

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

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DE *Passiflora alata*  
Curtis (PASSIFLORACEAE)**

**GUSTAVO PROVENSI**

**PORTO ALEGRE, ABRIL DE 2007.**



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

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DE *Passiflora alata*  
Curtis (PASSIFLORACEAE)

Dissertação apresentada por **Gustavo Provensi**  
para obtenção do GRAU DE MESTRE  
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dra. Stela Maris Kuze Rates  
Co-orientadora: Prof. Dra. Grace Gosmann

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 10.04.2007, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Daniela Martí Barros  
Função Universidade Federal de Rio Grande

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

Profa. Dra. Raquel Bridi  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

P969i Provensi, Gustavo

Investigação da atividade ansiolítica de passiflora alata curtis (passifloraceae) / Gustavo Provensi – Porto Alegre : UFRGS, 2007. - xvii, 135 p.: il., gráf., tab.

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

1. Atividade ansiolítica. 2. Passiflora alata. 3. Passifloraceae. 4. Maracujá. I. Rates, Stela Maris Kuze. II. Gosmann, Grace. III. Título.

CDU: 615.322:582.842.7

Bibliotecárias responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Fitoquímica (105) e Psicofarmacologia (503) do Departamento de Produção de Matéria-Prima da Faculdade de Farmácia da UFRGS através de bolsa de estudos do CNPq, e no *Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas da Facultad de Farmácia y Bioquímica da Universidad de Buenos Aires*, Buenos Aires, Argentina, com fundos da *International Brain Research – LatinAmerican Regional Committee*.



**“A ciência não pode resolver o mistério final da natureza. E isto porque, em última análise, somos parte do mistério que tentamos resolver.”**

Max Planck





## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra Stela Maris Kuze Rates, pela orientação, amizade, apoio, conversas, conselhos, gargalhadas, discussões e elucubrações, enfim, ainda que não concordemos em todos aspectos, um dos resultados dessa convivência e aprendizado está materializado nessa dissertação.

À Profa. Dra. Grace Gosmann, minha orientadora desde que comecei a trabalhar com pesquisa no laboratório de Fitoquímica, e co-orientadora desse trabalho, pelo apoio e incentivo que fizeram com que eu chegasse até aqui.

À Dra. Mariel Marder e a Cristina Wasowski, pelo auxílio, amizade, confiança e carinho durante o estágio no *Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas*. Agradecimentos também aos amigos Dr. Sebastián Fernández e o doutorando Leonardo Loscalzo, pelo auxílio nos experimentos *in vitro*, discussões sobre o trabalho e também pela “*joda*” na noite portenha.

Ao Dr. François Noel e Doutoranda Daniela Valentim de Souza Lopes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela colaboração nos experimentos de radioligação.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fitoquímica: Si Quintana, Juli, Anna e Andresa, sempre ouvindo meus desabafos e devaneios durante a roda de chimarrão matinal. Everton e Fernanda (ou Ferzinha BG, para os íntimos), que trabalharam intensamente no projeto *Passiflora*. Agradecimentos especiais à “mãe emprestada”, Si Gnoatto, pelo carinho e amizade, além das sessões de terapia durante as caminhadas no Gasômetro ou Redenção e a Carla Kauffmann, com quem descobri os desafios da ciência.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Psicofarmacologia: Andresa, Keka e Cássia, pois juntos dividimos as dificuldades e sucessos do trabalho com *Passiflora*. Alice, Gilda e Léo, pelo apoio moral, amizade e companheirismo que começa na bancada do laboratório e se estende até uma mesa de bar na Cidade Baixa. A Mari, Sheila e Camila que estão conosco há pouco tempo, mas sempre dispostas a ajudar. Ana Paula e Michele (Meiguxa) que mesmo não sendo mais colegas no laboratório, continuam sendo grandes amigas.

Cris, Agus, Felipe (Jurema), Alfredo, Laura, Maria Alejandra, Federico, amigos bonaerenses, por toda ajuda, pela paciência de ensinar *castellano*, pelos bons momentos, e é claro, pelas festas que fizemos juntos em Buenos Aires.

Aos meus pais, Rosalina e Luiz, por sempre acreditarem em mim, pelo apoio incondicional, pelo carinho e incentivo em todas minhas decisões. Grande parte do que sou hoje, devo ao exemplo que recebi de vocês. À Mana e o Gilmar também pelo apoio que sempre me deram. Amo todos vocês!

Por fim, a todos meus amigos que souberam compartilhar momentos bons e ruins, ou apenas me escutar quando precisava desabafar, mesmo sem nada entender

A todos vocês, um brinde ao nosso sucesso!



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT .....	xvii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. OBJETIVOS .....	09
3. REVISAO.....	13
3.1 <i>Passiflora alata</i> Curtis (PASSIFLORACEAE) .....	15
3.1.1 Aspectos Botânicos .....	15
3.1.2 Constituição Química.....	16
3.1.3 Dados farmacológicos para o gênero <i>Passiflora</i> .....	18
3.1.3.1 Atividade sobre o Sistema Nervoso Central .....	18
3.1.3.2 Atividade antioxidante.....	24
3.1.3.3 Atividade antiinflamatória.....	25
3.1.3.4 Atividade cicatrizante.....	26
3.1.3.5 Atividade antimicrobiana.....	26
3.1.3.6 Ação sobre o sistema respiratório .....	27
3.1.3.7 Atividade anti-hipertensiva.....	27
3.1.3.8 Efeito hipolipemiante .....	27
3.1.3.9 Outras atividades.....	28
3.1.3.10 Toxicidade .....	29
3.2 Flavonóides e Ansiedade .....	29
3.3 Saponinas e Ansiedade.....	50
3.4 Alcalóides $\beta$ -carbolínicos e o Sistema Nervoso Central .....	53
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1 Material vegetal .....	59
4.2 Material biológico.....	59
4.3 Fármacos, drogas e solventes.....	59
4.4 Preparação dos extratos .....	60
4.5 Obtenção das frações a partir do extrato aquoso.....	60
4.6 Experimentos Comportamentais .....	61
4.6.1 Tratamentos .....	62

4.6.2 Avaliação da atividade ansiolítica – Labirinto em cruz elevado .....	64
4.6.3 Teste de potenciação do sono barbitúrico .....	65
4.6.4 Avaliação da atividade locomotora espontânea .....	65
4.6.5 Avaliação da coordenação motora em aparelho de <i>rota-rod</i> .....	66
4.6.6 Proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol .....	66
4.7 Investigação do envolvimento do sistema benzodiazepínico/GABAérgico no efeito ansiolítico .....	67
4.7.1 Antagonismo da atividade ansiolítica no labirinto em cruz elevado .....	67
4.7.2 Ensaios neuroquímicos .....	68
4.7.2.1 Preparação das membranas sinaptossomais .....	69
4.7.2.2 Deslocamento da radioligação de [ <sup>3</sup> H]-flunitrazepam .....	69
4.7.2.3 Deslocamento da radioligação de [ <sup>3</sup> H]-TBOB .....	70
4.8 Análise Estatística .....	71
4.10 Ética.....	71
5. RESULTADOS .....	73
5.1 Obtenção dos extratos e purificação da fração enriquecida em flavonóides e fração enriquecida em saponinas a partir do extrato aquoso de <i>P. alata</i> .....	75
5.2 Experimentos Comportamentais .....	76
5.2.1 Avaliação da atividade ansiolítica – Labirinto em cruz elevado .....	76
5.2.1 Potenciação do sono barbitúrico .....	80
5.2.2 Avaliação da atividade locomotora espontânea .....	81
5.2.3 Avaliação da coordenação motora em aparelho <i>rota-rod</i> .....	82
5.2.4 Proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol .....	85
5.4 Investigação do envolvimento do sistema benzodiazepínico/GABAérgico no efeito ansiolítico .....	86
5.4.1 Antagonismo da atividade ansiolítica do extrato hidroetanólico (70%) de <i>P. alata</i> no labirinto em cruz elevado. ....	86
5.4.2 Deslocament da radioligação de [3H]-flunitrazepam em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos .....	89
5.4.3 Deslocamento da radioligação de [3H]-TBOB em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos .....	90
6. DISCUSSÃO .....	91
7. CONCLUSÕES .....	105
8. REFERÊNCIAS .....	109
9. ANEXO .....	133

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estruturas dos flavonóides descritos para <i>P. alata</i> .....	17
<b>Figura 2:</b> Estruturas das saponinas descritas para <i>P. alata</i> . ....	18
<b>Figura 3:</b> Estruturas químicas de alguns núcleos básicos de flavonóides .....	30
<b>Figura 4:</b> Esquema utilizado para obtenção e purificação da fração enriquecida em flavonóides (FLA) e fração enriquecida em saponinas (SAP) a partir do extrato aquoso das folhas de <i>P. alata</i> .....	61
<b>Figura 5:</b> Esquema empregado para avaliação do efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado, em camundongos.. ....	64
<b>Figura 6:</b> Esquema empregado para avaliação do efeito sobre o tempo de sono barbitúrico (pentobarbital sódico, 40 mg/kg, i.p.) em camundongos.....	65
<b>Figura 7:</b> Esquema empregado para avaliação da atividade motora em caixa de locomoção em camundongos. ....	65
<b>Figura 8:</b> Esquema empregado para avaliação da coordenação motora em aparelho <i>rota-rod</i> em camundongos.....	66
<b>Figura 9:</b> Esquema empregado no teste de proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.) em camundongos. ....	67
<b>Figura 10:</b> Esquema empregado para avaliação do envolvimento do receptor benzodizépínico no efeito ansiolítico do extrato hidroetanólico (70%) de <i>P. alata</i> no labirinto em cruz elevado, em camundongos.....	68
<b>Figura 11:</b> Cromatogramas do extrato aquoso, extrato hidroetanólico e das frações enriquecidas em saponinas e flavonóides de <i>P. alata</i> .....	75
<b>Figura 12:</b> Efeito da fração de saponinas (SAP 300, 600 e 900 mg/kg) e fração de flavonóides (FLA 300 mg/kg) obtidas a partir do extrato aquoso de <i>P. alata</i> no labirinto em cruz elevado. ....	76
<b>Figura 13:</b> Efeito do extrato hidroetanólico 70% de <i>P. alata</i> (EXT 150, 300 e 600 mg/kg) no labirinto em cruz elevado. ....	78
<b>Figura 14:</b> Efeito da fração de saponinas (SAP 300, 600 e 900 mg/kg) e fração de flavonóides (FLA 300 mg/kg) obtidas do extrato aquoso de <i>P. alata</i> no teste de coordenação motora em aparelho <i>rota-rod</i> . Parâmetro: maior tempo de permanência. ....	83
<b>Figura 15:</b> Efeito da fração de saponinas (SAP 300, 600 e 900 mg/kg) e fração de flavonóides (FLA 300 mg/kg) obtidas do extrato aquoso de <i>P. alata</i> no teste de coordenação motora em aparelho <i>rota-rod</i> . Parâmetro: número de quedas. ....	83

<b>Figura 16:</b> Efeito do extrato hidroetanólico (70%) de <i>P. alata</i> (EXT 300 mg/kg) no teste de coordenação motora em aparelho <i>rota-rod</i> . Parâmetro: número de quedas .....	84
<b>Figura 17:</b> Efeito do extrato hidroetanólico (70%) de <i>P. alata</i> (EXT 300 mg/kg) no teste de coordenação motora em aparelho <i>rota-rod</i> . Parâmetro: maior tempo de permanência .....	84
<b>Figura 18:</b> Efeito da administração de flumazenil (FLU 6 mg/kg, i.p.) no efeito do extrato hidroetanólico 70% de <i>P. alata</i> (EXT 300 mg/kg, v.o.) e diazepam (2 mg/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado. Parâmetro: Percentual de tempo de permanência nos braços abertos e braços fechados. ....	87
<b>Figura 18:</b> Efeito da administração de flumazenil (FLU 6 mg/kg, i.p.) no efeito do extrato hidroetanólico 70% de <i>P. alata</i> (EXT 300 mg/kg, v.o.) e diazepam (2 mg/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado. Parâmetro: Percentual de entradas nos braços abertos e braços fechados .....	87
<b>Figura 20:</b> Curvas deslocamento da ligação de [ <sup>3</sup> H]-TBOB gerado por FLA e SAP em membranas sinaptossomais de córtex de rato extensivamente lavadas e adicionadas de 0,3 μM de GABA. ....	90
<b>Figura 21:</b> Flavona ajustada no modelo farmacóforo descrito por MARDER e colaboradores (2001). ....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dados relativos à atividade ansiolítica de espécies de <i>Passiflora</i> , em roedores.....	20
<b>Tabela 2:</b> Afinidade de diferentes isoflavonas pelo sítio benzodiazepínico .....	31
<b>Tabela 3:</b> Afinidades de flavonóides isolados das raízes de <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi pelo sítio de ligação benzodiazepínico do complexo receptor GABA <sub>A</sub> .....	36
<b>Tabela 4:</b> Dados neuroquímicos e farmacológicos comparativos entre os flavonóides naturais com atividade ansiolítica/sedativa.....	41
<b>Tabela 5:</b> Dados neuroquímicos e farmacológicos comparativos entre os derivados flavônicos sintéticos .....	48
<b>Tabela 6:</b> Descrição dos grupos experimentais e tratamentos usados nos ensaios comportamentais realizados .....	63
<b>Tabela 7:</b> Grupos experimentais empregados para avaliação do envolvimento do receptor benzodiazepínico no efeito ansiolítico do extrato hidroetanólico (70%) de <i>P. alata</i> no labirinto em cruz elevado. ....	68
<b>Tabela 8:</b> Efeito da fração de saponinas (SAP 300, 600 e 900 mg/kg) e fração de flavonóides (FLA 300 mg/kg) obtidas a partir do extrato aquoso de <i>P. alata</i> no labirinto em cruz elevado (valores absolutos).....	77
<b>Tabela 9:</b> Efeito do extrato hidroetanólico 70% de <i>P. alata</i> (EXT 150, 300 e 600 mg/kg) no labirinto em cruz elevado (valores absolutos) .....	79
<b>Tabela 10:</b> Efeito da fração de saponinas (SAP 300, 600 e 900 mg/kg) e fração de flavonóides (FLA 300 mg/kg) obtidas a partir do extrato aquoso de <i>P. alata</i> no tempo de sono induzido por pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). ....	80
<b>Tabela 11:</b> Efeito do extrato hidroetanólico 70% de <i>P. alata</i> (EXT 300 e 600 mg/kg) no tempo de sono induzido por pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). ....	81
<b>Tabela 12:</b> Efeito da fração de saponinas (SAP 300, 600 e 900 mg/kg) e fração de flavonóides (FLA 300 mg/kg) na atividade locomotora espontânea. ....	81
<b>Tabela 13:</b> Efeito do extrato hidroetanólico (70 %) de <i>P. alata</i> (EXT 300 e 600 mg/kg) na atividade locomotora espontânea. ....	82
<b>Tabela 14:</b> Efeito da fração de saponinas (SAP 300, 600 e 900 mg/kg) e fração de flavonóides (FLA 300 mg/kg, v.o.) obtidas do extrato aquoso de <i>P. alata</i> no teste de proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.).....	85
<b>Tabela 15:</b> Efeito do extrato hidroetanólico (70 %) de <i>P. alata</i> (EXT 300 mg/kg) no teste de proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.). ....	86

<b>Tabela 16:</b> Efeito da administração de flumazenil (FLU 6 mg/kg, i.p.) no efeito do extrato hidroetanólico 70% de <i>P. alata</i> (EXT 300 mg/kg, v.o.) e diazepam (2 mg/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado (valores absolutos). .....	88
<b>Tabela 17:</b> Percentuais de inibição da ligação de [ <sup>3</sup> H]-flunitrazepam em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.....	89



## RESUMO

*Passiflora alata* Curtis (PASSIFLORACEAE) é utilizada como tranqüilizante, seja popularmente ou pela indústria farmacêutica na produção de fitoterápicos. O objetivo desse trabalho foi avaliar, em camundongos, a atividade geral sobre o Sistema Nervoso Central e o efeito ansiolítico de um extrato hidroetanólico (70%) (EXT) e de duas frações enriquecidas (fração de saponinas - SAP e fração de flavonóides - FLA) obtidos das folhas de *P. alata* e, também, investigar o envolvimento do complexo receptor GABA<sub>A</sub> nos efeitos observados. O extrato e as frações foram administrados agudamente, pela via oral, e avaliados nos seguintes modelos: labirinto em cruz elevado, tempo de sono barbitúrico, avaliação da atividade locomotora espontânea, avaliação da coordenação motora em aparelho rota-rod e proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol. FLA 300 mg/kg e SAP 600 e 900 mg/kg provocaram um efeito do tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado. FLA (CI<sub>50</sub>= 181,2 µg/mL) e SAP (CI<sub>50</sub>= 23,4 µg/mL) deslocaram a ligação específica de [<sup>3</sup>H]-TBOB em membranas sinaptossomais de córtex de ratos adicionadas de GABA (0,3 µM), indicando uma modulação positiva do canal de cloreto ativado por GABA, porém esse efeito não é mediado pelo sítio benzodiazepínico uma vez que ambas as frações não deslocaram a ligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam em concentrações até 300 µg/mL. O extrato hidroetanólico (EXT) provocou efeito do tipo ansiolítico (300 mg/kg) no labirinto em cruz elevado, o qual foi bloqueado pela administração de flumazenil (6 mg/kg, i.p.). Porém, esse extrato em concentrações até 1000 µg/mL não deslocou a ligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam, indicando que o efeito ansiolítico é mediado pelo sítio benzodiazepínico mas não pela interação direta das substâncias presentes no extrato com este sítio. Na dose de 600 mg/kg não foi observado efeito ansiolítico para o extrato, porém foi verificada uma redução da atividade motora dos animais, indicando um efeito sedativo. EXT 300 e 600 e FLA 300 prolongaram o tempo de sono barbitúrico e SAP (300-900 mg/kg) não apresentou efeito neste teste. Os dados obtidos demonstraram que *P. alata* apresentou efeito hipnótico-sedativo e ansiolítico em camundongos, os quais parecem ser mediados pela ativação do complexo receptor benzodiazepínico/GABA<sub>A</sub> e podem estar relacionados com a presença de flavonóides e saponinas.

**Palavras-chave:** *Passiflora alata*, flavonóides, saponinas, ansiolítico, sedativo.



## ABSTRACT

### ANTI-ANXIETY STUDIES ON *Passiflora alata* Curtis (PASSIFLORACEAE)

*Passiflora alata* Curtis (PASSIFLORACEAE) is used in folk medicine and also by pharmaceutical industry, as raw material in phytotherapy, due its tranquilizing properties. The aims of this work were to evaluate, in mice, the central nervous system general activity and the anxiolytic effect of a hydroethanolic extract (70%) (EXT) and two enriched fractions (saponin fraction – SAP – and flavonoid fraction – FLA), obtained from leaves of *P. alata* and, also, to investigate the GABA<sub>A</sub> receptor complex involvement on the observed effects. The extract and the fractions were administrated acutely, by oral route, and evaluated on elevated plus maze, barbiturate sleeping time, locomotor activity, rota-rod, and pentilenotetrazole-induced seizures tests. FLA 300 mg/kg and SAP 300 and 900 mg/kg produced an anxiolytic-like effect on elevated plus maze test. FLA (IC<sub>50</sub>=181,2 µg/mL) and SAP (IC<sub>50</sub>=23,4 µg/mL) inhibited the [<sup>3</sup>H]-TBOB binding to rat cerebral sinaptosomal membranes added of GABA (0,3 µM), which is an indicative of a positive modulation of the chloride channel activated by GABA, but this effect is not mediated by the benzodiazepine binding site, once these fractions in concentrations up to 300 µg/mL did not displaced the [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam. The hidroethanolic extract (EXT) showed anxiolytic-like effect (300 mg/kg) on elevated plus maze test which was prevented by flumazenil (6 mg/kg, i.p.). However, in concentrations up to 1000 µg/mL this extract showed no potency in displacing the [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam binding, indicating that the anxiolytic-like effect is mediated by activation of benzodiazepine binding site, but not by a direct interaction of the compounds presented in this extract at this site. At 600 mg/kg this extract did not show anxiolytic effect but it decreased the motor activity, pointing to a sedative effect. EXT 300 and 600 mg/kg and FLA 300 mg/kg increased the barbiturate sleeping time while SAP (300-900 mg/kg) presented no effects in this test. Taken account of these results, *P. alata* presented anxiolytic and hypnotic-sedative effects in mice. These effects may be mediated by the activation of benzodiazepine/GABAergic complex, and can be related to the presence of both flavonoids and saponins.

**Key-words:** *Passiflora alata*, flavonoids, saponin, anxiolytic effect, sedative effect



---

## 1. INTRODUÇÃO



A palavra ansiedade provém do termo grego *anshein*, que significa estrangular, sufocar, oprimir. O termo correlato, angústia, origina-se de duas palavras latinas: *angere* (causar pânico) e *angor* (opressão ou falta de ar). Tais palavras derivam da raiz indo-germânica *angh*, indicando estreitamento ou constrição. Todos esses termos referem-se, metaforicamente, à experiência subjetiva característica da ansiedade (GRAEFF, 1993).

Medo e ansiedade constituem as primeiras respostas naturais de defesa frente a um perigo potencial, sendo a habilidade de pressentir o perigo potencial uma chave evolucionária para a sobrevivência. Porém esse mecanismo pode perder a capacidade de auto-regulação transformando-se assim, em um distúrbio de ansiedade. Um indivíduo ansioso sente-se exposto ao perigo a todo instante, em outras palavras, esse indivíduo é incapaz de “ligar” e “desligar” o seu instinto de proteção quando necessário (KIM e GORMAN, 2005).

Até o final do século XIX os distúrbios de ansiedade raramente eram encarados como problemas médicos. No século XIX Sigmund Freud estabeleceu o conceito de neurose, distinguindo a neurose crônica dos ataques de ansiedade, além de notar associação entre estes e a agorafobia. Na década de 60, Donald Klein evidenciou a resposta favorável aos antidepressivos tricíclicos no controle de ataques de pânico, 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.

Atualmente, os distúrbios de ansiedade são classificados, segundo o DSM-IV (2002) em: ansiedade generalizada, distúrbio obsessivo-compulsivo, síndrome do pânico, síndrome de estresse pós-traumático e fobias específicas. Dentre as desordens citadas, o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) é a mais comum. Sua prevalência na população é estimada como 5 a 6%, com uma incidência anual variando de 1,5 a 3,1% (BALDWIN e POLKINGHORN, 2005). É importante ressaltar o alto grau de comorbidade entre os diferentes subtipos de ansiedade e outras desordens psiquiátricas, particularmente distúrbios de humor. Um estudo americano revelou que 66,3% dos pacientes com diagnóstico de transtorno de ansiedade generalizada também sofriam de pelo menos um outro distúrbio psiquiátrico, sendo a maior associação, verificada com a depressão (38,6%) (NUTT *et al.*, 2006).

A ansiedade e 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, representando 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)

Nas desordens associadas à ansiedade, enquanto a habilidade de compreender a realidade é mantida, o sofrimento e a incapacidade algumas vezes são severos. As manifestações mais características ocorrem no plano afetivo, constituindo-se em motivação negativa, isto é, no desejo de tomar ações no sentido de evitar, atenuar ou eliminar o estado de desprazer. No plano cognitivo, a ansiedade manifesta-se por pensamentos de que algo ruim vai acontecer, podendo ser tão intensos a ponto de interferir na capacidade de concentração. O nível de vigilância encontra-se aumentado, dificultando a conciliação com o sono. Além de manifestações psicológicas, a ansiedade induz alterações somáticas relacionadas à hiperatividade autonômica, destacando-se: palpitação, taquicardia, sudorese, tremores, hipersecreção gástrica, aumento da motilidade intestinal, sensação de falta de ar e sufocação acompanhada de hiperventilação e parada respiratória (DE ABREU e CORDIOLI, 1996; GRAEFF, 1999).

A ansiedade é uma desordem psiquiátrica de etiologia complexa e ainda não entendida completamente. Vários são os sistemas neuroanatômicos e funcionais envolvidos na neurobiologia da ansiedade, particularmente áreas corticais, com estruturas 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 (KUHAR, 1996; KIM e GORMAN, 2005). A amígdala, o hipocampo, o *locus coeruleus*, os núcleos da rafe, a substância periaquedutal cinzenta e suas interconexões estão envolvidos na neurobiologia da ansiedade (GRAEFF, 2004).

Diante de uma circuitaria neuronal tão complexa, é possível entender o envolvimento de diversos sistemas neurotransmissores na neurobiologia da ansiedade. O primeiro sistema cogitado na etiologia das desordens de ansiedade foi o GABAérgico, partindo-se do estudo do mecanismo de ação de ansiolíticos



benzodiazepínicos. Atualmente há evidência do envolvimento de outros sistemas, principalmente serotonérgico, noradrenérgico, glutamatérgico e vias neuroendócrinas (eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e fator de liberação de corticotrofina) (KENT *et al.*, 2002; KIM e GORMAN, 2005).

O arsenal terapêutico disponível para o manejo dos distúrbios de ansiedade é vasto, incluindo fármacos de diferentes classes terapêuticas e com mecanismos de ação diversos. Cada um destes apresenta melhores respostas em determinados subtipos de ansiedade: benzodiazepínicos, inibidores da monoamino oxidase, antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina, agonistas de receptores serotonérgicos 5HT<sub>1A</sub>, anticolinérgicos e antihistamínicos (BALDESSARINI, 2001).

Até os anos 90, os fármacos benzodiazepínicos eram os medicamentos de escolha para o tratamento da ansiedade. Atualmente são bastante utilizados, porém sua efetividade no tratamento da ansiedade generalizada tem sido bastante discutida. O uso considerado mais racional é o de alívio de estados ansiosos agudos (RATES e SALLES, 2004). Além da atividade ansiolítica, os fármacos dessa classe possuem ação hipnótico-sedativa, anticonvulsivante e relaxante muscular (STAHL, 2000).

Apesar da segurança de seu uso, comprovada pelo seu grande emprego na clínica, são relatados efeitos adversos importantes para os benzodiazepínicos, como sedação, amnésia, prejuízos de cognição e funções motoras hábeis, particularmente em idosos, período no qual são uma causa comum de confusão, delírio e quedas, além de provocarem tolerância e dependência (BALDESSARINI, 2001; STAHL, 2000). Além disso, o risco de dependência e sobredose com benzodiazepínicos estão particularmente aumentados em pacientes com distúrbios de personalidade ou história de abuso de sedativos ou álcool (BALDESSARINI, 2001).

A constatação da presença dos efeitos adversos para os fármacos já estabelecidos no mercado aliada à prevalência dos distúrbios de ansiedade na sociedade denota a importância da busca por novas moléculas efetivas para o tratamento da ansiedade (ARGYROPOULOS e NUTT, 1999). Porém, a maior limitação nos esforços para desenvolver novos fármacos reside no fato de que estes

são sintetizados a partir da estratégia *me too*, ou seja, apenas pela modificação estrutural de outros fármacos com atividade comprovada e não pela descoberta efetiva de novas substâncias com mecanismos de ação realmente inovadores (WERMUTH, 2003).

Neste contexto, as plantas medicinais podem se tornar uma fonte de moléculas inovadoras com mecanismos de ação diferenciados dos atuais ou com melhor relação risco/benefício que os fármacos atualmente disponíveis no mercado (CALIXTO, 2001). A diversidade estrutural encontrada na natureza é importante na pesquisa para atingir diferentes alvos biológicos e os produtos naturais constituem uma fonte para a obtenção de novos fármacos e/ou protótipos farmacológicos (YUNES e 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 químico e farmacológico das preparações utilizadas, abordados respectivamente no âmbito da etnobotânica e da etnofarmacologia (RATES, 2001).

Algumas espécies vegetais já têm seu uso aprovado para o tratamento de distúrbios de ansiedade. A Organização Mundial da Saúde considera que a espécie *Valeriana officinallis* pode ser utilizada *in natura* ou na produção de fitoterápicos, como alternativa aos benzodiazepínicos (OMS, 1999). Suas principais indicações de uso são como sedativo leve, no alívio dos estados de excitação nervosa, tensão, irritabilidade e ansiedade indutora de distúrbios do sono (ESCOP, 1997; OMS, 1999; BLUMENTHAL *et al.*, 2000). Não há um consenso acerca das substâncias ativas presentes nos extratos de valeriana, contudo muitas substâncias já foram isoladas e suas atividades farmacológicas comprovadas, podendo-se citar: valepotriatos e seus produtos de degradação, os baldrinais; componentes do óleo essencial, como o ácido valerênico e seus derivados; e ainda flavonóides, como a 6-metilapigenina, linarina e hesperidina (HOUGHTON, 1999; MARDER *et al.*, 2003; FERNÁNDEZ *et al.*, 2004).

Outra planta com usos terapêuticos como ansiolítico e sedativo respaldados por ensaios clínicos é *Piper methysticum*, conhecida popularmente como cava (PITTLER e EDZARD, 2002). Essas atividades são atribuídas a uma mistura de cavalactonas presentes no extrato, principalmente cavaína e iangonina (AMARAL *et*

*al.*, 2002). No entanto dados relativos à hepatotoxicidade têm limitado o uso de medicamentos à base de cava (CLOUATRE, 2004; ULBRICHT *et al.*, 2005). Outras plantas como lúpulo (*Humulus lupulus*), melissa (*Melissa officinalis*) podem ser usadas como ansiolítico e sedativo (BLUMENTHAL, *et al.*, 2000).

Além destas, espécies de *Passiflora*, conhecidas popularmente no Brasil como maracujás, apresentam um uso tradicional importante como ansiolítico e sedativo (DHAWAN *et al.*, 2004). As espécies mais citadas na literatura, para as quais há dados científicos coerentes com o uso popular são *P. actinia*, *P. alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* e *P. quadrangularis*. Destas, apenas *P. alata* é citada pela Farmacopéia Brasileira, nas suas 1ª, 2ª e 3ª edições. Além disso, é constituinte de diversos medicamentos fitoterápicos comercializados no Brasil, com a indicação de calmante (ANVISA, 2006).

O estágio do conhecimento atual sobre a farmacologia do gênero *Passiflora* indica seu potencial para o desenvolvimento de medicamentos ansiolíticos e hipnótico/sedativos. Apesar do caráter oficial de *P. alata*, os estudos com esta espécie são escassos, tanto em aspectos químicos quanto farmacológicos. Nesse sentido, nosso grupo desenvolve uma linha de investigação química e farmacológica com espécies de *Passiflora* de ocorrência no sul do Brasil, especialmente *P. alata*. Estudos anteriores relataram efeito ansiolítico e hipnótico-sedativo para o extrato aquoso de *P. alata*, em ratos (DE PARIS *et al.*, 2002; REGINATTO *et al.*, 2006; FENNER, 2006). Contudo, os extratos testados até o momento são de caráter hidrofílico (aquosos e hidroetanólicos 40%), os quais reproduzem as preparações populares, mas diferem um pouco das especialidades farmacêuticas no mercado, normalmente com maior teor alcoólico. Além disso, não foram realizados estudos que indiquem quais são as substâncias ativas presentes nos extratos, nem seu mecanismo de ação. Assim, damos continuidade a esta linha de investigação, visando à definição de quais são as classes de compostos envolvidas na atividade, o estudo do mecanismo de ação e, também, a avaliação do efeito em extratos, com maior teor alcoólico.



---

## **2. OBJETIVOS**



Foram objetivos desta dissertação:

- Avaliar, em camundongos, a atividade sobre o Sistema Nervoso Central de um extrato hidroetanólico e de frações enriquecidas (flavonóides e saponinas) obtidas a partir do extrato aquoso de *Passiflora alata* Curtis (PASSIFLORACEAE).
- Investigar o envolvimento do complexo receptor GABA<sub>A</sub> nos efeitos observados.





---

### **3. REVISÃO**



### 3.1 *Passiflora alata* Curtis (PASSIFLORACEAE)

#### 3.1.1 Aspectos Botânicos

A característica mais destacada das *Passifloras* é a beleza de suas flores, as quais encantaram e intrigaram os jesuítas que, durante os séculos XVI e XVII, vieram ao Novo Mundo executar a tarefa da catequese. Os missionários fizeram das estruturas florais elementos simbólicos da Paixão de Cristo e essa associação conferiu à planta o nome de “Flor-da-Paixão” ou “Passion flower”, conservado no nome desta família de plantas – *Passifloraceae* (SACCO *apud* DE SOUZA, 1997).

A família *Passifloraceae* abrange cerca de 650 espécies classificadas em 16 gêneros, distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais da América e da África (CRONQUIST, 1981). O gênero *Passiflora* é essencialmente americano, mas é cultivado em várias regiões do mundo. No Brasil, são encontradas pelo menos 79 espécies, distribuídas principalmente pelos estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SACCO, 1980).

*P. alata* é uma espécie amplamente distribuída no Brasil, com relatos de ocorrência nos estados da Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pará, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina. O primeiro registro da ocorrência de *P. alata* no Rio Grande do Sul foi feito em 1934 em uma área cultivada (RAMBO, 1951), porém cerca de 20 anos após, esta espécie já era classificada como selvagem (*efferrata*) nos subúrbios de Porto Alegre. Atualmente *P. alata* encontra-se amplamente distribuída no estado, excetuando-se a região da campanha (KOEHLER-SANTOS *et al.*, 2006).

*P. alata* é uma trepadeira com gavinhas, caule firme, tetragulado, os ângulos alados. Com folhas simples, inteiras, ovadas ou ovado-oblongadas, membranáceas, peninervadas, de margem lisa ou finamente denticulada de até 21 cm comprimento e de até 14 cm de largura, na face brilhante de cor verde-escura e no verso, pálidas. O pecíolo é curto, com 2 a 6 cm superiormente canaliculados, com 2-4 glândulas

---

SACCO, J.C. **As espécies de *Passiflora* L. espontâneas nos estados de Santa Catarina e no Rio Grande do Sul.** Pelotas: Universidade de Pelotas, 1977. Livre Docência. 143 p. *apud* DE SOUZA, K.C.B. **Desenvolvimento de Metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa*.** Porto Alegre: UFRGS, 1997. Dissertação de Mestrado. 156p

sésseis, orbiculares. Estípulas pequenas, foliáceas, lineares ou linear- lanceoladas a ovado-lanceoladas, de margem lisa ou serrilhada, com 1 a 2 cm de comprimento e até 1 cm de largura (SACCO, 1980).

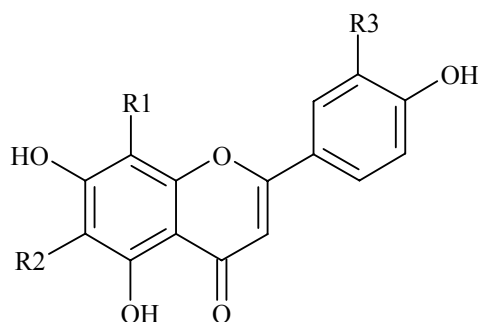
As flores são hermafroditas, actinomorfas, pentâmeras, axilares, em geral isoladas, odoríferas, tendo em média 10 a 12 cm de diâmetro. Sépalas e pétalas carnosas, avermelhadas internamente, pétalas mais longas do que as sépalas e de forma semelhante. Corona bisseriada, a série externa muito mais longa com filamentos listados de branco e roxo, série interna muito curta, dentiforme. Pedúnculos florais solitários, axilares, unifloros e duas vezes mais curtos do que os pecíolos. O fruto é ovóide a piriforme, glabro, de 8-11 cm de comprimento e 6 cm de largura, apresentando-se amarelo quando maduro (SACCO, 1980).

A fenologia de *P. alata* no estado do Rio Grande do Sul aponta para a presença apenas do estado vegetativo nos meses de julho e agosto (no inverno) e dezembro e janeiro (no verão). A floração ocorre em todos os outros meses. A presença de frutos é observada nos meses de março, maio, setembro, outubro e novembro (KOEHLER-SANTOS *et al.*, 2006).

### 3.1.2 Constituição Química

Os constituintes químicos mais freqüentemente citados para espécies de *Passiflora* são os flavonóides C-glicosilados. Para *P. alata* é relatada a ocorrência de vitexina, isovitexina, orientina, 2''-xilossil-vitexina (ULUBELEN *et al.*, 1982), 2''-ramnosil-vitexina, 2''-ramnosil-escoparina, 2''-ramnosil-orientina e isoorientina (DOYAMA *et al.*, 2005), cujas estruturas estão apresentadas na figura 1. O teor de flavonóides totais foi avaliado em diferentes soluções extrativas. Para um extrato hidroetanólico (40 %) de *P. alata*, o teor de flavonóides totais foi de 2,9% (PETRY *et al.*, 2001). Para um extrato aquoso foi determinado um teor de 2,6% (DE PARIS *et al.*, 2002, REGINATTO *et al.*, 2006, FENNER, 2006). É importante notar que o teor de flavonóides totais encontrado para o extrato hidroetanólico 40% de *P. alata* (0,55 g%) foi inferior ao determinado para outras espécies, como *P. edulis* (0,90 g%) e *P. incarnata* (0,94 g%) obtidos nas mesmas condições experimentais (PETRY *et al.*, 1998).

MÜLLER e colaboradores (2005) determinaram a quantidade de isovitexina em *P. alata* como 1,137 g%. A presença de vitexina foi determinada apenas como traços. Além disso, os autores destacaram que essas duas flavonas não são os compostos majoritários da fração flavonoídica da espécie.

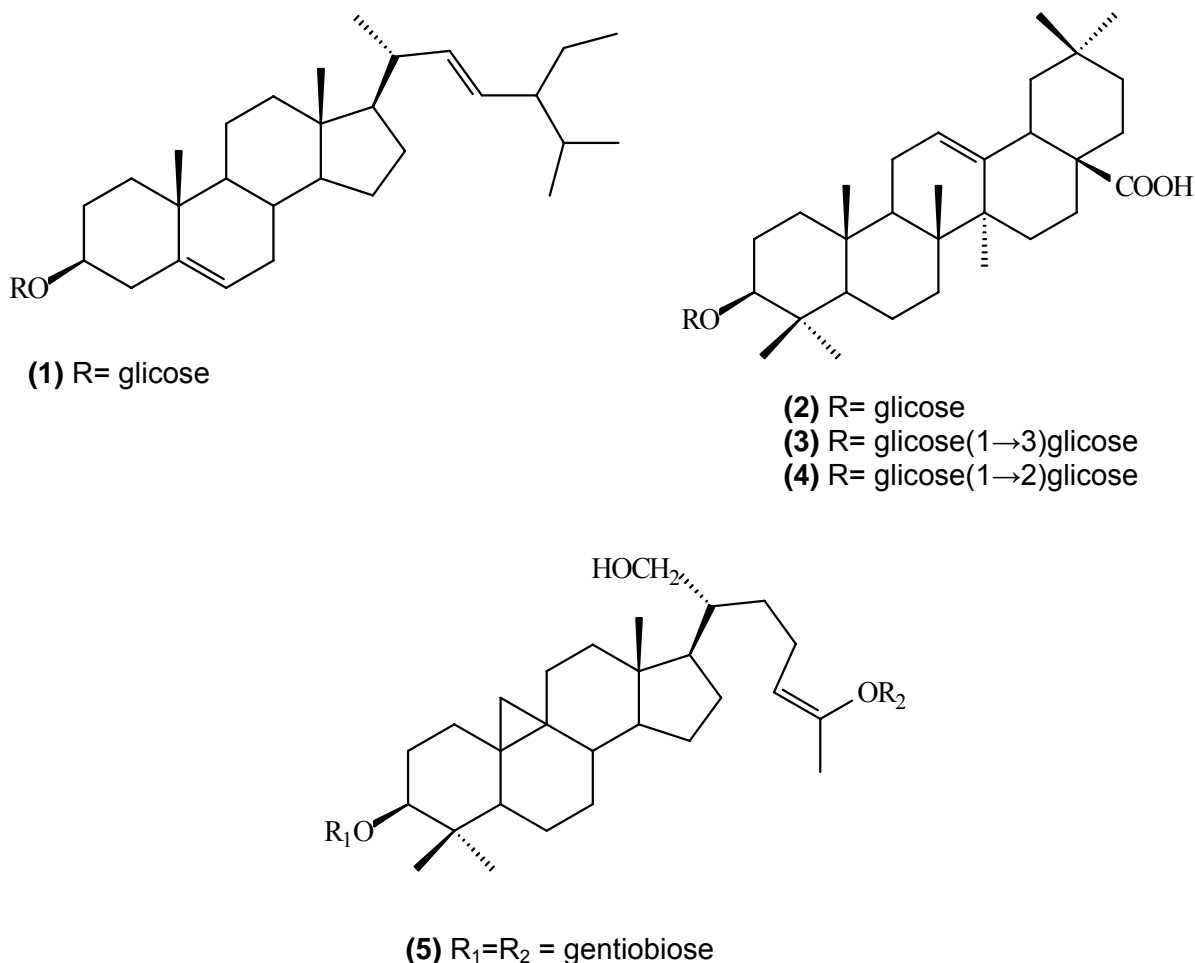


	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>
<b>vitexina</b>	glicose	H	H
<b>isovitexina</b>	H	glicose	H
<b>orientina</b>	glicose	H	OH
<b>2''-xilossil-vitexina</b>	glicose(1→2)xilose	H	H
<b>2''-ramnosil-vitexina</b>	glicose(1→2)ramnose	H	H
<b>2''-ramnosil-escoparina</b>	glicose(1→2)ramnose	H	O-CH <sub>3</sub>
<b>2''-ramnosil-orientina</b>	glicose(1→2)ramnose	H	OH
<b>isoorientina</b>	H	glicose	OH

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

Em um estudo visando à caracterização química das espécies *P. actinia* Hooker, *P. alata* Curtis, *P. amethystina* Mikan, *P. caerulea* L., *P. capsularis* L., *P. edulis* Sims var. *flavicarpa*, *P. elegans* Masters, *P. foetida* L., *P. misera* H.B.K, *P. organensis* Gardner, *P. suberosa* L., *P. tenuifila* Killip, *P. tricuspis* Masters e *P. warmingii* Masters, foi verificado um perfil cromatográfico diferenciado para *P. alata*. Esta espécie apresentou saponinas como metabólitos secundários majoritários, diferindo das demais espécies, nas quais os flavonóides são os metabólitos principais (BIRK *et al.*, 2005). A partir das folhas dessa espécie, cinco saponinas foram isoladas e identificadas (Figura 2): sendo quatro triterpênicas (**2-5**) e 1 esteróide (**1**) (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 desses constituintes, também há relatos da presença de alcalóides  $\beta$ -carbolínicos, sendo que sua concentração foi determinada como 0,217 mg% em *P. alata* (OGA *et al.*, 1984).



**Figura 2:** Estruturas das saponinas descritas para *P. alata*. (1) 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-estigmasterol; (2) ácido 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-oleanólico; (3) ácido 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1→3)- $\beta$ -D-glicopiranosil-oleanólico; (4) ácido 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1→2)- $\beta$ -D-glicopiranosil-oleanólico; (5) 9,19-ciclolanost-24Z-en-3 $\beta$ ,21,26-triidróxi-3,26-di-O-gentiobiose.

### 3.1.3 Dados farmacológicos para o gênero *Passiflora*

#### 3.1.3.1 Atividade sobre o Sistema Nervoso Central

Espécies de *Passiflora* são amplamente utilizadas na medicina popular com diversas indicações. Seu uso mais corrente é como sedativo e tranqüilizante, comum a vários países (CONRADO *et al.*, 2003). Este caráter cosmopolita pode ser

evidenciado pela inclusão da espécie *P. incarnata* em códigos oficiais de diferentes países, citados por DHAWAN e colaboradores (2004) e PARAFITT (1999): British Herbal Pharmacopoeia, 1983; Farmacopéia Homeopática Indiana, 1974; Farmacopéia Homeopática Americana, 1981; Farmacopéia Helvética, 1987; Farmacopéias Egípcia, Francesa, Alemã e Suíça; Brithish Herbal Compendium, 1992; European Cooperative on Phytotherapy monographs – ESCOP, 1997; Deutsches Arzneibuch, 1997; Deutsches Homeopatishes Arzneibuch, 1978; Comissão E, 1998 e Matéria Médica Americana, 1983.

As espécies para as quais existem dados experimentais relativos à investigação da atividade central reputada na medicina popular são *P. actinia* Hooker, *P. alata* Curtis, *P. edulis* Sims, *P. incarnata* Linneaus e *P. quadrangularis* Linneaus. Os estudos relativos à atividade ansiolítica encontram-se sumarizados na Tabela 1.

Das espécies citadas, o maior número de estudos quanto à ação central refere-se à *P. incarnata*. Um extrato etanólico das folhas e ramos, administrado intraperitonealmente a ratos, nas doses de 80 e 160 mg/kg, aumentou significativamente o tempo de sono induzido por pentobarbital, protegeu os animais dos efeitos pró-convulsivantes do pentilenotetrazol e reduziu a atividade locomotora (SPERONI e MINGHETTI, 1988). Este mesmo extrato reduziu a atividade motora espontânea e provocou um aumento na duração de sono induzido por pentobarbital em camundongos (65 – 250 mg/kg, v.o.) (SPERONI *et al.*, 1996a). Ambos os estudos indicaram um potencial efeito sedativo para esta espécie.

DHAWAN e colaboradores (2001c) demonstraram efeito ansiolítico dose-dependente para o extrato metanólico de *P. incarnata*, sendo a atividade máxima observada na dose de 125 mg/kg (v.o.). Na dose de 300 mg/kg, não foi observado efeito ansiolítico. Os autores sugerem que em doses elevadas um efeito sedativo esteja mascarando o efeito ansiolítico, fazendo com que este não seja mais detectado. Esse mesmo grupo avaliou a atividade ansiolítica de extratos metanólicos obtidos a partir de diferentes partes da espécie vegetal. Extratos de folhas, ramos, flores e da planta inteira apresentaram atividade ansiolítica nas doses de 100, 125, 200 e 300 mg/kg, v.o., respectivamente. Não foi verificada atividade para o extrato

obtido a partir das raízes. Os melhores resultados foram obtidos com o extrato das folhas (DHAWAN *et al.*, 2001b).

**Tabela 1:** Dados relativos à atividade ansiolítica verificada para espécies de *Passiflora* em roedores.

<b>Espécie</b>	<b>Atividade Ansiolítica em Roedores*</b>	<b>Referência</b>
<i>P. actinia</i> Hooker	Extrato metanólico, 100 e 300 mg/kg, v.o., camundongos	LOLLI <i>et al.</i> , 2006
	Extrato hidroetanólico (45%), 300 e 600 mg/kg, v.o., camundongos	LOLLI <i>et al.</i> , 2006
<i>P. alata</i> Curtis	Extrato hidroetanólico (40%), 100 e 150 mg/kg, i.p., ratos	PETRY <i>et al.</i> , 2001
	Extrato aquoso, 100 e 150 mg/kg, i.p., ratos	DE PARIS <i>et al.</i> , 2002
	Extrato aquoso, 640 e 800 mg/kg, v.o., ratos	REGINATTO <i>et al.</i> , 2006
<i>P. edulis</i> Sims	Extrato metanólico, 75, 200 e 300 mg/kg, v.o., camundongos	DHAWAN <i>et al.</i> , 2001a
	Extrato hidroetanólico (40%), 50, 100 e 150 mg/kg, i.p., ratos	PETRY <i>et al.</i> , 2001
	Extrato aquoso, 50, 100 e 150 mg/kg, i.p., ratos	DE PARIS <i>et al.</i> , 2002
	Extrato aquoso, 100 e 125 mg/kg, v.o., camundongos	DHAWAN <i>et al.</i> , 2001a
	Extrato aquoso, 400 e 800 mg/kg, v.o., ratos	REGINATTO <i>et al.</i> , 2006
<i>P. incarnata</i> Linneaus	Extrato aquoso, v.o., camundongos	COLETA <i>et al.</i> , 2006
	Extrato metanólico, 125 mg/kg, v.o., camundongos	DHAWAN <i>et al.</i> , 2001a DHAWAN <i>et al.</i> , 2001c
<i>P. quadrangularis</i> Linneaus	Extrato hidroetanólico (30%), 400 mg/kg, i.p., camundongos	SOULIMANI <i>et al.</i> , 1997
	Extrato hidroetanólico, 100, 250 e 500 mg/kg, v.o., ratos	DE CASTRO <i>et al.</i> , 2007

\* a atividade ansiolítica dos extratos foi avaliada empregando-se o modelo do labirinto em cruz elevado, excetuando-se o estudo de SOULIMANI e colaboradores (1997) que empregaram o modelo de discriminação claro-escuro.



Um outro estudo demonstrou que o extrato hidroetanólico (70%) de *P. incarnata* (250 mg/kg, v.o.) diminuiu a hipermotilidade induzida por anfetamina e prolongou o tempo de sono induzido por barbitúricos, em camundongos. Em um segundo experimento, os pesquisadores avaliaram o efeito da administração oral da combinação desse extrato (250 mg/kg) com o extrato etanólico de *Piper methysticum* (100 mg/kg). O efeito da associação entre os extratos foi superior aos resultados obtidos com cada extrato separadamente (CAPASSO e SORRENTINO, 2005).

Estudos clínicos demonstraram a eficácia ansiolítica de um extrato de *P. incarnata* (45 gotas/dia), comparável ao oxazepam (30 mg/dia), 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 opióides, demonstrou que pacientes tratados com associação de *P. incarnata* (60 gotas/dia) e clonidina (0,8 mg/dia) tiveram sintomas de ansiedade mais leves do que aqueles tratados somente com clonidina (0,8 mg/dia) (AKHONDZADEH *et al.*, 2001b). Em ambos os estudos foi utilizado um extrato comercial (Passipay™, Iran Darouk), sem descrição da preparação e padronização do extrato.

Recentemente, MIYASAKA e colaboradores (2007) realizaram uma revisão sistemática da efetividade e segurança do uso de extratos de *Passiflora* para o tratamento da ansiedade. Dos estudos encontrados, apenas dois atenderam os critérios de inclusão, um deles apontando para efeitos similares entre *Passiflora* e benzodiazepínicos. Os autores concluem que há muito poucos estudos para permitir conclusões definitivas acerca da eficácia do uso de extratos de *Passiflora* no tratamento da ansiedade e denotam a importância de serem realizados outros estudos, com amostras maiores e comparando a eficácia de preparações obtidas de espécies de *Passiflora* com outros tipos de medicamentos.

Quanto à espécie de *P. edulis*, estudos demonstraram que os extratos hidroetanólico (40%) 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). Também foi verificado um efeito ansiolítico em ratos, após a administração oral de um extrato aquoso nebulizado nas doses de 400 e 800 mg/kg (REGINATTO *et al.*, 2006). Recentemente, COLETA e colaboradores (2006) também verificaram efeito ansiolítico para o extrato aquoso de *P. edulis* em camundongos.

Os extratos hidroetanólico (45%) (100 e 300 mg/kg) e metanólico (300 e 600 mg/kg) de *P. actinia* apresentaram efeito sedativo em camundongos quando administrados pela via intraperitoneal (SANTOS *et al.*, 2003). LOLLI e colaboradores (2006) demonstraram que esta espécie também apresenta efeito ansiolítico: quando administrados pela via oral, tanto o extrato hidroetanólico (45%) (300 e 600 mg/kg) quanto o metanólico (100 e 300 mg/kg), apresentaram efeito no labirinto em cruz elevado, em camundongos; nas doses mais altas, ambos os extratos aumentaram o tempo de sono induzido por pentobarbital, indicando um efeito sedativo. O efeito ansiolítico de ambos os extratos foi revertido pela pré-administração do antagonista benzodiazepínico flumazenil (10 mg/kg, i.p.), indicando que este efeito é mediado pelo sistema benzodiazepínico-GABAérgico. Além disso, nenhum dos extratos teve efeito sobre a memória (aquisição ou retenção). O extrato metanólico (300 mg/kg), quando administrado em doses repetidas (2 vezes ao dia durante 7 dias), induziu o desenvolvimento de tolerância ao efeito ansiolítico (LOLLI *et al.*, 2006).

SANTOS e colaboradores (2005) observaram efeito catatônico, em camundongos, após a administração dos extratos metanólico e hidroetanólico (45 %) (300 mg/kg, i.p.) de *P. actinia*. Esse mesmo efeito foi observado para todas as frações purificadas a partir do extrato metanólico. Segundo os autores, esse efeito catatônico não parece estar relacionado à presença de flavonóides ou alcalóides no extrato. Eles consideraram que o efeito pode estar relacionado às saponinas. No entanto, não existem relatos da presença destes metabólitos nessa espécie.

Um estudo recente indicou efeito ansiolítico para o extrato hidroetanólico de *P. quadrangularis* (500 mg/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado. Já para o extrato aquoso desta mesma espécie não foi observado o mesmo efeito (DE CASTRO *et al.*, 2007).

A espécie oficial da Farmacopéia Brasileira (I, II e III) é *P. alata*. Apesar de seu caráter oficial, há poucos estudos, tanto químicos quanto biológicos. A administração intraperitoneal de um extrato fluido de *P. alata* (75 e 150 mg/kg) prolongou o tempo de sono induzido por pentobarbital, reduziu a atividade motora espontânea e apresentou discreto efeito anticonvulsivante em camundongos, demonstrando sua ação depressora do sistema nervoso central (OGA *et al.*, 1984).

Foi verificada, também, 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). Pela via oral, o mesmo efeito foi observado, porém em doses mais elevadas (640 e 800 mg/kg) (REGINATTO *et al.*, 2006).

Em estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório, foi realizada a avaliação da atividade central, em camundongos, de um extrato aquoso nebulizado de *P. alata*. A administração oral desse extrato provocou efeito hipnótico (300 mg/kg, v.o.) e hipotérmico (300 e 600 mg/kg, v.o.) agudamente, não sendo observados efeito ansiolítico e sedativo. Quando avaliado em ratos, a administração aguda desse extrato, surpreendentemente, resultou em uma tendência a um efeito ansiogênico para a dose de 300 mg/kg, que foi confirmada após administração diária por um período de 14 dias (FENNER, 2006).

Apesar do volume de estudos existentes para o gênero *Passiflora*, a identidade das substâncias responsáveis pela ação central ainda é controversa. SOULIMANI e colaboradores (1997) investigaram o efeito ansiolítico de misturas de constituintes de *P. incarnata* em diferentes dosagens: alcalóides (harmano, harmina, harmalina e harmol) e maltol, flavonóides (vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina) e maltol, bem como maltol isoladamente. Nenhum dos tratamentos empregados foi efetivo.

O monoflavonol crisina, um ligante benzodiazepínico isolado de *P. caerulea* (MEDINA *et al.*, 1990) também foi cogitado como constituinte ativo de *P. incarnata*. De fato, a crisina isoladamente apresentou atividade ansiolítica (WOLFMAN *et al.*, 1994; ZANOLLI *et al.*, 2000), contudo SPERONI e colaboradores (1996b) não detectaram a presença deste flavonóide em ambas as espécies, mesmo em traços (1 ppm.).

Através do fracionamento do extrato aquoso de *P. incarnata* guiado pela avaliação da atividade ansiolítica em camundongos, no labirinto em cruz elevado, foi possível o isolamento de um derivado benzoflavônico tri-substituído, com estrutura ainda não definida, o qual foi ativo na dose de 10 mg/kg, v.o. (DAHWAN *et al.*, 2001c). Os autores apontam este composto como provável responsável pela atividade biológica da espécie. Para essa substância, também foram relatadas ação na reversão da tolerância e dependência de psicotrópicos como morfina, nicotina, álcool, diazepam e  $\Delta$ -9-tetraidrocanabinol. Ainda, foram verificadas propriedades afrodisíacas, como aumento da libido e virilidade em ratos machos de dois anos de idade (DHAWAN *et al.*, 2004).

Recentemente, em um estudo desenvolvido por COLETA e colaboradores (2006), foi verificado efeito ansiolítico para o extrato aquoso de *P. edulis* e uma fração de flavonóides purificada a partir desse extrato. A continuação do fracionamento conduziu ao isolamento do flavonol luteolina-7-O-2-ramnosilglicosídeo, o qual apresentou efeito ansiolítico sem comprometimento da atividade motora dos animais.

### **3.1.3.2 Atividade antioxidante**

Foi verificada atividade antioxidante para o suco de *P. edulis* (17,2  $\mu$ M equivalentes de Trolox/mL). Através do fracionamento do suco com éter de petróleo foi observado que os componentes responsáveis por esta atividade estavam contidos nessa fração lipofílica. O estudo químico dessa fração indicou que esta era constituída majoritariamente por carotenóides e polifenóis (TALCOTT *et al.*, 2003).

RUKDNICKI e colaboradores (2007a) verificaram atividade antioxidante para extratos hidroetanólicos (40%) de *P. alata* e *P. edulis* (1-10  $\mu$ g/mL). A capacidade antioxidante do extrato de *P. alata* (0,52 mM) foi superior a apresentada pelo extrato de *P. edulis* (0,23 mM). Foi observada uma relação linear entre a capacidade antioxidante e o conteúdo de fenóis totais de ambos os extratos (171  $\mu$ g/g extrato *P. alata* e 92,5  $\mu$ g/g para *P. edulis*) indicando que os compostos fenólicos são os principais componentes responsáveis pela capacidade antioxidante verificada para

os extratos. Para estes mesmos extratos (1 µg/mL), também foi verificado um efeito protetor frente ao dano oxidativo induzido por sulfato de ferro em fatias de fígado, verificado pelo aumento da viabilidade celular e redução do dano protéico.

Também foi verificado um efeito protetor frente ao dano oxidativo induzido por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>, 3 mL/kg, i.p.) em ratos que haviam recebido extrato aquoso de *P. alata* (1 e 5 mg/kg, v.o.) durante 30 dias. Esse efeito protetor foi verificado especialmente para o fígado, evidenciado pelo baixo grau de necrose, redução da peroxidação lípídica e aumento da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase (RUDINICKI *et al.*, 2007b).

### 3.1.3.3 Atividade antiinflamatória

A administração intraperitoneal de um extrato aquoso de *P. edulis* (250 mg/kg) resultou em um efeito antiinflamatório, caracterizado pela inibição da migração leucocitária na cavidade pleural associada a um bloqueio da atividade da enzima mieloperoxidase, redução dos níveis de óxido nítrico, fator de necrose tumoral *alfa* (TNF $\alpha$ ) e interleucina 1-*beta* (IL-1 $\beta$ ) em um modelo de pleurisia induzida pela injeção intrapleural de carragenina (1%, 0,1 mL). Esse mesmo extrato (250-500 mg/kg, i.p.) também inibiu a migração leucocitária na pleurisia induzida por bradicinina (10 nmol), histamina (100 µg) e substância P (20 nmol) (MONTANHER *et al.*, 2007; VARGAS *et al.*, 2007). Resultados semelhantes foram obtidos através da administração subcutânea do extrato aquoso (100 mg/kg), e das frações butanólica (50 mg/kg) e do resíduo aquoso (100 mg/kg) obtidas da partição do extrato bruto (BENICÁ *et al.*, 2007).

Também para o extrato aquoso de *P. alata* (100 – 300 mg/kg, i.p.) foi descrita atividade antiinflamatória de modo similar a *P. edulis* (VARGAS *et al.*, 2007).

### 3.1.3.4 Atividade cicatrizante

No interior do Brasil, o cataplasma feito com folhas de *P. edulis* é usado como cicatrizante, para tratar infecções e inflamações cutâneas. Alguns estudos têm sido desenvolvidos no sentido de comprovar cientificamente suas propriedades cicatrizantes. O extrato hidroetanólico (70%) de *P. edulis* (250 mg/kg) quando administrado peroperatório na cavidade peritoneal de ratos influenciou favoravelmente a cicatrização de gastrorragias (DA SILVA *et al.*, 2006), laparotomias medianas (GOMES *et al.*, 2006) e anastomoses colônicas (BEZERRA *et al.*, 2006) tanto em parâmetros morfológicos quanto tensiométricos. Ainda, foi observada uma melhora na cicatrização da bexiga de ratos quando o extrato foi administrado pela via intraperitoneal 250 mg/kg pós-operatório (GONÇALVES FILHO *et al.*, 2006). Também foi avaliado o efeito da aplicação tópica do extrato em feridas abertas na região dorsal de ratos. A aplicação diária tópica de 1mL do extrato hidroetanólico (70%) de *P. edulis* não influenciou a cicatrização macroscopicamente, porém aumentou a proliferação de fibroblastos e a colagenização (GARROS *et al.*, 2006).

### 3.1.3.5 Atividade antimicrobiana

Em um *screening* realizado com diferentes extratos de plantas tradicionalmente usadas para doenças gastrointestinais, foi verificada atividade antibacteriana para o extrato metanólico de *P. incarnata* (concentração inibitória mínima igual a 50 µg/mL) frente a *Helicobacter pylori*, uma bactéria relacionada ao desenvolvimento de gastrite e úlcera péptica (MAHADY *et al.*, 2005).

PELEGRINI e colaboradores (2006) descrevem a purificação e caracterização de um peptídeo (Pe-AFP1) com peso molecular de 5 kDa e estrutura bastante semelhante a 2S-albumina. Este peptídeo inibiu o desenvolvimento de fungos filamentosos: *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus fumigatus* com valores de concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) de 32, 34 e 40 µg/mL respectivamente. Não foi verificada atividade antifúngica frente *Rhizoctonia solani*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Candida albicans*.

### **3.1.3.6 Ação sobre o sistema respiratório**

O extrato metanólico das folhas de *P. incarnata* (100 e 200 mg/kg, v.o.) exibiu atividade antitussígena no modelo de tosse induzidas por dióxido de enxofre, em camundongos. Inibição da tosse foi comparável à promovida por sulfato de codeína (10 mg/kg, v.o.) (DHAWAN *et al.*, 2002). Usando um regime de tratamento de 7 dias, o mesmo extrato (100 mg/kg, v.o.) apresentou atividade espasmolítica em cobaias, num modelo de dispnéia induzida por cloridrato de acetilcolina, os autores acreditam que esse efeito seja devido a interação de moléculas presentes no extrato com  $\beta$ -adrenorreceptores (DHAWAN *et al.*, 2003a).

### **3.1.3.7 Atividade anti-hipertensiva**

ICHIMURA e colaboradores (2006) observaram que a administração oral do extrato metanólico de *P. edulis* (10 e 50 mg/kg) resultou na redução da pressão sistólica em ratos espontaneamente hipertensos. O mesmo efeito foi verificado para luteolina (50 mg/kg), um dos flavonóides descritos para esta espécie. A concentração deste flavonóide no extrato é baixa (20  $\mu$ g/g), mas além dele, foi detectada uma concentração de GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) relativamente elevada (4,4 mg/g). O GABA, um neurotransmissor depressor no sistema nervoso central, também exerce um papel importante na regulação da função cardiovascular (GILLIS *et al.*, 2006). Dessa forma, os autores sugerem que o efeito antihipertensivo do extrato pode ser devido principalmente ao GABA e parcialmente a ação vasodilatadora de polifenóis presentes no extrato, como a luteolina e seus glicosídeos (ICHIMURA *et al.*, 2006).

### **3.1.3.8 Efeito hipolipemiante**

CHAU e HUANG (2006) avaliaram o efeito, em hamsters, de uma dieta hipercolesterolêmica contendo 5 % de uma fração enriquecida em fibras obtida a partir das sementes de *P. edulis*. O consumo dessa fração reduziu os níveis séricos

de triglicérides e colesterol total, fato que pode ser atribuído, ao menos em parte, ao aumento da excreção de colesterol, ácidos biliares e lipídeos totais nas fezes.

Um extrato aquoso obtido das cascas dos frutos de *P. edulis* (200 mg/kg, v.o.) reverteu a hipertrigliceridemia, mas não a hipercolesterolemia induzida por Triton WR 1339 (400 mg/kg, i.p.) em camundongos (MORAIS *et al.*, 2006).

O extrato aquoso de *P. alata* (1000 mg/kg, v.o.), administrado três vezes por semana a ratos, 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).

### 3.1.3.9 Outras atividades

Camundongos machos tratados com o extrato metanólico de *P. incarnata* (75-150 mg/kg, v.o.) tiveram o comportamento de monta aumentado na presença de fêmeas fora do período estral. A atividade afrodisíaca máxima foi verificada na dose de 100 mg/kg (DHAWAN *et al.*, 2003a).

O extrato aquoso de *P. quadrangularis* apresentou atividade hemolítica de forma dose-dependente (10-30 µg/mL). O fracionamento do extrato com solventes orgânicos revelou que a atividade se mantinha para a fração *n*-butanólica, enriquecida em saponinas, sugerindo que estes compostos sejam os responsáveis pelo efeito. Na presença de lipossomas contendo colesterol, o efeito hemolítico do extrato foi completamente abolido. Uma possível explicação para este efeito seria a ligação preferencial das hemolisinas contidas no extrato com o colesterol contido nas lipossomas, e não com o da membrana eritrocitária, dessa forma protegendo os eritrócitos da lise (YULDASHEVA *et al.*, 2005).

A presença do extrato aquoso de *P. laurifolia* (0,406 mg/mL) aumentou em 45,7% a viabilidade celular de fibroblastos incubados na presença do veneno de *Heterometrus laoticus*, sugerindo uma possível efetividade frente ao veneno dessa espécie de escorpião (UAWONGGUL *et al.*, 2006).



### 3.1.3.10 Toxicidade

Os estudos de toxicidade para espécies do gênero *Passiflora* são escassos. O extrato etanólico de *P. alata* apresentou DL<sub>50</sub> de 456 mg/kg, i.p., em camundongos (OGA *et al.*, 1984). Além disso, um extrato aquoso dessa espécie, quando administrado na dose de 800 mg/kg/dia (v.o.) não apresentou toxicidade reprodutiva durante a gestação de ratas (AMARAL *et al.*, 2001). Em nosso grupo, avaliamos a toxicidade aguda e de doses repetidas (300 mg/kg, v.o.) do extrato aquoso de *P. alata*. Quando considerados letalidade, parâmetros bioquímicos, histológicos e hematológicos, e sinais físicos gerais, o extrato apresentou uma toxicidade considerada baixa. No entanto, na administração de doses repetidas, os ratos não apresentaram ganho de massa corporal, o que poderia representar um indício de toxicidade. Além disso, a administração aguda do extrato (150 – 600 mg/kg, v.o.) provocou aumento significativo no índice e frequência de dano no DNA em células de cérebro, fígado e sangue periférico de camundongos avaliados no ensaio cometa alcalino (FENNER, 2006).

Em humanos, há o relato de um paciente com alergia a *P. alata* e *Rhamnus purshiana*, cuja sensibilização foi confirmada pelo teste de reação na pele e por *Western blot*. Dessa forma, foi possível determinar uma associação causa-efeito entre as plantas (alergenos) e as doenças respiratórias do paciente (GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 1997).

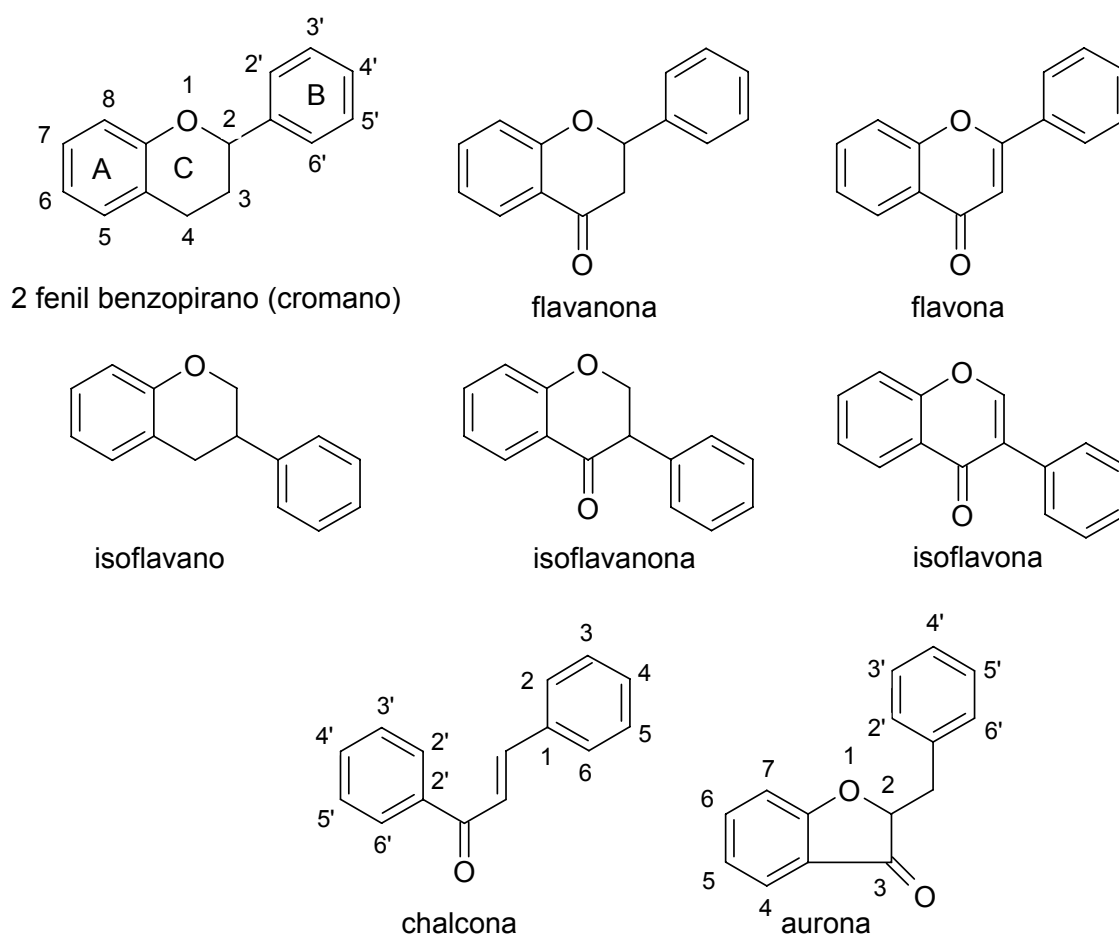
Há um relato de caso de uma paciente do sexo feminino, 34 anos, que desenvolveu sintomas severos de intoxicação após a auto-administração de *P. incarnata*, em dose terapêutica. Os sintomas apresentados pela paciente incluíam náusea, vômitos, sonolência e taquicardia sistólica (FISHER *et al.*, 2000).

### 3.2 Flavonóides e Ansiedade

Uma classe de compostos naturais que tem demonstrado um grande potencial na busca de novas moléculas com atividade ansiolítica são os flavonóides, um grupo de metabólitos secundários amplamente distribuído no reino vegetal (MARDER e PALADINI, 2002). Os flavonóides são biossintetizados a partir da via

dos fenilpropanóides, podendo ser encontrados na forma de aglicona livre ou conjugados com açúcares (HARBORNE, 1994).

Pode-se encontrar flavonóides de diversas formas estruturais. A maioria apresenta 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, comumente dispostos na forma tricíclica (anéis A, B e C). Conforme a posição do anel B e o grau de oxidação do anel C os flavonóides são classificados como: flavanos, flavonas, flavanonas, isoflavonas, isoflavanonas. Outros tipos de flavonóides são antocianos, auronas e chalconas (HAVSTEEN, 2002; ZUANAZZI e MONTANHA, 2003). Na Figura 3 estão representados alguns dos núcleos de flavonóides.



**Figura 3:** Estruturas químicas de alguns núcleos básicos de flavonóides.

Mais de 5000 flavonóides estão descritos e muitas são as ações biológicas a eles atribuídas, destacando-se antioxidante, antiinflamatória, hepatoprotetora, inibidora de enzimas, antitumoral, antiviral, espasmolítica e estrogênica (HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

Apesar das inúmeras atividades biológicas descritas para os flavonóides, até o início da década de 1980 não havia muitos dados disponíveis sobre a ação destas substâncias em nível de Sistema Nervoso Central. A primeira referência de flavonóides como ligantes do sítio benzodiazepínico, presente no complexo receptor GABA<sub>A</sub>, foi relatada por pesquisadores da indústria farmacêutica Roche, em 1983. Na busca por compostos *diazepam-like* endógenos, estes pesquisadores isolaram quatro isoflavonas a partir da urina bovina, sendo que três destas apresentaram afinidade pelo sítio benzodiazepínico. Com base nesta constatação, outras três isoflavonas foram sintetizadas, uma delas idêntica a formononetina, uma isoflavona natural. Porém, todos os compostos apresentaram baixa afinidade pelo receptor (Tabela 2) e não apresentaram atividade *in vivo* (LUCK *et al.*, 1983). Um destes compostos identificados na urina, o equol, foi também isolado do conteúdo ruminal bovino (MEDINA *et al.*, 1991).

**Tabela 2:** Afinidade de diferentes isoflavonas pelo sítio benzodiazepínico (LUCK *et al.*, 1983; MARDER e PALADINI; 2002)

Composto	CI <sub>50</sub> (µM)
S-7,4'-diidróxi-isoflavona (equol)	80
dl-3',7'-diidróxi-isoflavona	45
dl-4-hidróxi-7-metóxi-isoflavona	1300
dl-7-hidróxi-4-metóxi-isoflavona	> 1500
7-hidróxi-4'-metóxi-isoflavona (formononetina)	> 700
4'-hidróxi-7-metóxi-isoflavona	1100
3,7'-diidróxi-isoflavona	140

CI<sub>50</sub>= concentração inibitória 50% da ligação de [<sup>3</sup>H]-diazepam em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos.

Em 1988, NIELSEN e colaboradores descreveram o isolamento de um biflavonol, amentoflavona, a partir de uma tintura comercial usada no tratamento de ansiedade e epilepsia. Este foi o primeiro relato de uma molécula sem átomos de nitrogênio com alta afinidade pelo sítio benzodiazepínico (K<sub>i</sub> = 7 nM). A amentoflavona liga-se indistintamente a receptores benzodiazepínicos dos tipos I e II, uma vez que os valores de K<sub>i</sub> observados para a inibição da ligação de [<sup>3</sup>H]-diazepam em membranas de cerebelo e hipocampo, regiões cerebrais enriquecidas em receptores benzodiazepínicos tipo I e tipo II, respectivamente, foram similares. Em

um estudo *ex-vivo* não foram verificadas mudanças na ligação de [<sup>3</sup>H]-diazepam quando a amentoflavona havia sido administrada intraperitonealmente, o que sugere que esta seja rapidamente transformada em metabólitos que não possuem afinidade pelo sítio benzodiazepínico ou que não seja capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica (NIELSEN *et al.*, 1988). De fato, a permeabilidade da amentoflavona em células de capilar cerebral porcino é inferior a 2% (GUTMAN *et al.*, 2002). Esses dados corroboram estudos anteriores em que amentoflavona não apresentou nenhuma atividade em nível central, quando testada *in vivo*, tanto em ratos quanto em camundongos (CHAKRAVARTHY *et al.*, 1981).

A amentoflavona foi também identificada em outras espécies vegetais, por exemplo, *Hypericum perforatum* (NAHRSTEDT e BUTTERWECK, 1997). Devido a sua alta afinidade pelo sítio benzodiazepínico, alguns autores acreditam que ela possa ser responsável, ao menos em parte pelo efeito ansiolítico relatado para *H. perforatum* (BUTTERWECK *et al.*, 2002). No entanto, HANRAHAN e colaboradores (2003) demonstraram, através de estudos eletrofisiológicos, que a amentoflavona exerce uma ação moduladora negativa moderada ( $EC_{50} = 3,6 \mu\text{M}$ ) em receptores  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$  GABA<sub>A</sub> expressos em oócitos de *Xenopus leavis*. Segundo os autores, este efeito não parece ser mediado pelo sítio benzodiazepínico, pois não foi afetada na presença de flumazenil (um antagonista benzodiazepínico) ou diazepam.

No extrato etanólico de *Rhus pyroides* foi identificada a amentoflavona e um outro biflavonóide, agastiflavona, que deslocou a ligação de [<sup>3</sup>H]-flumazenil com  $K_i$  (constante de inibição) igual 37 nM (SVENNINGSEN, 2006). Outros biflavonóides, com estrutura semelhante à amentoflavona, também foram avaliados em ensaios de ligação ao receptor benzodiazepínico: ginkgetina e isoginkgetina apresentaram afinidade moderada ( $K_i = 2$  e  $6 \mu\text{M}$ , respectivamente), enquanto bilobetina, sciadopistina e hinokiflavona não apresentaram afinidade apreciável (NIELSEN *et al.*, 1988, MEDINA *et al.*, 1998; MARDER e PALADINI, 2002).

O primeiro monoflavonóide ligante específico benzodiazepínico e com atividade *in vivo* foi a crisina, isolada de *Passiflora caerulea*. Esta inibiu a ligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam a receptores benzodiazepínicos centrais ( $K_i = 3 \mu\text{M}$ ) e periféricos ( $K_i = 13\mu\text{M}$ ). A crisina não apresentou afinidade por  $\alpha$  e  $\beta$  adrenorreceptores, receptor muscarínico ou receptor GABAérgico. Apresentou também efeito

anticonvulsivante (0,04 mg/kg, i.c.v., camundongos) e ansiolítico (1 mg/kg, i.p., camundongos e ratos). Ambos os efeitos foram abolidos pela co-administração de flumazenil, fato que, somado aos dados obtidos *in vitro*, indica que estes efeitos estão vinculados à modulação do complexo receptor GABA<sub>A</sub> via ligação com sítio benzodiazepínico (MEDINA *et al.*, 1990; WOLFMAN *et al.*, 1994; ZANOLI *et al.*, 2000). Somente em doses muito mais altas (25-100 mg/kg, i.p., ratos) foi verificado efeito sedativo, porém este não foi bloqueado por flumazenil (ZANOLI *et al.*, 2000). Não foram verificados ação relaxante muscular (30 mg/kg, i.p., camundongos) ou sobre a memória (1 mg/kg, i.p., ratos) (WOLFMAN *et al.*, 1994; SALGUEIRO *et al.*, 1997). GOUTMAN e colaboradores (2003) verificaram que a crisina atua de modo distinto das benzodiazepinas clássicas, uma vez que não potencializa as correntes iônicas induzidas por GABA em receptores  $\alpha_1\beta_1\gamma_{2s}$  GABA<sub>A</sub> e  $\rho$ GABA<sub>C</sub> expressos em oócitos de *Xenopus leavis*. Em concentrações mais altas (nível  $\mu$ M), a crisina apresentou uma ação do tipo antagonista do canal ionóforo. Esta ação não parece estar vinculada ao sítio benzodiazepínico uma vez que não foi afetada pela presença de flumazenil e, além disso, a ação inibitória foi mais pronunciada sobre os receptores  $\rho$ GABA<sub>C</sub>, que não expressam o sítio benzodiazepínico.

Em um estudo de fracionamento bioquímico realizado a partir do extrato de *Matricaria recutita* foram identificadas diversas frações com afinidade pelo sítio benzodiazepínico. De uma dessas frações foi isolada apigenina que, de forma semelhante à crisina, apresentou afinidade pelo sítio benzodiazepínico ( $K_i = 4 \mu$ M) e efeito ansiolítico em camundongos (3 mg/kg, i.p.). Um discreto efeito sedativo foi observado apenas em doses elevadas (30 mg/kg, i.p.). Não foram observados efeitos miorelaxante, anticonvulsivante ou amnésico (VIOLA *et al.*, 1994a; SALGUEIRO *et al.*, 1997). AVALLONE e colaboradores (2000) e ZANOLI e colaboradores (2000) avaliaram o efeito ansiolítico da apigenina (1 – 25 mg/kg, i.p.) em ratos, em dois modelos animais de ansiedade: labirinto em cruz elevado e discriminação claro-escuro. Em nenhum dos modelos foi verificado efeito ansiolítico. Esta flavona 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 via interação com sítio benzodiazepínico. Estudos eletrofisiológicos revelaram que a apigenina (30  $\mu$ M) inibiu as correntes de cloreto induzidas por

GABA em receptores  $\alpha_1\beta_1\gamma_{2s}$  GABA<sub>A</sub>,  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$  GABA<sub>A</sub> e  $\rho$ GABA<sub>C</sub> sendo seu efeito mais pronunciado sobre o receptor GABA<sub>C</sub>. De forma semelhante à crisina, o efeito inibitório não foi afetado pela presença de flumazenil (GOUTMANN *et al.*, 2003; CAMPBELL *et al.*, 2004).

A flavona, núcleo básico de diversos flavonóides foi capaz de deslocar a ligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam com constante de inibição igual a 1  $\mu$ M. Também foi verificado efeito ansiolítico em camundongos na dose de 3 mg/kg, i.p. Em doses de 1 e 3 mg/kg, a flavona reduziu a atividade motora espontânea dos animais, indicando um possível efeito sedativo, porém no ensaio de *hole board*, quando testada em doses até 10 mg/kg (i.p.) esse efeito não foi confirmado (MEDINA *et al.*, 1998).

Uma fração enriquecida em flavonóides obtida do extrato de *Tilia tomentosa* apresentou atividade ansiolítica em camundongos. Também a partir do extrato dessa espécie, foi isolado o canferol, que apresentou baixa afinidade pelo receptor benzodiazepínico ( $K_i = 93 \mu$ M) e não apresentou efeito ansiolítico ou sedativo em camundongos em doses até 100 mg/kg, i.p. (VIOLA *et al.*, 1994b).

A partir do extrato de *Salvia guaranitica* foram isolados dois ligantes com baixa afinidade pelo sítio benzodiazepínico: o éster etílico do ácido caféico ( $K_i = 150 \mu$ M) e circiliol ( $K_i = 200 \mu$ M). O circiliol apresentou maior afinidade por receptores benzodiazepínicos tipo I ( $K_i = 20 \mu$ M) e também apresentou efeito sedativo em camundongos (2-4 mg/kg, i.p.) (MARDER *et al.*, 1996a; VIOLA *et al.*, 1997a).

A partir das partes aéreas de *Leptospermum scoparium* foram identificados 10 flavonóides com diferentes afinidades pelo sítio benzodiazepínico. Tais compostos, em ordem de afinidade são: 5- hidróxi-7-metóxi-6,8-dimetilflavan-3-ona ( $CI_{50} = 1,2 \mu$ M); 5,7-dimetoxiflavona ( $CI_{50} = 2,0 \mu$ M); 5-hidróxi-7-metóxi-6-metilflavona ( $CI_{50} = 3,3 \mu$ M); 5-hidróxi-7-metóxi-6,8-dimetilflavona ( $CI_{50} = 40 \mu$ M); 5,7-dimetóxi-6-metilflavona ( $CI_{50} = 45 \mu$ M); 5,7-dimetóxi-6-metilflavanona; 5-hidróxi-7-metóxi-6-metilflavanona; 5-hidróxi-7-metoxiflavanona; 5,7-dimetoxiflavanona, estes quatro últimos todos com  $CI_{50}$  superior a 100  $\mu$ M (HÄBERLEIN *et al.*, 1994; HÄBERLEIN e TSCHIERSCHE, 1998). A atividade central dessas substâncias não foi investigada *in vivo*.

A partir do extrato de uma planta medicinal peruana, *Jatropha cillata* conhecida pelos ameríndios como *huanarpo*, foram isolados dois flavonóides C-glicosilados (orientina e isoorientina) que apresentaram um efeito ansiolítico discreto no teste anti-conflito em roedores, porém dados sobre o mecanismo de ação desses flavonóides não foram encontrados nessa revisão (OKUYAMA *et al.*, 1996).

Do extrato hidroetanólico de *Artemisia herba-alba* foram isolados dinatina, hispidulina, escrofuléina e circilineol, que inibiram a ligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam ao sítio de ligação benzodiazepínico em membranas sinaptossomais de córtex de ratos com constantes de inibição iguais a 1,3; 8; 23 e 104  $\mu$ M, respectivamente. Dados sobre a atividade *in vivo* destes compostos ainda não foram relatados (SHEN *et al.*, 1994; SALAH e JÄGER, 2005).

*Scutellaria baicalensis* é uma das mais importantes plantas medicinais utilizada na medicina tradicional chinesa. Para esta espécie já foram relatadas atividade antibacteriana, antiviral, antioxidante e antitumoral (LIAO *et al.*, 1998). Além dessas atividades, também foi verificado seu efeito sobre o sistema nervoso central, e a partir de extratos de suas raízes foram isolados 26 flavonóides com diferentes afinidades pelo sítio benzodiazepínico do complexo receptor GABA<sub>A</sub> (Tabela 3).

Alguns desses flavonóides foram testados *in vivo* para avaliação de sua atividade central. Para a vogonina, foi observado efeito ansiolítico (7,5–30 mg/kg, v.o., camundongos), o qual foi antagonizado pela pré-administração de flumazenil. Nas doses testadas não foram detectados efeito sedativo ou miorreaxante. A dose letal mediana determinada para o composto foi 3,9 g/kg. Em estudos eletrofisiológicos foi verificado que a vogonina exerce uma modulação alostérica positiva em receptores  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  GABA<sub>A</sub> (EC<sub>50</sub> = 3  $\mu$ M) a qual foi parcialmente revertida na presença flumazenil. O efeito modulador positivo não foi detectado em receptores recombinantes que não apresentavam a subunidade  $\gamma$ . Sabe-se que o sítio de ligação de benzodiazepínicos é expresso no complexo receptor GABA<sub>A</sub> na interface entre as subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$ . Dessa maneira, o conjunto de dados obtidos permitiu inferir que a vogonina atue como um agonista parcial desse sítio de ligação (HUI *et al.*, 2002).

**Tabela 3:** Afinidades de flavonóides isolados das raízes de *Scutellaria baicalensis* Georgi pelo sítio de ligação benzodiazepínico do complexo receptor GABA<sub>A</sub> (WANG *et al.*, 2002).

<b>Composto</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>
baicaleína	10,1 ± 1,68
baicaleína-7-O-β-D-glicopiranosídeo	43,7 ± 2,40
baicalina	> 100
crisina	0,69 ± 0,12
crisina-7-O-β-D-glicuronopiranosídeo	> 100
oroxilina A	0,14 ± 0,01
oroxilina A-7-O-β-D-glicopiranosídeo	22,6 ± 1,30
sculcaplavona II	0,31 ± 0,088
scutelareína	21,0 ± 1,79
viscidulina II	45,7 ± 2,48
viscidulina III	6,8 ± 1,18
viscidulina III-2'-O-β-D-glicopiranosídeo	> 100
vogonina	1,26 ± 0,24
vogonosídeo	> 100
5,2'-diidróxi-7,8-dimetóxi-flavona	0,28 ± 0,076
5,6,7-triidróxi-4'-metóxi-flavona	21,4 ± 1,42
5,7-diidróxi-6,8-dimetóxi-flavona	0,36 ± 0,095
5,7,2'-triidróxi-6,8-dimetóxi-flavona	0,008 ± 0,0002
5,7,4'-triidróxi-8-metóxi-flavona	1,27 ± 0,08
5,7,2',6'-tetraidróxi-flavona	6,42 ± 0,95
6,2'-diidróxi-5,7,8,6'-tetrametóxi-flavona	32,8 ± 1,51
8,8''-baicaleína	12,5 ± 1,58
(2S)-5,6,7,4'-tetraidróxi-flavona	88,0 ± 5,46
(2S)-5,7-diidróxi-6-metóxi-flavona	> 100
(2S)-5,7,2',6'-tetraidróxi-flavona	58,6 ± 3,65
(2S)-5,7,8,4'-tetraidróxi-flavona	21,4 ± 1,32

Baicaleína e seu glicuronídeo, baicalina, apresentaram atividade ansiolítica, em camundongos, no teste de conflito de Vogel, nas doses de 10 e 20 mg/kg (i.p.), respectivamente. Este efeito foi bloqueado pela co-administração do antagonista benzodiazepínico flumazenil, mas não por pindolol, um antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, indicando que o efeito ansiolítico é mediado pelo sistema benzodiazepínico/GABAérgico e não pelo sistema serotoninérgico (LIAO *et al.*, 2003). Esses resultados são consistentes com dados anteriores onde foi verificado que a baicalina possui uma afinidade pelo sítio benzodiazepínico aproximadamente 10 vezes inferior a da baicaleína (HUI *et al.*, 2000).



O efeito ansiolítico da baicalina também foi verificado no labirinto em cruz elevado (7,5-30 mg/kg, i.p., camundongos), sem provocar efeito sedativo ou relaxamento muscular. Também foi observado efeito sinérgico entre a baicalina (3,75 mg/kg, i.p.) e diazepam (0,5 mg/kg, i.p.), e também entre baicalina (3,75 mg/kg, i.p.) e tetraidropalmatina (0,25 mg/kg, i.p.) - um alcalóide com atividade ansiolítica e hipnótica. Esses resultados apontam para o potencial uso da baicalina como ansiolítico, além de uma possível aplicação em terapias combinadas (XU *et al.*, 2006).

O flavonóide 5,7,2'-triidróxi-6,8-dimetóxi-flavona (K36), apresentou alta afinidade pelo sítio benzodiazepínico ( $K_i = 6,4$  nM). Foi verificada atividade ansiolítica na dose de 4 mg/kg, v.o., não sendo observados efeito sedativo, miorelaxante ou de incoordenação motora em aparelho *rota-rod* (1-8 mg/kg) em camundongos. Um dado interessante de se notar é o de que o efeito ansiolítico é detectado após 20 minutos da administração oral, porém após 60 minutos, esse efeito não é mais observado. Uma das possíveis explicações para este efeito, pode ser a rápida metabolização e excreção, devido ao fato de ser uma molécula polihidroxilada. Os resultados dos estudos eletrofisiológicos para K36 indicaram uma atuação como um modulador alostérico positivo do receptor GABA<sub>A</sub> (HUEN *et al.*, 2003a).

Oroxilina A (3,75 – 60 mg/kg) em camundongos não apresentou efeito algum, *per se*, em diferentes modelos animais. Contudo, na dose de 60 mg/kg, v.o. este bloqueou a ação ansiolítica, miorelaxante e de incoordenação motora, mas não os efeitos sedativo e anticonvulsivante provocados pela administração de diazepam (3 mg/kg, v.o.). Dados neuroquímicos revelaram uma “razão GABA” (determinada pela razão entre a IC<sub>50</sub> de um ensaio de ligação na ausência GABA pela IC<sub>50</sub> de um ensaio na presença de GABA) de 1,09, característica de antagonistas benzodiazepínicos. Com base em todos esses achados, os autores caracterizaram a 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 e colaboradores (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 (LIAO *et al.*, 2003). 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.

Puerarina (50 e 150 mg/kg, i.p.), uma isoflavona isolada das raízes de *Pueraria lobata*, reverteu os efeitos ansiogênicos associados com a retirada de álcool em ratos (17 dias com 7% de álcool na dieta). Também foi verificado que a pré-administração de puerarina (150 mg/kg, i.p.) resultou no bloqueio do efeito ansiogênico induzido pela administração de um agonista inverso do sítio benzodiazepínico (metil-6,7-dimetóxi-4-etil-β-carbolina-3-carboxilato, 0,5 mg/kg, i.p.) e também de RO 600175 (0,3 mg/kg i.p.), um antagonista de receptores 5-HT<sub>2C</sub>. Na concentração de 100 μM, a puerarina reduziu a ligação específica de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam e não alterou a recaptação de [<sup>36</sup>Cl<sup>-</sup>] induzida por muscimol em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. Todos esses dados contribuíram para corroborar a hipótese que a puerarina atue como um fraco antagonista do sítio de ligação de benzodiazepinas (OVERSTREET *et al.*, 2003).

Flavonóides também têm sido relacionados como componentes ativos em espécies de *Valeriana*, tradicionalmente usadas como sedativas. Da espécie *V. wallichii* foi isolada 6-metilapigenina, um composto inédito que foi capaz de inibir a ligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam em membranas corticais de ratos com K<sub>i</sub> = 0,5 μM. Foi verificada sua ação ansiolítica, em camundongos, na dose de 1 mg/kg, i.p. 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).

Linarina, um flavonóide glicosilado, isolado de *V. officinalis* apresentou atividade sedativa em camundongos (7 mg/kg, i.p.). Foi demonstrado, no mesmo estudo, que a combinação de linarina (4 mg/kg, i.p.) e ácido valerênico (5 mg/kg, i.p.) ou 6-metilapigenina (1 mg/kg, i.p.) resulta em um importante efeito sedativo

(FERNÁNDEZ *et al.*, 2004). Um outro flavonóide, 2S(-)-hesperidina, também foi isolado desta mesma espécie e apresentou efeito sedativo em doses de 2-4 mg/kg (i.p.) em camundongos. Estes flavonóides glicosilados não apresentaram efeito ansiolítico e tampouco tiveram afinidade pelo sítio benzodiazepínico (MARDER *et al.*, 2003). 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). O mecanismo de ação da hesperidina parece não envolver diretamente receptores GABA<sub>A</sub>, uma vez que não foram verificadas alterações nas correntes de cloreto induzidas por GABA em receptores  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$  GABA<sub>A</sub> e, ainda, o efeito sedativo deste flavonol não foi revertido pela pré-administração de picrotoxina, um antagonista não competitivo do canal GABA (FERNÁNDEZ *et al.*, 2006).

Com base nos achados da atividade sedativa para os flavonóides linarina e hesperidina, FERNÁNDEZ e colaboradores (2006) avaliaram a atividade depressora central de uma série de flavonóides glicosilados (2S-naringina, 2S-neohesperidina, didimina, diosmina, eriocitrina, gossipina, isohioifolina, narirutina, prunina e rutina) e sua atividade foi comparada com a anteriormente relatada para 2S-hesperidina e linarina. Nenhum dos flavonóides testados teve atividade superior aos utilizados para comparação, porém alguns destes exibiram efeito sedativo nos testes avaliados (*hole board*, tempo de sono barbitúrico e atividade locomotora), na seguinte ordem quanto a potência da atividade: 2S-hesperidina > linarina > rutina > diosmina ~ 2S-neohesperidina > gossipina ~ naringina. Nenhum destes compostos apresentou atividade sobre o canal GABA<sub>A</sub> *in vitro*.

Flavonóides glicosilados são facilmente metabolizados pelo organismo e uma das primeiras reações seria a hidrólise da porção glicídica com conseqüente absorção na forma de aglicona (WALLE, 2004). Assim, uma hipótese seria que a ação detectada *in vivo* para os flavonóides glicosilados poderia ser devida a sua aglicona. Contudo as agliconas, 2S-hesperetina, diosmetina, quercetina e narigenina não apresentaram nenhum efeito quando submetidas aos mesmos testes onde os glicosídeos apresentaram efeito sedativo, o que indica que a porção glicídica é importante para o efeito sedativo dos flavonóides estudados. Ainda que não se

tenha um estudo de relação estrutura-atividade completo, alguns pontos parecem importantes para a atividade: a ligação do tipo 1→6 entre ramnose e glicose e a presença do resíduo de açúcar na posição 7 no núcleo benzo- $\gamma$ -pirona parecem ser as mais importantes para a atividade (FERNÁNDEZ *et al.*, 2006).

A atividade sedativa de flavonóides glicosilados já havia sido relatada por KACZMAREK e SZPUNAR (1964) que verificaram que os flavonóides apiina, hiperosídeo, quercitrina, rutina e robinina diminuíam a excitabilidade induzida pela administração de cocaína (30 mg/kg i.p.) em ratos.

Uma série de outros flavonóides tiveram sua afinidade pelo receptor benzodiazepínico avaliada, porém nenhum destes mostrou afinidade apreciável: isoquercitrina ( $K_i = 10 \mu\text{M}$ ), 7,3'-dihidróxi-isoflavana ( $K_i = 45 \mu\text{M}$ ), tectocrisina ( $K_i = 10 \mu\text{M}$ ). Eriodictiol, narigenina, genisteína e floretina (em concentrações de até 25  $\mu\text{M}$ ), galangina, luteolina, fisetina, quercetina, rutina, rhoifolina, miricetina e acacetina (concentrações de até 100  $\mu\text{M}$ ) não tiveram afinidade pelo sítio de ligação benzodiazepínico (MARDER e PALADINI, 2002).

Considerando todos os dados apresentados, é possível concluir que os flavonóides naturais apresentam-se como moléculas interessantes na busca de novos fármacos ansiolíticos e sedativos. O efeito ansiolítico de grande parte desses compostos foi revertido pela administração de flumazenil, indicando a participação do sítio benzodiazepínico neste efeito. Contudo, nos ensaios *in vitro* foi verificada uma afinidade moderada por este sítio (ordem de  $\mu\text{M}$ ), além disso, em grande parte dos estudos eletrofisiológicos, não foi observada atividade moduladora positiva do receptor GABA<sub>A</sub>, diferindo dos benzodiazepínicos. Também é importante notar que a glicosilação dos flavonóides resulta na redução na afinidade pelo sítio benzodiazepínico. Apesar disso alguns flavonóides glicosilados apresentam atividade ansiolítica, contudo, a atividade sedativa é mais pronunciada para estes compostos.

Um quadro resumo com os achados bioquímicos e farmacológicos para os flavonóides naturais encontra-se na Tabela 4.

**Tabela 4:** Dados neuroquímicos e farmacológicos comparativos entre os flavonóides naturais com atividade ansiolítica/sedativa. (As doses se referem a estudos realizados em camundongos pela via i.p., casos em que seja usada outra via ou espécie estão explicitados).

Composto	<i>Binding</i>	Efeitos farmacológicos (dose mínima efetiva – mg/kg, i.p.)						Referência
	Ki ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	Ansiolítico <sup>b</sup>	Sedativo <sup>c</sup>	Miorrelaxante <sup>d</sup>	Locomotor <sup>e</sup>	Anticonvulsivante <sup>f</sup>	Amnésico <sup>g</sup>	
crisina	3	1	NE (10)	NE (30)	NE (30)	0,04 (i.c.v.)	NE (10)	MEDINA <i>et al.</i> , 1990; WOLFMAN <i>et al.</i> , 1994; SALGUEIRO <i>et al.</i> , 1997; ZANOLI <i>et al.</i> , 2000
apigenina	4	3	30	NE (100)	↓25 (ratos)	-	NE (10)	VIOLA <i>et al.</i> , 1994; SALGUEIRO <i>et al.</i> , 1997; AVALLONE <i>et al.</i> , 2000
flavona	1	3	NE (10)	NE (10)	↑1	-	-	MEDINA <i>et al.</i> , 1998
canferol	93	NE (100)	NE (100)	-	-	-	-	VIOLA <i>et al.</i> , 1994
cirsiliol	200	NE	2	NE (30)	-	-	-	MARDER <i>et al.</i> , 1996a; VIOLA <i>et al.</i> , 1997a
vogonina	1,3	7,5 (v.o.)	NE (30)	NE (30)	NE (30)	-	-	HUI <i>et al.</i> , 2002
baicaleína	10	10 *	-	-	-	-	-	HUI <i>et al.</i> , 2000; LIAO <i>et al.</i> , 2003
baicalina	> 100	20* e 7,5	-	-	-	-	-	HUI <i>et al.</i> , 2000; LIAO <i>et al.</i> , 2003; XU <i>et al.</i> , 2006
5,7,2'-triidróxi-6,8-dimetilflavona (K36)	0,0064	4 (v.o.)	NE (8)	NE (8)	NE (8)	-	-	HUEN <i>et al.</i> , 2003a
oroxilina A	0,14	NE (60)	NE (60)	NE (60)	NE (60)	NE (60)	-	HUEN <i>et al.</i> , 2003b

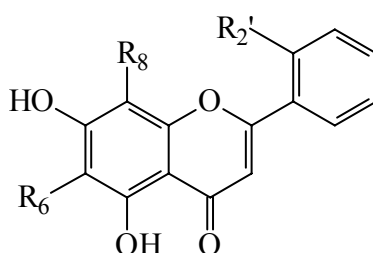
**Tabela 4:** Dados neuroquímicos e farmacológicos comparativos entre os flavonóides naturais com atividade ansiolítica/sedativa. (As doses se referem a estudos realizados em camundongos pela via i.p., casos em que seja usada outra via ou espécie estão explicitados) (CONTINUAÇÃO).

Composto	<i>Binding</i>	Efeitos farmacológicos (dose mínima efetiva – mg/kg, i.p.)						Referência
	Ki (vM) <sup>a</sup>	Ansiolítico <sup>b</sup>	Sedativo <sup>c</sup>	Miorrelaxante <sup>d</sup>	Locomotor <sup>e</sup>	Anticonvulsivante <sup>f</sup>	Amnésico <sup>g</sup>	
6-metilapigenina	0,5	1	NE (10)	-	NE (1)	-	-	WASOWSKI <i>et al.</i> , 2002 MARDER <i>et al.</i> , 2003
linarina	NI	-	7	-	-	-	-	FERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2004
2S(-)-hesperidina	NI	-	4	-	↓ 5	-	-	MARDER <i>et al.</i> , 2003 FERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2006
diosmetina	NI	-	30	-	↓ 30	-	-	FERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2006
rutina	NI	-	10	-	↓ 10	-	-	FERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2006
Narigenina, gossipina, 2S-neohesperidina	NI	-	30	-	NE (30)	-	-	FERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2006

<sup>a</sup> deslocamento da ligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos; <sup>b</sup> labirinto em cruz elevado (\* teste de conflito de Vogel), <sup>c</sup> *hole-board test*, <sup>d</sup> *horizontal wire test*, <sup>e</sup> atividade locomotora – caixa de ambulância, <sup>f</sup> proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.), <sup>g</sup> esquiva inibitória (em ratos). NE() = não observado efeito (máxima dose testada). NI = não observada inibição da ligação.

Os achados da atividade central de diversos flavonóides naturais motivaram estudos de química medicinal no intuito de obter novos compostos com atividade superior aos naturais. Partindo-se de estudos de relação estrutura-atividade existentes para os fármacos benzodiazepínicos, os quais estabeleciam que a presença de grupamentos eletronegativos na molécula aumentava a atividade e afinidade destes pelo sítio benzodiazepínico, o grupo liderado por Alejandro Paladini e Jorge Medina (*Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas, Universidad de Buenos Aires, Argentina*) centrou seus esforços na modificação estrutural de flavonóides e avaliação farmacológica *in vitro* e *in vivo* dos derivados obtidos (MEDINA *et al.*, 1997; MEDINA *et al.*, 1998; PALADINI *et al.*, 1999; MARDER e PALADINI, 2002).

As primeiras tentativas, através da introdução de halogênios à molécula da crisina (cuja afinidade pelo sítio benzodiazepínico e atividade *in vivo* já haviam sido determinadas) não tiveram o sucesso almejado, pois os derivados obtidos apresentaram afinidade semelhante ou inferior ao composto original (MARDER, 1997).

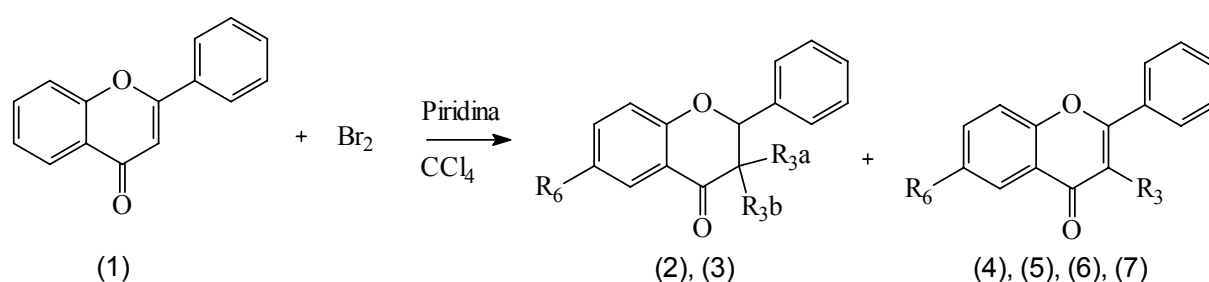


Composto	Substituição			K <sub>i</sub> (μM)
	R <sub>6</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>2</sub> '	
1	Br	Br	H	0,7
2	I	I	H	1
3	H	H	F	8
4	H	H	Cl	8
Crisina	H	H	H	3

Uma segunda abordagem foi a modificação estrutural da flavona, núcleo fundamental de flavonóides com ação central, e para a qual havia sido detectada uma afinidade moderada pelo receptor benzodiazepínico e atividade ansiolítica em camundongos. Inicialmente, três distintas sínteses foram empregadas com finalidade de obter: bromoflavonas (por brominação da flavanona); nitroflavonas (por nitração

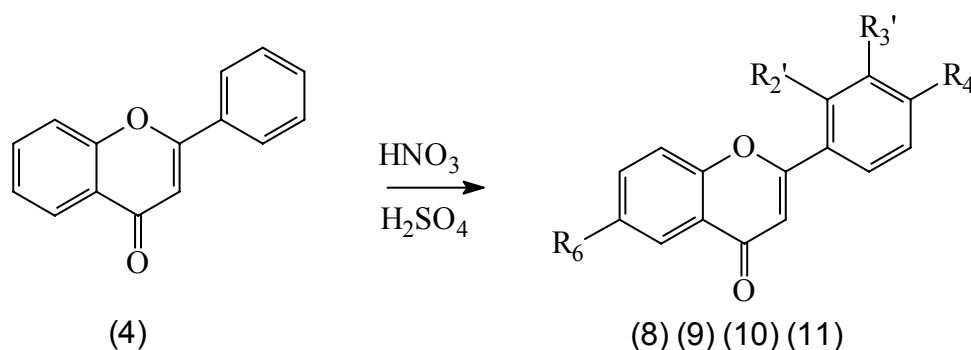
da flavona) e nitroderivados da 6-bromoflavona (por nitração da 6-bromoflavona). Os produtos obtidos tiveram sua afinidade pelo receptor benzodiazepínico avaliada através do deslocamento da ligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam em membranas sinaptossomais de córtex de ratos (MARDER *et al.*, 1997). As sínteses realizadas, produtos obtidos e afinidades pelo receptor benzodiazepínico encontram-se sumarizados a seguir:

### I) Bromoflavonas - brominação da flavanona



Composto	Substituição				Ki (μM)
	R <sub>3a</sub>	R <sub>3b</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>6</sub>	
(1) flavanona	H	H	-	H	40
(2) 3,3-dibromoflavanona	Br	Br	-	H	>100
(3) 3,3,6-tribromoflavanona	H	Br	-	Br	>100
(4) flavona	-	-	H	H	1
(5) 3-bromoflavona	-	-	Br	H	85
(6) 6-bromoflavona	-	-	H	Br	0,07
(4) 6,3-dibromoflavona	-	-	Br	Br	60

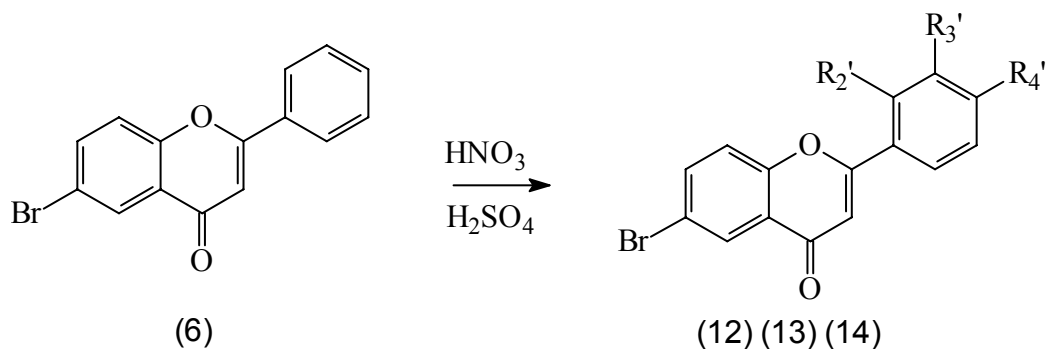
### II) Nitroflavonas - nitração da flavona



Composto	Substituição				Ki (μM)
	R <sub>6</sub>	R <sub>2'</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	
(8) 2'-nitroflavona	H	NO <sub>2</sub>	H	H	>20
(9) 4'-nitroflavona	H	H	H	NO <sub>2</sub>	>20
(10) 6,3'-nitroflavona	NO <sub>2</sub>	H	NO <sub>2</sub>	H	0,026
(11) 6,4'-nitroflavona	NO <sub>2</sub>	H	H	NO <sub>2</sub>	17

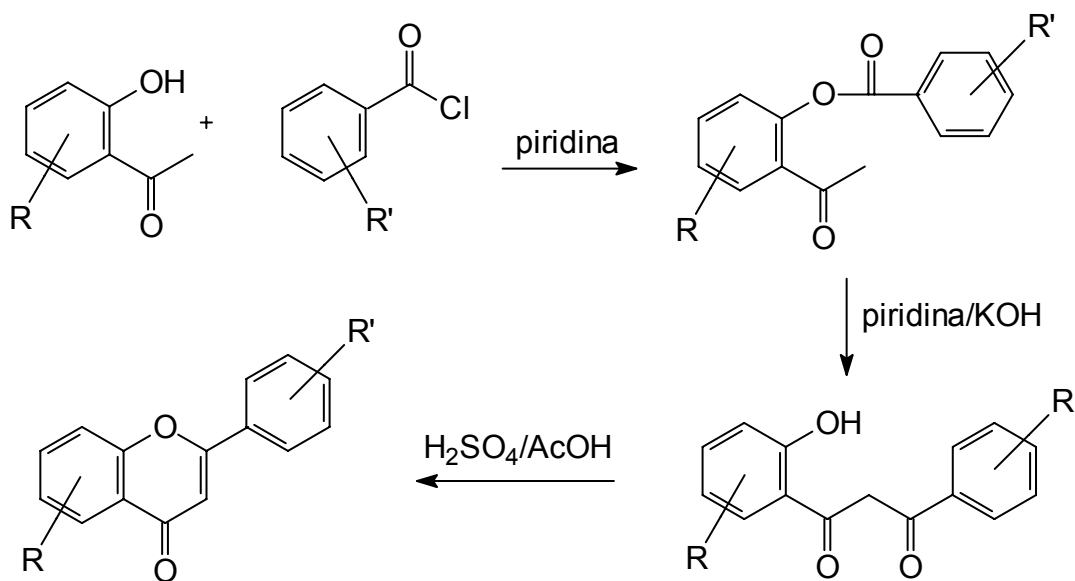


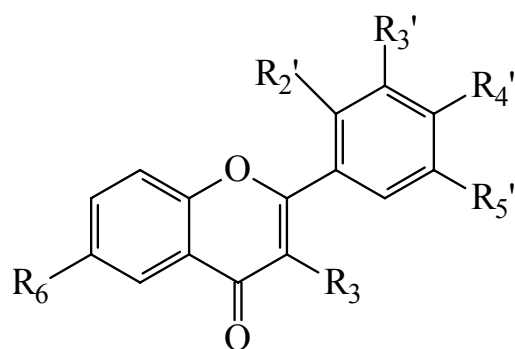
### III) Nitroderivados da 6-bromoflavona - *nitração da 6-bromoflavona*



Composto	Substituição			Ki (μM)
	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	R <sub>4</sub> '	
(12) 6-bromo-2'-nitroflavona	Br	H	H	0,2
(13) 6-bromo-3'-nitroflavona	H	Br	H	0,001
(14) 6-bromo-4'-nitroflavona	H	H	Br	0,2

Em outra estratégia foi empregada a reação de Baker-Venkataraman modificada, uma reação bastante empregada para obtenção de flavonóides. Nesta reação, uma hidroxiacetofenona e um derivado cloreto de benzoila são convertidos em um éster de benzoila. Este último quando tratado com base forma 1,3 dicetona. O tratamento desta dicetona com ácido leva a ciclização e geração do derivado de flavona correspondente (MARDER *et al.*, 1997; MARDER e PALADINI, 2002).





(15) – (28)

Composto	Substituição						Ki (μM)
	R <sub>3</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	R <sub>4</sub> '	R <sub>5</sub> '	
(15)	H	F	H	H	H	H	4,5
(16)	H	Cl	H	H	H	H	0,164
(17)	H	NO <sub>2</sub>	H	H	H	H	0,275
(18)	H	H	H	NO <sub>2</sub>	H	H	0,285
(19)	H	H	H	Cl	H	H	0,614
(20)	H	H	H	Br	H	H	0,413
(21)	H	H	H	H	Br	H	>20
(22)	H	H	H	NO <sub>2</sub>	H	NO <sub>2</sub>	>20
(23)	Br	H	H	NO <sub>2</sub>	H	H	>20
(24)	H	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	H	H	H	>10
(25)	H	F	H	NO <sub>2</sub>	H	H	0,180
(26)	H	Cl	H	NO <sub>2</sub>	H	H	0,008
(27)	H	Br	H	Br	H	H	0,019
(28)	H	NO <sub>2</sub>	H	Br	H	H	0,025

Outra abordagem foi a utilização de química combinatória, empregando-se a reação de Baker-Venkataraman acima descrita. Dessa maneira obtiveram-se outros 36 derivados, distribuídos em nove pequenas bibliotecas que foram construídas pela reação de quatro distintos cloretos de benzoila com nove diferentes hidroxiacetofenonas. Dos compostos obtidos, quatro apresentaram alta afinidade pelo sítio benzodiazepínico: 6-bromo-3-flúor-flavona (Cl<sub>50</sub>= 42 nM); 6,3'-dicloro-flavona (Cl<sub>50</sub>= 23 nM), 6-bromo-3'cloro-flavona (Cl<sub>50</sub>= 17 nM); 6-cloro-3'-bromo-flavona (Cl<sub>50</sub>= 23 nM). Estes derivados também apresentaram uma “razão GABA” próxima a um, indicando um possível perfil agonista parcial de receptores benzodiazepínicos. Maiores detalhes acerca dos compostos utilizados e dos produtos obtidos podem ser acessados no trabalho de MARDER *et al.*, 1998.

Analisando o conjunto de novas substâncias obtidas (aproximadamente 70) é possível concluir que a estratégia empregada realmente levou à obtenção de compostos com maior afinidade (até 100 vezes superior) pelo sítio benzodiazepínico que o composto protótipo (flavona  $K_i = 1 \mu\text{M}$ ). Em uma análise preliminar pode-se visualizar que as posições 6 e 3' são as mais efetivas para a substituição em relação ao incremento da atividade. Os compostos substituídos na posição C6 por um átomo de cloro, bromo ou grupamento nitro e um halogênio ou grupo nitro na posição C3' apresentaram afinidade 40 a 1000 vezes maior que a estrutura protótipo. Por outro lado, substituições nas posições C3, C2', C4' apresentam uma influência negativa na afinidade destes compostos.

Alguns dos flavonóides obtidos foram submetidos à avaliação farmacológica *in vivo* em modelos animais clássicos de comportamentos mediados pelo sistema benzodiazepínico/GABAérgico (MEDINA *et al.*, 1997). Os principais resultados encontram-se sumarizados na Tabela 5.

O primeiro ponto que deve ser avaliado quando analisamos o conjunto de dados apresentado é o de que além de possuírem maior afinidade que a molécula protótipo, alguns dos derivados, como a 6,3'-dinitroflavona e 6-bromo-3'-nitroflavona, possuem atividade ansiolítica em doses muito menores do que a do controle positivo empregado nos testes (diazepam 1 mg/kg, i.p.).

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, 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).

**Tabela 5:** Dados neuroquímicos e farmacológicos comparativos entre os derivados flavônicos sintéticos

Composto	<i>Binding</i>	Efeitos farmacológicos em camundongos, dose mínima efetiva – mg/kg					Referência
	Ki (nM) <sup>a</sup>	Ansiolítico <sup>b</sup>	Sedativo <sup>c</sup>	Miorrelaxante <sup>d</sup>	Locomotor <sup>e</sup>	Anticonvulsivante <sup>f</sup>	
6-bromoflavona	70	0,5	3	10	NE (3)	-	MARDER <i>et al.</i> , 1996b
6-bromo-3'-nitroflavona	15,5	0,01	10	NE (30)	NE (1)	0,1	VIOLA <i>et al.</i> , 1997b WOLFMANN <i>et al.</i> , 1998
6-cloro-3'-nitroflavona	6,7	NE (3)	NE (30)	NE (30)	NE (10)	NE (3)	VIOLA <i>et al.</i> , 2000b
6,3'-dibromoflavona	18,7	0,1	30	NE (30)	NE (30)	NE (1)	VIOLA <i>et al.</i> , 2000a
6,3'-dinitroflavona	12	0,001	10	NE (10)	10	NE (6)	MARDER <i>et al.</i> , 1995 WOLFMANN <i>et al.</i> , 1996
6-nitro-3'-bromoflavona	17,1	0,3	30	NE (30)	NE (30)	NE (1)	VIOLA <i>et al.</i> , 2000a
6-metil-3'-bromoflavona	13,1	NE (10)	NE (10)	NE (10)	NE (10)	NE (10)	VIOLA <i>et al.</i> , 1999

<sup>a</sup> deslocamento da ligação de [H3]-flunitrazepam em membranas de córtex cerebral de ratos; <sup>b</sup> labirinto em cruz elevado, <sup>c</sup> *hole-board test*, <sup>d</sup> *horizontal wire test*, <sup>e</sup> atividade locomotora (Opto-varimex<sup>®</sup>), <sup>f</sup> proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.). NE() = não observado efeito (máxima dose testada).

Além disso, as modificações realizadas também resultaram em compostos com atividades diferentes da flavona: 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 bloquear os efeitos ansiolítico, anticonvulsivante, miorreaxante e de incoordenação motora causados pelo diazepam (VIOLA *et al.*, 1999; VIOLA *et al.*, 2000b).

Em alguns destes trabalhos, os autores sugerem que certos compostos sintetizados possuem potência ansiolítica superior ao diazepam, usado como controle positivo durante os ensaios. Com base nessa hipótese, GRIEBEL e colaboradores (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 neuroquímicos revelaram que o composto 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, indicando uma certa seletividade para receptores benzodiazepínicos tipo I (BZP- $\omega$ 1), uma vez que estes são prevalentes no cerebelo. Na bateria de ensaios ansiolíticos 6-bromoflavona (3-10 mg/kg, i.p.) e 6-bromo-3'-nitroflavona (0,3-1 mg/kg, i.p.) foram ativos nos testes de conflito de Vogel (ratos) e no labirinto em cruz elevado (ratos), porém nos testes de discriminação claro/escuro (camundongos) e no teste de conflito de Geller (ratos) não foi observado esse efeito. A atividade ansiolítica destes compostos foi revertida pela co-administração de flumazenil apenas no labirinto em cruz elevado.

Foi realizada ainda uma bateria de ensaios de defesa, quando os camundongos foram expostos a um predador natural (rato) ambos os compostos testados (6-bromoflavona e 6-bromo-3'-nitroflavona) não alteraram o comportamento de fuga ou de avaliação de risco dos animais. Analisando conjuntamente os dados obtidos foi possível concluir que os compostos possuem atividade ansiolítica, porém com um perfil diferenciado do diazepam (GRIEBEL *et al.*, 1999).

Atentos a esses dados, outros pesquisadores também buscaram sintetizar e caracterizar farmacologicamente derivados de flavonóides. LOPES e colaboradores (2004) descreveram a síntese de um isoflavonóide (2-metóxi-3,8,9-triidroxicumestano), codificado como PCALC36. Essa substância inibiu a ligação de

[<sup>3</sup>H]-flunitrazepam em membranas sinaptosomais de ratos com  $Cl_{50}$  de 13,8  $\mu$ M. Dados eletrofisiológicos mostraram que PCALC36 (60  $\mu$ M) causou uma pequena redução (20%) nas correntes inibitórias GABAérgicas registradas pela técnica de *patch clamp* em célula íntegra em culturas hipocámpais de ratos. Além disso, essa substância antagonizou completamente o efeito do midazolam nessa técnica. Todos esses dados corroboram a razão GABA determinada como 0,68, preditiva de agonistas inversos do sítio benzodiazepínico. Apesar de estar bem estabelecido que esse tipo de molécula possa induzir convulsões e ansiedade, os autores acreditam que elas podem ser úteis na clínica por aumentarem a função cognitiva. Uma outra possibilidade do emprego de agonistas inversos do sítio benzodiazepínico seria na reversão da intoxicação com depressores centrais, especialmente GABAérgicos, por exemplo, o etanol (LOPES *et al.*, 2004).

### 3.3 Saponinas e ansiedade

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 são assim denominadas quando apresentam duas cadeias de açúcares ligadas a diferentes carbonos da aglicona. Raramente ocorrem saponinas tridesmosídicas (HOSTETTMAN e MARSTON, 1995).

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

Quanto às 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 diferentes espécies (principalmente do gênero *Panax*) cujos rizomas e raízes são utilizados em preparações classificadas como agentes adaptógenos, isto é, com ação não específica, normalizadora das funções do organismo (RATES e GOSMANN, 2001). Muitos compostos foram

isolados das partes subterrâneas do ginseng, principalmente saponinas derivadas do damarano ou do ácido oleanólico, conhecidas como ginsenosídeos (TANAKA *et al.*, 2000; DU *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2004).

PARK e colaboradores (2005) realizaram uma comparação do efeito ansiolítico em camundongos entre *ginseng vermelho* (RG) e *ginseng branco* (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 como 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 teve maior atividade.

Para os ginsenosídeos Rb1 (10-50 mg/kg, v.o.), Rg1 (10-50 mg/kg, v.o.), Rg5 (25-50 mg/kg, v.o.) e Rk (10-50 mg/kg, v.o.), também foi observado efeito ansiolítico, em camundongos, no labirinto em cruz elevado (CHA *et al.*, 2005; CARR *et al.*, 2006). Uma mistura dos ginsenosídeos Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub> e Rc prolongou o tempo de sono induzido por hexabarbital e reduziu a atividade locomotora espontânea em camundongos, ações características de substâncias depressoras do SNC (ATTELE *et al.*, 1999).

Em estudos neuroquímicos realizados com os ginsenosídeos foi verificado que Rb1, Rb2, Rc, Re, Rf e Rg1 inibiram a ligação de [<sup>3</sup>H]-muscimol ao receptor GABAérgico. Os ginsenosídeos Re e Rf aumentaram a ligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam ao sítio de ligação benzodiazepínico. O ginsenosídeo Rc inibiu a ligação de [<sup>3</sup>H]-baclofeno ao receptor GABA<sub>B</sub> (KIMURA *et al.*, 1994). Este último também potencializou as correntes iônicas estimuladas por GABA, em receptores GABA<sub>A</sub> ( $\alpha_1\beta_1\gamma_2s$ ) expressos em oócitos de *Xenopus*, de forma dose-dependente. Esse efeito foi bloqueado por bicuculina, um antagonista do receptor GABA e por picrotoxina, um bloqueador do canal GABA<sub>A</sub> (CHOI *et al.*, 2003).

TACHIKAWA e colaboradores (1999) verificaram a redução causada pelo ginsenosídeo Rg2 (1-100  $\mu$ M) na secreção de catecolaminas estimulada por acetilcolina e GABA em células adrenais bovinas. De forma semelhante, o

ginsenósídeo Rg3 (1-100  $\mu$ M) também reduziu a secreção de catecolaminas induzida por acetilcolina, GABA e neurotensina e, em altas concentrações (100  $\mu$ M), também a 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 que Rg2 é um bloqueador seletivo de receptores ionotrópicos ( $GABA_A$  e nicotínico) enquanto Rg3, além dessa ação, seja também um antagonista de receptores muscarínico e histamínico.

Majonosídeo-R2 (M-R2) uma saponina do tipo ocotilol, constituinte majoritário de *P. vietnamensis*, atenuou o efeito antinociceptivo induzido por estresse em camundongos (HUONG *et al.*, 1995). Esta mesma saponina (3,1-12,5 mg/kg, v.o.) reverteu a redução do sono barbitúrico causada por estresse. Esse efeito foi bloqueado por flumazenil (1 mg/kg, i.v.), indicando o envolvimento do sistema 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).

O tratamento com M-R2 (3,1-12 mg/kg, i.p. ou 5-10  $\mu$ g, i.c.v.) reverteu, de modo dose-dependente a redução no sono causada pelo isolamento social. Essa ação foi significativamente atenuada pela administração de sulfato de pregnenolona (10  $\mu$ g, 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  $\alpha$ -helical-corticotrofina (antagonista do fator de liberação de corticotrofina - CRF) reverteram a redução no sono barbitúrico induzida por pregnenolona 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- $\alpha$ -hidroxila, uma característica necessária para esta ação. Dessa forma, sugere-se que esta saponina atue aumentando os níveis de agonistas neuroesteróides  $GABA_A$  (HUONG *et al.*, 1997).

A fração butanólica de *Albizzia lebbeck*, 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, de forma dose dependente. Esta fração também reverteu a hipotermia e passividade causada por baclofeno (10 mg/kg), um agonista de receptores GABA<sub>B</sub>, sugerindo que a modulação deste tipo de receptores esteja envolvida nos efeitos observados (UNE *et al.*, 2001).

Também foi verificado efeito ansiolítico para a fração de saponinas de *P. quinquefolium* (50 e 100 mg/kg) em três modelos animais (labirinto em cruz elevado, discriminação claro/escuro e *hole board*). Essa fração de saponinas possui um perfil cromatográfico similar à fração de saponinas de *P. ginseng*, dessa forma, sugerindo que os ginsenosídeos também estejam envolvidos no efeito observado para esta espécie (WEI *et al.*, 2007). Além disso, já havia sido demonstrado a ação da fração de saponinas de *P. quinquefolium* sobre o sistema GABAérgico, o que pode explicar, ao menos em parte, o efeito ansiolítico observado (YUAN *et al.*, 1998).

### **3.4 Alcalóides $\beta$ -carbolínicos e o Sistema Nervoso Central**

As  $\beta$ -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; SCHRIPSEMA *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  $\beta$ -carbolinas relaciona-se com atividade ansiolítica/ansiogênica 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  $\beta$ -carbolinas sintéticas com atividades bem estabelecidas na literatura. Uma dose de 30 mg/kg de  $\beta$ -carbolina-3-carboxilato-t-butil-éster ( $\beta$ -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- $\beta$ -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  $\beta$ -carbolínico, metil-6,7-dimetóxi-4-etil- $\beta$ -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. MATERIAIS E MÉTODOS**



#### **4.1 Material vegetal**

As partes aéreas de *Passiflora alata*, foram coletadas em janeiro de 2005 na cidade de Canoas (RS) e identificadas pela Profa. Dra. Lilian Auler Mentz (Programa de Pós-Graduação em Botânica – UFRGS). Material testemunho encontra-se depositado no herbário do Departamento de Botânica sob registro ICN133727.

#### **4.2 Material biológico**

Para os experimentos comportamentais foram utilizados camundongos CF1, machos, adultos (20-30 g), provenientes da colônia da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Antes dos experimentos, os animais foram ambientados por um período mínimo de 72 horas no biotério de passagem da Faculdade de Farmácia - UFRGS, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C), sistema de exaustão e umidade monitorada. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (17x28x13 cm) com no máximo 8 animais em cada, com livre acesso à água e alimento (ração certificada Nuvilab<sup>®</sup>), exceto nas seis horas precedentes à administração dos tratamentos. Os camundongos foram ambientados à sala de experimentação por um período mínimo de uma hora antes da realização dos experimentos, excetuando-se no teste do labirinto em cruz elevado, onde o período de habituação foi de duas horas.

Todos os experimentos comportamentais foram realizados no período compreendido entre as 12 e 16 horas.

Para os ensaios neuroquímicos, foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, pesando entre 250 - 300 g, provenientes do Biotério Central da *Facultad de Farmácia y Bioquímica* da *Universidad de Buenos Aires*, Buenos Aires, Argentina.

#### **4.3 Fármacos, drogas e solventes**

Diazepam (Germed, São Paulo/BR), pentobarbital e flumazenil (Cristália, São Paulo/ BR). Vitexina e isovitexina (Roth<sup>®</sup>). Acetato de etila, acetona, ácido acético,

etanol, metanol (Nuclear<sup>®</sup>), éter etílico e clorofórmio (Merck<sup>®</sup>), todos em grau p.a.; acetonitrila grau HPLC (Merck<sup>®</sup>). Radioligantes: [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam (New England Nuclear – EUA). [<sup>3</sup>H]-TBOB (t-butilbiccicloortobenzoato) (Amersham Biosciences Ltda. – UK).

#### **4.4 Preparação dos extratos**

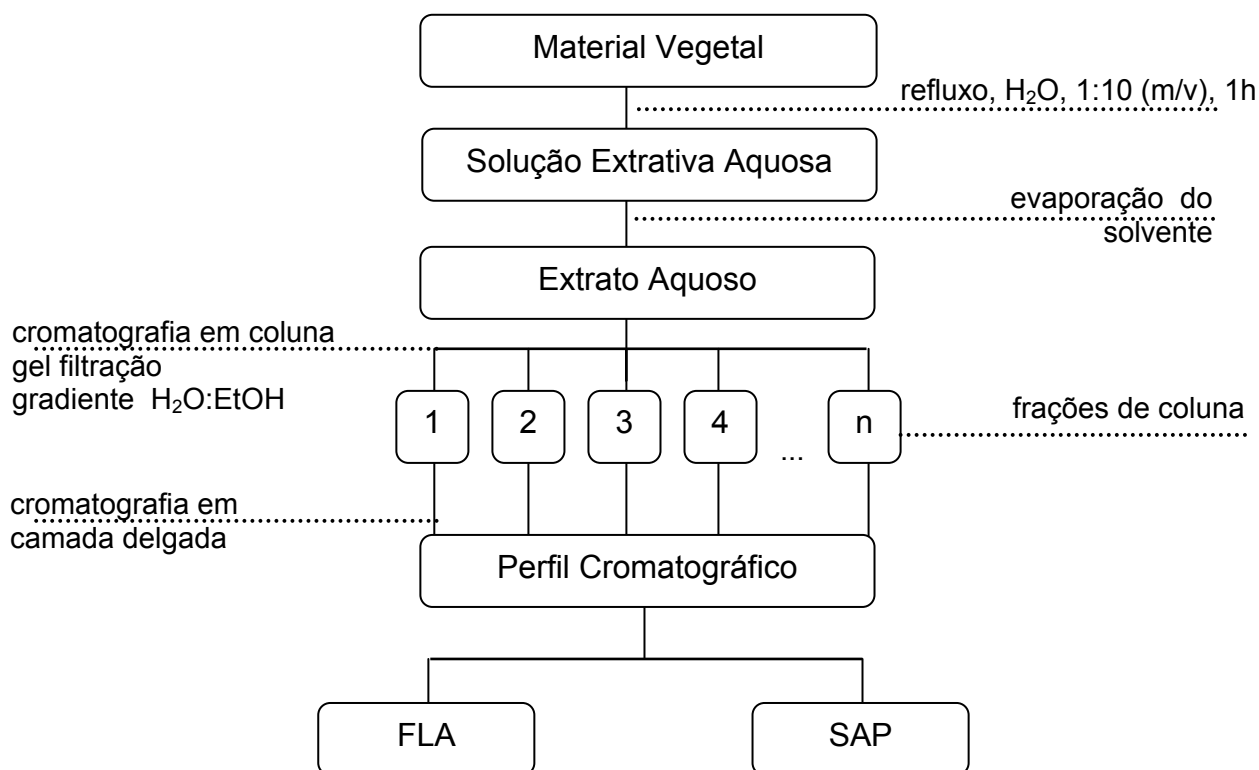
O material vegetal foi selecionado e seco em estufa de ar circulante (temperatura inferior a 40 °C) durante 7 dias. Após este período, as folhas foram cominuídas em triturador de facas.

O pó das folhas de *P. alata* foi submetido à extração com água destilada numa proporção 1:10 (m/v) sob refluxo durante 60 minutos, resultando na solução extrativa aquosa. Também foi preparada uma solução extrativa hidroetanólica, usando etanol 70% como líquido extrator, nas mesmas condições descritas acima. Após arrefecimento, as misturas foram filtradas e os extratos resultantes foram levados à secagem, sob pressão reduzida em temperatura inferior a 50 °C.

#### **4.5 Obtenção das frações a partir do extrato aquoso**

O extrato aquoso foi submetido à cromatografia em coluna sobre gel de dextrano (Sephadex<sup>®</sup> LH20), tendo como eluente um gradiente de água:etanol (variando de 100% de água até 100% de etanol). As frações obtidas foram cromatografadas em cromatofolhas de gel de sílica (Aldrich<sup>®</sup>) seguido de reação de cor com anisaldeído sulfúrico e aquecimento para visualização das saponinas, e acetato de etila:acetona:metanol:água (6:2:1:1 v/v) seguido de reação de cor com reagente natural/UV<sub>254</sub>, para a visualização dos flavonóides (WAGNER *et al.*, 1984). As frações com perfil cromatográfico semelhante foram reunidas e codificadas como FLA (fração enriquecida em flavonóides) e SAP (fração enriquecida em saponinas). Na figura 4 está representado um esquema que sumariza a obtenção e purificação das frações a partir do extrato aquoso.





**Figura 4:** Esquema utilizado para obtenção e purificação da fração enriquecida em flavonóides (FLA) e fração enriquecida em saponinas (SAP) a partir do extrato aquoso das folhas de *P. alata*.

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

#### 4.6 Experimentos comportamentais

A fração de flavonóides e fração de saponinas obtidas a partir do extrato aquoso, bem como o extrato hidroetanólico de *P. alata*, foram avaliados em diferentes modelos comportamentais para avaliação da atividade ansiolítica e atividade geral sobre o Sistema Nervoso Central.

#### 4.6.1 Tratamentos

Os camundongos foram tratados com volumes proporcionais a 1mL/100g, tanto para a via oral quanto para a via intraperitoneal, conforme protocolo específico de cada experimento. Todos os grupos experimentais foram constituídos por, no mínimo, 8 animais. A faixa de doses escolhida foi baseada em trabalhos anteriores com a espécie em estudo (PETRY *et al.*, 2001, DE PARIS, *et al.*, 2002; REGINATTO *et al.*, 2006; FENNER, 2006).

As frações FLA e SAP foram dissolvidas em solução salina (0,9 g%). Diazepam, flumazenil e o extrato hidroetanólico de *P. alata* foram dissolvidos em uma solução de polissorbato 80 (Tween 80<sup>®</sup>) 1% em salina, e a dissolução foi facilitada, quando necessário, com auxílio de aparelho de ultra-som.

Os grupos experimentais empregados nos diferentes testes comportamentais encontram-se sumarizados na Tabela 6.

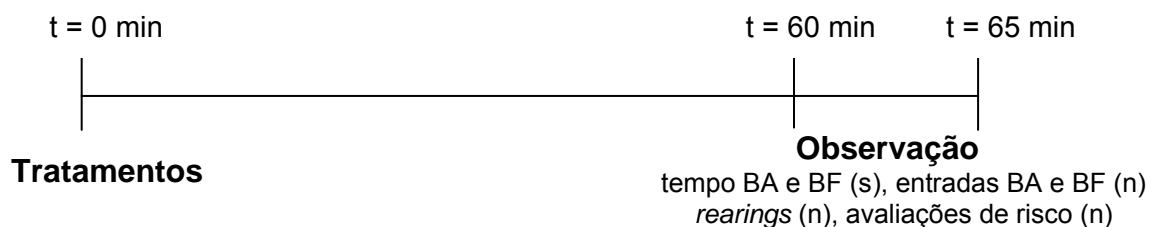
**Tabela 6:** Descrição dos grupos experimentais e tratamentos usados nos ensaios comportamentais realizados. Os valores entre parênteses indicam o número de animais por grupo.

Esaios comportamentais	Tratamento	Solução salina	Fração de saponinas			Fração de flavonóides	Extrato hidroetanólico (70%)			Diazepam	
	Código	SAL	SAP 300	SAP 600	SAP 900	FLA	EXT 150	EXT 300	EXT 600	DZP	DZP
	Dose (mg/kg)	1 mL/ 100 g	300	600	900	300	150	300	600	2	5
	Via	v.o.	v.o.	v.o.	v.o.	v.o.	v.o.	v.o.	v.o.	v.o.	v.o.
Labirinto em cruz elevado		(10)	(10)	(9)	(9)	(8)	(9)	(10)	(10)	(10)	-
Teste de potenciação do sono barbitúrico		(10)	(10)	(9)	(9)	(10)	-	(9)	(10)	(10)	-
Avaliação da atividade motora espontânea		(10)	(10)	(10)	(9)	(8)	-	(10)	(9)	-	-
Avaliação da coordenação motora em aparelho <i>Rota-rod</i>		(10)	(9)	(9)	(9)	(8)	-	(9)	-	-	(10)
Proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol		(10)	(10)	(8)	(10)	(8)	-	(9)	-	(9)	-

#### 4.6.2 Avaliação da atividade ansiolítica – Labirinto em cruz elevado

O labirinto empregado nesse estudo é construído de madeira e consiste de dois braços abertos com 30x10 cm e borda de proteção de 1 cm, e de dois braços fechados com 30x10x15 cm, dispostos perpendicularmente aos braços abertos em forma de cruz grega. A cruz é elevada a 50 cm do chão.

Os animais receberam os diferentes tratamentos (Tabela 6) pela via oral (gavagem) e, sessenta 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 (BA) e fechados (BF), 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). O aparato foi limpo com etanol 96% após a observação de cada animal. Todo procedimento foi realizado em ambiente de penumbra.



**Figura 5:** Esquema empregado para avaliação do efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado em camundongos.

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

$$\% \text{ tempo no braço aberto} = (\text{tempo no braço aberto} \times 100) / \text{tempo total}$$

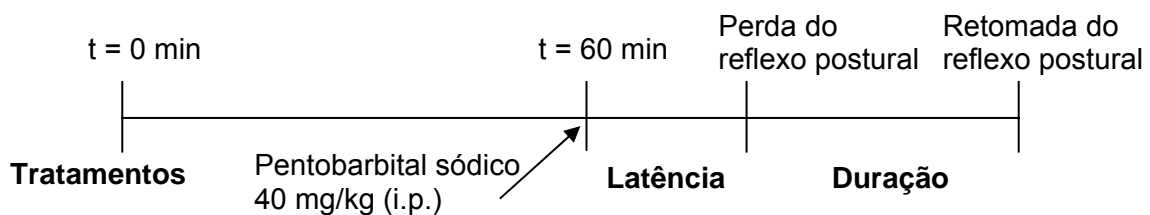
$$\% \text{ tempo no braço fechado} = (\text{tempo no braço fechado} \times 100) / \text{tempo total}$$

$$\% \text{ entradas no braço aberto} = (\text{entradas no braço aberto} \times 100) / \text{total de entradas}$$

$$\% \text{ entradas no braço aberto} = (\text{entradas no braço aberto} \times 100) / \text{total de entradas}$$

#### 4.6.3 Teste de potenciação do sono barbitúrico

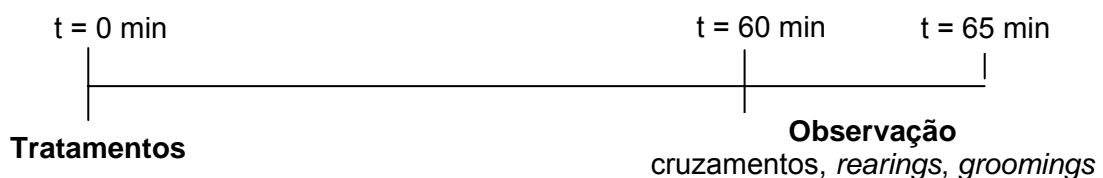
Camundongos receberam os diferentes tratamentos (Tabela 6) pela via oral (gavagem). Decorridos 60 minutos, uma injeção de pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) foi administrada a todos os grupos. Os animais foram observados e avaliados os parâmetros latência e duração do sono barbitúrico, determinados pela perda e retomada do reflexo postural. Foi estabelecido um valor máximo de duração do sono de 240 minutos.



**Figura 6:** Esquema empregado para avaliação do efeito sobre o tempo de sono barbitúrico (pentobarbital sódico, 40 mg/kg, i.p.) em camundongos.

#### 4.6.4 Avaliação da atividade locomotora espontânea

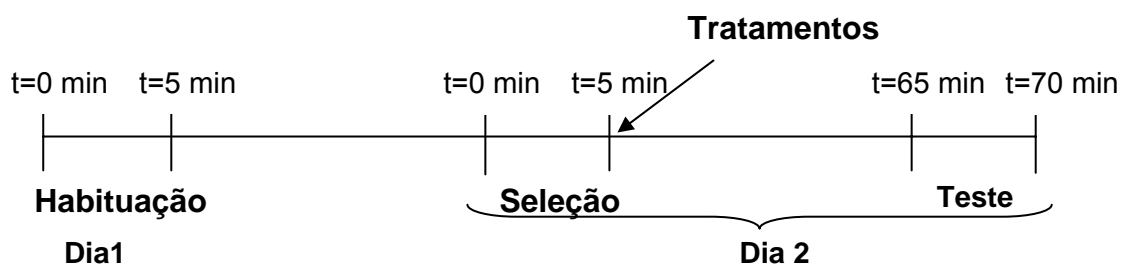
Camundongos receberam os diferentes tratamentos (Tabela 6) por gavagem e, após 60 minutos, os animais foram colocados em uma caixa de locomoção. Esse aparato consiste em uma caixa de acrílico transparente (45x30x30 cm), com o fundo negro dividido em 24 quadrantes de iguais dimensões. Foram registrados manualmente, durante 5 minutos, o número de cruzamentos entre os quadrantes, 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.



**Figura 7:** Esquema empregado para avaliação da atividade motora em caixa de locomoção em camundongos.

#### 4.6.5 Avaliação da coordenação motora em aparelho de *rota-rod*

Esse teste foi realizado em três sessões. Na primeira sessão (treino), os animais foram posicionados no aparato por um tempo total de 5 minutos, incluindo quedas e reposicionamentos, para habituação ao aparato (velocidade = 5 rotações por minuto). No dia do teste, vinte e quatro horas depois, o protocolo consistiu de duas sessões de 5 minutos no aparato, denominadas seleção e teste. Na seleção, apenas os animais que apresentaram pelo menos um período de permanência ininterrupto de 90 segundos durante os cinco minutos de observação, foram considerados aptos a continuar o teste. Imediatamente após o término da seleção, os animais selecionados receberam os tratamentos por gavagem (Tabela 6) e 60 minutos após, foram novamente colocados no aparato (sessão teste). Foi avaliado o desempenho dos animais no *rota-rod*, em ambas sessões, através dos parâmetros: maior tempo de permanência (s) e número de quedas.



**Figura 8:** Esquema empregado para avaliação da coordenação motora em aparelho *rota-rod* em camundongos

#### 4.6.6 Proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol

Camundongos receberam os diferentes tratamentos (Tabela 6) pela via oral (gavagem) e após 60 minutos todos os animais receberam uma injeção de pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.). Foram então avaliados a latência para a primeira convulsão e os graus de convulsões durante os trinta minutos subsequentes à administração do pentilenotetrazol. A classificação do comportamento convulsivo foi realizada de acordo com LAPA e colaboradores (2004). Os critérios para a classificação em graus encontram-se definidos a seguir:

GRAU 0: nenhum comportamento convulsivo

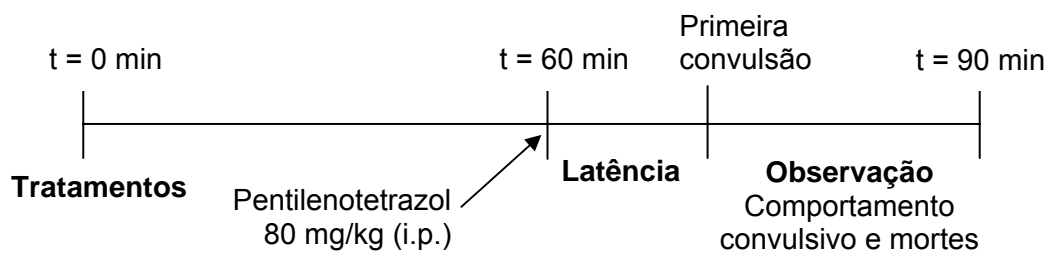
GRAU 1: abalos mioclônicos, caracterizados por movimentação anormal das orelhas, vibrissas, patas anteriores ou posteriores, contrações arrítmicas e assimétricas;

GRAU 2: abalos clônicos, mais severos que 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, podendo chegar a morte;

GRAU 4: morte do animal.

O número de mortes também foi registrado.



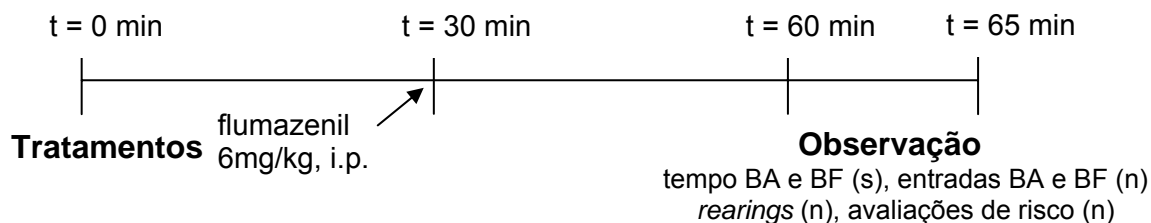
**Figura 9:** Esquema empregado no teste de proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.) em camundongos.

## 4.7 Investigação do envolvimento do sistema benzodiazepínico/GABAérgico no efeito ansiolítico

### 4.7.1 Antagonismo da atividade ansiolítica no labirinto em cruz elevado

Camundongos receberam os diferentes tratamentos pela via oral (gavagem) e trinta minutos após, receberam um segundo tratamento, pela via intraperitoneal: solução salina ou flumazenil (6 mg/kg). Decorridos 30 minutos da segunda administração, os animais tiveram seu comportamento avaliado no labirinto em cruz

elevado, conforme descrito no item 4.6.2. Os diferentes grupos experimentais e tratamentos encontram-se descritos na tabela 7.



**Figura 10:** Esquema empregado para avaliação do envolvimento do receptor benzodizépínico no efeito ansiolítico do extrato hidroetanólico (70%) de *P. alata* no labirinto em cruz elevado, em camundongos.

**Tabela 7:** Grupos experimentais empregados para avaliação do envolvimento do receptor benzodizépínico no efeito ansiolítico do extrato hidroetanólico (70%) de *P. alata* no labirinto em cruz elevado.

Grupo	Tratamento 1 (v.o.)	Tratamento 2 (i.p.)	n
SAL + SAL	solução salina 0,9 g %	solução salina 0,9 g %	10
EXT + SAL	extrato hidroetanólico de <i>P. alata</i> , 300 mg/kg	solução salina 0,9 g %	10
DZP + SAL	diazepam 2 mg/kg	solução salina 0,9 g %	11
SAL + FLU	solução salina 0,9 g %	flumazenil, 6 mg/kg	10
EXT + FLU	extrato hidroetanólico de <i>P. alata</i> , 300 mg/kg	flumazenil, 6 mg/kg	10
DZP + FLU	diazepam, 2mg/kg	flumazenil, 6 mg/kg	10

#### 4.7.2 Ensaio neuroquímico

As frações FLA e SAP, obtidas a partir do extrato aquoso de *P. alata*, o extrato hidroetanólico (70%) e os flavonóides vitexina e isovitexina foram submetidos a ensaios de deslocamento da ligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos. As frações FLA e SAP também foram



submetidas ao ensaio de deslocamento da ligação de [<sup>3</sup>H]-TBOB em membranas sinaptossomais de córtex cerebral murino, extensivamente lavadas, e adicionadas de uma quantidade definida de GABA, conforme descrito nos itens a seguir.

#### **4.7.2.1 Preparação das membranas sinaptossomais**

Cada rato foi decapitado e o cérebro rapidamente removido. De cada animal, o córtex cerebral foi rapidamente dissecado sobre gelo e armazenado a -20 °C. O córtex foi homogeneizado em 10 volumes de uma solução de sacarose 0,32 M. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 900g durante 10 min. O sobrenadante resultante foi centrifugado a 100.000g durante 30 minutos. O *pellet* foi lavado duas vezes com 30 volumes de tampão Tris-HCl 25 mM (pH = 7,4) para os ensaios de ligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam e 7 vezes 30 volumes de tampão Tris-HCl 50 mM adicionado de 500 mM de NaCl (pH = 7,4), para os ensaios de ligação de [<sup>3</sup>H]-TBOB (MARDER *et al.*, 2003; LOPES *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2006).

Em ambos os casos, os homogenatos foram armazenados a -20°C até o momento de sua utilização. A concentração de proteínas na suspensão final de membranas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

#### **4.7.2.2 Deslocamento da radioligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam**

As misturas de incubação foram preparadas em um volume final de 1 mL, adicionando-se 10 µL de uma solução das amostras (controles e teste) dissolvidas em etanol absoluto (contendo, no máximo, 10% de DMSO, quando necessário para auxiliar a dissolução das amostras), 10 µL de uma solução de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam (84,5 Ci/mmol) (concentração final 0,4 nM) e a preparação de membranas (contendo de 0,2 a 0,4 mg de proteína) em tampão Tris-HCl 25 mM (pH = 7,4). A incubação foi realizada a 4 °C por uma hora. A ligação inespecífica foi determinada em uma incubação paralela na presença de 10 µM flunitrazepam e representou 5-15% do total. Os ensaios foram terminados por diluição através da adição de 3 volumes de meio de incubação frio. A solução resultante foi rapidamente filtrada a vácuo através

de filtros Whatman GF/A. Os filtros foram lavados duas vezes mais com o meio de incubação. Ao final, foi adicionado 1,5 mL do líquido de cintilação (Optiphase “Hisafe” 3 Wallac Company, Turku, Finland). A contagem da radioatividade foi realizada 24 horas após, em um cintilômetro Wallac Rackbeta 1214 (MARDER *et al.*, 2003; LOPES *et al.*, 2004).

#### 4.7.2.3 Deslocamento da radioligação de [<sup>3</sup>H]-TBOB

Nesse ensaio, as misturas de incubação foram preparadas também em um volume final de 1 mL através da adição de: 10 µL de uma solução das amostras (controles e teste) dissolvidas em etanol absoluto (contendo, no máximo, 10% de DMSO quando necessário para auxiliar a dissolução das amostras), a preparação de membranas (contendo de 0,1 a 0,2 mg de proteína), 10 µL de uma solução de GABA (concentração final 0,3 µM) e 10 µL de uma solução de [<sup>3</sup>H]-TBOB (16 Ci/mmol) (concentração final 0,6 nM). A incubação foi realizada a temperatura ambiente por 90 minutos. A ligação inespecífica foi determinada em uma incubação paralela contendo 100 µM picrotoxinina e representou 35-40% do total. Os ensaios foram terminados por diluição através da adição de 3 volumes de meio de incubação frio. A solução resultante foi rapidamente filtrada a vácuo através de filtros Whatman GF/A. Os filtros foram lavados duas vezes mais com o meio de incubação. Ao final, foi adicionado 1,5 mL do líquido de cintilação (Optiphase “Hisafe” 3 Wallac Company, Turku, Finland). A contagem da radioatividade foi realizada 24 horas após, em um cintilômetro Wallac Rackbeta 1214 (FERNÁNDEZ *et al.*, 2006).

Para análise dos resultados foram considerados os valores de radioligante especificamente unido. A construção das curvas de deslocamento e cálculo dos valores de concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) foram realizadas utilizando o programa GraphPad®.

## **4.8 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 está especificado no item resultados.

## **4.10 Ética**

A manipulação animal foi realizada seguindo os princípios éticos para experimentação animal relatados por GOLDIM (1995), 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 aos ensaios neuroquímicos, imediatamente após a finalização dos experimentos, o sacrifício dos camundongos foi realizado pelo método de deslocamento cervical. A carcaça animal foi acondicionada em embalagem plástica apropriada e conservada em freezer a  $-20\text{ °C}$  até ser recolhida pelo centro de zoonoses da Prefeitura de Porto Alegre. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Universidade (processo nº 2005512, aprovado na reunião 01/2006, ata nº 67, de 19 de janeiro de 2006 – Anexo 1).



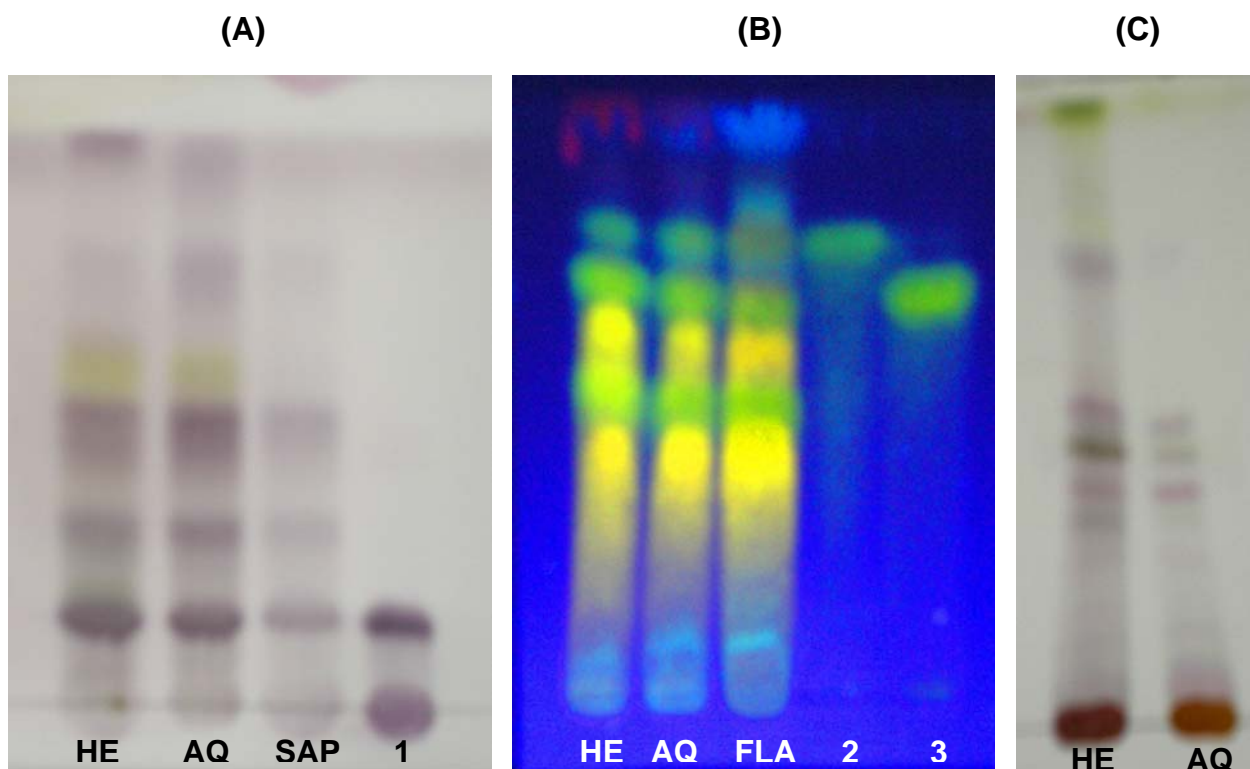
---

## **5. RESULTADOS**



## 5.1 Obtenção dos extratos e purificação da fração enriquecida em flavonóides e fração enriquecida em saponinas a partir do extrato aquoso de *P. alata*

O rendimento do extrato aquoso de *P. alata* foi de aproximadamente 20% e do extrato hidroetanólico aproximadamente 25% em relação ao pó das folhas dessecadas. Usando cromatografia de exclusão com gel de dextrano (Sephadex LH 20<sup>®</sup>) como adsorvente foi possível obter uma fração enriquecida em saponinas (SAP), e uma enriquecida em flavonóides (FLA), com rendimentos aproximados de 40% e 2%, respectivamente, em relação ao extrato aquoso. O perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico, extrato aquoso, e das frações FLA e SAP está apresentado na figura 11.



**Figura 11:** Cromatogramas do extrato aquoso (**AQ**), extrato hidroetanólico (**HE**) e das frações enriquecidas em saponinas (**SAP**) e flavonóides (**FLA**). (A) Sistema cromatográfico: cromatofolhas de sílica GF<sub>254</sub>, butanol:ácido acético:água (6:1:1, v/v); anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento. Substância de referência: quadrangulosídeo (**1**). (B) Sistema cromatográfico: cromatofolhas de gel de sílica GF<sub>254</sub>, acetato de etila:acetona:ácido acético:água (6:2:1:1, v/v); reagente natural/UV<sub>366</sub>. Substâncias de referência: vitexina (**2**) e isovitexina (**3**). (C) Sistema cromatográfico: cromatofolhas de sílica GF<sub>254</sub>, diclorometano:metanol (95:5, v/v); anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento.

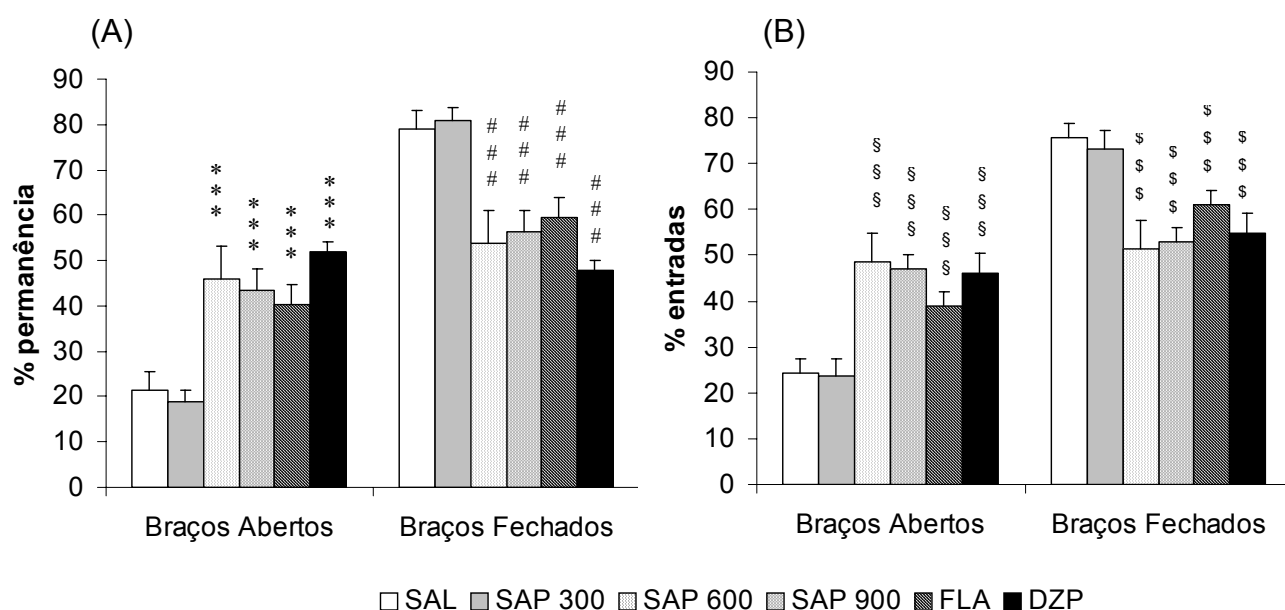
## 5.2 Experimentos Comportamentais

### 5.2.1 Avaliação da atividade ansiolítica – Labirinto em cruz elevado

#### *Fração de flavonóides de fração de saponinas*

Os animais tratados com FLA (300 mg/kg, v.o.) e SAP (600 e 900 mg/kg, v.o.) apresentaram um aumento significativo dos percentuais de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e uma redução dos percentuais de entradas e tempo de permanência nos braços fechados do labirinto, de forma análoga ao diazepam (Figura 12).

Em valores absolutos, FLA 300 mg/kg e SAP 900 mg/kg aumentaram o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto. A fração de saponinas, na dose de 600 mg/kg, aumentou o número de entradas nos braços abertos. O número de comportamentos de avaliação de risco foi reduzido pelo tratamento com fração de saponinas na dose de 900 mg/kg (Tabela 8).



**Figura 12:** Efeito da fração de saponinas (SAP 300, 600 e 900 mg/kg) e fração de flavonóides (FLA 300 mg/kg) obtidas a partir do extrato aquoso de *P. alata* no labirinto em cruz elevado. Resultados expressos como média dos percentuais individuais + erro padrão (n= 8-10 animais/grupo). Percentual de tempo de permanência (A) e percentual de entradas (B) nos braços abertos e fechados. Diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA seguida de Student Newman Keuls. \*\*\*p<0,001 ( $F_{(5,56)}= 9,652$ ); ### p<0,001 ( $F_{(5,56)}= 9,600$ ); \$\$\$ p<0,001 ( $F_{(5,56)}= 8,460$ ) \$\$\$ p<0,001 ( $F_{(5,56)}= 8,273$ ) quando comparados aos respectivos grupos controle (SAL).



**Tabela 8:** Efeito da fração de saponinas (SAP 300, 600 e 900 mg/kg) e fração de flavonóides (FLA 300 mg/kg) obtidas a partir do extrato aquoso de *P. alata* no labirinto em cruz elevado (valores absolutos).

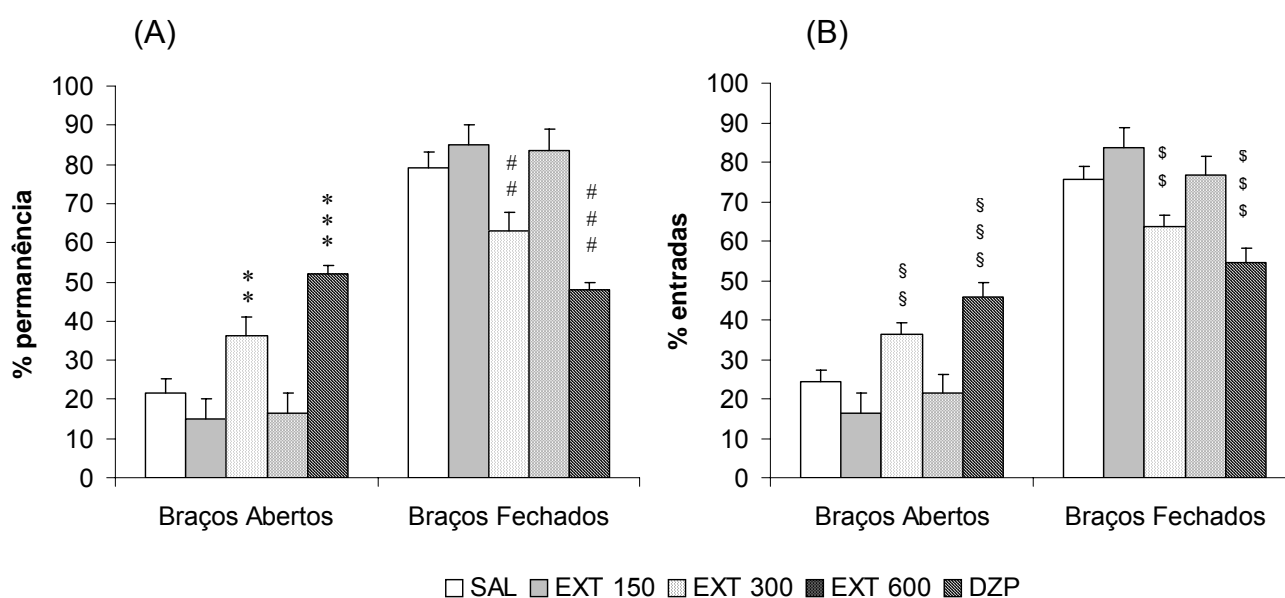
Tratamento	Tempo de permanência (s)		Número de Entradas (n)			Rearings (n)	Avaliação de Risco (n)
	Braços Abertos	Braços Fechados	Braços Abertos	Braços Fechados	Total		
SAL (n=10)	36,9 ± 22,3	136,9 ± 45,4	3,2 ± 1,8	10,2 ± 4,2	13,4 ± 4,9	4,5 ± 3,6	20,6 ± 5,7
SAP 300 (n=10)	35,6 ± 18,0	156,7 ± 47,2	3,6 ± 1,9	12,0 ± 5,4	15,3 ± 4,9	6,8 ± 8,6	25,5 ± 10,2
SAP 600 (n=10)	63,5 ± 32,4	97,3 ± 47,7	8,3 ± 4,2 <sup>\$\$</sup>	8,8 ± 3,6	17,1 ± 4,1	3,5 ± 3,6	19,6 ± 11,9
SAP 900 (n=9)	82,3 ± 42,2 <sup>**</sup>	100,2 ± 29,2	6,2 ± 2,4	7,0 ± 2,2	13,2 ± 4,0	5,6 ± 3,9	8,8 ± 5,1 <sup>\$\$</sup>
FLA (n=9)	78,6 ± 27,7 <sup>**</sup>	118,4 ± 38,6	5,9 ± 2,5	9,8 ± 1,9	15,6 ± 3,8	10,3 ± 5,5	22,4 ± 6,6
DZP (n=10)	91,4 ± 19,3 <sup>***</sup>	83,9 ± 17,7 <sup>#</sup>	8,5 ± 3,9	10,1 ± 4,1	16,9 ± 3,8	1,8 ± 0,8	16,6 ± 5,1

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA seguida de Student Newman Keuls. \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001 (F<sub>(5,56)</sub>= 7,075, p<0,001); # p<0,05 (F<sub>(5,56)</sub>= 4,459); \$\$ p<0,01 (F<sub>(5,56)</sub>= 5,695); \$\$ p<0,01 (F<sub>(5,56)</sub>= 4,799) quando comparados aos respectivos grupos controle (SAL).

### Extrato hidroetanólico

O tratamento oral com o extrato hidroetanólico (70%) na dose de 300 mg/kg de *P. alata* também aumentou de forma significativa os percentuais de tempo de exploração e entradas nos braços abertos e reduziu os percentuais de tempo de exploração e entradas nos braços fechados do labirinto (Figura 13). Na análise dos valores absolutos é possível visualizar que este mesmo tratamento apresenta uma tendência para o aumento da exploração dos braços abertos do labirinto (tempo de exploração e número de entradas) (Tabela 9).

Quando aumentada a dose, para 600 mg/kg (v.o.) não foram observados os mesmos efeitos. Nessa dose, não houve diferenças em relação ao grupo controle (salina) em nenhum dos parâmetros observados. Também foi possível observar uma tendência à redução de parâmetros motores (entradas nos braços fechados e totais), porém não de forma significativa (Tabela 9).



**Figura 13:** Efeito do extrato hidroetanólico 70% de *P. alata* (EXT 150, 300 e 600 mg/kg) no labirinto em cruz elevado. Resultados expressos como média dos percentuais individuais + erro padrão (n= 9-10 animais/grupo). Percentual de tempo de permanência (A) e percentual de entradas (B) nos braços abertos e fechados. Diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA seguida de Student Newman Keuls. \*\* p<0,01 \*\*\*p<0,001 ( $F_{(4,48)} = 12,966$ ); ## p<0,01 ### p<0,001 ( $F_{(4,48)} = 12,949$ ); \$\$ p<0,001 \$\$\$ p<0,001 ( $F_{(4,48)} = 9,437$ ); \$\$\$ p<0,01 \$\$\$\$ p<0,001 ( $F_{(4,48)} = 8,896$ ) quando comparados aos respectivos grupos controle (SAL).

**Tabela 9:** Efeito do extrato hidroetanólico 70% de *P. alata* (EXT 150, 300 e 600 mg/kg) no labirinto em cruz elevado (valores absolutos).

Tratamento	Tempo de permanência (s)		Número de Entradas (n)			Rearings (n)	Avaliação de Risco (n)
	Braços Abertos	Braços Fechados	Braços Abertos	Braços Fechados	TOTAL		
SAL (n=10)	36,9 ± 22,3	136,9 ± 45,4	3,2 ± 1,8	10,2 ± 4,2	13,4 ± 4,9	4,5 ± 3,6	20,6 ± 5,7
EXT 150 (n=10)	26,0 ± 25,9	155,7 ± 48,1	2,4 ± 2,8	12,0 ± 5,4	12,3 ± 6,0	3,4 ± 2,9	20,1 ± 4,4
EXT 300 (n=10)	64,1 ± 31,1*	116,7 ± 53,5	4,6 ± 1,8	9,9 ± 3,8	13,0 ± 4,5	3,2 ± 3,1	16,8 ± 5,8
EXT 600 (n=9)	28,8 ± 25,9	189,2 ± 83,4	2,2 ± 2,3	8,4 ± 3,4	9,3 ± 5,6	4,5 ± 5,0	15,3 ± 10,4
DZP (n=10)	91,4 ± 19,3 ***	83,9 ± 17,7	8,5 ± 3,9####	7,1 ± 4,1	16,9 ± 7,1	1,8 ± 0,8	16,6 ± 5,1

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA seguida de Student Newman Keuls. \* p<0,05 \*\*\* p<0,001 ( $F_{(4,48)}=11,979$ ); #### p<0,001 ( $F_{(4,48)}=9,550$ ) quando comparados aos respectivos grupos controle (SAL).

### 5.2.1 Potenciação do sono barbitúrico

#### *Fração de flavonóides e fração de saponinas*

Nenhum dos tratamentos alterou o tempo de indução (latência) para o sono barbitúrico, porém a fração de flavonóides na dose de 300 mg/kg (v.o.) aumentou significativamente o tempo de sono (duração) induzido por pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) (Tabela 10).

**Tabela 10:** Efeito da fração de saponinas (SAP 300, 600 e 900 mg/kg) e fração de flavonóides (FLA 300 mg/kg) obtidas a partir do extrato aquoso de *P. alata* no tempo de sono induzido por pentobarbital (40 mg/kg, i.p.).

Tratamentos	Latência (min)	Duração (min)
SAL (=10)	5,0 (4,0-5,0)	25,0 (17,0-44,0)
SAP 300 (n=10)	4,0 (4,0-4,0)	31,0 (18,0-51,0)
SAP 600 (n=9)	3,0 (3,0-3,75)	40,0 (26,75-52,5)
SAP 900 (n=9)	4,0 (3,0-5,0)	37,0 (33,5-58,75)
FLA (n=10)	3,25 (3,0-4,0)	86,0 (32,0-121,0) ###
DZP (n=10)	3,0 (3,0-3,0) ***	97,0 (89,0-120,0) ###

Resultados expressos como mediana (intervalos interquartis). Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (SAL) \*\*\*  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis,  $H=21,969$ ); ###  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis  $H=28,081$ ).

#### *Extrato hidroetanólico*

Em ambas as doses testadas (300 e 600 mg/kg, v.o.) o extrato hidroetanólico (70%) de *P. alata* não alterou a latência, mas aumentou significativamente a duração do sono induzida por pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) (Tabela 11).

**Tabela 11:** Efeito do extrato hidroetanólico 70% de *P. alata* (EXT 300 e 600 mg/kg) no tempo de sono induzido por pentobarbital (40 mg/kg, i.p.).

Tratamentos	Latência (min)	Duração (min)
SAL (=10)	5,0 (4,0-5,0)	25,0 (17,0-44,0)
EXT 300 (n=9)	3,5 (3,0-4,0)	113,0 (98,0-139,5) ###
EXT 600 (n=10)	4,0 (3,0-5,0)	89,5 (55,0-132,5) ###
DZP (n=10)	3,0 (3,0-3,0) ***	97,0 (89,0-120,0) ###

Resultados expressos como mediana (intervalos interquartis). Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (SAL) \*\*\*  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis,  $H=14,077$ ); ###  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis  $H=21,805$ ).

### 5.3.2 Avaliação da atividade locomotora espontânea

#### *Fração de flavonóides e fração de saponinas*

Os animais tratados com FLA e SAP não apresentaram alterações nos parâmetros da atividade motora (Tabela 12).

**Tabela 12:** Efeito da fração de saponinas (SAP 300, 600 e 900 mg/kg) e fração de flavonóides (FLA 300 mg/kg) na atividade locomotora espontânea.

Tratamentos	Cruzamentos	Rearings	Groomings
SAL (=10)	124,4 ± 33,9	19,8 ± 11,6	3,8 ± 2,8
SAP 300 (n=10)	135,3 ± 34,0	24,9 ± 11,2	1,8 ± 1,0
SAP 600 (n=10)	121,0 ± 45,2	18,0 ± 14,8	3,9 ± 1,7
SAP 900 (n=9)	121,8 ± 26,0	18,6 ± 7,9	3,1 ± 1,1
FLA (n=8)	109,8 ± 24,2	24,4 ± 14,5	4,1 ± 2,7

Resultados expressos como média ± desvio padrão

### *Extrato hidroetanólico*

Quando os animais foram tratados com o extrato hidroetanólico (70%) de *P. alata* na dose de 300 mg/kg (v.o.) não foram observadas alterações na atividade locomotora. Contudo, quando a dose foi aumentada para 600 mg/kg (v.o.) foi observada uma redução da atividade locomotora espontânea dos animais, visualizada pela redução significativa do número de cruzamentos e número de *rearings* (Tabela 13).

**Tabela 13:** Efeito do extrato hidroetanólico (70 %) de *P. alata* (EXT 300 e 600 mg/kg) na atividade locomotora espontânea.

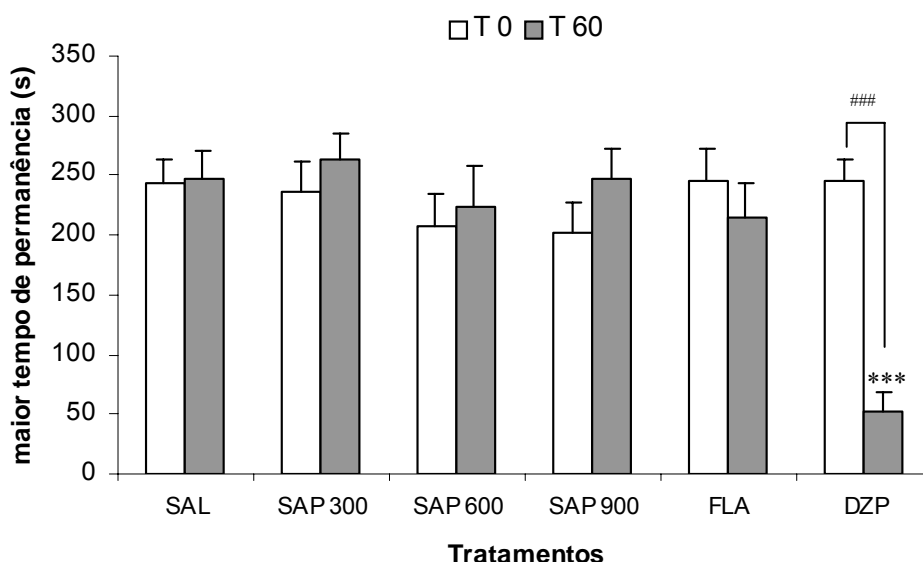
<b>Tratamentos</b>	<b>Cruzamentos</b>	<b>Rearings</b>	<b>Groomings</b>
SAL (=10)	121,3 ± 37,6	27,7 ± 11,0	2,9 ± 2,1
EXT 300 (n=10)	128,5 ± 46,6	18,1 ± 13,5	2,0 ± 1,1
EXT 600 (n=8)	63,6 ± 33,6**	9,25 ± 9,5 <sup>##</sup>	2,4 ± 2,1

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA seguida de Student Newman Keuls. \*\* p<0,01 (F<sub>(2,27)</sub>=6,767); <sup>##</sup> p<0,01 (F<sub>(2,27)</sub>= 5.685) quando comparados aos respectivos grupos controle (SAL).

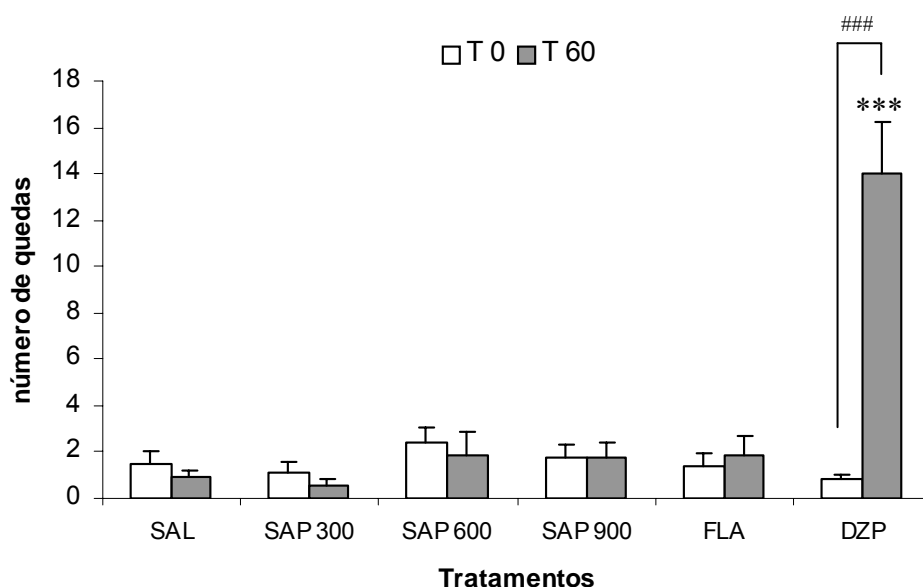
### **5.2.3 Avaliação da coordenação motora em aparelho *rota-rod***

#### *Fração de flavonóides e fração de saponinas*

O tratamento com FLA ou SAP não resultou em alterações dos parâmetros observados na avaliação da coordenação motora em aparelho *rota-rod* (número de quedas e maior tempo de permanência) dentro do período de cinco minutos de observação. (Figuras 14 e 15).



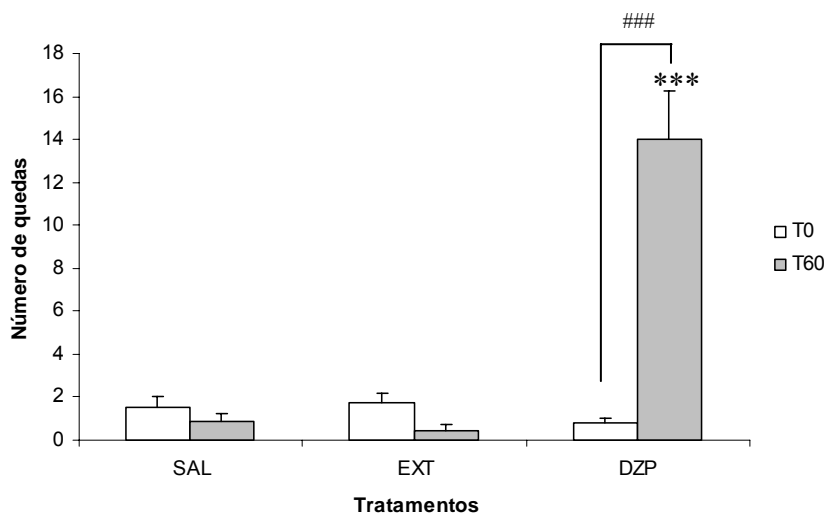
**Figura 14:** Efeito da fração de saponinas (SAP 300, 600 e 900 mg/kg) e fração de flavonóides (FLA 300 mg/kg) obtidas do extrato aquoso de *P. alata* no teste de coordenação motora em aparelho *rota-rod*. Parâmetro: maior tempo de permanência. Resultados expressos como média + erro padrão (n = 8-10 animais/grupo). \*\*\* Diferença significativa em relação ao grupo SAL no T60, ### diferença significativa entre T0 e T60 no mesmo tratamento (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, fator tratamento  $F_{(5,111)}=4,115$   $p<0,001$ ; fator tempo  $F_{(5,111)}=2,622$   $p<0,001$ ; interação tempo x tratamento  $F_{(5,111)}=6,886$   $p<0,001$ ).



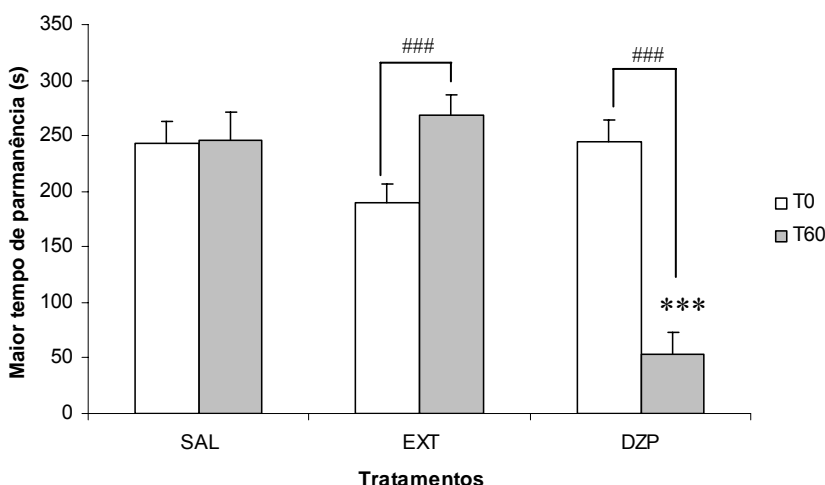
**Figura 15:** Efeito da fração de saponinas (SAP 300, 600 e 900 mg/kg) e fração de flavonóides (FLA 300 mg/kg) obtidas do extrato aquoso de *P. alata* no teste de coordenação motora em aparelho *rota-rod*. Parâmetro: número de quedas. Resultados expressos como média + erro padrão. (n= 8-10 animais/grupo). \*\*\* Diferença significativa em relação ao grupo SAL no T60, ### diferença significativa entre T0 e T60 no mesmo tratamento (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, fator tratamento  $F_{(5,111)}=12,928$   $p<0,001$ ; fator tempo  $F_{(5,111)}=16,996$   $p<0,001$ ; interação tempo x tratamento  $F_{(5,111)}=21,066$   $p<0,001$ ).

## Extrato hidroetanólico

Os animais tratados pela via oral, com o extrato hidroetanólico (70%) de *P. alata* na dose de 300 mg/kg apresentaram uma melhora no desempenho durante os 5 minutos de observação da sessão teste quando comparado com a sessão treino observado por uma redução no número de quedas (embora não significativa) aumento significativo no tempo de permanência (Figuras 16 e 17).



**Figura 16:** Efeito do extrato hidroetanólico (70%) de *P. alata* (EXT 300 mg/kg) no teste de coordenação motora em aparelho *rota-rod*. Parâmetro: número de quedas. Resultados expressos como média + erro padrão (n= 9-10 animais/grupo). \*\*\* Diferença significativa em relação ao grupo SAL no T60, ### diferença significativa entre T0 e T60 no mesmo tratamento (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, fator tratamento  $F_{2,57}=23,414$   $p<0,001$ ; fator tempo  $F_{2,57}=20,454$   $p<0,001$ ; interação tempo x tratamento  $F_{2,57}=31,522$   $p<0,001$ ).



**Figura 17:** Efeito do extrato hidroetanólico (70%) de *P. alata* (EXT 300 mg/kg) no teste de coordenação motora em aparelho *rota-rod*. Parâmetro: maior tempo de permanência. Resultados expressos como média + erro padrão (n= 9-10 animais/grupo). \*\*\* Diferença significativa em relação ao grupo SAL no T60, ### diferença significativa entre T0 e T60 no mesmo tratamento (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, fator tratamento  $F_{2,57}=12,637$   $p<0,001$ ; fator tempo  $F_{2,57}=6,148$   $p<0,05$ ; interação tempo x tratamento  $F_{2,57}=28,648$   $p<0,001$ ).



## 5.2.4 Proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol

### *Fração de flavonóides e fração de saponinas*

Nenhum dos tratamentos testados protegeu os animais frente aos efeitos pró-convulsivantes do pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.) (Tabela 14).

**Tabela 14:** Efeito da fração de saponinas (SAP 300, 600 e 900 mg/kg) e fração de flavonóides (FLA 300 mg/kg, v.o.) obtidas do extrato aquoso de *P. alata* no teste de proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.).

Tratamentos	Latência (min)	Graus	Mortes (n)
SAL (=10)	90,4 ± 30,9	2,0 (1,0-4,0)7	3
SAP 300 (n=10)	68,1 ± 15,3	2,0 (1,0-3,0)	0
SAP 600 (n=8)	72,0 ± 30,2	2,0 (1,5-2,0)	1
SAP 900 (n=10)	85,2 ± 19,2	2,0 (1,0-3,0)	1
FLA (n=8)	90,6 ± 18,1	2,0 (1,0-2,0)	0
DZP (n=9)	-	0,0 (0,0-0,0)***	0

Resultados expressos como média ± desvio padrão para o parâmetro latência, e como mediana (intervalos interquartis) para os graus. \*\*\* Diferença significativa em relação ao grupo controle (SAL) (Kruskal-Wallis, H=24,348, p<0,001).

### *Extrato hidroetanólico*

Os animais que receberam extrato hidroetanólico (70%) de *P. alata* na dose de 300 mg/kg não apresentaram nenhuma alteração nos parâmetros observados durante os trinta minutos subsequentes a administração intraperitoneal do agente indutor de convulsão, pentilenotetrazol na dose de 80 mg/kg. (Tabela 15).

**Tabela 15:** Efeito do extrato hidroetanólico (70 %) de *P. alata* (EXT 300 mg/kg) no teste de proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.).

Tratamentos	Latência (min)	Graus	Mortes (n)
SAL (=10)	90,4 ± 30,9	2,0 (2,0-4,0)	3
EXT (n=9)	66,1 ± 19,7	4,0 (2,0-4,0)	4
DZP (n=9)	-	0,0 (0,0-0,0)***	0

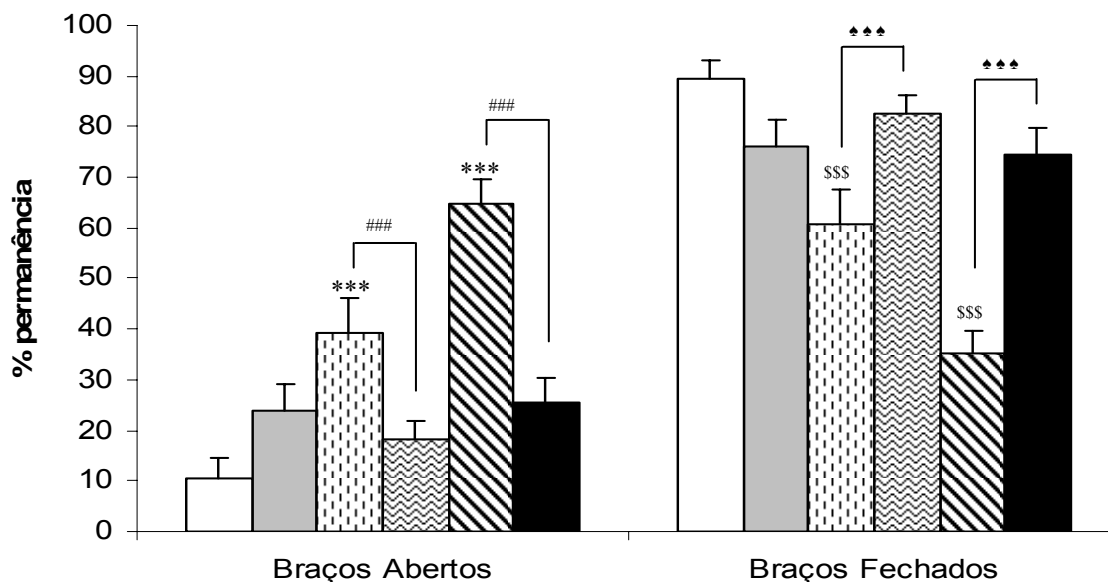
Resultados expressos como média ± desvio padrão para o parâmetro latência, e como mediana (intervalos interquartis) para os graus. \*\*\* Diferença significativa em relação ao grupo controle (SAL) (Kruskall-Wallis, H=19,438, p<0,001).

#### 5.4 Investigação do envolvimento do sistema benzodiazepínico/GABAérgico no efeito ansiolítico

##### 5.4.1 Antagonismo da atividade ansiolítica do extrato hidroetanólico (70%) de *P. alata* no labirinto em cruz elevado.

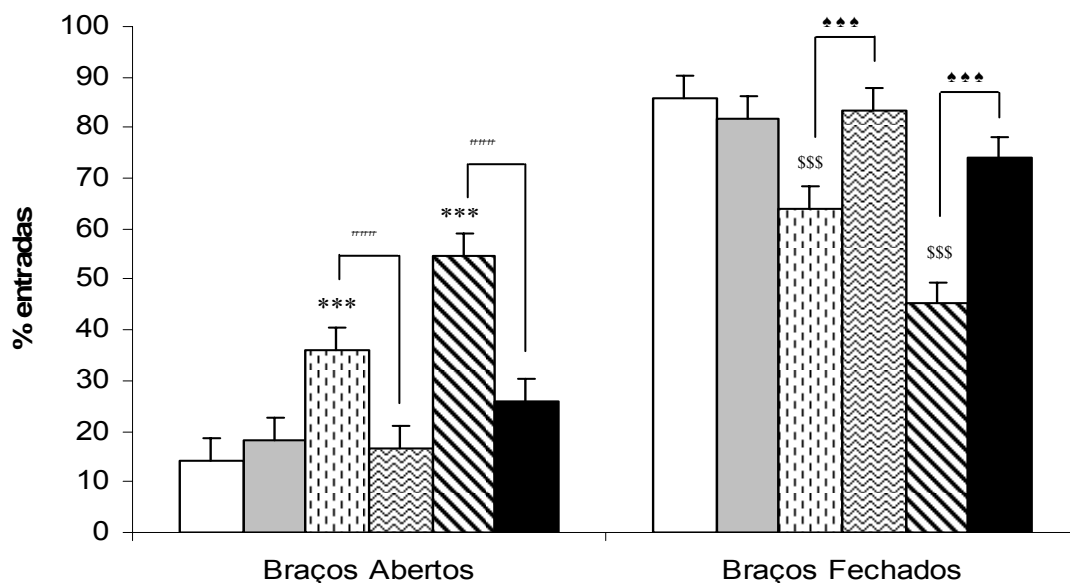
A administração de flumazenil (6 mg/kg, i.p.) trinta minutos após a administração do extrato, reverteu o aumento da exploração dos braços abertos do labirinto observada quando da administração do extrato hidroetanólico seguida de salina (Figura 18 e Figura 19).

Na tabela 16 estão apresentados os valores absolutos dos diferentes parâmetros observados. O tratamento com flumazenil também bloqueou o aumento no tempo de exploração (Anova de duas vias, fator tratamento x fator pós-tratamento  $F_{(2,72)}=13,397$ ) e no número de entradas (Anova de duas vias, fator tratamento x fator pós-tratamento  $F_{(2,72)}=2,707$ ) causado pelo extrato hidroetanólico. Para o diazepam ainda foram verificado antagonismo no tempo (Anova de duas vias, fator tratamento x fator pós-tratamento  $F_{(2,72)}=2,751$ ) e entradas (Anova de duas vias, fator tratamento x fator pós-tratamento  $F_{(2,72)}=7,263$ ) nos braços fechado do labirinto.



□ SAL+SAL □ SAL+FLU □ EXT+SAL □ EXT+FLU □ DZP+SAL ■ DZP+FLU

**Figura 18:** Efeito da administração de flumazenil (FLU 6 mg/kg, i.p.) no efeito do extrato hidroetanólico 70% de *P. alata* (EXT 300 mg/kg, v.o.) e diazepam (2 mg/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado. Parâmetro: Percentual de tempo de permanência nos braços abertos e braços fechados. Resultados expressos como média dos percentuais individuais + erro padrão (n= 12-13 animais/grupo). \*\*\* Diferença significativa em relação ao grupo controle (SAL+SAL), ### diferença significativa em relação ao respectivo grupo sem FLU (Anova de duas vias, interação tratamento x pós-tratamento  $F_{(2,72)}=14,629$ ,  $p<0,001$ ). \$\$\$ diferença significativa em relação ao grupo controle (SAL+SAL), \*\*\* diferença significativa em relação ao respectivo grupo sem FLU (Anova de duas vias, interação tratamento x pós-tratamento  $F_{(2,72)}=14,693$ ,  $p<0,001$ ).



□ SAL+SAL □ SAL+FLU □ EXT+SAL □ EXT+FLU □ DZP+SAL ■ DZP+FLU

**Figura 19:** Efeito da administração de flumazenil (FLU 6 mg/kg, i.p.) no efeito do extrato hidroetanólico 70% de *P. alata* (EXT 300 mg/kg, v.o.) e diazepam (2 mg/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado. Parâmetro: Percentual de entradas nos braços abertos e braços fechados. Resultados expressos como média dos percentuais individuais + erro padrão (n= 12-13 animais/grupo). \*\*\* Diferença significativa em relação ao grupo controle (SAL+SAL), ### diferença significativa em relação ao respectivo grupo sem FLU (Anova de duas vias, interação tratamento x pós-tratamento  $F_{(2,72)}=7,524$ ,  $p<0,001$ ). \$\$\$ diferença significativa em relação ao grupo controle (SAL+SAL), \*\*\* diferença significativa em relação ao respectivo grupo sem FLU (Anova de duas vias, interação tratamento x pós-tratamento  $F_{(2,72)}=7,524$ ,  $p<0,001$ ).

**Tabela 16:** Efeito da administração de flumazenil (FLU 6 mg/kg, i.p.) no efeito do extrato hidroetanólico 70% de *P. alata* (EXT 300 mg/kg, v.o.) e diazepam (2 mg/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado (valores absolutos).

Tratamento	Tempo de permanência (s)		Número de Entradas (n)			Rearings (n)	Avaliação de Risco (n)
	Braços Abertos	Braços Fechados	Braços Abertos	Braços Fechados	Total		
SAL + SAL (n=12)	15,0 ± 15,7	145,7 ± 49,5	1,6 ± 1,4	10,2 ± 3,3	11,8 ± 3,5	2,9 ± 2,5	24,2 ± 5,8
SAL + FLU (n=12)	39,5 ± 30,6	131,2 ± 46,0	2,3 ± 1,7	10,3 ± 2,3	12,6 ± 2,4	3,8 ± 1,7	27,3 ± 8,5
EXT + SAL (n=12)	58,5 ± 29,8 <sup>***</sup>	109,0 ± 64,1	4,7 ± 2,6 *	8,9 ± 4,5	13,7 ± 5,5	1,8 ± 1,6	25,2 ± 5,4
EXT + FLU (n=12)	26,5 ± 19,1 <sup>###</sup>	140,2 ± 60,6	2,2 ± 1,4 <sup>#</sup>	10,8 ± 3,3	12,9 ± 3,8	2,8 ± 2,7	24,5 ± 4,8
DZP + SAL (n=13)	115,7 ± 52,3 <sup>***</sup>	62,6 ± 40,2 <sup>***</sup>	8,6 ± 5,0 <sup>***</sup>	6,8 ± 3,6*	14,5 ± 7,9	2,0 ± 1,7	22,4 ± 7,8
DZP + FLU (n=12)	38,7 ± 28,7 <sup>\$\$\$</sup>	112,3 ± 39,7 <sup>\$\$</sup>	5,4 ± 4,1 <sup>\$\$</sup>	14,0 ± 3,2 <sup>\$\$\$</sup>	19,4 ± 4,8	4,2 ± 5,0	24,0 ± 8,1

Resultados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA de duas vias, seguida de Student-Newmann-Keuls: \* p<0,05 e \*\*\* p<0,001 diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo controle (SAL+SAL); # p<0,05 e ### p<0,001 diferença significativa em relação ao grupo (EXT+FLU); \$\$ p<0,01 e \$\$\$ p<0,001 diferença significativa em relação ao grupo (EXT+FLU).

#### 5.4.1 Deslocamento da radioligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos

A fração de flavonóides e de saponinas em concentrações até 450 mg/mL não apresentaram afinidade apreciável pelo sítio benzodiazepínico. O extrato hidroetanólico (10-100 µg/mL), bem como os flavonóides vitexina e isovitexina, mesmo em concentrações bastante elevadas (300 µM), também não deslocaram a ligação (Tabela 17).

**Tabela 17:** Percentuais de inibição da ligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos (EXT= extrato hidroetanólico (70%) de *P. alata*, FLA = fração de flavonóides; SAP = fração de saponinas)

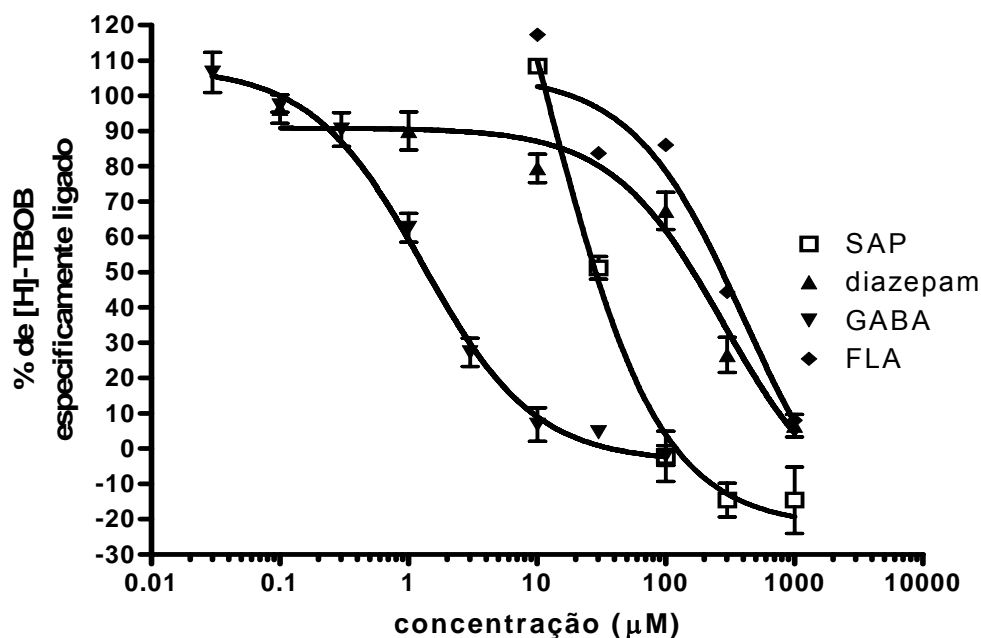
Amostra	% de inibição
EXT (1000 µg/mL)	NI
EXT (300 µg/mL)	NI
EXT (100 µg/mL)	NI
EXT (300 µg/mL)	NI
EXT (100 µg/mL)	NI
FLA (450 µg/mL)	34,5
FLA (300 µg/mL)	17,1
FLA (100 µg/mL)	7,6
SAP (450 µg/mL)	43,6
SAP (300 µg/mL)	23,1
SAP (100 µg/mL)	10,2
Vitexina (300 µM)	NI
Vitexina (100 µM)	NI
Isovitexina (300 µM)	NI
Isovitexina (100 µM)	NI

NI= não foi observada inibição

#### 5.4.1 Deslocamento da radioligação de [3H]-TBOB em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos

Na figura 20 estão apresentadas as curvas de deslocamento da radioligação de [3H]-TBOB em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos, na presença de GABA, geradas pela adição de concentrações crescentes da fração de flavonóides, fração de saponinas, diazepam e GABA.

Os valores de  $CI_{50}$  determinados para fração de flavonóides e de saponinas foram de 181,2  $\mu\text{g/mL}$  e 23,4  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Para expressão desses valores em molaridade e construção das curvas, admitiu-se que a fração de flavonóides era majoritariamente constituída de vitexina (peso molecular = 432 g/mol) e fração de saponinas majoritariamente de quadrangulosídeo (peso molecular= 1080 g/mol). Nessas mesmas condições, o diazepam, um modulador alostérico do canal GABA apresentou  $CI_{50}$  igual a 278,8  $\mu\text{M}$  e o GABA apresentou  $CI_{50}$  igual a 1,16  $\mu\text{M}$ .



**Figura 20:** Curvas deslocamento da ligação de [3H]-TBOB gerado por FLA e SAP em membranas sinaptossomais de córtex de rato extensivamente lavadas e adicionadas de 0,3  $\mu\text{M}$  de GABA. Resultados expressos como percentagens (média  $\pm$  desvio padrão) da ligação específica de [3H]-TBOB determinadas em três experimentos individuais.

---

## **6. DISCUSSÃO**





Trabalhos anteriores realizados nesta Universidade demonstraram que o tratamento agudo com extratos aquosos e hidroetanólicos das folhas de *P. alata* tem efeito ansiolítico em roedores, quando avaliados no modelo de ansiedade do labirinto em cruz elevado (PETRY *et al.*, 2001; DE PARIS *et al.*, 2002; REGINATTO *et al.*, 2006; FENNER, 2006). No entanto, os resultados não são homogêneos. Enquanto REGINATTO e colaboradores (2006) observaram um efeito ansiolítico agudo discreto em doses acima de 600 mg/kg, quando extratos aquosos foram administrados pela via oral, FENNER (2006) observou efeito hipnótico e apenas uma tendência ao efeito ansiolítico em tratamento agudo com extrato aquoso nebulizado em doses até 600 mg/kg (v.o.) e também, paradoxalmente, um efeito ansiogênico com tratamento crônico. A obtenção de resultados distintos e, por vezes, até mesmo discrepantes não é incomum quando se trabalha com extratos vegetais, visto que diferenças na época, local e estado vegetativo da planta no momento da coleta, bem como nos métodos de preparação do material vegetal e obtenção dos extratos podem determinar diferenças significativas na constituição química do extrato e, conseqüentemente, no efeito farmacológico observado (RATES *et al.*, 2001, CALIXTO, 2001; SONAGLIO *et al.*, 2003). Ainda que os laboratórios busquem uma padronização de seus métodos, normalmente esta padronização é realizada com base na constituição química majoritária do vegetal, ou na presença de substâncias passíveis de análise com os métodos analíticos disponíveis (marcadores químicos). Além disso, de uma maneira geral, ainda não se conhece as substâncias responsáveis pela atividade farmacológica das plantas nativas e do gênero *Passiflora*, em particular. Assim, não é possível garantir uma relação direta entre a variação nos teores de substâncias marcadoras e a dos teores das substâncias ativas, podendo-se imaginar que, independente da padronização química e tecnológica, os teores de substâncias ativas em diferentes extratos podem variar.

Neste trabalho, objetivamos iniciar a investigação das substâncias presentes no extrato aquoso responsáveis pelos efeitos hipnótico e ansiolítico anteriormente relatados. Além disso, avaliamos o efeito de um extrato hidroetanólico com maior teor alcóolico (70%), visto que, embora o uso de espécies de *Passiflora* na medicina popular seja sob a forma do infuso das folhas, a maioria das especialidades farmacêuticas registradas no Brasil são apresentadas na forma de soluções alcoólicas (ANVISA, 2006).

Foi investigado o efeito de um extrato hidroetanólico (70%) e das frações de flavonóides (FLA) e de saponinas (SAP), obtidas do extrato aquoso das folhas de *P. alata*, em modelos comportamentais clássicos para avaliação da atividade central: labirinto em cruz elevado, tempo de sono barbitúrico, avaliação da atividade locomotora espontânea, avaliação da coordenação motora em aparelho *rota-rod* e proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol.

Existem mais de 30 modelos animais de ansiedade descritos que podem ser subdivididos em dois grandes grupos: aqueles baseados em respostas condicionadas (conflito de Geller-Seifter e conflito de Vogel, por exemplo) e aqueles que são baseados em respostas não condicionadas, isto é, no comportamento espontâneo dos animais. O labirinto em cruz elevado é um exemplo do segundo grupo (RODGERS e DALVI, 1997) e é provavelmente o mais conhecido e utilizado dos modelos animais de ansiedade atualmente disponíveis, tendo seu uso validado para avaliação da atividade ansiolítica de substâncias em ratos (PELLOW *et al.*, 1985) e camundongos (LISTER, 1987). A exploração dos braços do labirinto pelos animais pode revelar tanto efeito ansiolítico quanto ansiogênico. Um aumento da exploração dos braços abertos é considerado indicativo de efeito ansiolítico, enquanto que o aumento da exploração dos braços fechados é preditivo de efeito ansiogênico (PELLOW *et al.*, 1987; RODGERS *et al.*, 1997). Parâmetros etológicos, como avaliação de risco, vêm sendo adotados visando aumentar a sensibilidade e utilidade do labirinto em cruz elevado (RODGERS e DALVI, 1997).

O tratamento oral, em doses únicas, com FLA 300 mg/kg e SAP 600 e 900 mg/kg, resultou num efeito do tipo ansiolítico, caracterizado pelo aumento da exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Para a fração de saponinas 900 mg/kg foi observada, ainda, uma redução significativa da frequência de avaliações de risco. Embora a atividade ansiolítica das frações seja verificada em doses relativamente elevadas, é possível sugerir que ambas as frações presentes no extrato aquoso, possam contribuir no efeito anteriormente relatado para o extrato. O efeito em doses elevadas é comum em extratos ou frações de extratos vegetais, visto tratar-se de uma mistura de substâncias onde a possibilidade das substâncias ativas serem minoritárias ou pouco absorvidas, além de antagonismos farmacológicos, é sempre presente. No caso de *Passiflora*, as doses citadas na literatura para as quais foi verificada atividade ansiolítica variam de 100 – 800 mg/kg.

A extensão da absorção oral de flavonóides e saponinas ainda não está plenamente definida, mas alguns estudos demonstram que estas classes de substâncias são pobremente absorvidas, especialmente quando na forma de heterosídeos (CHANG *et al.*, 2005; KHALED *et al.*, 2003; SCALBERT e WILLIAMSON, 2000; HOSTETTMAN e MARSTON, 1995). Evidências indicam que 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 (HOLLMAN *et al.*, 1999; GRAEFE *et al.*, 2001; WALLE, 2004; CHANG *et al.*, 2005).

Não foram encontrados relatos da farmacocinética dos flavonóides e saponinas 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). Além disso, também foi demonstrado que alguns microorganismos presentes na luz intestinal podem transformar, *in vitro*, alguns flavonóides através de metabolismo anaeróbico. Uma das reações descritas é a degradação do anel C, resultando em derivados hidroxifenilacéticos e hidroxifenilpropionícos correspondentes às agliconas dos flavonóides incubados na presença das bactérias (WINTER *et al.*, 1989; BLAUT *et al.*, 2003). Como visto, o metabolismo de flavonóides em animais e humanos é bastante complexo, sendo razoável supor que algum desses metabólitos possa ser o responsável pelo efeito observado para esta fração.

Também existem evidências de que as saponinas são pouco absorvidas quando administradas por via oral (HOSTETTMAN e MARSTON, 1995). Estudos realizados com os ginsenosídeos Rb1 e Rg1 demonstram que estes possuem uma biodisponibilidade de 4,35% e 18,4%, respectivamente (XU *et al.*, 2003). O fator mais importante para essa biodisponibilidade é sua baixa permeabilidade às membranas no trato gastro intestinal (HAN e FANG, 2006).

Estudos apontam o envolvimento de flavonóides no efeito ansiolítico observado em diversas espécies vegetais como *Cecropia glazioui*, *Matricaria chamomilla*, *Passiflora caerulea*, *Scutellaria baicalensis*, *Tillia tomentosa*, *Valeriana officinalis*, entre outros (ROCHA *et al.*, 2002; ZANOLLI *et al.*, 2000; WOLFMAN *et al.*, 1994; HUI *et al.*, 2002; VIOLA *et al.*, 1994a; MARDER, *et al.*, 2003; FERNÁNDEZ *et al.*, 2004). OKUYAMA e colaboradores (1996) demonstraram que os flavonóides

orientina e isoorientina apresentaram efeito ansiolítico discreto no teste anti-conflito, em camundongos. Estes flavonóides também são descritos para *P. alata* (ULUBELEN *et al.*, 1982; DOYAMA *et al.*, 2005) sendo plausível supor que estes compostos possam estar presentes em FLA e contribuir no efeito ansiolítico observado.

Como apresentado no item 3.2 da Revisão (Flavonóides e Ansiedade), o mecanismo de ação mais comumente relatado na explicação do efeito ansiolítico de diversos flavonóides é a modulação alostérica positiva do receptor GABA<sub>A</sub>, via sítio benzodiazepínico (MEDINA *et al.*, 1990; MEDINA, *et al.*, 1998; PALADINI *et al.*, 1999; GRIEBEL *et al.*, 1999; MARDER e PALADINI, 2002; GOUTMAN *et al.*, 2003; HUEN *et al.*, 2003a). Há também evidências da atuação de saponinas no sítio benzodiazepínico (HUONG *et al.*, 1996) e no próprio sítio de ligação do GABA (KIMURA *et al.*, 1994; CHOI *et al.*, 2003).

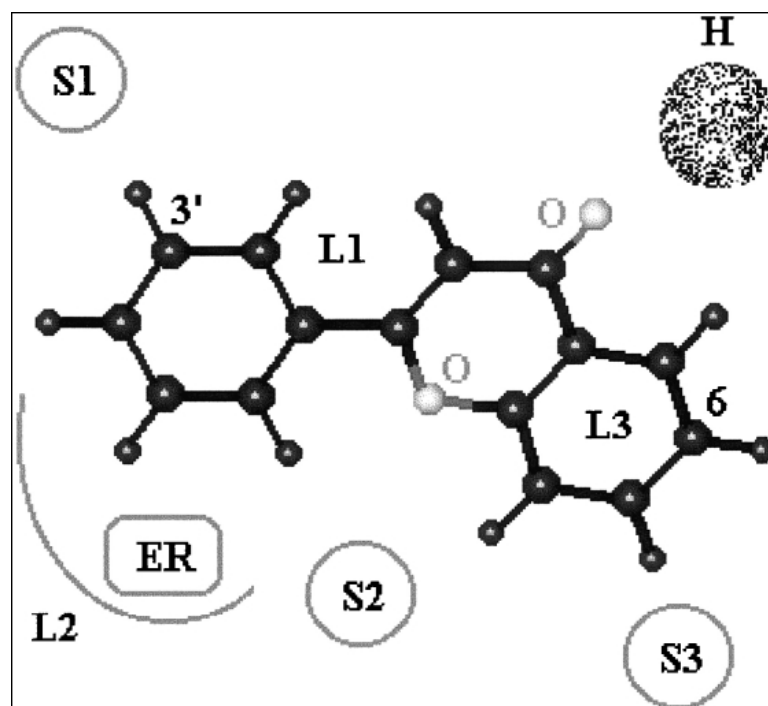
No entanto, os dados aqui obtidos indicam que não há uma interação importante dos flavonóides ou saponinas presentes no extrato aquoso de *P. alata* com o sítio benzodiazepínico, visto que nenhuma das frações, nem os flavonóides vitexina e isovitexina, foram capazes de deslocar a ligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam em membranas sinaptosomais de córtex cerebral de ratos, em concentrações relevantes. Este achado está de acordo com dados da literatura sobre os requisitos estruturais para interação de uma substância com o sítio benzodiazepínico conforme explicitado a seguir.

Em 1995, ZHANG e colaboradores descreveram um modelo para a interação de agonistas/antagonistas com o sítio benzodiazepínico. Nesse modelo, são definidas no receptor uma região doadora (H1), uma aceptora (A2) e uma bifuncional (doadora/aceptora) (H2/A3) de pontes de hidrogênio. Além disso, são demarcadas três bolsas lipofílicas (L1, L2 e L3) e ainda três regiões de restrição de volume (interações estéricas negativas). Esse modelo foi aplicado com sucesso para previsão de afinidade de diferentes classes de compostos. Atentos a esse modelo e com base na afinidade de vários flavonóides naturais e sintéticos pelo sítio benzodiazepínico, vários pesquisadores desenvolveram estudos de relação estrutura-atividade (REA) para esta classe de compostos, sendo que foi possível estabelecer requisitos estruturais importantes para a interação entre flavonóides e o

sítio benzodiazepínico, bem como modelos farmacofóricos para essa interação (DEKERMENDJIAN *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 2001; KAHNBERG, *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2002; KAHNBERG *et al.*, 2002; HUONG e HOPFINGER, 2003).

Os modelos propostos apresentam algumas características em comum. Todos relatam a necessidade de uma estrutura planar ou quase planar para o encaixe no receptor. Além disso, a carbonila em C4 no anel benzoflavônico parece ser um requisito fundamental para uma interação do tipo ponte de hidrogênio com o sítio doador (H) descrito no modelo. Outras características importantes para aumento da afinidade são as substituições em C6 e C3' por grupamentos eletronegativos e em C2' por grupamento hidroxila (DEKERMENDJIAN *et al.*, 1999; MARDER *et al.*, 2001; HUEN *et al.*, 2003). Na figura 21 está representado o modelo da interação flavonóide/sítio benzodiazepínico desenvolvido no trabalho de MARDER e colaboradores (2001). Esse trabalho aponta a existência de uma região com alta densidade eletrônica (ER), próxima à bolsa lipofílica L2, que realiza uma interação com C5'; uma região doadora de pontes de hidrogênio (H), responsável por uma interação com a carbonila da posição 4; três regiões de restrição de volume - S1, S2 e S3 - próximas às posições C3', C7 e C8, respectivamente, o que denota uma limitação no tamanho dos substituintes nessas posições; três bolsas lipofílicas (L1, L2 e L3), responsáveis por interações com as regiões aromáticas do núcleo benzopirano e com substituintes do anel B.

Com base nesses trabalhos e considerando as estruturas dos flavonóides descritos para *P. alata* (Figura 1), é possível justificar a baixa afinidade pelo sítio benzodiazepínico. Todos são derivados do núcleo flavona, o que é uma característica favorável, uma vez que uma estrutura mais próxima ao planar é favorável à afinidade. De fato, a flavanona (que difere da flavona pela ausência de uma ligação dupla entre C2 e C3) tem uma afinidade cerca de 40 vezes menor que a flavona pelo sítio benzodiazepínico (MARDER, 1997). No entanto, os flavonóides descritos para *P. alata* apresentam uma hidroxila ligada em C4' e a substituição nessa posição tem um efeito negativo sobre a afinidade (MARDER *et al.*, 2001).



**Figura 21:** Flavona ajustada no modelo farmacofórico descrito por MARDER e colaboradores (2001). **H** representa um sítio doador de ponte de hidrogênio; **S1**, **S2** e **S3** denotam regiões de restrições de volume; **L1**, **L2** e **L3** representam bolsas lipofílicas e **ER** indica uma região de alta densidade eletrônica.

O maior incremento de afinidade para flavonóides naturais é dado pela substituição por uma hidroxila em C2' (HUEN *et al.*, 2003) e nenhum dos flavonóides de *P. alata* apresenta esse padrão de substituição. Contudo, a principal característica que leva a baixa afinidade apresentada por estes compostos é a presença de açúcares ligados a aglicona, uma vez que todos são C-glicosídeos com resíduos de açúcar ligados nas posições C6 ou C8. No modelo apresentado na figura 21, percebe-se que a posição C8 está próxima a uma região de restrição de volume no receptor, logo, a presença de um resíduo de açúcar dificulta o encaixe. Exemplificando, vitexina apresenta uma glicose ligada em C6 e isovitexina apresenta esse mesmo resíduo em C8, o que resultaria em um impedimento estérico para a ligação ao sítio benzodiazepínico (MARDER *et al.*, 2001). Além disso, FERNANDEZ e colaboradores (2006) verificaram que diversos flavonóides glicosilados não apresentam afinidade pelo receptor benzodiazepínico em concentrações até 100  $\mu$ M. Com base nisso, é possível compreender a baixa afinidade da fração de flavonóides,

uma vez que todos flavonóides descritos até o momento para *P. alata* são glicosilados, e nessa forma, apresentam baixa afinidade por esse receptor.

Não foram encontrados relatos de estudos sobre a afinidade de saponinas pelo sítio benzodiazepínico. Segundo o modelo apresentado, em teoria, o grande volume, as ligações com açúcares e a estrutura não planar das saponinas dificultariam a ligação destas a este sítio.

Entretanto, os efeitos depressores do Sistema Nervoso Central e ansiolítico podem estar relacionados à interação com outros sítios no canal de cloreto ativado por GABA, que não o sítio benzodiazepínico. Por exemplo, existem sítios específicos para o álcool e barbitúricos, cuja ativação resulta em efeito depressor (COOPER, *et al.*, 2006; STAHL, 2000).

O GABA é o neurotransmissor inibitório majoritário do SNC de mamíferos e pode se ligar a três diferentes subtipos de receptores: GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>C</sub>, que são canais transmembrana carreadores de cloreto; e GABA<sub>B</sub>, um receptor tipo metabotrópico acoplado a proteínas G (BORMANN, 2000; CHEBIB e JOHNSTON, 2000; BETTLER e TIAO, 2006). Todos esses receptores são formados por subunidades protéicas sendo que já foram identificados 19 diferentes tipos de subunidades, a saber:  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-4}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\rho_{1-3}$  (MÖHLER, 2006). O receptor GABA<sub>A</sub> é formado de cinco subunidades protéicas, as quais formam um poro central transmembrana capaz de carrear íons cloreto. As diferentes combinações possíveis entre as subunidades levam à expressão dos sítios de ligação presentes no complexo. O sítio benzodiazepínico, por exemplo, é expresso no complexo receptor GABA<sub>A</sub> na interface entre as subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$  (MÖHLER, *et al.*, 1995; NUTT e MALIZIA, 2001). RUDOLPH e colaboradores (1999) discutem a importância da composição das subunidades do receptor para os efeitos biológicos. Usando camungongos *knock out*, os autores demonstraram que os efeitos sedativo, amnésico e anticonvulsivante de ligantes benzodiazepínicos são mediados pela subunidade  $\alpha_1$ , enquanto que os efeitos ansiolítico, miorelaxante, redução da atividade motora e potenciação dos efeitos do etanol são mediados pelas subunidades  $\alpha_{2,3,5}$ .

Desta forma, em teoria, os flavonóides e as saponinas poderiam estar apresentando efeito ansiolítico por uma modulação positiva do canal, via outros sítios de ligação que não o do [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam.

O estado funcional do complexo receptor GABA<sub>A</sub> pode ser avaliado medindo-se a quantidade de [<sup>3</sup>H]-TBOB (*t*-butil-biciclo-ortobenzoato) que se liga ao sítio convulsivante (sítio de ligação da picrotoxina) presente no complexo receptor (VAN RIJIN e BREE, 2003). FLA e SAP foram capazes de inibir a ligação específica de [<sup>3</sup>H]-TBOB, sendo que a fração de saponinas parece ser mais potente. Nas condições empregadas nesse ensaio (membranas extensivamente lavadas e adicionadas de uma quantidade definida de GABA), substâncias que atuam ativando o canal (direta ou indiretamente) são capazes de reduzir a ligação específica de [<sup>3</sup>H]-TBOB. De forma contrária, substâncias que atuam de modo a fechar o canal aumentam essa ligação (PERICIC *et al.*, 1998).

Efeito semelhante ao de FLA e SAP já foi relatado para substâncias capazes de ativar o canal GABAérgico (isto é, permitir o influxo de íons cloreto), tais como felbamato, tiopental, deidroepiandrosterona, retigabina, alguns dissacarídeos, que também são capazes de deslocar a ligação específica de [<sup>3</sup>H]-TBOB (KUME *et al.*, 1996; PERICIC *et al.*, 1998; VAN RIJIN e BREE, 2003; REZAI *et al.*, 2003).

Além do efeito ansiolítico, FLA 300 mg/kg aumentou significativamente o tempo de duração do sono induzido por pentobarbital, enquanto SAP não apresentou efeito. Nesse teste, fármacos depressores do Sistema Nervoso Central, em geral, reduzem a latência e/ou aumentam a duração do sono induzido pelo barbitúrico. Assim, é possível considerar que o efeito depressor relatado por FENNER (2006) pode ser devido, ao menos em parte, à presença dos flavonóides no extrato. Já as saponinas parecem não contribuir com esse efeito.

Por outro lado, substâncias metabolizadas no fígado podem alterar os parâmetros registrados no teste de sono barbitúrico, como consequência de uma interação farmacocinética, através da inibição da metabolização do pentobarbital e, conseqüentemente, aumentando a duração do sono (LAPA *et al.*, 2003). A ação inibitória de flavonóides sobre uma grande diversidade de enzimas é bem documentada, incluindo atividade inibitória sobre lipoxigenases, fosfolipases,



cicloxygenases, fosfodiesterases, cinases, aromatase, e também modulação de enzimas do sistema citocromo P450, inibindo ou ativando isoenzimas CYP específicas (MANTHEY, 2000, HODEK *et al.*, 2002; MOON *et al.*, 2006). Já foi relatada atividade inibitória de flavonóides sobre as isoenzimas CYP 1A1, 1A2, 1B1 e 3A4 (HODECK *et al.*, 2002; CHAUDHARY e WITTNEY, 2006), o que sugere que estes compostos poderiam inibir as enzimas responsáveis pela metabolização do pentobarbital e resultar num aumento do tempo de sono induzido. Porém não foram encontrados relatos na literatura relativos à atividade dos flavonóides descritos para *P. alata* sobre o citocromo P450. Além disso, nem FLA, nem SAP causaram alterações dos parâmetros motores observados na caixa de locomoção. Uma redução na locomoção é preditiva de um efeito sedativo pronunciado. Se por um lado a ausência de efeito sobre a locomoção pode indicar que o aumento do tempo de sono barbitúrico seja mediado pela inibição do metabolismo do pentobarbital, também indica que o efeito observado no labirinto em cruz não é resultante de um comprometimento motor e fortalece a hipótese de efeito ansiolítico.

FLA e SAP também não protegeram os animais dos efeitos pró-convulsivantes do pentilenoterazol nem alteraram os parâmetros avaliados no aparelho rota-rod, demonstrando que estas frações não apresentam um efeito anticonvulsivante ou relaxante muscular, o que, juntamente com os dados de *binding*, demonstra um perfil farmacológico diferente dos benzodiazepínicos.

A avaliação do extrato hidroetanólico (70%) também evidenciou um efeito depressor do Sistema Nervoso Central para *P. alata*, mediado pela modulação alostérica do receptor GABA<sub>A</sub>, mas que não pode ser atribuído à ativação direta do sítio benzodiazepínico pelas moléculas presentes no extrato. A administração de uma dose única de 300 mg/kg (v.o.) resultou num efeito do tipo ansiolítico em camundongos, quando avaliados no labirinto em cruz elevado. Este efeito foi completamente bloqueado pela administração do antagonista benzodiazepínico flumazenil (6 mg/kg, i.p.), indicando um efeito mediado pela ativação do sítio benzodiazepínico. Porém, nos ensaios *in vitro* o extrato (10-1000 µg/mL) não deslocou a ligação do [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam em membranas sinaptossomais de córtex de ratos. Uma das explicações para essa aparente discrepância é a de que as substâncias presentes no extrato sofram algum tipo de transformação no organismo e os metabólitos resultantes liguem-se ao sítio benzodiazepínico desencadeando o

efeito ansiolítico. Este fenômeno também pode somar-se à explicação do que se observou com as frações FLA e SAP que, como discutido anteriormente, apresentam efeito ansiolítico, sem apresentarem interação importante com o sítio benzodiazepínico, mas causando uma modulação alostérica positiva do canal de cloreto. Por fim, o efeito ansiolítico sensível à administração da flumazenil observado após administração sistêmica do extrato pode, ainda, ser interpretado com base na modulação da atividade das endozepinas, substâncias endógenas com afinidade pelo sítio benzodiazepínico. Este tipo de mecanismo de ação tem sido proposto para explicar o efeito ansiolítico da apigenina, um derivado de flavona (YAROM *et al.*, 1998; BARALDI *et al.*, 2000; CAMPBELL, *et al.*, 2004).

O tratamento com o extrato hidroetanólico 300 mg/kg também prolongou o tempo de sono induzido por pentobarbital, não alterou na atividade locomotora, nem apresentou efeito anticonvulsivante. No entanto, surpreendentemente, os animais tratados com o este extrato tiveram um desempenho superior aos animais controle no aparelho *rota-rod*, quando considerados os desempenhos na sessão teste em relação à sessão treino. Este resultado mostra que, nessa dose, o extrato além de não causar prejuízos à coordenação motora dos animais, os torna mais hábeis nesta tarefa. Esse não é um achado de explicação simples, mas pode estar indicando um efeito nootrópico que merece investigação futura. Efeito nootrópico já foi relatado para saponinas (YING *et al.*, 1997; UNE *et al.*, 2001; KENNEDY e SHOLEY, 2003).

Na dose de 600 mg/kg, o extrato hidroetanólico não apresentou efeito ansiolítico. Contudo, esse mesmo tratamento também prolongou o tempo de sono induzido por pentobarbital, e causou uma redução significativa no número de cruzamentos e de *rearings* dos animais na caixa de locomoção. Essa redução na atividade motora caracteriza um efeito sedativo, o qual pode estar impedindo a expressão do efeito ansiolítico. De fato, foi possível observar no labirinto em cruz elevado que os animais permaneciam bastante parados, especialmente nos braços fechados, o que também poderia ser interpretado como um efeito ansiogênico (RODGERS e DALVI, 1997). Porém, houve uma tendência à redução no número de entradas nos braços fechados e no número total de entradas, parâmetros relacionados à atividade motora, o que reforça a idéia de efeito sedativo e não ansiogênico. O efeito sedativo suplantando o ansiolítico em função da dose

administrada também foi descrito para *P. incarnata* (DHAWAN *et al.*, 2001c) e *P. actinia* (SANTOS *et al.*, 2003; LOLLI *et al.*, 2006).

Em resumo, neste trabalho demonstramos que o extrato hidroetanólico (70 %) de *P. alata*, quando administrado agudamente, apresenta um efeito ansiolítico e sedativo enquanto FENNER (2006) verificou que o extrato aquoso apresenta apenas efeito sedativo. Achados semelhantes foram descritos por SOULIMANI e colaboradores (1997) para extratos de *P. incarnata*. Como extratos hidroetanólicos apresentam maior quantidade de compostos lipofílicos do que extratos aquosos, pode-se supor que o efeito ansiolítico esteja relacionado à presença de substâncias de menor polaridade. Já o efeito hipnótico-sedativo observado para os dois extratos poderia ser atribuído à presença de moléculas mais polares nos dois extratos. No caso do extrato hidroetanólico, o efeito sedativo também pode estar relacionado a um aumento da concentração das substâncias cujo efeito ansiolítico predomina em concentrações menores. Esta relação entre dose e efeito ansiolítico ou hipnótico-sedativo é clássica para benzodiazepínicos (STHAL, 2000; BALDESSARINI, 2001).

De uma forma geral, os dados aqui apresentados não contradizem o uso popular e também das preparações farmacêuticas alcoólicas obtidas a partir de *P. alata* como sedativo e ansiolítico, respectivamente. Também estão de acordo com o estado da arte do perfil farmacológico do gênero *Passiflora*. No entanto, é importante ressaltar que não foram encontrados estudos clínicos para *P. alata* e que FENNER (2006) relatou um efeito ansiogênico, após tratamento repetido com o extrato aquoso, bem como, potencial toxicidade genética para esta espécie. Além disso, a observação da dependência entre efeito encontrado - ansiolítico ou sedativo – e o tipo e a dose de extrato é recorrente na literatura. Portanto, a garantia da segurança e eficácia de produtos farmacêuticos obtidos com *P. alata* depende, ainda, de estudos mais aprofundados de sua farmacologia, toxicologia, e desenvolvimento tecnológico.

Finalmente, até onde sabemos, este é o primeiro estudo desenvolvido identificando classes de substâncias presentes em *P. alata* com atividade central *in vivo* e que possam estar relacionadas com o efeito relatado para o extrato. Também, neste trabalho foi iniciado o estudo do mecanismo de ação de *P. alata* e os

resultados obtidos até o momento indicam que *P. alata* exerce seus efeitos centrais pela ativação da neurotransmissão GABAérgica.

---

## **7. CONCLUSÕES**



A fração de flavonóides (300 mg/kg, v.o.) e a fração de saponinas (600 e 900 mg/kg, v.o.) obtidas de um extrato aquoso das folhas de *Passiflora alata*, provocaram um efeito do tipo ansiolítico em camundongos. Esses dados indicam que flavonóides e saponinas podem contribuir para o efeito ansiolítico já relatado para esta espécie. O estudo preliminar do mecanismo de ação destas frações indica que são capazes de modular positivamente o canal GABAérgico, porém não através da interação com o sítio benzodiazepínico, apontando para um mecanismo de ação diferenciado das benzodiazepinas clássicas.

O extrato hidroetanólico (70%) de *P. alata* causou, em camundongos, efeito do tipo ansiolítico na dose de 300 mg/kg (v.o.) e sedativo na dose de 600 mg/kg (v.o.) O estudo do mecanismo de ação revelou a participação do sistema benzodiazepínico GABAérgico no efeito ansiolítico do extrato, porém não através da interação direta de moléculas presentes no extrato com o sítio benzodiazepínico, apontando para a possível existência de metabólitos ativos destes compostos após a administração sistêmica desse extrato.

Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com o estágio atual do conhecimento para o gênero *Passiflora*, não contradizem as indicações terapêuticas das preparações existentes no mercado farmacêutico nacional e indicam a potencialidade do uso de *P. alata* para o desenvolvimento de novos fármacos ansiolíticos.





---

## **8. REFERÊNCIAS**



ADZU, B.; AMOS, S.; DZARMA, S.; WAMBEBE, C. GAMANIEL, K. Effect of *Zizyphus spina-christi* Willd aqueous extract on the central nervous system in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 13-16, 2002.

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](http://www.anvisa.gov/medicamentos/banco_med.htm). Acesso: dezembro 2006.

ARGYROPOULOS, S.V.; NUTT, D.J. The use of benzodizepines in anxiety and other disorders. **European Neuropsychopharmacology**, v. 9, n. 6, p. 407-412, 1999.

ARICIOGLU, F.; YILLAR, O.; KORCEGEZ, E.; BERKMAN, K. Effect of harmene on the convulsive threshold in epilepsy models in mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1009, p. 190-195, 2003.

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.; POLKINGHORN, C. Evidence-based pharmacotherapy of generalized anxiety disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 8, p. 293-302, 2005.

BARALDI, M.; AVALLONE, R.; CORSI, L.; VENTURINI, I.; BARALDI, C.; ZENEROLI, M.C. Endogenous benzodiazepines, **Therapie**, v. 55, p. 143–146, 2000.

BENINCÁ, J.P.; MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTI, S.M.; SCHENKEL, A.P.; FRÖDE, T.S.. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**, 2007, *in press*, DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.01.20.

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

BEZERRA, J.A., CAMPOS, A.C.; VASCONCELOS, P.R.; NICARETA, J.R.; RIBEIRO, E.R.; SEBASTIAO, A.P.; URDIALES, A.I.; MOREIRA, M.; BORGES, A.M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de anastomose colônica em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p.16-25, 2006.

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.

BLAUT, M.; SCHOEFER, L.; BRAUNE, A. Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 73, n. 2, p. 79-87, 2003. (*abstract*)

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

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

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** v. 72, p. 248-254. 1976.

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: Edición ACRIBIA, 1991.

BUTTERWECK, V.; NAHRSTEDT, A.; EVANS, J.; HUFSEIN, S.; RAUSER, L.; SAVAGE, J.; POPADAK, B.; ERNSBERGER, P.; ROTH, B.L. *In vitro* receptor screening of pure constituents of St. John's wort reveals novel interactions with a number of GPCRs. **Psychopharmacology**, v. 162, n. 2, p. 193-202, 2002.

CALIXTO, J.B. Estudo Farmacológico Pré-Clínico de Plantas Mediciniais. *In*: YUNES, R. A. & CALIXTO, J.B. (Org.) **Plantas Mediciniais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001, p. 77-99.

CAMPBELL, E.L.; CHEBIB, M.; JOHNSTON, G.A. The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABA(A) receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 8, p.1631-1638, 2004

CAPASSO, A. e SORRENTINO, L. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of Kawa kawa and *Passiflora* extracts combination. **Phytomedicine**, v. 12, n. 1-2, p. 39-45, 2005.

CARR, M.N.; BEKKU, N.; YOSHIMURA, H. Identification of anxiolytic ingredients in ginseng root using the elevated plus-maze test in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 531, n. 1-3, p.160-165, 2006.

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.

CHAKRAVARTHY, B.K. ; RAO, Y.V. ; GAMBHIR, S.S.; GODE, K.D. Isolation of amenthoflavone from *Selaginella rupestris* and its pharmacological activity on CNS, smooth muscles and isolated frog heart preparations. **Planta Medica**, v. 43, p. 64-70, 1981.

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.

CHAU, C.F.; HUANG, Y.L. Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, n.8, p. 786-790, 2005.

CHAUDHARY, A.; 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.

CHEBIB, M.; JOHNSTON, G.A. GABA-Activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 8, p. 1427-1447, 2000.

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 expresses in *Xenopus* oocytes. **Archives of Pharmacological Research**. v. 26, n. 1, p. 28-33, 2003.

CLOUATRE, D.L. Kava kava: examining new reports of toxicity. **Toxicology Letters**, v.150, n.1, p. 85-96, 2004.

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.

COLETA, M.; BATISTA, M.T.; CAMPOS, M.G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M.D.; LIMA T.C.; CUNHA, A.P. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 12, p. 1067-1073, 2006.

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 Afargs**, n. 15, p. 14-19, 2003.

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. **The Biochemical Basis of Neuropharmacology**. 7 ed. New York: Oxford University Press, 1996. 518p.

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.

DA SILVA, J.R.S.; CAMPOS, A.C.L.; FERREIRA, L.M.; ARANHA-JUNIOR, A.A.; THIEDE, A.; ZAGO-FILHO, L.A.; BERTOLI, L.C.; FERREIRA, M. TRUBIAN, P.S.; FREITAS, A.C.T. Efeito do extrato da *Passiflora adulis* na cicatrização de gastrorrafias em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 50-58, 2006.

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 CASTRO, P.C.; HOSHINO, A.; SILVA, J.C.; MENDES, F.R. Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in experimental models. **Phytotherapy Research**, *in press* 2007 (ABSTRACT)

DE VANE, C.L.; CHIAO, E.; FRANKLIN, M.; KRUEP, E.J. Anxiety disorders in the 21<sup>st</sup> century: status, challenges, opportunities, and comorbidity with depression. **The American Journal of Managed Care**, v. 11, p.344-353, 2005.

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.

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

DEKERMENDJIAN, K.; KAHNBERG, P.; WITT, M.R.; STERNER, O.; NIELSEN, M.; LILJEFORS, T. Structure-activity relationships and molecular modeling analysis of flavonoids binding to the benzodiazepine site of the rat brain GABA(A) receptor complex. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 21, p.4343-4350, 1999.

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.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 8, p. 922-926, 2001b.

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

DHAWAN, K.; SHARMA, A. Antitussive activity of the methanol extract of *Passiflora incarnata* leaves. **Fitoterapia**, v. 73, p. 397-399, 2002.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Aphrodisiac activity of methanol extract of leaves of *Passiflora incarnata* Linn in mice. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 4, p. 401-403, 2003a.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Antiasthmatic activity of methanol extract of leaves of *Passiflora incarnata*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 7, p. 821-822, 2003b.

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.

DU, Q.; JERZ, G.; WAIBEL, R.; WINTERHALTER, P. Isolation of dammarane saponins from *Panax notoginseng* by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1008, n.2, p. 173-80, 2003.

ESCOP. **European Scientific Cooperative on Phytotherapy Monograph on the Medicinal Uses of Plant**. United Kingdom: Exeter, 1997.

**FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil**. 2ª ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

**FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil**. 3ª ed. São Paulo: Andrei, 1977.

FENNER, R. **Avaliação do efeito hipnótico/sedativo e ansiolítico de um extrato seco nebulizado *Passiflora alata* Curtis (PASSIFLORACEAE)**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFRGS, 105p, 2006.

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, n. 2-3, p. 189-198, 2005.

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

FISHER, A.A.; PURCELL, P.; LE COUTEUR, D.G. Toxicity of *Passiflora incarnata* L. **Journal of Toxicology and Clinical Toxicology**, v. 38, n.1, p. 63-66, 2000. *Abstract*

GARROS, I.D.; CAMPOS, A.C.; TAMBARA, E.M.; TENORIO, S.B.; TORRES, O.J.; AGULHAM, M.A.; ARAUJO, A.C.; SANTIS-ISOLAN, P.M.; OLIVEIRA, R.M.; ARRUDA, E.C. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 55-65, 2006.



GIAVINA-BIANCHI, P.F.Jr.; CASTRO, F.F.; MACHADO, M.L.; DUARTE, A.J. Occupational respiratory allergic disease induced by *Passiflora alata* and *Rhamnus purshiana*. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 79, n. 5, p. 449-454, 1997. *Abstract*

GILLIS, R.A.; DIMICCO, J.A.; WILLIFORD, D.J.; HAMILTON, B.L.; GALE, K.N. Importance of CNS GABAergic mechanisms in the regulation of cardiovascular function. **Brain Research Bulletin**, v. 5, n. 2, p.303-315, 1980.

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

GOMES, C.S.; CAMPOS, A.C.L.; TORRES, O.J.M.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, A.T.R.; TENÓRIO, S.B.; TÂMBARA, E.M.; SAKATA, K.; JÚNIOR, H.M.; FERRER, A.L.S. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 7-14, 2006.

GONÇALVES-FILHO, A.; TORRES, O.J.M.; CAMPOS, A.C.L.; TÂMBARA-FILHO, R.; ROCHA, L.C.A.; THIEDE, A.; LUNEDO, S.M.C.; BARBOSA, R.E.A.; BERNHARDT, J.A.; VASCONCELOS, P.R.L. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização da bexiga em ratos: estudo morfológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 1-6, 2006.

GOUTMAN, J.D.; WAXEMBERG, M.D.; DOÑATE-OLIVER, F.; POMATA, P.E.; CALVO, D.J. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> 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. Ansiedade. In: GRAEFF, F.C. e BRANDÃO, M.L. **Neurobiologia das Doenças Mentais**. São Paulo: Lemos Editorial & Gráficos, 1993. p. 109-144

GRAEFF, F.G. Medicamentos Ansiolíticos. In: GRAEFF, F.G. e GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, 1999, 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.

GUTMAN, H.; BRUGGISSER, R.; SCHAEFFNER, W.; BOGMAN, K.; BOTOMINO, A.; CRENE, J. Transport of amentoflavone across the blood-brain barrier *in vitro*. **Planta Medica**, v. 68, p. 804-807, 2002.

HABERLEIN, H.; TSCHIERSCH, 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.

HABERLEIN, H.; TSCHIERSCH, K.P. On the occurrence of methylated and methoxylated flavonoids in *Leptospermum scoparium*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 97-103, 1998.

HAN, M.; FANG, X.L. Difference in oral absorption of ginsenoside Rg1 between *in vitro* and *in vivo* models. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, n. 4, p. 499-505, 2006.

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<sub>A</sub> receptors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 14, p. 2281-2284, 2003.

HARBORNE, J.B. (ED). **The Flavonoids: Advances in research since 1986**. London: Chapman and Hall, 1994.

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

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

HILBER, P. e CHAPILLON, P. Effects of harmaline on anxiety-related behavior in mice. **Physiology & Behavior**, v. 86, p. 164-167, 2005.

HODEK, P; TRIFIL, P.; STIBOROVA, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions**, v. 139, n. 1, p. 1-21, 2002.

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.

HOSTETTMAN, K e MARSTON, A. **Saponins**. Cambridge: University Press, 1995.

HOUGHTON, P.J., The scientific basis for the reputed activity of *Valerian*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 505-512, 1999.

HUANG, X.,; LIU, T.; GU, J.; LUO, X.; JI, R.; CAO, Y.; XUE, H.; WONG, J.T.; WONG, B.L.; PEI, G.; JIANG, H.; CHEN, K. 3D-QSAR model of flavonoids binding at benzodiazepine site in GABA<sub>A</sub> receptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 12, p. 1883-1891, 2001.

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.; WANG, X.H.; XUE, H. Interaction of flavones from the roots of *Scutellaria baicalensis* with the benzodiazepine site. **Planta Medica**, v. 66, n. 1, p. 91-93, 2000.

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.

HONG, X.; HOPFINGER, A.J. 3D-pharmacophores of flavonoid binding at the benzodiazepine GABA(A) receptor site using 4D-QSAR analysis. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, n.1, p. 324-336, 2003.

ICHIMURA, T.; YOMANAKA, A.; ICHIBA, T.; TOYOKAWA, T.; KAMADA, Y.; TAMAMURA, T.; MARUYAMA, S. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, n. 3, p. 718-721, 2006.

KACZMARECK, F.; SZPUNAR, K. Untersuchungen über den einfluss einiger flavoide auf die kokainerregung bei mausen. **Institut Przemysly Zielarskiego W Poznaniu Biuletyn**, v. 37, n.1, p. 1-6, 1964.

KAHNBERG, P.; LAGER, E.; ROSENBERG, C.; SCHOUGAARD, J.; CAMET, L.; STERNER, O.; OSTERGAARD NIELSEN E, NIELSEN M, LILJEFORS T. Refinement and evaluation of a pharmacophore model for flavone derivatives binding to the benzodiazepine site of the GABA(A) receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 19, p. 4188-4201, 2002.

KENNEDY, D.O.; SCHOLEY, A.B. Ginseng: potential for the enhancement of cognitive performance and mood. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 3, p. 687-700, 2003..

KENT, J.M.; MATHEW, S.J.; GORMAN, J.M. Molecular targets in the treatment of anxiety. **Biological Psychiatry**, v. 52, p. 1008-1030, 2002.

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.

KIM, J.; GORMAN, J. The pshychobiology of anxiety. **Clinical Neuroscience Research**, v. 4 , p. 335-347, 2005.

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.

KOEHLER-SANTOS, P.; LORENZ-LEMKE, E.A.; SALZANO, F.M.; FREITAS, L.B. Ecological-evolutionary relationships in *Passiflora alata* from Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n.3, p.809-816, 2006.

KUHAR, M.J. Neuroanatomic substrates of anxiety: a brief survey. **Trend in Neursciences**, v.97, p.307:311, 1996.

KUME, A.; GREENFIELD, L.J.Jr.; MACDONALD, R.L.; ALBIN, R.L. Felbamate inhibits [<sup>3</sup>H]-*t*-butylbicycloorthoobenzoato (TBOB) binding and enhances Cl<sup>-</sup> courent at the gamma-aminobutyric AcidA (GABA<sub>A</sub>) receptor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 277, n. 3, p. 1784-1792, 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.

LIAO, J.F.; WANG, H.H.; CHEN, M.C.; CHEN, C.C.; CHEN, C.F. Benzodiazepine binding site-interactive flavones from *Scutellaria baicalensis* root. **Planta Medica**, v. 64, n.6, p.571-572, 1998.

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.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

LOLLI, L.F. ; SATO, C.M. ; ROMANINI, C.V. ; VILLAS-BOAS, L.B. ; SANTOS, C.A.M.; DE OLIVEIRA, R.M.W. Possible involvement of GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 2006, *in press*, doi :10,1016/j.jep.2006.11.021.

LOPES, D.V.; CARUSO, R.R.; CASTRO, N.G.; COSTA, P.R.; DA SILVA, A.J.; NOEL, F. Characterization of a new synthetic isoflavonoid with inverse agonist activity at the central benzodiazepine receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 495, n. 2-3, p. 87-96, 2004.

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.

LYDIARD, R.B. An overview of generalized anxiety disorder: disease state-appropriate therapy. **Clinical Therapeutics**, v. 22, suppl.A, p. 3-19, 2000.

MAHADY, G.B.; PENDLAND, S.L.; STOIA, A.; HAMIL, F.A.; FABRICANT, D.; DIETZ, B.M.; CHADWICK, L.R. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 11, p. 988-991, 2005.

MANTHEY, J.A. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. **Microcirculation**, v. 7, p. 29-34, 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. Cirsiliol 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, PG.; 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. **Flavonoides naturales y sintéticos con acción sobre el Sistema Nervioso Central**. Tesis de Doutorado. Universidad de Buenos Aires, 1997, 140p.

MARDER, M.; ZINCZUK, J.; COLOMBO, M.; WASOWSKI, C.; VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; MEDINA, J.H.; RÚVEDA, E.A.; PALADINI, A.C. Syntesis of halogenated/nitrated flavone derivatives and evaluation of their affinity for the central benzodiazepine receptor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 15, p. 2003-2008, 1997.

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.; ESTIU, G.; BLANCH, L.B.; VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C. Molecular modeling and QSAR analysis of the interaction of flavone derivatives with the benzodiazepine binding site of the GABA<sub>A</sub> receptor complex. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 323-335, 2001.

MARDER, M.; PALADINI, A.C. GABA(A)-receptor ligands of flavonoid structure. **Current Topics on Medicinal Chemisry**, v. 2, n. 8, p. 853-867, 2002.

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.

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.

MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C.; WOLFMAN, C.; LEVI, M.; CALVO, D.; DIAZ, L.E.; PEÑA, C. Chrysin, a naturally occurring monoflavonoid, recognizes benzodiazepine receptors and posses anticonvulsant properties. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, p. 2227-2232, 1990.

MEDINA, J.H.; DANELON, 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.

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

MIYASAKA, L.; ATALLAH, A.; SOARES, B. *Passiflora* for anxiety disorder. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. I, art. n° CD004518, 2007.

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

MÖHLER, H. GABA<sub>A</sub> receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia. **Journal of Receptors and Signal Transduction Research**, v. 26, n. 5-6, p. 731-40, 2006.

MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTO, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 281-288, 2007.

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.

MORAIS, T.M.F.; DANTAS, M.B.; MAGALHÃES, J.F.; SOUSA, D.F.; MARTINS, A.; TOMAZ, C.C.; ALVES, C.D.; ARAÚJO, G.A.; QUEIROZ, M.G.R.; MARTINS, M.A.C. **Efeito hipolipemiante do extrato aquoso de *Passiflora edulis* (maracujá)**. Resumos, Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, SBF, Salvador, 2006.

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.

NAHRSTEDT, A.; BUTTERWECK, V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. **Pharmacopsychiatry**, v. 30, n. 2, p. 129-34, 1997.

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.

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

NUTT, D.; ARGYROPOULOS, S.; HOOD, S.; POTOKAR, J. Generalized anxiety disorder: a comorbid disease. **European Neuropsychopharmacology**, v. 16, p. 109-118, 2006.

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.

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.

OKUYAMA, E.; OKAMOTO, Y.; YAMAZAKI, M.; SATAKE, M. Pharmacologically active components of Peruvian medicinal plant, Huanarpo (*Jatropha cillinata*, M. Arg). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Japan)**, v. 44, p.333-336, 1996.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **WHO monographs on selected medicinal plants**, v. 1, Malta: WHO Graphics, 1999.

OVERSTREET, D.H.; KRALIC, J.E.; MORROW, A.L.; MA, Z.Z.; ZHANG, Y.W.; LEE, D.Y. NPI-031G (puerarin) reduces anxiogenic effects of alcohol withdrawal or benzodiazepine inverse or 5-HT<sub>2C</sub> agonists. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 3, p. 619-625, 2003.

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.

PARAFITT, K. **Martindale: The complete drug reference**. 32<sup>ed</sup>. London: Pharmaceutical Press, 1999, 2315p.

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

PELEGRINI, P.B.; NORONHA, E.F.; MUNIZ, M.A.R; VASCONCELOS, I.M.; CHIARELLO, M.D.; OLIVEIRA, J.T.A.; FRANCO, O.L. An antigungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S abulmin proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 1141-1146, 2006.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neurosciences Methods**, v. 14, n. 3, p.149-167, 1985.

PERICIC, D.; MIRKOVIC, K.; JAZVINSKAK, M.; BESNARD, F. [<sup>3</sup>H]-*t*-butylbicycloorthobenzoate binding to recombinant  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$  GABA<sub>A</sub> receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 360, p. 99-104, 1998.



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.

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

PITTLER, M.A.; EDZARD, E. Kava extract versus placebo for treating anxiety. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. I, art. nº CD003383, 2003.

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.

RAMBO, B. A imigração da selva higrófila no Rio Grande do Sul. **Sellowia**, v. 3, p. 55-91, 1951.

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.<sup>a</sup> ed. rev e ampl. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2004, p.200-210.

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.

REGINATTO, F.H.; DE-PARIS, F.; PETRY, R.D.; QUEVEDO, J.; ORTEGA, G.G.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Evaluation of anxiolytic activity of spray dried powders of two South Brazilian *Passiflora* species. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 5, p. 348-351, 2006.

REZAI, N.; DUGGAN, C.; CAIRNS, D.; LEES, G.; CHAZOT, P.L. Modulation of [<sup>3</sup>H]-TBOB binding to the rodent GABA<sub>A</sub> receptor by simple disaccharides. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 619-623, 2003.

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

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

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 289-304, 1997.

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.

RUDNICKI, M.; OLIVEIRA, M.R.; PEREIRA, T.V.; REGINATTO, F.H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C.F. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 719-724, 2007a.

RUDNICKI, M.; SILVEIRA, M.M.; PEREIRA, T.V.; OLIVEIRA, M.R.; REGINATTO, F.H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C.F. Protective effects of *Passiflora alata* extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 4, p. 665-661, 2007b.

RUDOLPH, U.; CRESTANI, F.; BENKE, D.; BRUNIG, I.; BENSON, J.A.; FRITSCHY, J.M.; MARTIN, J.R.; BLUETHMANN, H.; MOHLER, H. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. **Nature**, v. 401(6755), p. 796-800, 1999.

SACCO, J.C. **Flora Ilustrada Catarinense, Passifloráceas**. Itajaí:IBDF, 1980. 132 p.

SALAH, S.M. e JÄGER, A.K. Two flavonoids from *Artemisia herba-alba* Asso with *in vitro* GABA<sub>A</sub>-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.

SANTOS, K.C.; MÜLLER, S.D.; BIAVATTI, M.W.; DE OLIVEIRA, R.M.W.; SANTOS, C.A.M. Sedative effect of *Passiflora actinia* Hooker fractions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, p. 240, 2003.

SANTOS, K.C.; SANTOS, C.A.M.; DE OLIVEIRA, R.M.W. *Passiflora actinia* Hooker extracts and fractions induce catalepsy in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 306-309, 2005.

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  $\beta$ -CCT. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.79, p. 279-290, 2004.

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

SHEN, M.; NIELSEN, M.R.. WITT, O. S.; BERGENDORFF, O. Inhibition of [methyl-<sup>3</sup>H]diazepam binding to rat brain membranes *in vitro* by diantoin and skrofulein. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 15, p. 385–388, 1994.

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

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L.; Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos. *In*: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003, 5 ed., 9.289-326.

SPERONI, E.; MINGHETTI, A. Neuropharmacological activity of extract from *Passiflora incarnata*. **Planta Medica**, v. 54, np. 488-491, 1988.

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, 1996a.

SPERONI, E.; BILLI, R.; PERRELLINO, N.C.; MINGHETTI, A. Role of chrysin in the sedative effects of *P. incarnata* L. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. s98-s100, 1996b.

SOULIMANI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISLIN, 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.

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

SVENNINGSSEN, A.B.; MADSEN, K.D.; LILJEFORS, T.; STAFFORD, G.I.; VAN STADEN, J.; JÄGER, A.K. Biflavones from *Rhus* species with affinity for the GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 2736-280, 2006.

TALCOTT, S.T.; PERCIVAL, S.S.; PITTET-MOORE, J.; CELORIA, C. Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p.935-941, 2003.

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.

TANAKA, O.; HAN, E.C.; YAMAGUCHI, H.; MATSUURA, H.; MURAKAMI, T.; TANIYAMA, T.; YOSHIKAWA, M. Saponins of plants of *Panax* species collected in Central Nepal, and their chemotaxonomical significance. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 48, n. 6, p. 889-892, 2000.

UAWONGGUL, N.; CHAVEERACH, A.; THAMMASIRIRAK, S.; ARKARAVICHIEEN, T.; CHUACHAN, C.; DADUANG, S. Screening of plants acting against *Heterometrus laoticus* scorpion venom activity on fibroblast cell lysis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 201-207, 2006.

ULBRICHT, C.; BASCH, E.; BOON, H.; ERNST, E.; HAMMERNESS, P.; SOLLARS, D.; TSOUROUNIS, C.; WOODS, J.; BENT, S. Safety review of kava (*Piper methysticum*) by the natural standard research collaboration. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 4, n. 4, p. 779-794, 2005.

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.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant Drug Analysis**. Berlin: Springer, 1984, 320p.

WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, p.829-837, 2004.

WANG, H.; HUI, K.M.; CHEN, Y.; XU, S.; TZE-FEI WONG, J.; XUE, H. Structure-activity relationships of flavonoids isolated from *Scutellaria baicalensis*, binding to benzodiazepine site of GABA<sub>A</sub> receptor complex. **Planta Medica**, v. 68, p. 1059-1062, 2002.

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

WEI, X.Y.; YANG, J.Y.; WANG, J.H.; WU, C.F. Anxiolytic effect of saponins from *Panax quinquefolium* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 2007, *in press*, DOI: 10.1016/j.jep.2007.01.009.

WINTER, J.; MOORE, L.H.; DOWELL, V.R.; BOKKENHEUSER, V.D. C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1203-1208, 1989.

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.

WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; MARDER, M.; ARDENGHI, P.; WASOWSKI, C.; SCHRÖDER, N.; IZQUIERDO, I.; RÚVEDA, E.; PALADINI, A.C.; MEDINA, J.H. Pharmacological characterization of 6-bromo-3-nitroflavone, a synthetic flavonoid with high affinity for the benzodiazepine receptors. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 61, n. 3, p. 239-246, 1998.

VAN RIJIN, C.M.; BREE, W.E. Synergy between retigabine and GABA in modulating the convulsant site of the GABA<sub>A</sub> receptor complex. **European Journal of Pharmacology**, v. 464, p. 95-100, 2003.

VARGAS, A.J.; GEREMIAS, D.S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P.E.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, Volume 78, Issue 2, February 2007, Pages 112-119.

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.; WASOWSKI, C.; MARDER, M.; WOLFMAN, C.; PALADINI, A.C.; MEDINA, J.H. Sedative and hypnotic properties of *Salvia guaranitica* St.Hil. and of its active principle: Cirsiolol. **Phytomecicine**, v. 4, p. 45-50, 1997a.

VIOLA, H.; MARDER, M.; WOLFMAN, C.; WASOWSKI, C.; MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C. 6-bromo-3'-nitroflavone, a new high affinity benzodiazepine receptor agonist recognizes two populations of cerebral cortical binding sites. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n.3, p. 373-378, 1997b.

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<sub>A</sub> 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<sub>A</sub> receptor devoid of intrinsic activity. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 65, n. 2, p. 313-320, 2000b

YUAN, C.S.; ATTELE, A.S.; WU, J.A.; LIU, D. Modulation of American ginseng on brainstem GABAergic effects in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 3, p. 215-222, 1998.

YULDASHEVA, L.N.; CARVALHO, E.B.; CATANHO, M.T.J.A; KRASILNIVOK, O.V. Cholesterol-dependent hemolytic activity of *Passiflora quadrangularis* leaves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 8, p. 1061-1070, 2005.

XU, Q.F.; FANG, X.L.; CHEN, D.F. Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb1 and Rg1 from *Panax notoginseng* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 2-3, p. 187-192, 2003.

XU, Z.; WANG, F.; TSANG, S.Y.; HO, K.H.; ZHENG, H.; YUEN, C.T.; CHOW, C.Y.; XUE, H. Anxiolytic-like effect of baicalin and its additivity with other anxiolytics. **Planta Medica**, v. 72, n. 2, p.189-192, 2006.

YAROM, M.; TANG, X.W.; WU, E.; CARLSON, R.G.; VANDERVELDE, D.; LEE, X.H. Identification of inosine as an endogenous modulator for the benzodiazepine binding site of the GABA<sub>A</sub> receptors, **Journal of Biomedical Sciences**, v. 5, p. 274-280, 1998.

YING, Y.; ZHANG, J.T.; SHI, C.Z.; LIU, Y. Study on the nootropic mechanism of ginsenoside Rb1 and Rb1-influene on mouse brain development. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, p. 241–245, 1994.

YUNES, R.A. e FILHO, V.C. Breve Análise Histórica da Química da Plantas Medicinais: Sua Importância na Atual Concepção 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.

ZHANG, W.; KOEHLER, K.F.; ZHANG, P.; COOK, J.M. Development of a comprehensive pharmacophore model for the benzodiazepine receptor. **Drug Design and Discovery**, v. 2, n. 3, p.193-248; 1995.

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

ZHANG, Y.; TIE, X.; BAO, B.; WU, X.; ZANG, Y. Metabolism of flavone c-glucosides and p-cumaric acid from antioxidant fo bamboo leaves (AOB) in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 484-194, 2007.

ZHU, S.; ZOU, K.; CAI, S.; MESELHY, M.R.; KOMATSU, K. Simultaneous determination of triterpene saponins in ginseng drugs by high-performance liquid chromatography. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 52, n. 8, p. 995-998, 2004.

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.

ZUANAZZII, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003, 5 ed., 9. p.577-615.





**ANEXO**  
**Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa**