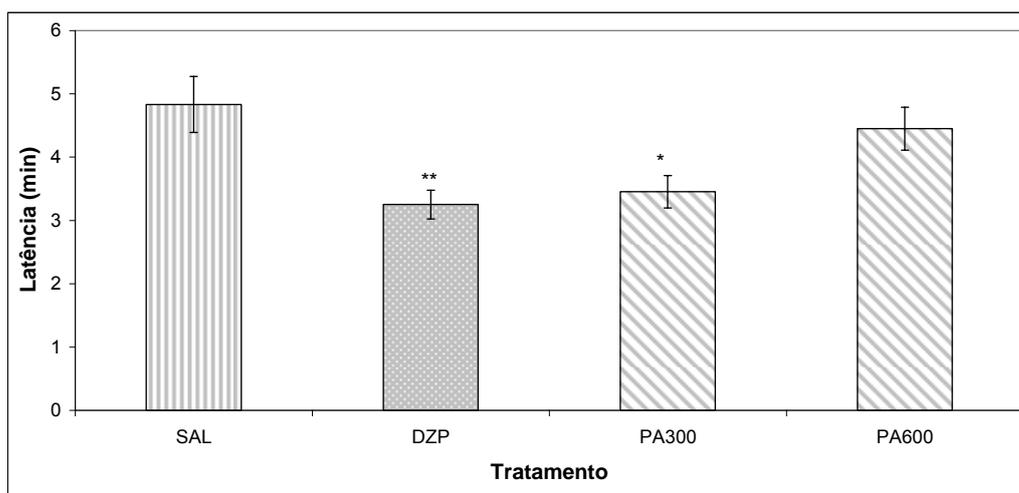


Figura 8: Efeito de PA na latência para o sono induzido por pentobarbital, 40 mg/kg, i.p.. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100g v.o., n=9), DZP (diazepam 2 mg/kg v.o., n=12), PA300 (PA 300 mg/kg v.o., n=11) e PA600 (PA 600 mg/kg v.o., n=10). Resultados expressos em média \pm erro padrão. **diferença significativa em relação ao grupo SAL (ANOVA, $F_{(3,41)}=5,996$, $p<0,01$); *diferença significativa em relação ao grupo SAL (ANOVA, $F_{(3,41)}=5,996$, $p<0,05$).

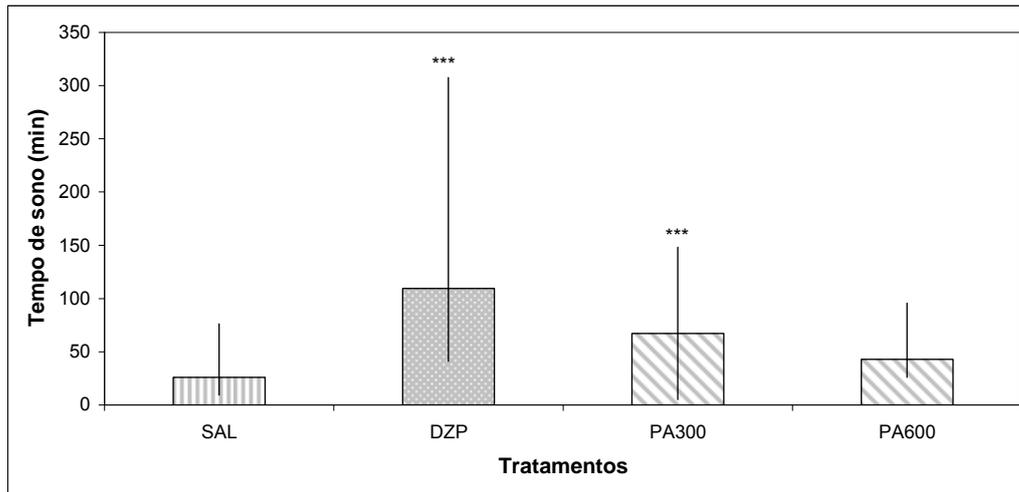


Figura 9: Efeito de PA na duração do sono induzido por pentobarbital (40 mg/kg i.p.). Tratamentos: SAL (solução salina, 1mL/100g v.o., n=9), DZP (diazepam 2mg/kg v.o., n=12), PA300 (PA 300 mg/kg v.o., n=11) e PA600 (PA 600 mg/kg v.o., n=10). Resultados expressos em mediana e intervalos interquartis ***diferença significativa em relação ao grupo SAL (Kruskal-Wallis, $H_{(3,40)}=21,499$, $p<0,001$).

5.2.1.2 Avaliação da atividade locomotora espontânea

Em ambas as doses de PA testadas, não houve alteração nos parâmetros de atividade locomotora espontânea observados (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito de PA na atividade locomotora espontânea. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100g, v.o.), PA300 (PA 300 mg/kg, v.o.) e PA600 (PA 600 mg/kg, v.o.). Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

Tratamentos	Crossings	Rearings	Groomings
SAL (n=13)	134 \pm 39	33 \pm 10	2,8 \pm 2,3
PA300 (n=9)	152 \pm 41	27 \pm 10	2,7 \pm 1,6
PA600 (n=8)	156 \pm 38	32 \pm 14	3,0 \pm 2,7

ANOVA uma via, $p>0,05$.

5.2.1.3 Avaliação da coordenação motora em aparelho de rota-rod

A administração de PA, tanto na dose de 300 mg/kg como na dose de 600 mg/kg, não alterou os parâmetros observados na avaliação da coordenação motora

em aparelho de rota-rod (maior tempo de permanência e número de quedas) dentro do período de 5 min de observação (Figuras 10 e 11).

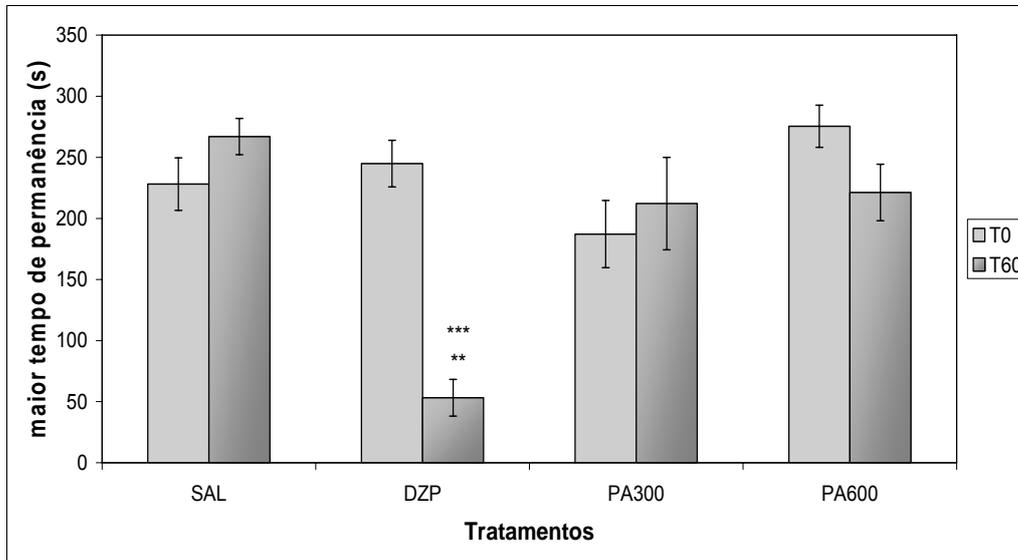


Figura 10: Efeito de PA no teste de avaliação da coordenação motora em aparelho de rota-rod. Parâmetro: maior tempo de permanência. Tratamentos: SAL (solução salina, 1mL/100g v.o., n=11), DZP (diazepam 5 mg/kg v.o., n=10), PA300 (PA 300 mg/kg v.o., n=8) e PA600 (PA 600 mg/kg v.o., n=9). Resultados expressos em média \pm erro padrão (***)diferença significativa em relação ao grupo SAL no T60; **diferença significativa em relação a T0 no grupo DZP. ANOVA de duas vias com medidas repetidas: fator tratamento $F_{(3,75)}=11,044$ $p<0,001$; fator tempo $F_{(1,75)}=7,589$ $p=0,009$; interação tempo x tratamento $F_{(3,75)}=10,842$ $p<0,001$.

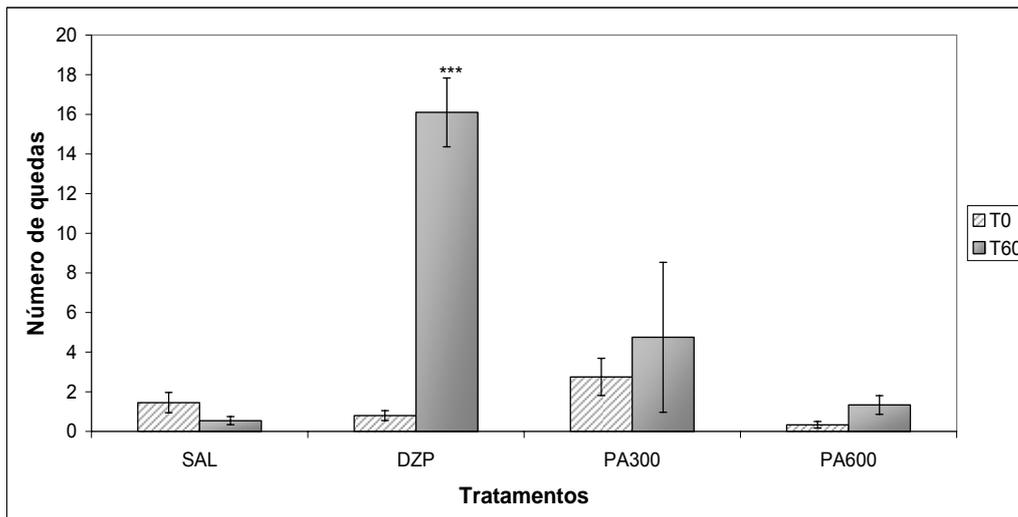


Figura 11: Efeito de PA no teste de avaliação da coordenação motora em aparelho de rota-rod. Parâmetro: número de quedas. Tratamentos: SAL (solução salina, 1mL/100g v.o., n=11), DZP (diazepam 5mg/kg v.o., n=10), PA300 (PA 300 mg/kg v.o., n=8) e PA600 (PA 600 mg/kg v.o., n=9). Resultados expressos em média \pm erro padrão (***)diferença significativa em relação ao grupo SAL no T60 e entre o T0 do mesmo grupo. ANOVA de duas vias com medidas repetidas: fator tratamento $F_{(3,75)}=17,065$ $p<0,001$; fator tempo $F_{(1,75)}=17,851$ $p<0,001$; interação tempo x tratamento $F_{(3,75)}=13,847$ $p<0,001$.

5.2.1.4 Indução de catatonía

O resultado deste teste está apresentado na figura 12. A administração de PA, nas doses de 300 e 600 mg/kg, não alterou o tempo de permanência dos animais na barra, nos intervalos de tempo observados após a administração do tratamento.

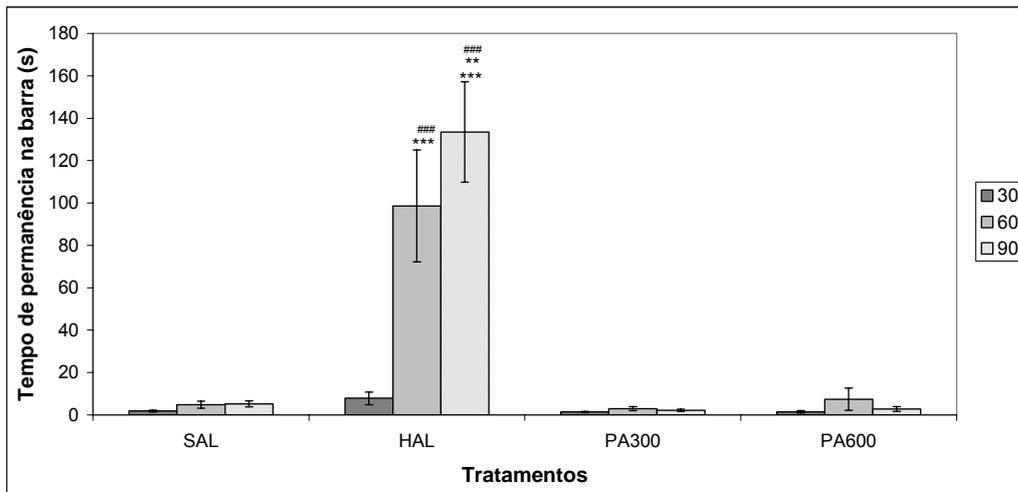


Figura 12: Efeito de PA no teste de indução de catatonía. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100g v.o., n=10), HAL (haloperidol 4 mg/kg v.o., n=9), PA300 (PA 300 mg/kg v.o., n=10) e PA600 (PA 600 mg/kg v.o., n=8). Resultados expressos em média \pm erro padrão (**diferença significativa em relação a T30 no grupo HAL; **diferença significativa em relação a T60 no grupo HAL; ###diferença significativa em relação ao grupo SAL no tempo T60 e T90. ANOVA de duas vias com medidas repetidas: fator tratamento $F_{(3,110)}=28,422$ $p<0,001$; fator tempo $F_{(2,110)}=15,245$ $p<0,001$; interação tempo x tratamento $F_{(6,110)}=12,990$ $p<0,001$).

5.2.1.5 Avaliação do efeito sobre a temperatura corporal

Os animais apresentaram efeito hipotérmico em ambas as doses de PA testadas (300 e 600 mg/kg), já no intervalo de 15 minutos até o intervalo de 90 minutos após a administração dos tratamentos, em relação à temperatura basal dos animais. Quando os grupos foram comparados ao controle, somente a dose de 600 mg/kg apresentou diferenças significativas, nos intervalos de 30 e 60 minutos após a administração de PA (Figura 13).

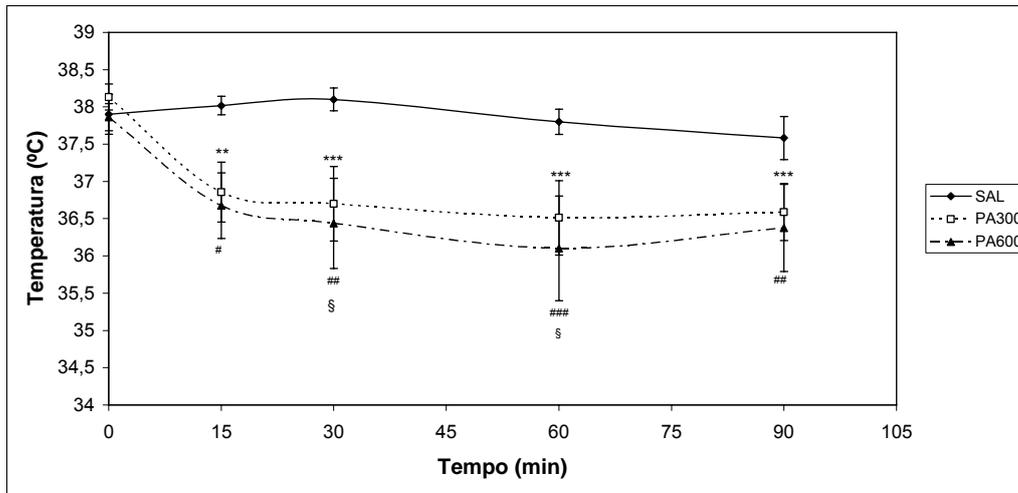


Figura 13: Efeito de PA sobre a temperatura retal de camundongos. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100g v.o., n=6), PA300 (PA 300 mg/kg v.o., n=9) e PA600 (PA 600 mg/kg v.o., n=8). Resultados expressos em média \pm erro padrão (**diferença significativa em relação a T0 no grupo PA300; **diferença significativa em relação a T0 no grupo PA300; #### diferença significativa em relação a T0 no grupo PA600; ### diferença significativa em relação a T0 no grupo PA600; # diferença significativa em relação a T0 no grupo PA600; § diferença significativa em relação ao grupo SAL no tempo T30 e T60 para PA600. ANOVA de duas vias com medidas repetidas: fator tratamento $F_{(2,114)}=2,538$, $p=0,104$; fator tempo $F_{(4,114)}=8,468$, $p<0,001$; interação tempo x tratamento $F_{(8,114)}=1,740$ $p=0,102$).

5.2.1.6 Labirinto em cruz elevado

a) Em camundongos

Quando avaliadas as porcentagens de entradas e de tempo gasto nos braços abertos e fechados (Tabela 3), PA não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, em nenhuma das doses testadas (300, 600 e 900 mg/kg).

Em valores absolutos, a dose de 600 mg/kg causou um aumento significativo no número de entradas nos braços fechados. Nos outros parâmetros observados, PA não mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle (Tabela 4).

Tabela 3: Efeito da administração aguda de PA (em valores percentuais) no labirinto em cruz elevado, em camundongos. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100g, v.o.), DZP (diazepam, 2 mg/kg, v.o.), PA300 (PA 300 mg/kg, v.o.), PA600 (PA 600 mg/kg, v.o.) e PA900 (PA 900 mg/kg, v.o.). Resultados expressos em mediana e intervalo interquartis.

Tratamentos	Porcentagem de tempo de permanência		Porcentagem de entradas	
	Braços Abertos	Braços Fechados	Braços Abertos	Braços Fechados
SAL (n=12)	22,2 (13,8 – 31,7)	77,8 (68,3 – 86,2)	30,3 (26,1 – 34,8)	69,7 (65,2 – 73,9)
DZP (n=12)	47,2 (41,6 – 57,9)*	52,8 (42,1 – 58,4) [#]	47,1 (38,0 – 50,8)	52,9 (49,2 – 62,0)
PA300 (n=12)	14,0 (8,5 – 49,5)	86,0 (50,5 – 91,5)	22,0 (15,0 – 44,0)	78,0 (56,0 – 85,0)
PA600 (n=14)	33,5 (12,0 – 49,0)	72,0 (51,0 – 86,0)	25,0 (12,0 – 33,0)	75,0 (67,0 – 88,0)
PA900 (n=6)	26,0 (16,0 – 57,0)	74,0 (43,0 – 84,0)	31,0 (25,0 – 50,0)	69,0 (50,0 – 75,0)

*Diferença significativa em relação ao grupo SAL. Kruskal-Wallis, $H_{(4,55)}=10,559$ $p=0,032$; [#]diferença significativa em relação ao grupo SAL. Kruskal-Wallis, $H_{(4,55)}=10,924$ $p=0,027$.

Tabela 4: Efeito da administração aguda de PA (em valores absolutos) no labirinto em cruz elevado, em camundongos. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100g, v.o.), DZP (diazepam, 2 mg/kg, v.o.), PA300 (PA 300 mg/kg, v.o.), PA600 (PA 600 mg/kg, v.o.) e PA900 (PA 900 mg/kg, v.o.). Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

Tratamento	Tempo de permanência (s)		Número de Entradas			Rearings	Avaliação de Risco
	Braços Abertos	Braços Fechados	Braços Abertos	Braços Fechados	TOTAL		
SAL (n=12)	34,8 \pm 13,1	118,8 \pm 43,4	4,1 \pm 1,9	9,3 \pm 3,3	13,4 \pm 4,1	3,0 \pm 3,4	17,9 \pm 8,3
DZP (n=12)	84,8 \pm 19,4 ^{***}	90,5 \pm 26,1	10,7 \pm 3,8 ^{####}	12,0 \pm 3,0	22,7 \pm 5,8 ^{§§§}	2,7 \pm 2,6	16,6 \pm 4,6
PA300 (n=12)	35,2 \pm 31,2	105,4 \pm 47,0	3,7 \pm 2,3	10,1 \pm 4,7	13,8 \pm 4,9	2,9 \pm 3,3	16,2 \pm 4,5
PA600 (n=14)	45,8 \pm 29,8	114,5 \pm 39,3	4,6 \pm 2,7	14,5 \pm 4,3 ^{##}	19,1 \pm 4,8	4,6 \pm 4,1	16,5 \pm 6,7
PA900 (n=6)	47,0 \pm 43,0	111,2 \pm 59,2	4,7 \pm 4,3	8,0 \pm 3,6	12,7 \pm 6,9	3,3 \pm 2,0	15,0 \pm 7,8

^{***}Diferença significativa em relação ao grupo SAL (ANOVA, $F_{(4,55)}=6,873$ $p<0,001$); ^{##}diferença significativa em relação ao grupo SAL (ANOVA, $F_{(4,55)}= 4,639$, $p=0,007$); ^{####}diferença significativa em relação ao grupo SAL (ANOVA, $F_{(4,55)}=11,323$ $p<0,001$); ^{§§§}diferença significativa em relação ao grupo SAL (ANOVA, $F_{(4,55)}=7,964$ $p<0,001$).

b) Em ratos

Administração aguda

Os valores percentuais de tempo e entradas nos braços abertos e fechados estão sumarizados na tabela 5. PA (300 e 600 mg/kg) não mostrou diferenças significativas em relação ao grupo controle nesses parâmetros.

Na avaliação dos parâmetros em valores absolutos, pode-se observar que PA 300 mg/kg apresenta uma tendência em diminuir o tempo de permanência dos animais no braço aberto e aumenta significativamente o tempo gasto no braço fechado (Tabela 6). Nesta dose, PA reduziu significativamente o número total de entradas nos braços do labirinto. Pode-se observar também que PA 600 mg/kg diminuiu significativamente o número de comportamentos de avaliação de risco.

Tabela 5: Efeito da administração aguda de PA (em valores percentuais) no labirinto em cruz elevado, em ratos. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/1000g, v.o.), DZP (diazepam, 1 mg/kg, v.o.), PA300 (PA 300 mg/kg, v.o.) e PA600 (PA 600 mg/kg, v.o.). Resultados expressos em mediana e intervalo interquartis.

Tratamentos	Porcentagem de tempo de permanência		Porcentagem de entradas	
	Braços Abertos	Braços Fechados	Braços Abertos	Braços Fechados
SAL (n=13)	16,0 (11,5 – 23,5)	84,0 (76,5 – 88,5)	27,0 (23,2 – 31,5)	73,0 (68,5 – 83,8)
DZP (n=12)	44,5 (38,5 – 49,0)***	55,5 (51,0 – 61,5)***	50,0 (48,5 – 53,0)###	50,0 (47,0 – 51,5)§§§
PA300 (n=10)	5,0 (2,0 – 13,0)	95,0 (87,0 – 98,0)	24,5 (11,0 – 36,0)	75,5 (64,0 – 89,0)
PA600 (n=12)	27,0 (15,5 – 36,5)	73,0 (63,5 – 84,5)	39,5 (36,0 – 48,5)	60,5 (51,5 – 64,0)

***Diferença significativa em relação ao grupo SAL. Kruskal-Wallis, $H_{(3,46)} = 27,522$, $p < 0,001$;

###diferença significativa em relação ao grupo SAL. Kruskal-Wallis, $H_{(3,46)} = 23,891$, $p < 0,001$;

§§§diferença significativa em relação ao grupo SAL. Kruskal-Wallis, $H_{(3,46)} = 24,429$, $p < 0,001$.

Tabela 6: Efeito da administração aguda de PA (em valores absolutos) no labirinto em cruz elevado, em ratos. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/1000g, v.o.), DZP (diazepam, 1 mg/kg, v.o.), PA300 (PA 300 mg/kg, v.o.) e PA600 (PA 600 mg/kg, v.o.). Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

Tratamento	Tempo de permanência (s)		Número de Entradas			Rearings	Avaliação de Risco
	Braços Abertos	Braços Fechados	Braços Abertos	Braços Fechados	TOTAL		
SAL (n=13)	37,3 \pm 23,1	172,3 \pm 26,4	3,2 \pm 1,8	9,1 \pm 3,1	12,2 \pm 3,9	13,2 \pm 3,5	10,7 \pm 6,1
DZP (n=12)	94,0 \pm 17,2***	121,2 \pm 23,9**	8,4 \pm 1,4####	8,4 \pm 1,8	16,8 \pm 2,2###	12,9 \pm 3,5	3,7 \pm 1,9 ^{§§§}
PA300 (n=10)	17,4 \pm 16,7	209,4 \pm 38,7*	1,9 \pm 1,6	6,3 \pm 2,9	8,2 \pm 3,7 [#]	10,4 \pm 3,5	9,0 \pm 5,3
PA600 (n=12)	54,4 \pm 30,3	170,2 \pm 54,1	4,5 \pm 2,2	6,3 \pm 2,7	10,8 \pm 4,4	13,0 \pm 4,0	4,3 \pm 2,4 ^{§§}

***Diferença significativa em relação ao grupo SAL. ANOVA, $F_{(3,46)} = 23,145$, $p < 0,001$; **diferença significativa em relação ao grupo SAL. ANOVA, $F_{(3,46)} = 10,347$, $p = 0,004$; *diferença significativa em relação ao grupo SAL. ANOVA, $F_{(3,46)} = 10,347$, $p = 0,023$; ####diferença significativa em relação ao grupo SAL. ANOVA, $F_{(3,46)} = 28,456$, $p < 0,001$; ###diferença significativa em relação ao grupo SAL. ANOVA, $F_{(3,46)} = 10,926$, $p = 0,003$; #diferença significativa em relação ao grupo SAL. ANOVA, $F_{(3,46)} = 10,926$, $p = 0,032$; §§§diferença significativa em relação ao grupo SAL. ANOVA, $F_{(3,46)} = 7,783$, $p < 0,001$; §§diferença significativa em relação ao grupo SAL. ANOVA, $F_{(3,46)} = 7,783$, $p = 0,002$.

Administração de doses repetidas

Os animais tratados repetidamente com PA 300 mg/kg e avaliados no labirinto em cruz elevado apresentaram uma diferença significativa tanto na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos quanto nos braços fechados, em relação ao grupo controle. Ainda que não tenha havido diferença estatisticamente significativa para a porcentagem de entradas nos braços abertos e fechados, PA diminui essa porcentagem para os braços abertos e aumenta para os braços fechado (Tabela 7).

Da mesma forma, os valores absolutos de tempo de permanência nos braços abertos e fechados também mostraram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Nos outros parâmetros do teste do labirinto em cruz elevado avaliados, PA não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo SAL (Tabela 8).

Em relação a esse experimento, também se pode observar que o grupo tratado com diazepam na dose de 2 mg/kg não apresentou efeito ansiolítico, divergindo dos resultados observados com o tratamento agudo.

Tabela 7: Efeito da administração de doses repetidas de PA (em valores percentuais) no labirinto em cruz elevado, em ratos. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/1000g, v.o.) e PA300 (PA 300 mg/kg, v.o.). Resultados expressos em mediana e intervalo interquartis.

Tratamentos	Porcentagem de tempo de permanência		Porcentagem de entradas	
	Braços Abertos	Braços Fechados	Braços Abertos	Braços Fechados
SAL (n=8)	50,5 (28,5 – 77,0)	49,5 (23,0 – 71,5)	52,5 (35,5 – 62,0)	42,5 (37,5 – 60,0)
DZP (n=8)	37,5 (12,5 – 44,0)	62,5 (56,0 – 87,5)	40,0 (36,5 – 50,0)	60,0 (50,0 – 63,5)
PA300 (n=9)	12,0 (3,0 – 26,0)*	88,0 (74,0 – 97,0)*	38,0 (22,5 – 43,5)	62,0 (56,5 – 77,8)

*Diferença significativa em relação ao grupo SAL. Kruskal-Wallis, $H_{(2,24)} = 7,583$, $p=0,023$.

Tabela 8: Efeito da administração de doses repetidas de PA (em valores absolutos) no labirinto em cruz elevado, em ratos. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/1000g, v.o.) e PA300 (PA 300 mg/kg, v.o.). Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

Tratamento	Tempo de permanência (s)		Número de Entradas			Rearings	Avaliação de Risco
	Braços Abertos	Braços Fechados	Braços Abertos	Braços Fechados	TOTAL		
SAL (n=8)	121,8 \pm 72,4	103,9 \pm 52,3	5,8 \pm 2,6	6,0 \pm 2,2	11,8 \pm 2,4	13,9 \pm 3,6	4,9 \pm 1,4
DZP (n=8)	77,1 \pm 50,5	167,8 \pm 62,1	3,5 \pm 2,3	4,5 \pm 2,3	8,0 \pm 4,1	11,4 \pm 2,7	3,6 \pm 2,7
PA300 (n=9)	40,6 \pm 39,6*	210,7 \pm 21,8**	3,7 \pm 2,6	6,2 \pm 1,8	9,9 \pm 3,8	12,3 \pm 5,5	3,9 \pm 0,9

*Diferença significativa em relação ao grupo SAL. ANOVA, $F_{(2,24)} = 4,579$, $p=0,017$; **diferença significativa em relação ao grupo SAL. ANOVA, $F_{(2,24)} = 7,065$, $p=0,003$.

5.2.1.7 Proteção a convulsões induzidas por pentilenotetrazol

Os animais tratados agudamente com PA não mostraram diferenças significativas em relação ao grupo controle na latência para a primeira convulsão. Da mesma forma, quando as convulsões foram classificadas em graus (grau 0 – nenhum comportamento convulsivo; grau 1 - abalos mioclônicos; grau 2 - abalos

clônicos; grau 3 - abalos tônicos; e grau 4 - abalos tônicos, levando à morte), o grupo PA não apresentou diferenças significativas em relação ao controle. O grupo tratado com diazepam (2 mg/kg, v.o.) não mostrou nenhum comportamento convulsivo (Tabela 9).

Após administração durante o período de 14 dias, os animais tratados com PA 300 mg/kg não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle, nos parâmetros avaliados. Quando estes animais foram comparados aos animais tratados agudamente, também não foram observadas diferenças significativas nesses parâmetros (Tabela 9).

Tabela 9: Efeito de PA no teste de proteção a convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.), após administração aguda e administração de doses repetidas. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/100g, v.o.), DZP (diazepam, 2 mg/kg, v.o.), PA300 (PA 300 mg/kg, v.o.) e PA600 (PA 600 mg/kg, v.o.). Resultados expressos em mediana e intervalo interquartis.

APÓS ADMINISTRAÇÃO AGUDA		
Tratamentos	Latência (s)	Graus
SAL (n=12)	57,5 (55,5 - 83,5)	2,0 (2,0 – 3,0)
DZP (n=11)	-	0,0 (0,0 – 0,0)***
PA300 (n=10)	64 (58,0 – 77,0)	2,0 (2,0 – 2,0)
PA600 (n=10)	75,5 (62,0 – 91,0)	2,0 (2,0 – 2,0)

APÓS ADMINISTRAÇÃO REPETIDA		
Tratamentos	Latência (s)	Graus
SAL (n=10)	68,0 (61,0 – 73,0)	2,0 (2,0 – 3,0)
PA300 (n=10)	69,5 (56,0 – 87,0)	2,0 (2,0 – 3,0)

***Diferença significativa em relação ao grupo SAL. Kruskal-Wallis, $H_{(3,43)} = 33,820$, $p < 0,001$.

5.2.2 Ensaio de Toxicidade

5.2.2.1 Toxicidade aguda

A administração aguda de PA, em camundongos, não provocou mortes nas primeiras 24 horas de observação após a administração dos tratamentos, até a dose de 4800 mg/kg v.o. Conseqüentemente, não foi possível determinar a DL₅₀. Não foram observados sinais importantes de toxicidade no período de 14 dias após a administração dos tratamentos.

No desenvolvimento ponderal, somente os animais tratados com PA na dose de 600 mg/kg apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle no 7º dia de observação. No 15º dia, essa diferença não foi observada. Os animais tratados com PA nas doses de 1200, 2400 e 4800 mg/kg não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle. Todos os grupos apresentaram diferença significativa quando realizada comparação intragrupos do 7º dia em relação ao dia zero e 15º dia em relação ao dia zero e ao 7º dia (Figura 14).

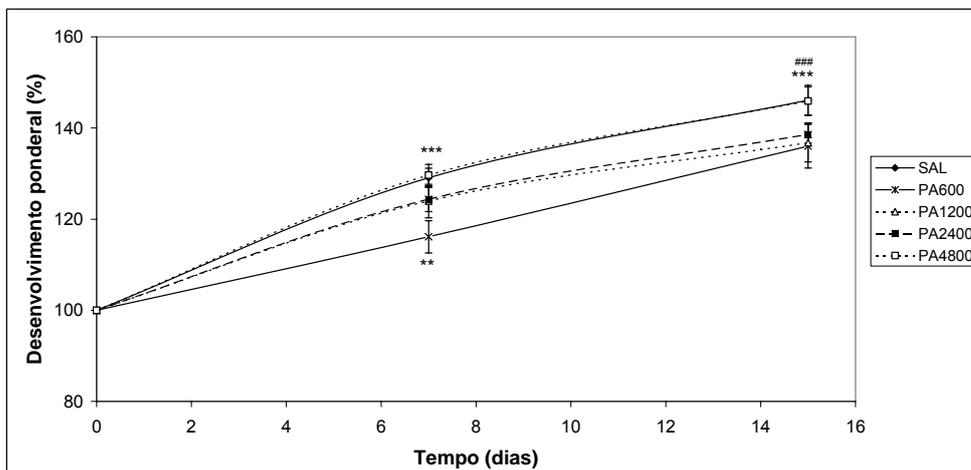


Figura 14: Efeito de PA sobre o desenvolvimento ponderal de camundongos após a administração aguda. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/1000g, v.o., n=08), PA600 (PA 600 mg/kg, v.o., n=08), PA1200 (PA 1200 mg/kg, v.o., n=08), PA2400 (PA 2400 mg/kg, v.o., n=08) e PA4800 (PA 4800 mg/kg, v.o., n=07). Resultados expressos em média \pm erro padrão. (***) diferença significativa em relação ao dia zero; (###) diferença significativa em relação ao sétimo dia; (**) diferença significativa em relação ao grupo SAL. ANOVA de duas vias com medidas repetidas: fator tratamento $F_{(4,117)} = 2,494$; $p = 0,060$; fator tempo $F_{(2,117)} = 460,315$; $p < 0,001$, interação tempo x tratamento $F_{(8,117)} = 2,245$; $p = 0,034$.

5.2.2.2 Toxicidade de doses repetidas

Quando PA foi administrado durante o período de 14 dias, também não foram observados sinais de toxicidade. Em relação aos parâmetros urinários, hematológicos, bioquímicos (Tabelas 10, 11 e 12) e histopatológicos (Anexo 7), o grupo tratado com PA não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle. Por outro lado, ratos tratados com PA não apresentaram ganho de peso durante os 14 dias de administração, efeito observado também para os animais tratados com diazepam. Somente os animais tratados com SAL apresentaram diferenças significativas em relação ao dia zero (Figura 15).

Tabela 10: Parâmetros hematológicos avaliados em ratos após administração de doses repetidas de PA300 (300 mg/kg, v.o., n=08). Grupo controle: SAL (solução salina, 1 mL/1000g, v.o., n=07). Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

	SAL	PA300
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,0 \pm 0,2	8,2 \pm 0,4
Hematócrito (%)	50,9 \pm 1,4	49,6 \pm 2,7
Hemoglobina (g/dL)	16,7 \pm 0,6	16,8 \pm 1,3
VCM (fL)	62,7 \pm 1,1	60,5 \pm 2,3
CHCM (%)	33,3 \pm 0,9	33,9 \pm 1,7
Proteínas plasmáticas totais (g/L)	55,7 \pm 1,4	57,0 \pm 2,4
Leucócitos ($/\mu\text{L}$)	4642,9 \pm 2145,4	5537,5 \pm 1143,6
Neutrófilos segmentados ($/\mu\text{L}$)	1019,0 \pm 472,4	1129,9 \pm 335,5
Eosinófilos ($/\mu\text{L}$)	6,0 \pm 15,9	21,5 \pm 30,5
Linfócitos ($/\mu\text{L}$)	3431,6 \pm 1705,0	4306,4 \pm 1002,4
Monócitos ($/\mu\text{L}$)	186,3 \pm 165,0	79,8 \pm 52,2

Teste t, $p > 0,05$.

Tabela 11: Parâmetros bioquímicos séricos avaliados em ratos após administração de doses repetidas de PA300 (300 mg/kg, v.o., n=08). Grupo controle: SAL (solução salina, 1 mL/1000g, v.o., n=07). Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

	SAL	PA300
AST (U/L)	196,9 \pm 63,1	145,9 \pm 36,9
ALT (U/L)	57,1 \pm 39,9	61,1 \pm 39,4
Fosfatase alcalina (U/L)	207,1 \pm 70,3	172,0 \pm 31,8
Creatinina (mg/dL)	1,1 \pm 0,4	0,9 \pm 0,2
Colesterol (mg/dL)	65,7 \pm 16,8	52,3 \pm 9,9
Triglicerídeos (mg/dL)	98,3 \pm 33,0	90,5 \pm 18,6
Glicose (mg/dL)	361,8 \pm 117,3	465,3 \pm 87,2
Proteínas totais (g/dL)	7,8 \pm 1,2	7,4 \pm 1,0

Teste t, $p > 0,05$.

Tabela 12: Parâmetros urinários avaliados em ratos após administração de doses repetidas de PA300 (300 mg/kg, v.o., n=05). Grupo controle: SAL (solução salina, 1 mL/1000g, v.o., n=07). Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

	SAL	PA300
Densidade	1.046 \pm 0.0122	1.053 \pm 0.0096
pH	6.4 \pm 0.6	7.0 \pm 0.9
Cetona (mg/dL)	12.1 \pm 4.9	15.0 \pm 0.0
Urobilinogênio (U/dL)	0.2 \pm 0.0	0.4 \pm 0.4

Teste t, $p > 0,05$.

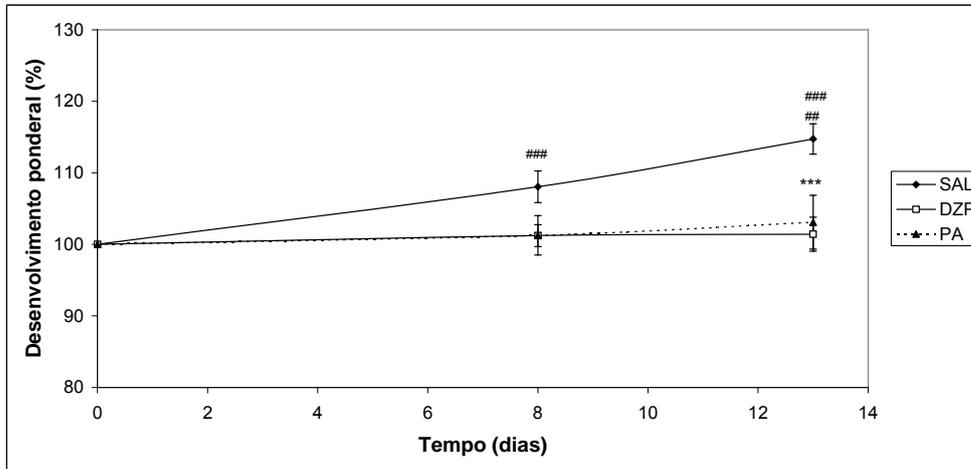


Figura 15: Efeito de PA sobre desenvolvimento ponderal de ratos durante a administração de doses repetidas. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 mL/1000g, v.o., n=08), PA300 (PA 300 mg/kg, v.o., n=08) e DZP (diazepam 2 mg/kg, v.o., n=08). Resultados expressos em média \pm erro padrão. (***) diferença significativa em relação ao grupo SAL; ### diferença significativa em relação ao dia zero; ## diferença significativa em relação ao dia 8. ANOVA de duas vias com medidas repetidas: fator tratamento $F_{(2,71)}=2,178$; $p=0,138$; fator tempo $F_{(2,71)}=12,735$; $p<0,001$, interação tempo x tratamento $F_{(4,71)}=5,515$; $p=0,001$.

5.2.2.3 Genotoxicidade

A administração aguda de PA (150, 300 e 600 mg/kg) causou um aumento significativo no índice de dano (ID) e frequência de dano (%) em células de cérebro, fígado e sangue periférico de camundongos, quando avaliado pelo ensaio cometa. Todas as doses de PA provocaram mais do que 85% de cometas (Tabela 14). A figura 16 mostra a extensão dos danos de DNA. Os danos da classe 4 observados ocorreram em mais de 10% das células de cérebro e fígado, com todas as doses testadas.

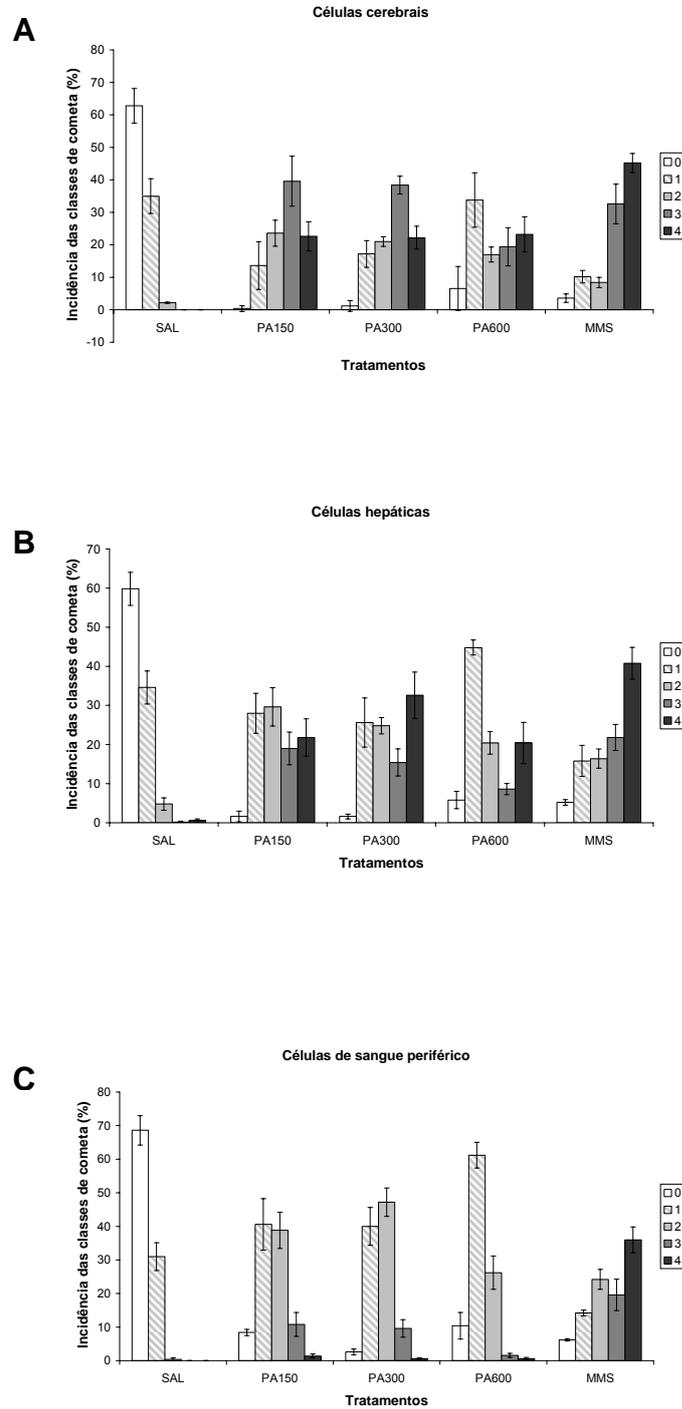


Figura 16: Distribuição das classes de danos de DNA (0 – sem dano to 4 – dano máximo) no ensaio cometa para células de cérebro, fígado e sangue periférico. Tratamentos: SAL (solução salina, 1 ml/1000g, n=05), PA150 (150 mg/kg v.o., n=05), PA300 (300 mg/kg v.o., n=05), PA600 (600 mg/kg v.o., n=05) e MMS (metilmetanosulfonato, 40 mg/kg, n=05). Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Tabela 13: Ensaio cometa em células de cérebro, fígado e sangue periférico de camundongos tratados agudamente com PA (150 mg/kg v.o., n=05), PA300 (300 mg/kg v.o., n=05), PA600 (600 mg/kg v.o., n=05) e sacrificados 3 horas após a administração. Grupos-controle: SAL (solução salina, 1 ml/100g v.o., n=05) e MMS (controle positivo, metilmetanosulfonato 40 mg/kg v.o., n=05). Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

	Tratamento	Índice de dano (ID)	Frequência de dano(%)
Cérebro	SAL	39.4 \pm 12.0	37.2 \pm 12.0
	PA150	270.0 \pm 41.3 ***	99.6 \pm 0.9 ###
	PA300	263.2 \pm 22.2 ***	98.8 \pm 1.6 ###
	PA600	218.8 \pm 69.4 ***	93.4 \pm 6.8 ###
	MMS	305.6 \pm 11.9 ***	96.4 \pm 2.9 ###
Fígado	SAL	46.8 \pm 12.4	40.2 \pm 9.4
	PA150	231.4 \pm 21.6 §§§	98.4 \pm 3.0 &&&
	PA300	251.8 \pm 41.8 §§§	99.2 \pm 1.3 &&&
	PA600	192.8 \pm 33.0 §§§	94.2 \pm 5.0 &&&
	MMS	277.2 \pm 27.8 §§§	94.8 \pm 1.6 &&&
Sangue periférico	SAL	31.8 \pm 10.4	31.4 \pm 9.8
	PA150	156.2 \pm 28.6 □□□	91.6 \pm 2.1 $\Psi\Psi\Psi$
	PA300	165.6 \pm 20.2 □□□	97.4 \pm 1.9 $\Psi\Psi\Psi$
	PA600	120.8 \pm 17.6 □□□	89.6 \pm 8.9 $\Psi\Psi\Psi$
	MMS	265.4 \pm 10.9 □□□	93.8 \pm 0.8 $\Psi\Psi\Psi$

***Diferença significativa em relação ao grupo controle para o índice de dano em células cerebrais (ANOVA, $F_{(4,24)}= 37.895$; $p<0,001$); ###Diferença significativa em relação ao grupo controle para frequência de dano em células cerebrais (ANOVA, $F_{(4,24)}= 98.919$; $p<0,001$); §§§Diferença significativa em relação ao grupo controle para o índice de dano em células hepáticas (ANOVA, $F_{(4,24)}= 49.027$; $p<0,001$); &&&Diferença significativa em relação ao grupo controle para frequência de dano em células hepáticas (ANOVA, $F_{(4,24)}= 126.292$; $p<0,001$); □□□Diferença significativa em relação ao grupo controle para o índice de dano em células sanguíneas (ANOVA, $F_{(4,24)}= 100.591$; $p<0,001$); $\Psi\Psi\Psi$ Diferença significativa em relação ao grupo controle para frequência de dano em células sanguíneas (ANOVA, $F_{(4,24)}= 104.076$; $p<0,001$).

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi investigada a ação de um extrato seco nebulizado de *P. alata* quimicamente caracterizado em modelos animais clássicos para avaliação de efeito central, especialmente ação hipnótico/sedativa e ansiolítica, bem como sua toxicidade. A caracterização é um passo importante para garantir a uniformidade da composição química e, conseqüentemente, reprodutibilidade do efeito farmacológico. O estabelecimento de marcadores químicos, preferencialmente as substâncias ativas (quando conhecidas), é indispensável para o planejamento e monitoramento das ações de transformação tecnológicas e para os estudos de estabilidade (SONAGLIO *et al.*, 2003). Os flavonóides C-glicosilados parecem constituir a melhor opção de escolha de marcadores de qualidade para a espécie de *P. alata*, pois são os constituintes de distribuição mais homogênea no gênero *Passiflora* (DHAWAN *et al.*, 2004) e têm sido sugeridos como possíveis constituintes responsáveis pelas suas atividades farmacológicas (OGA *et al.*, 1984; LUTOMSKI *et al.*, 1975; BETTI *et al.*, 2004; DHAWAN *et al.*, 2004) e, além disso, já são relatados como marcadores para as espécies de *P. incarnata* e *P. edulis* (PETRY *et al.*, 1998; DE SOUZA, 1997; SCHMIDT; GONZÁLEZ ORTEGA, 1993). Além disso, a determinação do teor de flavonóides totais através da técnica de complexação com cloreto de alumínio constitui um método simples e rápido para a caracterização desses compostos (PETRY *et al.*, 1998) e, por esta razão, foi utilizada neste trabalho. Para o extrato seco nebulizado de *P. alata* (PA) o teor de flavonóides totais foi de $2,6 \pm 0,05\%$.

Como primeiro passo para a avaliação farmacológica de PA foi realizado o teste de potenciação do sono induzido por barbitúricos. A administração do extrato na dose de 300 mg/kg diminuiu a latência e prolongou a duração do sono, significativamente, em relação ao grupo controle. Porém, quando a dose foi aumentada para 600 mg/kg, nenhum desses efeitos foi observado.

No teste de potenciação do sono barbitúrico, fármacos depressores do SNC, em geral, reduzem a latência e/ou aumentam a duração do sono induzido. Por outro lado, substâncias metabolizadas no fígado podem alterar os parâmetros registrados como conseqüência de uma interação farmacocinética (LAPA *et al.*, 2003), inibindo a metabolização do pentobarbital e, conseqüentemente, aumentando o tempo de sono. Flavonóides modulam enzimas do sistema citocromo P-450, incluindo indução,

ativação e inibição de isoenzimas CYP específicas (MOON *et al.*, 2006). CHAUDHARY; WILLETT (2006) demonstraram que flavonóides inibem seletivamente isoenzimas CYP1, dependendo da extensão de sua absorção, indicando que os flavonóides poderiam inibir as enzimas responsáveis pela metabolização do pentobarbital, aumentando o tempo de sono induzido. Contudo, não foram encontrados estudos que demonstrem que flavonóides inibem especificamente enzimas CYP3A2 de ratos, equivalentes a CYP3A4 humana, que metaboliza os fármacos barbitúricos. Além disso, o fato de PA diminuir a latência para o início do sono reforça a idéia de uma ação central. Porém, o desaparecimento do efeito de PA sobre o sono com o aumento da dose é um resultado intrigante. Três explicações poderiam ser sugeridas, duas de base farmacocinética e uma, de base farmacodinâmica: efeito auto-indutor de metabolismo, interferências na absorção ou antagonismo farmacológico entre as diferentes substâncias presentes no extrato.

Uma hipótese plausível seria que as substâncias ativas de PA apresentem um efeito auto-indutor do metabolismo, como descrito para alguns fármacos, por exemplo, a carbamazepina (ARROYO; SANDER, 1999). Como um extrato vegetal é uma mistura complexa de substâncias, também é razoável supor a possibilidade de que substâncias diferentes daquelas responsáveis pela ação depressora de PA, quando em maior concentração, possam induzir o metabolismo das mesmas. No entanto, estes efeitos dificilmente se expressariam com uma única dose.

Outra possibilidade é que na dose mais baixa (300 mg/kg), a(s) substância(s) responsável(is) pelo aumento da duração do sono sejam absorvidas numa extensão suficiente para apresentar o efeito e, quando a dose é aumentada, outras substâncias presentes no extrato estejam impedindo a absorção da(s) substância(s) com efeito depressor do SNC.

As saponinas são os principais constituintes de *P. alata*, constituindo em torno de 20 % de um extrato aquoso das folhas (BIRK *et al.*, 2005; REGINATTO *et al.*, 2001). Os flavonóides também representam um grupo importante de metabólitos secundários nesta espécie, tendo sido já isolados vitexina, isovitexina, orientina e 2'-xilosil-vitexina (ULUBELEN *et al.*, 1982), 2''-ramnosil-vitexina, 2''-ramnosil-escoparina, 2''-ramnosil-orientina, isoorientina (DOYAMA *et al.*, 2005). Além disso, ainda que não tenham sido detectados em PA, alcalóides β -carbolínicos do tipo harmano foram

detectados anteriormente na folhas de *P. alata* em concentração de 0,217 mg% (OGA *et al.*, 1984).

Embora existam registros da atividade central de algumas saponinas em modelos experimentais (UNE *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2003; CHA *et al.*, 2005), existem evidências de que as saponinas são pouco absorvidas quando administradas por via oral (HOSTTETMANN; MARSTON, 1995). Além disso, é descrito que as saponinas podem afetar a penetração e transporte de moléculas biologicamente ativas (HOSTTETMANN; MARSTON, 1995). Alguns estudos demonstraram que elas podem agir como promotores de absorção de diversos fármacos, especialmente antitumorais (CHO *et al.*, 2003; NAKAMURA *et al.*, 2003). Por outro lado, elas também atuam como inibidores de absorção de açúcares, colesterol e álcool (YOSHIKAWA *et al.*, 1996; KOO, 1999; MOREHOUSE *et al.*, 1999; DETMERS *et al.*, 2000; LUO *et al.*, 2001). Portanto, as saponinas, quando em concentrações mais altas (PA 600 mg/kg), poderiam estar interferindo na absorção das substâncias ativas no tempo de sono, resultando na perda do efeito hipnótico/sedativo observado na dose de 300 mg/kg.

A extensão da absorção oral dos flavonóides ainda não está plenamente definida, mas alguns estudos demonstram que esta classe de substâncias é pobremente absorvida, especialmente quando na forma de heterosídeos (CHANG *et al.*, 2005; KHALED *et al.*, 2003; SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). A extensão da absorção dos heterosídeos está relacionada com a extensão da hidrólise enzimática no intestino e com o tipo de açúcar ligado às agliconas (CHANG *et al.*, 2005; GRAEFE *et al.*, 2001; HOLLMAN *et al.*, 1999). Não foram encontrados relatos da farmacocinética dos flavonóides já identificados em *P. alata*. Porém, um derivado de vitexina (vitexina 7-glicosídeo) exibiu alta permeabilidade intestinal em ratos, o que é preditivo de uma boa absorção (RUAN *et al.*, 2006).

Alguns estudos demonstram efeito ansiolítico/hipnótico/sedativo de flavonóides isolados ou frações enriquecidas (GOUTMANN *et al.*, 2003; HUI *et al.*, 2002). OKUYAMA *et al.* (1996) demonstraram que dois flavonóides C-glicosilados (orientina e isoorientina), que também estão presentes na espécie de *P. alata*, apresentam efeito ansiolítico discreto no teste anti-conflito, em camundongos. Um grande número de estudos relata a afinidade e ação agonista, agonista parcial, antagonista ou agonista inversa de flavonóides e seus derivados semi-sintéticos em receptores benzodiazepínicos (MEDINA *et al.*, 1990; MARDER *et al.*, 1995; MARDER *et*

al., 1996b; WOLFMAN *et al.*, 1996; GRIEBEL *et al.*, 1999; PALADINI *et al.*, 1999; VIOLA *et al.*, 2000b, GOUTMAN *et al.*, 2003; HUEN *et al.*, 2003a). A modulação alostérica positiva do receptor GABA_A, gerada pela interação de um agonista ao sítio benzodiazepínico é o mecanismo de ação mais relatado na explicação dos efeitos observados. Agonistas benzodiazepínicos apresentam propriedades sedativa, ansiolítica e anticonvulsivante, enquanto que agonistas inversos apresentam propriedades ansiogênica e pró-convulsivante. Substâncias antagonistas de receptores benzodiazepínicos não apresentam efeitos comportamentais pela sua ligação ao receptor (STAHL, 2000). Em tese, PA pode apresentar diferentes flavonóides com diferentes perfis farmacodinâmicos: agonistas, antagonistas ou agonistas inversos. Por isso, o efeito observado no tempo de sono, na dose de 300 mg/kg, poderia ser devido à interação de flavonóides atuando como agonistas dos receptores benzodiazepínicos. Já na dose de 600 mg/kg, outros flavonóides poderiam alcançar uma concentração que permita a interação destes com os receptores benzodiazepínicos, mas desta vez, atuando como antagonistas ou agonistas inversos, impedindo que o efeito hipnótico/sedativo se pronuncie.

Finalmente, LUTOMSKI *et al.* (1975) atribuiu o efeito sedativo do suco de *P. edulis* à presença de flavonóides e de alcalóides do grupo harmano. No entanto, é conhecido que os alcalóides presentes nas espécies de *Passiflora*, especialmente a harmina, apresentam atividade inibidora da monoamino oxidase, o que, em princípio, resultaria um efeito estimulante e não sedativo (SLOTKIN; DISTEFANO, 1970).

Quando PA (300 e 600 mg/kg) foi testado nos modelos de locomoção espontânea, coordenação motora em aparelho de rota-rod e indução de catatonía, os animais não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle em nenhum dos parâmetros observados nesses testes. Este conjunto de dados é importante, já que PA demonstra ter um efeito hipnótico, sem comprometimento das funções motoras ou efeito sedativo pronunciado, nas doses testadas, indicando não atuar na junção neuromuscular e não possuir um efeito neurotóxico agudo.

PA apresentou um efeito hipotérmico importante. Estudos já relacionaram a hipotermia e efeito no tempo de sono (RASHOTTE *et al.*, 1998; PIETRZAK; KUBIK-BOGUCKA, 2002). No entanto, alguns estudos relacionam o aumento da temperatura corporal à indução do sono e a hipotermia à indução de despertar (FROSINI *et al.*, 2004). Por outro lado, ROWLETT *et al.* (2001) demonstraram que zolpidem, um

agonista de receptor benzodiazepínico do tipo 1, empregado como hipnótico, também diminui a temperatura retal de camundongos.

Diversos sistemas neurotransmissores estão envolvidos na regulação da temperatura corporal, entre eles os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico, e também o sistema GABAérgico (SALMI, 1998; SALMI; AHLENIUS, 1998; KITAMURA *et al.*, 2003; FROSINI *et al.*, 2004). Estudos recentes evidenciaram que tanto receptores GABA_A quanto GABA_B estão envolvidos nos mecanismos centrais de termorregulação, com prevalência do papel do receptor GABA_B (FROSINI *et al.*, 2004). Outro estudo, que investigou a modulação do efeito hipotérmico induzido por canabinóides, demonstrou que este efeito é mediado por receptores GABA_A (RAWLS *et al.*, 2004).

Assim, levando-se em consideração esses dados de literatura, os resultados aqui apresentados, e mesmo a utilização popular como calmante, os efeitos hipnótico e hipotérmico observados após a administração de PA poderiam estar relacionados a uma interação com receptores benzodiazepínicos. No entanto, nem a administração aguda, nem a administração crônica de PA produziram efeito ansiolítico significativo em ratos ou camundongos avaliados no modelo do labirinto em cruz elevado, que é um teste sensível a fármacos do tipo benzodiazepínicos. Ao contrário, em ambas as espécies de roedores, os animais tratados agudamente com 300 mg/kg de PA apresentaram uma tendência a um comportamento ansioso. Por outro lado, a administração aguda de PA 600 mg/kg resultou em um perfil próximo do ansiolítico, ainda que não significativamente. Aqui, como no tempo de sono, observa-se um efeito que tende a aparecer ou aparece em doses menores e desaparece em doses maiores, demonstrando que efetivamente uma interação farmacológica está na base desta peculiar relação dose x efeito. Estas observações poderiam, também, explicar a discrepância dos nossos dados em relação ao efeito ansiolítico relatado por PETRY *et al.* (2001) e DE PARIS *et al.* (2002). Estes autores trabalharam com extratos aquosos e hidroetanólicos não-nebulizados, obtidos com o material vegetal coletado em outro local e, possivelmente, em outra época do ano, com composição química não-definida, o que pode determinar uma composição química diferente para os extratos, com diferentes concentrações relativas de substâncias com atividades antagônicas ou que interfiram na absorção das substâncias ativas, como discutido em parágrafos anteriores.

A presença de efeito hipnótico sem efeito ansiolítico observada para PA é semelhante ao perfil de efeitos de fármacos do tipo zolpidem, que agem através da interação com receptores benzodiazepínicos do tipo 1 (LESLIE *et al.*, 2004; STAHL, 2000). Os efeitos hipnótico/sedativo e amnésico dos benzodiazepínicos têm sido atribuídos, principalmente, à ligação ao subtipo de receptor GABA_A contendo a subunidade $\alpha 1$. Os efeitos ansiolítico e relaxante muscular relacionam-se ao subtipo de receptor que contém a subunidade $\alpha 2$. A ação anticonvulsivante também é mediada pela ativação de receptores benzodiazepínicos do tipo 1, mas apenas parcialmente (SAVIC *et al.*, 2004).

A tendência a um efeito ansiogênico de PA, observada no tratamento agudo, foi confirmada com um efeito ansiogênico significativo em ratos tratados por 14 dias com PA 300 mg/kg. O diazepam também não apresentou efeito ansiolítico após tratamento repetido, mas, como previsto, não apresentou ansiogênico. Outros estudos já demonstraram o desenvolvimento, em ratos, de tolerância ao efeito ansiolítico de diazepam no labirinto em cruz elevado, em diferentes regimes e vias de administração (FERNANDES *et al.*, 1999; SCHMITT *et al.*, 2001).

O efeito ansiogênico de PA é, de certa maneira, surpreendente. Como já discutido, flavonóides podem atuar como agonistas inversos. Estudos revelaram que um isoflavonóide sintético age como agonista inverso do sítio benzodiazepínico no complexo receptor GABA_A, o que pode conferir atividade ansiogênica (LOPES *et al.*, 2004). Outra explicação para o fato de PA apresentar efeito ansiogênico somente após administração repetida é a hipótese de que os metabólitos dos flavonóides presentes em PA possam apresentar atividade, como já relatado para outros metabólitos de flavonóides (PARK *et al.*, 2005b). Esses metabólitos poderiam estar atuando como agonistas inversos, e seus efeitos não se pronunciarem após administração aguda, já que é necessário um tempo maior para os metabólitos serem produzidos e alcançarem a corrente circulatória. Além disso, pode estar havendo efeito cumulativo das substâncias com perfil agonista inverso, sejam elas os flavonóides presentes em PA ou seus metabólitos. Outra possibilidade seria a ligação dessas moléculas às proteínas plasmáticas. FIORANI *et al.* (2003) demonstraram que a quercetina liga-se à albumina e sugeriram que a ligação a proteínas plasmáticas tenha um papel importante na distribuição e biodisponibilidade de flavonóides na circulação. Pode-se sugerir que os flavonóides com perfil agonista

inverso, após a saturação da ligação às proteínas plasmáticas, atinjam uma concentração na forma livre capaz de interagir com os receptores.

HILBER E CHAPILLON (2005) demonstraram que, no labirinto em cruz elevado, doses baixas de harmalina (5 – 10 mg/kg i.p.) provocaram efeito ansiogênico em camundongos e, em doses mais altas (20 mg/kg i.p.) apresentaram ação ansiolítica. Esses autores referem, ainda, que a harmalina pode atuar como um agonista fraco ou parcial de receptores benzodiazepínicos e que suas atividades podem ser, em parte, influenciadas pela interação com esses receptores. As β -carbolinas também são relatadas por apresentarem diferentes perfis de ligação aos receptores benzodiazepínicos. A β -carbolina-3-carboxilato-t-butil-éster (β -CCt) é um antagonista seletivo de receptores benzodiazepínico alfa1 (ROWLETT *et al.*, 2001; SAVIC *et al.*, 2004). Metil-6,7-dimetóxi-4-etil- β -carbolina-3-carboxilato (DMCM) e FG7142 são relatadas como agonistas inversos e apresentam efeito ansiogênico (SAVIC *et al.*, 2004; COLE *et al.*, 1995).

Apesar de todas as evidências acima discutidas relacionarem o efeito ansiogênico de substâncias análogas às relatadas para *P. alata* com uma inibição da atividade GABAérgica, PA (300 e 600 mg/kg) não apresentou efeito no teste de proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol (um antagonista de receptor GABA_A). Neste teste, seria esperado um efeito pró-convulsivante para substâncias ansiogênicas e um efeito protetor das convulsões, para substâncias ansiolíticas, que atuassem via complexo receptor GABA/benzodiazepínico. Esse efeito não foi observado nem após administração aguda, nem após tratamento repetido com PA.

Na avaliação da toxicidade aguda, não ocorreram mortes até a dose de 4800 mg/kg, nas primeiras 24 horas após a administração dos tratamentos. Também não foram observados sinais importantes de toxicidade no período de 14 dias de observação, sugerindo que PA apresenta baixa toxicidade quando administrado agudamente. Além disso, não foram observados sinais importantes de toxicidade geral após de doses repetidas. Neste teste, os ratos tratados com PA não apresentaram alterações significativas nos relação aos parâmetros bioquímicos, hematológicos, urinários e histopatológicos, em relação ao grupo controle. Por outro lado, os animais não apresentaram ganho de peso durante os 14 dias de tratamento. Em um primeiro momento, este fato pode representar um sinal de toxicidade, no entanto, o mesmo efeito foi observado no grupo tratado com diazepam 1 mg/kg.

Considerando que *P. alata* apresenta efeito hipnótico, já demonstrado em outros estudos (OGA *et al.*, 1984) e confirmado para PA neste trabalho, pode-se sugerir que o fato de os animais dormirem por mais tempo impeça o ganho de peso por decréscimo da ingestão de comida. Além disso, não pode ser excluída uma inibição da absorção intestinal de gorduras da dieta por PA, visto que saponinas podem interferir no metabolismo do colesterol e diminuir a absorção intestinal de gorduras da dieta via inibição da atividade da lipase pancreática (HOSTTETMANN; MARSTON, 1995; HAN *et al.*, 2002; 2005). DOYAMA *et al.* (2005) relataram que *P. alata* aumenta significativamente os níveis de HDL sem modificar as concentrações de LDL e colesterol total em ratos. No trabalho aqui apresentado, PA também não alterou o nível de colesterol total de ratos e os níveis de LDL e HDL não foram analisados.

PA apresentou indícios de toxicidade genética, quando avaliado no ensaio cometa alcalino. Este ensaio é sensível para quantificar lesões do DNA em células eucarióticas, que incluem quebras nas fitas simples e dupla do DNA (COLLINS, 2004; FAIRBAIRN *et al.*, 1995; MOLLER, 2006). O tratamento com PA provocou danos importantes no DNA. Além de causar um aumento significativo no índice (ID) e na frequência de danos (%) em células cerebrais, hepáticas e do sangue periférico de camundongos, a administração de PA (150, 300 e 600 mg/kg) provocou mais de 10% de danos do tipo 4 nas células cerebrais e hepáticas. A ocorrência de cometas com praticamente todo o DNA na cauda e pouco na cabeça (classe 4) é uma indicação de efeito citotóxico e tem sido descrita como indicativo de células apoptóticas, por geração de quebras na fita dupla (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; HARTMANN; SPEIT, 1997; COLLINS, 2004). Contudo, de acordo com ROJAS *et al.* (1999), aproximadamente 85% dos estudos nessa área têm resultados positivos. COLLINS *et al.* (1997) e SPEIT *et al.* (1998) sugeriram que quebras simples observadas na versão alcalina são facilmente reparadas e não são consideradas lesões significativas para letalidade ou mutação. Além disso, AMARAL *et al.* (2001) demonstraram que um extrato aquoso liofilizado de *P. alata* (800 mg/kg), não apresentou toxicidade reprodutiva em ratas. Assim, a correlação de PA com outros efeitos genotóxicos como troca entre cromátides irmãs, aberrações cromossômicas, mutação ou indução de micronúcleos torna-se necessária para investigar a persistência e o reparo dos danos induzidos por PA e conseqüente significado clínico.

Em relação aos constituintes de PA que possam ser responsáveis por esses danos, não é possível uma conclusão definitiva. Para saponinas são relatados efeitos protetores contra danos no DNA no ensaio cometa (MBAGACHOU *et al.*, 1999), porém, existem alguns dados de atividade citotóxica em células tumorais *in vitro* (HOSTTETMAN; MARSTON, 1995). Estudos de genotoxicidade de flavonóides relatam efeito protetor e indutor, dependendo da substância e/ou do ensaio utilizado. POPP E SCHIMMER (1991) demonstraram que vitexina e orientina induzem troca entre cromátides irmãs, o que sugere que os flavonóides podem estar envolvidos na genotoxicidade apresentada por PA.

O estudo farmacodinâmico pré-clínico tem como um de seus objetivos comprovar o efeito que motivou o estudo de um produto com a finalidade de se obter um medicamento. Nesta dissertação, no entanto, o conjunto de resultados obtidos contraria o emprego de *P. alata* como calmante, se interpretarmos esta indicação como resultado de um efeito sedativo ou ansiolítico. Porém, o efeito hipnótico após administração aguda pode explicar o efeito indutor de sono percebido como calmante pela população. Além da comprovação dos efeitos farmacológicos, a etapa pré-clínica também tem como objetivo determinar experimentalmente o grau de segurança para os testes em seres humanos. Para *P. alata*, ainda não haviam sido relatados efeitos tóxicos relacionados à sua utilização. Neste trabalho, PA não apresentou efeitos tóxicos importantes na avaliação da toxicidade aguda e de doses repetidas, porém, o ensaio cometa alcalino demonstrou que PA provoca danos importantes no DNA.

O estudo em seres humanos deve ser justificado por evidências de uma atividade farmacológica de interesse terapêutico e cabalmente embasado nas experiências farmacodinâmicas e toxicológicas pré-clínicas (LAPA *et al.*, 2003). O estudo clínico para a avaliação da qualidade do sono em voluntários sadios estava justificado pela observação do efeito hipnótico observado em camundongos. Além disso, o uso de plantas medicinais pela população, sem relato de efeitos nocivos, por um período superior a vinte anos é aceito como um indicativo de segurança (BRASIL - RDC nº 48, 2004). A Organização Mundial da Saúde nas suas exigências de comprovação de segurança e eficácia também aceita uso tradicional como evidência de segurança de uso (OMS, 2001). No entanto, apesar de *P. alata* ser considerada espécie de uso tradicional, a ocorrência de efeitos genotóxicos

impossibilitou a execução do estudo clínico inicialmente planejado, pelo menos até o momento em que mais estudos sejam realizados para a avaliação das conseqüências clínicas desses resultados.

7. CONCLUSÃO

O extrato seco nebulizado de *P. alata* (PA), quimicamente caracterizado quanto ao teor de flavonóides (2,6 % de flavonóides totais), provocou efeito hipnótico e hipotérmico quando administrado agudamente em camundongos. Este efeito hipnótico não foi acompanhado de efeito ansiolítico e sedativo: PA não causou redução na locomoção espontânea, prejuízos de desempenho no aparelho de rota-rod e comportamento catatônico, em camundongos; no teste do labirinto em cruz elevado, em camundongos e ratos, a administração aguda de PA demonstrou uma tendência a um efeito ansiogênico para a dose de 300 mg/kg e uma tendência a efeito ansiolítico para a dose de 600 mg/kg; a tendência ao efeito ansiogênico foi confirmada após administração de PA por um período de 14 dias, em ratos. Apesar do modelo de ansiedade utilizado detectar principalmente substâncias com ação sobre o sistema neurotransmissor GABA, o extrato não interferiu com as convulsões induzidas por pentilenotetrazol, um antagonista GABA_A, nem após administração aguda, nem após tratamento repetido. Esses dados permitem sugerir que diferentes moléculas presentes no extrato apresentem também ações farmacológicas distintas, determinando a ocorrência de antagonismos farmacológicos ou interferência na farmacocinética das substâncias ativas.

O extrato apresentou uma toxicidade aguda e de doses repetidas baixa, quando considerados letalidade, parâmetros bioquímicos, histológicos e hematológicos, e sinais físicos gerais. No entanto, na administração repetida os ratos não apresentaram ganho de massa corporal, o que poderia representar um indício de toxicidade. Além disso, a administração aguda de PA em camundongos provocou danos importantes no DNA, avaliados no ensaio cometa alcalino.

Concluindo, os resultados apresentados neste trabalho podem explicar o efeito relatado pela população como agente indutor de sono, mas não apóiam o uso popular, ou comercialização, como calmante (sedativo ou ansiolítico). Pelo contrário, o efeito ansiogênico e a toxicidade genética observados determinam a necessidade de cautela na utilização de *P. alata* como matéria-prima para a produção de medicamentos até que mais estudos farmacológicos e toxicológicos sejam realizados. Por outro lado, os efeitos hipnótico e ansiogênico observados mantêm a espécie *P. alata* como um alvo interessante para a busca de moléculas com ação sobre o Sistema Nervoso Central.

8. REFERÊNCIAS

- AIRAKSINEN, M.M. e KARI, I. Beta-carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body. Part II: Effects. **Medical Biology**, v. 59, p. 190-211, 1981.
- AKHONDZADEH, S.; NAGHAVI, H.R.; VAZIRIAN, M.; SHAYEGANPOUR, A.; RASHIDI, H.; KHANI, M. Passionflower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 26, p. 363-367, 2001a.
- AKHONDZADEH, S.; KASHANI, L.; MOBASRI, M.; HOSSEINI, S.H., NIKZAD, S.; KHANI, M. Passionflower in the treatment of opiates withdrawal: a double-blind randomized controlled trial. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 26, p. 369-373, 2001b.
- AMARAL, K.M.; SCHENKEL, E.; LANGELOH, A. Avaliação da toxicidade reprodutiva dos extratos aquosos liofilizados de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims em ratas Wistar. **Acta Farmacéutica Bonarense**, v. 20(3), p. 215-220, 2001.
- AMARAL, P.A.; EIFLER-LIMA, V.L.; RATES, S.M.K. Kava em alerta. **Revista Afargs**, n.º 11, encarte n.º10, 2002.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Banco de dados. Produtos das empresas de medicamentos e hemoderivados. Disponível em: http://www.anvisa.gov/medicamentos/banco_med.htm. Acesso: março 2006.
- ARICIOGLU, F. e ALTUNBAS, H. Harmane induces anxiolysis and antidepressant-like effects in rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1009, p. 196-201, 2003.
- ARICIOGLU, F.; YILLAR, O.; KORCEGEZ, E.; BERKMAN, K. Effect of harmane on the convulsive threshold in epilepsy models in mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1009, p. 190-195, 2003.
- ARROYO, S. e SANDER, J.W. Carbamazepine in comparative trials: pharmacokinetic characteristics too often forgotten. **Neurology**, 53(6), 1170-1174, 1999.
- ATTELE, A.S.; WU, J.A.; YUAN, C. Ginseng pharmacology: Multiple constituents and multiple actions. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 11, p. 1685-1693, 1999.
- AVALLONE, R.; ZANOLI, P.; PUJA, G.; KLEINSCHNITZ, M.; SCHREIER, P.; BARALDI, M. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 1387-1394, 2000.
- AWAD, R.; ARNASON, J.T.; TRUDEAU, V.; BERGERON, C.; BUDZINSKI, J.W.; FOSTER, B.C.; MERALI, Z. Phytochemical and biological analysis of Scullcap (*Scutellaria laterifolia* L.): a medicinal plant with anxiolytic properties. **Phytomedicine**, v. 10, p. 640-649, 2003.
- BALDESSARINI, R.J. Drugs and the Treatment of Psychiatric Disorders: Depression and Anxiety Disorders. In: HARDMAN, J.G. & LIMBIRD, L.E. (Ed.) **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10 ed. Nova York: McGraw-Hill, 2001, cap. 19, p. 447-483.

- BALDWIN, D.S.; ANDERSON, I.M.; NUTT, D.J.; BANDELOW, B.; BOND, A.; DAVIDSON, J.R.T.; DEN BOER, J.A.; FINEBERG, N.A.; KNAPP, M.; SCOTT, J.; WITTCHEN, H.-U. Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, v. 19, p. 567-596, 2005.
- BELLO, C.M.; RECH, S.B.; VON POSER, G.L.; RATES, S.M.K. Elementos para o uso racional de valeriana. **Revista Afargs**, n.º 13, encarte n.º 12, 2002.
- BETTI, A.H.; PROVENSÍ, G.; FENNER, R.; KLIEMANN, M.; HECKLER, A.P.M.; MUNARI, L.; FORNARI, P.E.; GOSMANN, G.; RATES, S.M.K. 2004, **Investigação da atividade ansiolítica/sedativa de uma fração de flavonóides e uma fração de saponinas purificadas de *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae)**. XVI Salão de Iniciação Científica, UFRGS, Porto Alegre – RS, Brasil.
- BHC. **British Herbal Compendium**, v. 1, Dorset, 1992.
- BHP. **British Herbal Pharmacopoeia**. 4ª ed. Exeter: British Herbal Medicine Association, 1996.
- BIANCHIN, M.M.; WALZ, R.; BUSTAMANTE, G DE O.; SPANIS, C.W. O estudo do sono e de seus distúrbios. In: KAPCZINSKI, F., QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, cap. 31, p. 397-415.
- BIRK, C.D.; PROVENSÍ, G.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. TLC fingerprints of flavonoids and saponins from *Passiflora* species. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**. v. 28, p. 2285-2291, 2005.
- BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal Medicine – Expanded Commission E Monographs**. Newton: American Botanical Council, 2000.
- BOEIRA, J.M., SILVA, J DA, ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro. **Pharmacology & Toxicology**, v. 89, p. 287-294, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. RDC n.º 48, de 16.03.2004, Diário Oficial da União, de 18.03.2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. SVS. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 116, de 08/08/1996. Diário Oficial da União, de 12/08/1996.
- BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza: Editoria ACRIBIA, 1991.
- CALIXTO, J.B. Estudo Farmacológico Pré-Clínico de Plantas Medicinais. In: YUNES, R. A. & CALIXTO, J.B. (Org.) **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, p. 77-99, 2001.
- CAPASSO, A. e SORRENTINO, L. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of Kawa kawa and *Passiflora* extracts combination. **Phytomedicine**, 12 (1-2), 39-45, 2005.

CARLINI, E.A. **Farmacologia Prática Sem Aparelhagens**. São Paulo: Sarvier, 1973.

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

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução n.º 714, de 20/06/2002.

CHA, H.Y.; PARK, J.H.; HONG, J.T.; YOO, H.S.; SONG, S.; HWANG, B.Y.; EUN, J.S.; OH, K.W. Anxiolytic-like effects of ginsenosides on the elevated plus-maze model in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 9, p. 1621-1625, 2005.

CHANG, Q.; ZUO, Z.; CHOW, M.S.S.; HO, W.K.K. Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 549-555, 2005.

CHAUDHARY, A. e WILLETT, K.L. Inhibition of human cytochrome CYP 1 enzymes by flavonoids of St. John's wort. **Toxicology**, v. 217 (2-3), p. 194-205, 2006.

CHO, S.Y.; SIM, J.S.; KANG, S.S.; JEONG, C.S.; LINHARDT, R.J.; KIM, Y.S. Enhancement of heparin and heparin disaccharide absorption by the *Phytolacca americana* saponins. **Archives of Pharmacological Research**, v. 26(12), p. 1102-1108, 2003.

CHOI, S.E.; CHOI, S.; LEE, J.H.; WHITING, P.J.; LEE, S.M.; NASH, S.Y. Effects of ginsenosides on GABA(A) receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes. **Archives of Pharmacological Research**, v. 26, n. 1, p. 28-33, 2003.

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

COLE, B.J.; HILLMANN, M.; SEIDELMANN, D.; KLEWER, M.; JONES, G.H. Effects of benzodiazepine receptor partial inverse agonists in the elevated plus maze test of anxiety in the rat. **Psychopharmacology**, 121(1), 118-126, 1995.

COLLINS, A., DUSINSKÁ, M., FRANKLIN, M.; SOMOROSVSKÁ, H.; PETROVSKÁ, H., DUTHIE, S., FILLION, L., PANYIOTIDIS, M., RASLOVÁ, K., VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30, p. 139-146, 1997.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249-261, 2004.

CONRADO, D.J.; FRONZA, T.; PAIVA, R.M.; DRESCH, A.P.; GEREMIAS, D.; FENNER, R.; VIANA, A.F.; RATES, S.M.K. Aspectos químicos, farmacológicos e emprego terapêutico do gênero *Passiflora* (Maracujá). **Revista Afarg**, n. 15, p. 14-19, 2003.

CORDIOLI, A.V.; PÁDUA, A.C. DE; GAMA, C.S.; ZENI, C.P.; KNIJNIK, D.Z.; CECHIN, E.M. Medicamentos: Informações Básicas. *In*: CORDIOLI, A.V.

Psicofármacos: consulta rápida. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2005. seção 1, p. 19-314.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: IBDF. 1984. v.4, p.108-129.

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

DAB. **Deutsches Arzneibuch.** 10ª ed. Stuttgart: Wiss – Verl – Ges, 1991.

DEF. **Dicionário de Especialidades Farmacêuticas.** 33ª ed. Rio de Janeiro: Editora Publicações Científicas, 930 p., 2004.

DE ABREU, P.B. e CORDIOLI, A.V. Ansiedade. In: DUNCAN, B.B; SCHMIDT, M.I.; GIUGLIANI, E.R.J. **Medicina Ambulatorial: Condutas Clínicas em Atenção Primária.** Porto Alegre: Artes Médicas Sul. 1996. cap. 89, p. 529-537.

DE PARIS, F.; NEVES, G.; SALGUEIRO, J.B.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I.; RATES, S.M.K. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng. (Amaranthaceae) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 261-269, 2000.

DE PARIS, F.; PETRY, R.D.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J.B.; KAPCZINSKI, F.; ORTEGA, G.; SCHENKEL, E.P. Pharmacochemical Study of Aqueous Extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmacéutica Bonarense**, v. 21(1), p. 5-8, 2002.

DE SOUZA, K.C.B. **Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa*.** 1997, 156 p. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre.

DETMERS, P.A.; PATEL, S.; HERNANDEZ, M.; MONTENEGRO, J.; LISNOCK, J.M.; PIKOUNIS, B.; STEINER, M.; KIM, D.; SPARROW, C.; CHAO, Y.S.; WRIGHT, S.D. A target for cholesterol absorption inhibitors in the enterocyte brush border membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1486(2-3), p. 243-252, 2000.

DE VANE, C.L.; CHIAO, E.; FRANKLIN, M.; KRUEP, E.J. Anxiety disorders in the 21st century: status, challenges, opportunities, and comorbidity with depression. **The American Journal of Managed Care**, v. 11, S344-S353, 2005.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 698-702, 2001a.

DHAWAN, K.; DUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linnaeus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 165-170, 2001b.

DHAWAN, K. Drug/substance reversal effects of a novel tri-substituted benzoflavone moiety (BZF) isolated from *Passiflora incarnata* Linn. – a brief perspective. **Addiction Biology**, v. 8(4), p. 379-386, 2003.

- DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1-23, 2004.
- DOYAMA, J.T.; RODRIGUES, H.G.; NOVELLI, E.L.B.; CEREDA, E.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 371-374, 2005.
- DSM-IV-TR™ – **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Trad. Cláudia Dornelles. 4ª ed. Ver. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- ESGOP. **European Scientific Cooperative on Phytotherapy Monograph on the Medicinal Uses of Plant**. United Kingdom: Exeter, 1997.
- FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.O.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p. 37-59, 1995.
- FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil**. 2ª ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira S.A., 1959.
- FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil**. 3ª ed. São Paulo: Organização Andrei Editora S.A., 1977.
- FERNADES, C.; ARNOT, M.I.; IRVINE, E.E.; BATESON, A.N.; MARTIN, I.L.; FILE, S.E. The effect of treatment regimen on the development of tolerance to the sedative and anxiolytic effects of diazepam. **Psychopharmacology**, v. 145, p. 251-259, 1999.
- FERNÁNDEZ, S.; WASOWSKI, C.; PALADINI, A.C.; MARDER, 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, p. 189-198, 2005.
- FIORANI, M.; ACCORSI, A.; CANTONI, O. Human red blood cells as a natural flavonoid reservoir. *Free Radic Res*, v. 37(12), p. 1331-1338, 2003.
- FOLKS, D.G. The interface of psychiatry and irritable bowel syndrome. **Current Psychiatry Reports**, v. 6(3), p. 210-215, 2004.
- FROSINI, M.; VALOTI, M.; SGARAGLI, G. Changes in rectal temperature and ECoG spectral power of sensorimotor cortex elicited in conscious rabbits by i.c.v. injection of GABA, GABA_A and GABA_B agonists and antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, p. 152-162, 2004.
- GOLDIM, J.R. **Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995.
- GOUTMANN, 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.
- GRAEFE, E.U.; WITTIG, J.; MUELLER, S.; RIETHLING A.K.; UEHLEKE, B.; DREWELow, B.; PFORTE, H.; JACOBASCH, G.; DERENDORF, H.; VEIT, M.

- Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41(5), p.492-499, 2001.
- GRAEFF, F.G. Medicamentos Ansiolíticos. In: GRAEFF, F.G. & GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1999, cap. 7, p. 123-160.
- GRAEFF, F.G. Bases biológicas da Ansiedade. In: KAPCZINSKI, F., QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, cap. 14, p. 193-204.
- 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.
- GUIMARÃES, F.S. Medicamentos Hipnóticos. In: GRAEFF, F.G. & GUIMARÃES, F.S. (ed.). **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Editora Atheneu. 1999, cap. 8, p. 161-174.
- HABERLEIN, H.; TSCHIERSCHE, K.P.; SCHAEFER, H.L. Flavonoids from *Leptospermum scoparium* with affinity to the benzodiazepine receptor characterized by structure activity relationships and in vivo studies of a plant extract. **Pharmazie**, v. 49, p. 912-921, 1994.
- HAN, L.K.; ZHENG, Y.N.; XU, B.; OKUDA, H.; KIMURA, Y. Saponins from platycodi radix ameliorate high fat diet-induced obesity in mice. **The Journal of Nutrition**, v. 132(8), p. 2241-2245, 2002.
- HAN, L.K.; ZHENG, Y.N.; YOSHIKAWA, M.; OKUDA, H.; KIMURA, Y. Anti-obesity effects of chikusetsusaponins isolated from *Panax japonicus* rhizomes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 5(1), p. 9, 2005.
- HANRAHAN, J.R.; CHEBIB, M.; DAVUCHERON, N.L.M; HALL, B.J.; JOHNSTON, G.A.R. Semisynthetic preparation of amentoflavone: A negative modulator at GABA_A receptors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 14, p. 2281-2284, 2003.
- HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. (ed) **The Flavonoids**. New York: Academic Press, 1975, v. 1-2.
- HARBORNE, J.B. e WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.
- HARTMANN, A. e SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, v. 90, p. 183-188, 1997.
- HILBER, P. e CHAPILLON, P. Effects of harmaline on anxiety-related behavior in mice. **Physiology & Behavior**, 86, 164-167, 2005.
- HOLMANN, P.C.; BIJSMAN, M.N.; VAN GAMEREN, Y.; CNOSSEN, E.P.; DE VRIES, J.H.; KATAN, M.B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free Radical Research**, v. 31(6), p. 569-573, 1999.

- HOSTETTMANN, K e MARSTON, A. **Saponins**. Cambridge: University Press, 1995.
- HUEN, M.S.Y.; HUI, K.M.; LEUNG, J.W.C.; SIGEL, E.; BAUR, R.; TZE-FEI WONG, J. Naturally occurring 2'-hydroxyl-substituted flavonoids as high-affinity benzodiazepine site ligands. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p.2397-2407, 2003a.
- HUEN, M.S.Y.; LEUNG, J.W.C.; NG, W.; LUI, W.S.; CHAN, M.N.S.; TZE-FEI WONG, J.; XUE, H. 5,7-Dihydroxi-6-methoxyflavone, a benzodiazepine site ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi, with selective antagonistic properties. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p.125-132, 2003b.
- HUI, K.M.; HUEN, M.S.Y.; WANG, H.Y.; ZHENG, H.; SIGEL, E.; BAUR, R.; REN, H.; LI, Z.W.; TZE-FEI WONG, J.; XUE, H. Anxiolytic effect of wogonin, a benzodiazepine receptor ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 1415-1424, 2002.
- HUONG, N.T.T.; MATSUMOTO, K.; YAMASAKI, K.; DUC, M.N.; NHAM, N.T.; WATANABE, H. Crude sponin extracted from Vietnamese ginseng and its major constituent majonoside-R2 attenuate the psychological stress- and foot-shock stress-induced antinociception in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, n. 2, p. 427-432, 1995.
- HUONG, N.T.T.; MATSUMOTO, K.; YAMASAKI, K.; DUC, M.N.; NHAM, N.T.; WATANABE, H. Effects of majonoside-R2 on pentobarbital sleep and gastric lesion in psychologically stressed mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 53, n. 4, p. 957-463, 1996.
- HUONG, N.T.T.; MATSUMOTO, K.; YAMASAKI, K.; WATANABE, H. Majonoside-R2 reverses social isolation stress-induced decrease in pentobarbital sleep in mice: possible involvement of neuroactive steroids. **Life Sciences**, v. 61, n. 4, p. 395-402, 1997.
- KANG, T.H.; JEONG, S.J.; KIM, N.Y.; HIGUCHI, R.; KIM, Y.C. Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizia julibrissin* Durazz. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 321-323, 2000.
- KAPCZINSKI, F. 1995. **PhD Thesis**. Institute of Psychiatry, University of London, London.
- KAPCZINSKI, F.; DA FONSECA, M.M.R.; SANT'ANA, M.K. Transtorno de ansiedade generalizada. In: KAPCZINSKI, F., QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, cap. 16, p. 211-220.
- KHALED, K.A.; EL-SAYED, Y.M.; AL-HADIYA, B.M. Disposition of the flavonoid quercetin in rats after single intravenous and oral doses. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29(4), p. 397-403, 2003.
- KIMURA, T.; SAUNDERS, P.A.; KIM, H.S.; RHEU, H.M.; OH, K.W.; HO, I.K. Interactions of ginsenosides with ligand-bindings of GABA(A) and GABA(B) receptors. **General Pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 193-199, 1994.

- KITAMURA, Y.; ARAKI, H.; SHIBATA, K.; GOMITA, Y.; TANIZAKI, Y. Modulation of 8-OH-DPAT-induced hypothermia by imipramine in rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 93, p. 259-264, 2003.
- KOO, M.W.L. Effects of ginseng on ethanol induced sedation in mice. **Life Sciences**, v. 64, p. 153-160, 1999.
- KUHAR, M.J. Neuroanatomic substrates of anxiety: a brief survey. **Trend in Neurosciences**, v.97, p.307:311, 1996.
- 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 Medicinais**. Porto Alegre: Metrópole, 2003.
- LESLIE, J.C.; SHAW, D.; McCABE, C.; REYNOLDS, D.S.; DAWSON, G.R. Effects of drugs that potentiate GABA on extinction of positively-reinforced operant behavioral. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 28, 229-238, 2004.
- LIAO, J.F.; HUNG, W.Y.; CHEN, C.F. Anxiolytic-like effects of baicalein and baicalin in Vogel conflict test in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 464, p. 161-146, 2003.
- LOPES, D.V.S; CARUSO, R.R.B.; CASTRO, N.G.; COSTA, P.R.R.; DA 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. 495, p. 87-96, 2004.
- LÓPEZ-RUBALCAVA, C; HEN, R.; CRUZ, S.L. Anxiolytic-like actions of toluene in the burying behavior and plus-maze tests: Differences in sensitivity between 5-HT1B knockout and wild-type mice. **Behavioral Brain Research**, v. 115(1), p. 85-94, 2000.
- LUCK, K.C.; STERN, L.; WEIGELE, M.; O'BRIEN, R.A.; SPIRST, N. Isolation and identification of "diazepam-like" compounds in bovine urine. **Journal of Natural Products**, v. 46, p. 852-861, 1983.
- LUO, H.; IMOTO, T.; HIJI, Y. Inhibitory effect of voglibose and gymnemic acid on maltose absorption in vivo. **World Journal of Gastroenterology**, v. 7(2), p. 270-274, 2001.
- LUTOMSKI, J.; MALEK, B.; RYBACKA, L. Pharmacochemical investigations of the raw materials from passiflora genus. 2. The pharmacochemical estimation of juices from the fruits of *Passiflora edulis* and *Passiflora edulis* forma flavicarpa. **Planta Medica**, v. 27, p. 112-121, 1975.
- LYDIARD, R.B. An Overview of Generalized Anxiety Disorder: Disease State-Appropriate Therapy. **Clinical Therapeutics**, v. 22, suppl. A, 2000.
- MARDER, M.; VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; WOLFMAN, C.; WATERMAN, PG.; MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C. 6,3'-dinitroflavone, a novel high affinity ligand for the benzodiazepine receptor with potent anxiolytic properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 22, p. 2717-2720, 1995.

MARDER, M.; VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; WOLFMAN, C.; WATERMAN, P.G.; MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C. Cirsiolol and caffeic acid ethyl ester isolated from *Salvia guaranitica*, are competitive ligands for the central benzodiazepine receptors. **Phytomedicine**, v. 3, p. 29-31, 1996a.

MARDER, M.; VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; WOLFMAN, C.; WATERMAN, P.G.; CASSELS, B.K.; MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C. 6-bromoflavone, a high affinity ligand for the central benzodiazepine receptors is a member of a family of active flavonoids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 223, p. 384-389, 1996b.

MARDER, M.; VIOLA, H.; BACIGALUPPO, J.A.; COLOMBO, M.I.; WASOWSKI, C.; WOLFMAN, C.; MEDINA, J.H.; RÚVEDA, E.A.; PALADINI, A.C. Detection of benzodiazepine receptor ligands in small libraries of flavone derivatives synthesized by solution phase combinatorial chemistry. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 249, n. 2, p. 481-485, 1998.

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

MARTIN, J.V.; COOK, J.M.; HAGEN, T.J.; MENDELSON, W.B. Inhibition of sleep and benzodiazepine receptor binding by a beta-carboline derivative. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 34(1), p. 37-42, 1989.

MARTINDALE: The complete drug reference. 32 ed. London: Pharmaceutical Press, 1999, p. 1615.

MATSUMOTO, K.; KOHNO, S.I.; OJIMA, K.; WATANABE, H. Flumazenil but not FG7142 reverses the decrease in pentobarbital sleep caused by activation of central noradrenergic systems in mice. **Brain Research**, v. 754 (1-2), p. 325-328, 1997.

MBA GACHOU, C.; LAGET, M.; GUIRAUD-DAURIAC, H.; DE MEO, M.; ELIAS, R.; DUMENIL, G. The protective activity of alpha-hederine against H₂O₂ genotoxicity in HepG2 cells by alkaline comet assay. **Mutation Research**, v. 445(1), p. 9-20, 1999.

MEDINA, J.H.; DIAZ, L.E.; PEÑA, C. Chrysin, a naturally occurring monoflavonoid, recognizes benzodiazepine receptors and possesses anticonvulsant properties. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, p. 2227-2232, 1990.

MEDINA, J.H.; DANIELON, J.L.; WASOWSKI, C.; LEVI DE STEIN, M.; PALADINI, A.C. Production of benzodiazepine-like molecules in bovine rumen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 181, p. 1048-1055, 1991.

MEDINA, J.H.; VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; MARDER, M.; WASOWSKI, C.; CALVO, D.; PALADINI, A.C. Overview-Flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. **Neurochemical Research**, v. 22, n. 4, p. 419-425, 1997.

MOLLER, P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 336-345, 2006.

- MOON, Y.J.; WANG, X.; MORRIS, M.E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology In Vitro**, v. 20(2), p. 187-210, 2006.
- MORAZZONI, P. e BOMBARDELLI, E. Valeriana officinalis: traditional use and recent evaluation of activity. **Fitoterapia**, v. 66, n. 2, p. 99-112, 1995.
- MOREHOUSE, L.A.; BANGERTER, F.W.; DENINNO, M.P.; INSKEEP, P.B.; PETTINI, J.L.; SAVOY, Y.E.; SUGARMAN, E.D.; WILKINS, R.W.; WILSON, T.C.; WOODY, H.A.; ZACCARO, L.M.; CHANDLER, C.E. Comparison of synthetic saponin cholesterol absorption inhibitors in rabbits: evidence for a non-stoichiometric, intestinal mechanism of action. **Journal of Lipid Research**, v. 40(3), p. 464-474, 1999.
- MÜLLER, S.D.; VASCONCELOS, S.B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M.W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 399-403, 2005.
- NAKAMURA, J.; HORIMOTO, T.; HIRAYAMA, R.; MUKAI, T.; NAKASHIMA, M.; SASAKI, H.; NISHIDA, K. Effect of the absorption enhancer saponin on the intrarenal distribution of 5-fluorouracil following its kidney surface application in rats. **Biological and Pharmaceutica Bulletin**, v. 26(7), p. 1049-1051, 2003.
- NEUBAUER, D.N. Pharmacologic Approaches for the Treatment of Chronic Insomnia. **Clinical Cornerstone**, v. 5, n. 3, p. 16-23, 2003.
- NEVES, G. **Avaliação farmacológica de novos derivados n-fenilpiperazínicos – LASSBio579 e LASSBio581 – candidatos a protótipos de fármacos dopaminérgicos**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003, 122 p.
- NIELSEN, M.; FROKJAER, S.; BRAESTRUP, C. High affinity of naturally-occurring biflavonoid, amentoflavone, to brain benzodiazepine receptor in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 3285-3287, 1988.
- OGA, S.; DE FREITAS, P. C.; SILVA, A.C.G.; HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Medica**, v. 27, p. 303-306, 1984.
- OKUYAMA, E.; OKAMOTO, Y.; YAMAZAKI, M.; SATAKE, M. Pharmacologically active components of Peruvian medicinal plant, Huanarpo (*Jatropha cillata*, M. Arg). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Japan)**, v. 44, p.333-336, 1996.
- OJIMA, K; MATSUMOTO, K; WATANABE, H. Flumazenil reverses the decrease in the hypnotic activity of pentobarbital by social isolation stress: are endogenous benzodiazepine receptor ligands involved? **Brain Research**, v. 745 (1-2), p. 127-133, 1997.
- OMS. Organização Mundial da Saúde. **WHO monographs on selected medicinal plants**, v. 1, Malta: WHO Graphics, 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, 2005a.

PARK, J.; KIM, S.H.; CHO, D.; KIM, T.S. Formononetin, a phyto-oestrogen, and its metabolites up-regulate interleukin-4 production in activated T cells via increased AP-1 DNA binding activity. **Immunology**, v. 116(1), p. 71-81, 2005b.

PEREIRA, C.A.; YARIWAKE, J.H.; LANCAS, F.M.; WAUTERS, J.N.; TITS, M.; ANGENOT, L. A HPLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, 15(4), 241-248, 2004.

PETRY, R.D.; DE SOUSA, K.C.B.; BASSANI, V.L.; PETROVICK, P.R.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcoólicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 7, n 1/2, p. 7-10, 1998.

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

PHARMACOPEÉ Française. 9^a ed. Moulins – les – Mentz: Maisonneuve, 1976.

PHARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926.

PIETRZAK, B. e KUBIK-BOGUCKA, E. Influence of mianserin on some central effects of ethanol. **Pharmacological Research**, v. 46, p. 47-54, 2002.

POPP, R. e SCHIMMER, O. Induction of sister-chromatid exchanges (SCE), polyploidy, and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte cultures. A comparative study of 19 flavonoids. **Mutation Research**, v. 246(1), p. 205-213, 1991.

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

PROVENSI, G.; FENNER, R.; FORNARI, P.E.; LIEMANN, M.; RATES, S.M.K.; GOSMANN, G. **Avaliação do Efeito de um extrato seco nebulizado de *Passiflora alata* Dryander (PASSIFLORACEAE) em camundongos, no Labirinto em Cruz Elevado**. 2003, XV Salão de Iniciação Científica, UFRGS, Porto Alegre.

RASHOTE, M.E.; PASTUCKOV, I.F.; POLIAKOV, E.R.; HENDERSON, R.P. Vigilance states and body temperature during the circadian cycle in fed and fasted pigeons (*Columba livia*). **The American Journal of Physiology**, v. 275, R1690-R1702, 1998.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RATES, S.M.K. e GOSMANN, G. Pfaffia: ginseng nacional? **Revista AFARGS**, n.10, 2001.

- RATES, S.M.K. e SALLES, L. Medicamentos ansiolíticos. In: SCHENKEL, E.P., PETROVICK, P.R., MENGUE, S. S. (org). **Cuidados com os medicamentos**. 4.^a ed. rev e ampl. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2004, p.200-210.
- RAWLS, S.M.; TALLARIDA, R.J.; KON, D.A.; GELLER, E.B.; ADLER, M.W. GABA_A receptors modulate cannabinoid-evoked hypothermia. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 78, p. 83-91, 2004.
- REGINATTO, F.H.; KAUFFMANN, C.; SCHRIPSEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Steroidal and Triterpenoidal Glucosides from *Passiflora alata*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 1, p. 32-36, 2001.
- REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; SCHRIPSEMA, J.; SCHENKEL, E.P. Assay of quadranguloside, the major saponin of leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. **Phytochemical Analysis**, v. 15, p. 195-197, 2004.
- RODGERS, R.J. e DALVI, A. Anxiety, Defence and the Elevated Plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801-810, 1997.
- ROJAS, E.; LOPEZ, M.C.; MALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 722, p. 225-254, 1999.
- ROSENBERG, R.; CARON, T.; AMATO, D. An assessment of the efficacy and safety of eszopiclone in the treatment of transient insomnia in healthy adults. **Sleep Medicine**, v. 6, p. 15-22, 2005.
- ROTH, T. e ROEHERS, T. Insomnia: Epidemiology, Characteristics, and Consequences. **Clinical Cornerstone**, v. 5, n. 3, p. 5-12, 2003.
- ROWLET, J.K.; TORNATZKI, W.; COOK, J.M.; MA, C.; MICZEK, K.A. Zolpidem, triazolam, and diazepam decrease distress vocalizations in mouse pups: differential antagonism by flumazenil and β -carboline-3-carboxylate-*t*-butyl ester (b-CCT). **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, p. 247-253, 2001.
- RUAN, L.P.; CHEN, S.; YU, B.Y.; ZHU, D.N.; CORDELL, G.A.; QIU, S.X. Prediction of human absorption of natural compounds by the non-everted rat intestinal sac model. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2006.
- SALAH, S.M. e JÄGER, A.K. Two flavonoids from *Artemisia herba-alba* Asso with *in vitro* GABA_A-benzodiazepine receptor activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p. 145-146, 2005.
- SALGUEIRO, J.B.; ARDENGHI, P.; DIAS, M.; FERREIRA, C.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Anxiolytic natural and syntetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 58, n. 4, p. 887-891, 1997.
- SALMI, P. Independent roles of dopamine D₁ and D_{2/3} receptors in rat thermoregulation. **Brain Research** 781: 188-93, 1998.

SALMI, P. e AHLENIUS, S. Evidence for functional interactions between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in rat thermoregulatory mechanisms. **Pharmacology & Toxicology** 82: 122-7, 1998.

SATEIA, M.J. e NOWELL, P.D. Insomnia. **Lancet**, v. 364, p. 1959-1973, 2004.

SAVIC, M.M.; OBRADOVIC, D.I.; UGRESIC, N.D.; COOK, J.M.; YIN, W.; BOKONJIC, D.R. Bidirectional effects of benzodiazepine binding site ligands in the elevated plus-maze: differential antagonism by flumazenil and β -CCT. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 79, 279-290, 2004.

SCALBERT, A. e WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. 130(8S Suppl), p. 2073s-2085s, 2000.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003, 5 ed., rev., p. 711-740.

SCHIMDT, P.C. e GONZÁLEZ ORTEGA, G. Passionsblumenkraut: Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes von *Passiflorae herba*. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 133 (47), p. 4457-4466, 1993.

SCHMITT, U.; LUDDENS, H.; HIEMKE, C. Behavioral analysis indicates benzodiazepine-tolerance mediated by the benzodiazepine binding-site at the GABA_A-receptor. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 25, p. 1145-1160, 2001.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D; GOSMANN, G. Alcalóides Indólicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003., 5 ed., rev., p. 819-846.

SHEN, S.L.; NIELSEN, M.; WITT, M.R.; SERNER, O.; BERGENDORFF, O. Inhibition of [methyl-³H]-diazepam binding to rat brain membranes *in vitro* by dinatin and skrofullein. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 15, p. 385-388, 1994.

SHORTER, E. e TYRER, P. Separation of anxiety and depressive disorders: blind alley in psychopharmacology and classification of disease. **BMJ**, v. 327, p. 158-160, 2003.

SILVA, J. DA; DE FREITAS, T.R.O.; HEUSER, V.; MARINHO, J.R.; BITTENCOURT, F., CERSKI, C.T.S.; KLIEMANN, L.M.; ERDTMANN, B. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. **Mutation Research**, v. 470, p. 39-51, 2000.

SLOTKIN, T. e DISTEFANO, V. Urinary metabolites of harmine in the rat and their inhibition of monoamine oxidase. **Biochemical Pharmacology**, 19, 125-131, 1970.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK,

P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003., 5 ed., rev., p. 289-326.

SOULIMANI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, p. 11-20, 1997.

SPEIT, G.; DENNOG, C.; LAMPI, L. Biological significance of DNA damage induced by hyperbaric oxygen. **Mutagenesis**, v. 13, p. 85-87, 1998.

SPERONI, E.; BILLI, R.; MERCATI, V.; BONCOMPAGNI, E.; TOJA, E. Sedative effects of crude extract of *Passiflora incarnata* after oral administration. **Phytotherapy Research**, v.10, p. 92-94, 1996.

STAHL, S.M. **Essential Psychopharmacology – Neuroscientific Basis and Practical Applications**. 2ed. New York: Cambridge University Press, 2000, cap. 8, p. 297-333.

TACHIKAWA, E.; KUDO, K.; HARADA, K.; KASHIMOTO, T.; MIYATE, Y.; KAKIZAKI, A.; TAKAHASHI, E. Effects of ginseng saponins on responses induced by various receptor stimuli. **European Journal of Pharmacology**, v. 369, n. 1, p. 23-32, 1999.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J-C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

ULUBELEN, A.; OKSUZ, S.; MABRY, T.J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. C-glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia mannii*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 6, p. 783, 1982.

UNE, H.D.; SARVEIYA, V.P.; PAL, S.C.; KASTURE, V.S.; KASTURE, S.B. Nootropic and anxiolytic activity of saponins of *Albizia lebeck* leaves. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 69, p. 439-444, 2001.

VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; LEVI DE STEIN, M.; WOLFMAN, C.; SILVEIRA, R.; DAJAS, F.; MEDINA J.H.; PALADINI, A.C. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. **Planta Medica**, v. 61, p. 213-216, 1994a.

VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; LEVI DE STEIN, M.; WASOWSKI, C.; PEÑA, C.; MEDINA J.H.; PALADINI, A.C. Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tormentosa* (Tiliaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, p. 47-53, 1994b.

VIOLA, H.; MARDER, M.; NUÑES, J.; IZQUIERDO, L.; WASOWSKI, C.; WOLFMAN, C.; ARDENGHI, P.; BARROS, D.; MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C. 6-methyl-3'-bromoflavone, a high-affinity ligand for the benzodiazepine binding site of the GABA_A receptor with some antagonistic properties. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 262, p.643-646, 1999.

VIOLA, H.; MARDER, M.; WASOWSKI, C.; GIORGI, O.; PALADINI, A.C.; MEDINA, J.H. 6,3'-dibromoflavone and 6-nitro-3'-bromoflavone: new additions to the 6,3'-disubstituted flavone family of high-affinity ligands of the brain benzodiazepine binding site with agonistic properties. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 273, p.694-698, 2000a.

VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; MARDER, M.; GOUTMAN, J.D.; BIANCHIN, M.; WASOWSKI, C.; CALVO, D.J.; IZQUIERDO, I.; PALADINI, A.C.; MEDINA, J.H. 6-chloro-3'-nitroflavone is a potent ligand for the benzodiazepine binding site of the GABA_A receptor devoid of intrinsic activity. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 65, n. 2, p. 313-320, 2000b.

WASOWSKI, C.; MARDER, M.; VIOLA, H.; MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C. Isolation of 6-methylapigenin, a competitive ligand for the brain GABA_A receptor from *Valeriana wallichii*. **Planta Medica**, v. 68, p. 934-936, 2002.

WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; PALADINI, A.C.; DAJAS, F.; MEDINA, J.H. A. Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 47, p. 1-4, 1994.

WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; MARDER, M.; WASOWSKI, C.; ARDENGHI, P.; IZQUIERDO, I.; PALADINI, A.C.; MEDINA, J.H. Anxiolytic properties of 6,3'-dinitroflavone, a high-affinity benzodiazepine receptor ligand. **European Journal of Pharmacology**, v. 318, p. 23-30, 1996.

WU, C.F.; LIU, Y.L.; SONG, M.; LIU, W.; WANG, J.H.; LI, X.; YANG, J.Y. Protective effects of pseudoginsenosídeo-F11 on methamphetamine-induced neurotoxicity in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 103-109, 2003.

YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; HARADA, E.; MURAKAMI, N.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. Bioactive saponins and glycosides. VI. Elatosides A and B, potent inhibitors of ethanol absorption, from the bark of *Aralia elata* SEEM. (Araliaceae): the structure-requirement in oleanolic acid glucuronide-saponins for the inhibitory activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 44(10), p. 1915-1922, 1996.

YUNES, R.A. e FILHO, V.C. Breve Análise Histórica da Química das Plantas Medicinais: Sua Importância na Atual Conceção de Fármaco Segundo os Paradigmas Ocidental e Oriental. In: YUNES, R.A. e CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 17-44.

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

ZIN'KOVSKAIA, L.IA.; DOLZHENKO, A.T.; KOMISSAROV, I.V. Harman-induced changes in the anxiolytic effect of diazepam. **Farmakologiya i Toksikologiya**, v. 48(2), p. 21-23, 1985.

9. ANEXOS

ANEXO 1:

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



FACULDADE DE FARMÁCIA - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Avenida Ipiranga, 2752 - CEP 91.610-000 - Porto Alegre, RS - Brasil
Fone Secretaria: (51) 3316-5090 - Fax: (51) 3316-5437 - e-mail: factar@farmacia.ufrgs.br

Porto Alegre, 25 de outubro de 2005

Ilmo. Sr.
Dr. José Roberto Goldim
M.D. Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
PROPESQ/UFRGS

Senhor Coordenador,

Estamos encaminhando um termo aditivo ao Projeto "Estudo pré-clínico e clínico do efeito ansiolítico de *Passiflora alata* Curtis" (Cadastro 2005453). Este refere-se à alteração no ensaio clínico proposto. Assim, os questionamentos referentes ao ensaio clínico para avaliação do efeito sobre a ansiedade induzida, anteriormente apresentado, não foram respondidas, pois o mesmo não será no âmbito deste projeto. O que propomos agora é a realização de um ensaio clínico para avaliação sobre a qualidade do sono. Este estudo está também em avaliação no Comitê de Ética do HCPA (Projeto 05304). Todo o protocolo pré-clínico aprovado no parecer CEP-UFRGS de 18.08.2005 permanece o mesmo.

Atenciosamente,


Stela Máris Kuze Rates
Pesquisador Responsável

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

Número : 2005453

Título : Estudo pré-clínico e clínico do efeito ansiolítico de Passiflora alata Curtis (Passifloraceae)

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
STELA MARIS KUZE RATES	PESQ RESPONSÁVEL	ratessmk@farmacia.ufrgs.br	33165313
FLAVIO PEREIRA KAPCZINSKI	PESQUISADOR	kapcz@zaz.com.br	33168413
RAQUEL FENNER	PESQUISADOR	raquelfenner@yahoo.com.br	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 43 , ata nº 64 , de 24/11/2005 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, segunda-feira, 28 de novembro de 2005



José Roberto Goldim
Coordenador do CEP-UFRGS

ANEXO 2:

Planejamento do ensaio clínico para avaliação do extrato seco nebulizado de *Passiflora alata* (PA) sobre a qualidade de sono em voluntários sadios

PLANEJAMENTO DO ENSAIO CLÍNICO PARA AVALIAÇÃO DO EXTRATO SECO NEBULIZADO DE *Passiflora alata* (PA) SOBRE A QUALIDADE DE SONO EM VOLUNTÁRIOS SADIOS

O planejamento do estudo clínico foi realizado em paralelo aos ensaios pré-clínicos. No entanto, o ensaio clínico foi suspenso em razão dos resultados observados no teste de genotoxicidade, que demonstraram que o extrato seco nebulizado de *P. alata* (PA) provocou danos no DNA.

Preparação das cápsulas

Para a administração em humanos, foram preparadas cápsulas de gelatina dura, contendo aproximadamente 330 mg de extrato seco nebulizado das partes aéreas de *P. alata*, com teor definido de flavonóides, segundo descrito por PETRY *et al.* (1998).

Determinação do peso médio das cápsulas

A determinação do peso médio das cápsulas foi realizada conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira 4^a edição. Foram pesadas, individualmente, 20 cápsulas, e determinado o peso médio. Após, foi verificada a variação dos pesos individuais em relação ao peso médio, de acordo com os limites estabelecidos pela Farmacopéia.

Resultado: o peso médio determinado para as cápsulas preenchidas com PA foi de 460,5 mg. A Farmacopéia Brasileira estabelece, para peso médio acima de 300 mg, um limite de variação de 7,5%. Portanto, analisando a variação dos pesos individuais em relação ao peso médio das cápsulas preenchidas com PA, nenhuma das 20 cápsulas avaliadas ultrapassou o limite estabelecido. Esses resultados indicaram uniformidade de conteúdo para as cápsulas que seriam utilizadas no ensaio clínico.

Determinação do tempo de desintegração das cápsulas

Para a realização deste teste foi utilizado aparelho de desintegração acoplado ao motor J. ENGELSMANN modelo JEL-70. Foram utilizadas 6 cápsulas no teste. Cada cápsula foi colocada em cada um dos seis tubos da cesta, a qual possuía uma tela com abertura de 2 mm, de arame de aço inoxidável, adaptada à sua tampa. O líquido de imersão utilizado foi água destilada, mantida a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O tempo de desintegração das cápsulas foi registrado, durante o período de 45 minutos, conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição.

Resultado: o tempo médio registrado para a desintegração das cápsulas preenchidas com PA foi de 11,5 minutos. De acordo com a Farmacopéia Brasileira, todas as cápsulas deveriam estar completamente desintegradas no intervalo de 45 minutos. Portanto, o tempo médio de desintegração atende às exigências da Farmacopéia.

Contagem de microrganismos viáveis em produtos que não necessitam cumprir com teste de esterilidade

Este método é capaz de determinar o número total de bactérias e fungos presentes em produtos e matérias-primas não estéreis. Para isso, foram utilizadas 6 cápsulas preenchidas com PA. Estas cápsulas foram abertas e seu conteúdo dissolvido em água peptonada (Farm Bras IV), na proporção 1:10 (m/V). A partir dessa diluição, foram realizadas diluições subseqüentes (1:100), (1:1000), (1:10000) e (1:100000).

Para a realização dos testes, foram adicionados 15 mL dos meios de cultura (Ágar Caseína-soja ou Ágar Sabouraud-dextrose), em cada placa de Petri. Após solidificação dos meios, foi adicionado 1 mL de cada diluição, em duplicata. Em outras duas placas, foram colocados 15 mL de cada meio de cultura sem amostras (brancos). As placas contendo o meio Ágar Sabouraud-dextrose (Farm Bras IV), para a contagem de fungos, foram incubadas em estufa a $20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 7 dias. As placas que continham o meio Ágar Caseína-soja (Farm Bras IV), para posterior contagem de bactérias, foram incubadas em estufa a $30\text{-}35\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 4 dias. A

contagem das colônias foi realizada utilizando contador de colônias com iluminação artificial controlada e lupa apropriada.

Resultado: as amostras testadas não apresentaram contaminação importante e, portanto, não foi necessária a realização do cálculo das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Avaliação de PA sobre a qualidade do sono em voluntários sadios utilizando o teste de polissonografia

Participantes

O número de participantes estudados foi estimado em 11, considerando um tamanho de efeito padronizado igual a 1 para o desfecho “latência para o sono”, nível de significância de 0,05 e poder do teste de 90% (ROSENBERG *et al.*, 2005). O cálculo foi realizado utilizando-se o programa PEPI, com assessoria estatística do HCPA. Entretanto, o tamanho amostral seria de 14 participantes, definido a partir de exigência na legislação brasileira que preconiza este número de indivíduos como número mínimo para a realização de ensaios clínicos para avaliação da eficácia de fitoterápicos (Portaria nº 116, 1996).

O trabalho seria um estudo *cross-over*, randomizado e duplo-cego, em que os participantes receberiam tanto placebo quanto o tratamento com PA. O estudo seria realizado em duas fases. A primeira fase (piloto) incluiria 5 indivíduos e após uma primeira inspeção destes dados seriam incluídos os 9 indivíduos restantes.

Os voluntários seriam selecionados após realização de entrevistas. Nestas entrevistas, os indivíduos responderiam a questionários que abordassem os critérios de inclusão e exclusão para a participação no ensaio (Anexos 4 e 5).

Critérios de Inclusão

Seriam selecionados homens adultos, sadios, de 18 a 35 anos de idade, com índice de massa corporal (IMC) de no mínimo 16 e no máximo 30 kg/m², de

diferentes níveis de escolaridade. Os voluntários seriam convidados a participar do estudo através de chamadas no jornal e cartazes fixados no HCPA, Unidade Básica de Saúde Santa Cecília e Campi da UFRGS.

Após a seleção, os voluntários seriam esclarecidos oralmente e através da leitura do Termo de Consentimento Informado (Anexo 3) sobre os procedimentos a que seriam submetidos. O Termo de Consentimento Informado seria assinado pelos voluntários que aceitariam participar do estudo, antes do início do mesmo.

Os voluntários receberiam instruções dos procedimentos que deveriam tomar no dia do ensaio, tais como: não ingerir álcool, não tomar café, chimarrão ou outras bebidas contendo cafeína, não utilizar qualquer tipo de medicamento e evitar exercícios físicos exaustivos, nas 6 horas anteriores ao ensaio.

Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão utilizados seriam: utilização de psicofármacos, alcoolismo e tabagismo. Também seriam excluídos do estudo: indivíduos que freqüentemente viajassem por longas horas, trabalhassem durante a noite, que já tivessem dormido em um laboratório de sono e indivíduos com sintomas de insônia primária, que seria confirmada através de entrevistas utilizando o Índice de Qualidade do Sono Pittsburgh – anexo 5 (BUYSSE *et al.*, 1988).

Procedimentos

O estudo seria conduzido em 3 noites para cada participante, com intervalo de uma semana entre as noites. A primeira noite seria de adaptação do participante às condições do laboratório; na segunda noite e terceira noites seriam testados os tratamentos placebo e PA.

O tratamento placebo seria constituído de cápsulas preenchidas com celulose microcristalina. O tratamento PA seria constituído pela administração única de três cápsulas contendo aproximadamente 330 mg de PA, caracterizando uma dose de

1000 mg de PA por indivíduo. Esta posologia foi definida levando-se em consideração a posologia preconizada pela Comissão E para extratos secos de *P. incarnata* (900 – 1200 mg/dia) (BLUMENTHAL *et al.*, 2000).

Neste ensaio seriam medidas: a latência para persistir no sono, definida como tempo de sono de no mínimo 10 minutos ininterruptos; tempo total de sono; eficiência do sono; número de microdespertares; e arquitetura do sono, ou seja, tempo de sono nos estágios 1, 2, 3 e 4 do sono NREM e tempo de sono REM (ROSENBERG *et al.*, 2005).

Registros polissonográficos

A polissonografia seria realizada em polissonógrafo digital de 64 canais Nihon-Kohden (Neurofax®) com software de análise do sono Polysmith (Neurotronics®).

Referências Bibliográficas

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal Medicine – Expanded Commission E Monographs**. Newton: American Botanical Council, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. SVS. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 116, de 08/08/1996. Diário Oficial da União, de 12/08/1996.

BUYSSE, D.J.; REYNOLD, C.F.; MANK, T.H.; BERMAN, S.R.; KUPFER, D.J. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and psychiatric research. **Psychiatry Research**, v. 28. p. 193-213, 1998.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda, 1988.

PETRY, R.D.; DE SOUSA, K.C.B.; BASSANI, V.L.; PETROVICK, P.R.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcoólicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 7, n 1/2, p. 7-10, 1998.

ROSENBERG, R.; CARON, T.; AMATO, D. An assessment of the efficacy and safety of eszopiclone in the treatment of transient insomnia in healthy adults. **Sleep Medicine**, v. 6, p. 15-22, 2005.

ANEXO 3:

Termo de Consentimento Informado aprovado pelo
Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA

ANEXO 1

Termo de Consentimento Informado

Esta é uma pesquisa para verificar a atividade sedativa (para dormir) de um extrato vegetal; a pesquisa faz parte da Dissertação de Mestrado da Farmacêutica Raquel Fenner, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, sob orientação da Dra. Stela M. K. Rates e do Dr. Flávio Kapczinski. Antes desta pesquisa, este extrato foi avaliado nos protocolos necessários para determinação de sua segurança e este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Inicialmente, você será convidado a participar de uma entrevista, na qual responderá a um questionário sobre seus hábitos de vida, sua saúde e de sua família. Se você preencher os critérios para participar da pesquisa, será convidado a retornar para os próximos procedimentos, que serão os seguintes: você dormirá por três noites no Laboratório do Sono do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Na primeira noite, apenas dormirá e terá seu sono registrado. Nas duas noites seguintes, antes de dormir tomará duas cápsulas contendo o extrato ou uma formulação placebo (que não contém o extrato) e terá seu sono registrado. Entre cada noite haverá um intervalo de uma semana.

Esta pesquisa é considerada como de risco mínimo para a sua saúde. Na hipótese da ocorrência de algum desconforto decorrente da utilização deste produto, ou da exposição ao teste, fica garantido o recebimento de assistência adequada e a possibilidade de desistência do estudo. O inconveniente a que você será exposto será o tempo despendido durante as entrevistas (cerca de trinta minutos) e durante as noites do teste, além de um eventual desconforto relativo aos procedimentos necessários para o registro do sono. A participação no estudo é voluntária e não remunerada. Seu nome será removido do material do teste, logo após o término do estudo, sendo garantido seu anonimato. As informações serão utilizadas apenas para este estudo e somente os resultados referentes ao grupo serão relatados e não resultados individuais. Se você tiver dúvida sobre essa pesquisa, poderá contatar os pesquisadores em qualquer momento.

Eu, _____, portador da carteira de identidade nº _____, fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa da pesquisa, de forma clara e detalhada. Não fui alvo de qualquer método de coerção e recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, dos riscos previstos e dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, sem que isto traga prejuízo a minha pessoa. Fui informado de que caso existam danos à minha pessoa ou saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei facilitado meu acesso a tratamento médico adequado.

Assinatura do voluntário

Assinatura dos pesquisadores

Assinatura da testemunha

Local e data

Pesquisadores Responsáveis: Flávio Kapczinski, Stela M. K. Rates, Susana V. Schonwald, Raquel Fenner.

Endereço do Pesquisador: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Av. Ramiro Barcellos 2350, Porto Alegre -RS

Fone: (51) 99641096/ (51) 99177029/ (51) 98099628/ (51) 96414740

HOSPITAL DE CLÍNICAS
VERIFICAÇÃO ALIQUOTA
04/11/10b

GPPG
EXEMPLO 29/15
05-304

ANEXO 4:

Check List



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Av. Ipiranga, 2752 - 1º andar - P. Alegre, RS, 90610-000
Fone (051) 3165243 - Fax (051) 3165437
CPGCF@FARMACIA.UFRGS.BR

PPGCF



CHECK LIST

NOME:
ALTURA:

IDADE:
PESO:

DATA:

1. Você tem algum problema de saúde? S() N ()

Se sim, qual?

(Se não, questionar sobre problemas de diabetes, hipertensão, depressão, ansiedade, transtorno bipolar... com a pessoa e com a família)

2. Você é portador de alguma doença psiquiátrica? Qual? S() N ()

3. Você faz uso de algum medicamento? S() N ()

Se sim, qual? (não precisa ser diariamente)

4. Você é fumante? S() N ()

5. Com que frequência você ingere bebidas alcoólicas e/ou outra droga?

Alguma vez sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida ou parar de beber? S() N ()

As pessoas o(a) incomodam porque reclamam do seu modo de beber? S() N ()

Você se sente culpado(a) pela maneira com que costuma beber? S() N ()

Você bebe pela manhã para diminuir o nervosismo ou a ressaca? S() N ()

6. Você trabalha de madrugada? S() N ()

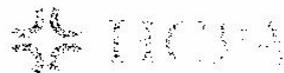
7. Costuma estudar de madrugada? S() N ()

8. Seu trabalho ou estudo envolve viagens frequentes? Quanto tempo em média duram suas viagens? S() N ()

9. Você já participou de algum ensaio clínico em um laboratório de sono? S() N ()

ANEXO 5:

Índice de Qualidade de Sono de Pittsburgh (IQSP)



ÍNDICE DE QUALIDADE DE SONO DE PITTSBURGH (IQSP)

Nome:

Registro:

Idade:

Data:

Instruções:

As seguintes perguntas são relativas aos seus hábitos usuais de sono durante o último mês **somente**. Suas respostas devem indicar a lembrança mais exata da **maioria** dos dias e noites no último mês. Por favor, responda todas as perguntas:

1. Durante o último mês, quando você foi geralmente para a cama à noite?
Hora usual de deitar _____
2. Durante o último mês, quanto tempo (em minutos) você geralmente levou para dormir cada noite?
Número de minutos _____
3. Durante o último mês, quando você geralmente levantou de manhã?
Hora usual de levantar _____
4. Durante o último mês, quantas horas de real sono você teve à noite? (este pode ser diferente do número de horas que você ficou na cama).
Horas de sono por noite _____

Para cada uma das questões restantes, marque a melhor (uma) resposta. Por favor, responda a todas as questões.

5. Durante o último mês, com que frequência você teve dificuldade de dormir porque você...
 - (a) não consegue dormir em até 30 minutos
nenhuma no último mês _____ uma ou duas vezes/semana _____
menos de uma vez/semana _____ três ou mais vezes/semana _____
 - (b) acorda no meio da noite ou de manhã cedo
nenhuma no último mês _____ uma ou duas vezes/semana _____
menos de uma vez/semana _____ três ou mais vezes/semana _____
 - (c) precisa levantar para ir ao banheiro
nenhuma no último mês _____ uma ou duas vezes/semana _____
menos de uma vez/semana _____ três ou mais vezes/semana _____
 - (d) não consegue respirar confortavelmente

- nenhuma no último mês _____
 menos de uma vez/semana _____
- uma ou duas vezes/semana _____
 três ou mais vezes/semana _____
- (e) tosse ou ronco forte
 nenhuma no último mês _____
 menos de uma vez/semana _____
- uma ou duas vezes/semana _____
 três ou mais vezes/semana _____
- (f) sente muito frio
 nenhuma no último mês _____
 menos de uma vez/semana _____
- uma ou duas vezes/semana _____
 três ou mais vezes/semana _____
- (g) sente muito calor
 nenhuma no último mês _____
 menos de uma vez/semana _____
- uma ou duas vezes/semana _____
 três ou mais vezes/semana _____
- (h) teve sonhos ruins
 nenhuma no último mês _____
 menos de uma vez/semana _____
- uma ou duas vezes/semana _____
 três ou mais vezes/semana _____
- (i) tem dor
 nenhuma no último mês _____
 menos de uma vez/semana _____
- uma ou duas vezes/semana _____
 três ou mais vezes/semana _____
- (j) outra(s) razão(ões), por favor descreva _____

Com que frequência, durante o último mês, você teve dificuldade para dormir devido a essa razão?

- nenhuma no último mês _____
 menos de uma vez/semana _____
- uma ou duas vezes/semana _____
 três ou mais vezes/semana _____
6. Durante o último mês, como você classificaria a qualidade do seu sono de uma maneira geral?
- Muito boa _____ Ruim _____
 Boa _____ Muito ruim _____
7. Durante o último mês, com que frequência você tomou medicamento (prescrito ou "por conta própria") para lhe ajudar a dormir?
- nenhuma no último mês _____
 menos de uma vez/semana _____
- uma ou duas vezes/semana _____
 três ou mais vezes/semana _____
8. No último mês, com que frequência você teve dificuldade de ficar acordado enquanto dirigia, comia ou participava de uma atividade social (festa, reunião de amigos, ...)?
- nenhuma no último mês _____
 menos de uma vez/semana _____
- uma ou duas vezes/semana _____
 três ou mais vezes/semana _____
9. Durante o último mês, quão problemático tem sido para você manter o entusiasmo para fazer as coisas?
- nenhuma dificuldade _____
 somente um problema muito leve _____
- um problema razoável _____
 um problema muito grande _____

ANEXO 6:

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 05-304

Versão do Projeto: 16/09/2005

Versão do TCLE: 16/09/2005

Pesquisadores:

FLAVIO KAPCZINSKI

STELA MARIS KUZE RATES

SUZANA VEIGA SCHONWALD

GRACE GOSMANN

ANDRESSA HEEMANN BETTI

RAQUEL FENNER

KEILA MARIA MENDES CERESER

Título: ENSAIO CLÍNICO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEDATIVA DE UM EXTRATO SECO NEBULIZADO DE PASSIFLORA ALATA (PASSIFLORACEAE)

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 04 de janeiro de 2006.

Profª Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

ANEXO 7:

Resultados dos Exames Histopatológicos de coração, fígado, rins e pulmões de ratos wistar machos, tratados com PA e SAL durante 14 dias (Grupo A – PA 300 mg/kg; Grupo B – solução salina (SAL) 1 mL/kg)



Faculdade Veterinária
Departamento de Patologia Clínica Veterinária
Setor de Patologia Veterinária
Telefone: 51 3316-6107
Fax: 3316-6116
E-mail: setpatvet@ufrgs.br

Resultado de exame histopatológico

Porto Alegre, 23 de setembro de 2005.

AP-1787-05

Ficha: A2

Espécie: Roedora

Raça: Rato

Nome: NI

Sexo: NI

Idade: NI

Proprietário: Faculdade de Farmácia

Telefone: NI

Endereço: NI

Veterinário: Professora Stela

Raquel Fenner

E-mail: NI

Telefone: NI

Plantonista:

Data do recebimento: 24/06/2005

Material enviado: Pulmão, coração, rim e fígado.

Histórico:

Descrição histológica: Pulmão: presença de macrófagos alveolares nos alvéolos. Perivascularite mononuclear moderada. Pneumonia mononuclear moderada. Enfisema de bordos. Fígado, rim e coração: sem alteração.

Diagnóstico: Pneumonia intersticial.

Prof. David Driemeier.
CRMV-RS 5756



Faculdade Veterinária
Departamento de Patologia Clínica Veterinária
Setor de Patologia Veterinária
Telefone: 51 3316-6107
Fax: 3316-6116
E-mail: seipatvet@ufrgs.br

Resultado de exame histopatológico

Porto Alegre, 23 de setembro de 2005.

AP-1789-05

Ficha: A7
Espécie: Roedora
Raça: Rato
Nome: NI
Sexo: NI
Idade: NI
Proprietário: Faculdade de Farmácia
Telefone: NI

Endereço: NI
Veterinário: Professora Stela Raquel Fenner
E-mail: NI
Telefone: NI
Plantonista:
Data do recebimento: 24/06/2005
Material enviado: Pulmão, coração, rim e fígado

Histórico:

Descrição histológica: Pulmão: Pneumonia intersticial discreta mononuclear e enfisema de bordos. Fígado, rim e coração: sem alteração.

Diagnóstico: Inconclusivo.

Prof. David Driemeier,
CRMV-RS 5756



Faculdade Veterinária
Departamento de Patologia Clínica Veterinária
Setor de Patologia Veterinária
Telefone: 51 3316-6107
Fax: 3316-6116
E-mail: setpatvet@ufrgs.br

Resultado de exame histopatológico

Porto Alegre, 23 de setembro de 2005.

AP-1788-05

Ficha: A5
Espécie: Roedora
Raça: Rato
Nome: NI
Sexo: NI
Idade: NI
Proprietário: Faculdade de Farmácia
Telefone: NI

Endereço: NI
Veterinário: Professora Stela e Raquel
Fenner
E-mail: NI
Telefone: NI
Plantonista:
Data do recebimento: 24/06/2005
Material enviado: Pulmão, coração, rim e
fígado

Histórico:

Descrição histológica: Pulmão: enfisema de bordos e hemorragias focais peribronquiais. Hiperplasia linfóide peribronquiolar. Fígado, rim e coração: sem alteração.

Diagnóstico: Inconclusivo.

Prof. David Driemeier.
CRMV-RS 5756



Faculdade Veterinária
Departamento de Patologia Clínica Veterinária
Setor de Patologia Veterinária
Telefone: 51 3316-6107
Fax: 3316-6116
E-mail: setpatvet@ufrgs.br

Resultado de exame histopatológico

Porto Alegre, 23 de setembro de 2005.

AP-1790-05

Ficha: B1 controle
Espécie: Roedora
Raça: Rato
Nome: NI
Sexo: NI
Idade: NI
Proprietário: Faculdade de Farmácia
Telefone: NI

Endereço: NI
Veterinário: Professora Stela e Raquel
Fenner
E-mail: NI
Telefone: NI
Plantonista:
Data do recebimento: 24/06/2005
Material enviado: Pulmão, coração, rim e fígado

Histórico

Descrição histológica: Pulmão: hiperplasia linfóide peribronquiolar. Fígado, rim e coração: sem alteração.

Diagnóstico: Inconclusivo.

Prof. David Driemeier.
CRMV-RS 5756



Faculdade Veterinária
Departamento de Patologia Clínica Veterinária
Setor de Patologia Veterinária
Telefone: 51 3316-6107
Fax: 3316-6116
E-mail: setpatvet@ufrgs.br

Resultado de exame histopatológico

Porto Alegre, 23 de setembro de 2005.

AP-1791-05

Ficha: B4 controle
Espécie: Roedora
Raça: Rato
Nome: NI
Sexo: NI
Idade: NI
Proprietário: Faculdade de Farmácia
Telefone: NI

Endereço: NI
Veterinário: Professora Stela e Raquel Fenner
E-mail: NI
Telefone: NI
Plantonista:
Data do recebimento: 24/06/2005
Material enviado: Pulmão, coração, rim e fígado

Histórico:

Descrição histológica: Pulmão: áreas focais de hemorragia. Fígado: Tumefação de hepatócitos (glicogênio). Rim e coração: sem alteração.

Diagnóstico: Inconclusivo.

Prof. David Driemeier.
CRMV-RS 5756



Faculdade Veterinária
Departamento de Patologia Clínica Veterinária
Setor de Patologia Veterinária
Telefone: 51 3316-6107
Fax: 3316-6116
E-mail: setpatvet@ufrgs.br

Resultado de exame histopatológico

Porto Alegre, 23 de setembro de 2005.

AP-1792-05

Ficha: B6 controle
Espécie: Roedora
Raça: Rato
Nome: NI
Sexo: NI
Idade: NI
Proprietário: Faculdade de Farmácia
Telefone: NI

Endereço: NI
Veterinário: Professora Stela e Raquel
Fenner
E-mail: NI
Telefone: NI
Plantonista:
Data do recebimento: 24/06/2005
Material enviado: Pulmão, coração, rim e
fígado

Histórico:

Descrição histológica: Pulmão: hiperplasia peribronquiolar discreta. Fígado, rim e coração: sem alteração.

Diagnóstico: Inconclusivo.

Prof. David Driemeier.
CRMV-RS 5756