

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Investigação do efeito de *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae) em modelos animais e ensaios neuroquímicos preditivos de ação sobre o comportamento alimentar e receptor GABA-benzodiazepínico

ANDRESSA BRAGA

PORTO ALEGRE, 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Investigação do efeito de *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae) em modelos animais e ensaios neuroquímicos preditivos de ação sobre o comportamento alimentar e receptor GABA-benzodiazepínico

Dissertação apresentada por **Andressa Braga** para a obtenção do grau de MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Stela Maris Kuze Rates

Porto Alegre, 2012

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 29.03.2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Gilda Ângela Neves
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dr. Gilsane Lino von Poser
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Rosane Gomez
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Braga, Andressa
Investigação do efeito de *Passiflora alata* Curtis
(Passifloraceae) em modelos animais e ensaios
neuroquímicos preditivos de ação sobre o comportamento
alimentar e receptor GABA-benzodiazepínico / Andressa
Braga. -- 2012.
138 f.

Orientadora: Stela Maris Kuze Rates.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. *Passiflora alata*. 2. flavonóides. 3. saponinas.
4. ansiolítico. 5. consumo alimentar. I. Rates, Stela
Maris Kuze, orient. II. Título.

Agradecimentos à CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e aos Laboratórios de Psicofarmacologia Experimental (UFRGS), Laboratório de Fitoquímica (UFRGS) que disponibilizaram todos equipamentos e materiais necessários na elaboração da presente dissertação.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dr. Stela Rates por ter me dado a oportunidade de poder participar do seu grupo de pesquisa e aprender um pouco mais sobre o “mundo da farmacologia”. Obrigada pela força e pelo apoio.

À Profa. Dr. Grace pelo apoio no laboratório de fitoquímica entre uma tentativa e outra frustrada das colunas, cromatografias e afins. Um incentivo sem igual, além dos momentos de descontração com as “Fito-girls”.

À Profa. Dr. Eliane Dallegrove e Profa. Dr. Andréia Buffon pela troca de idéias e colaboração nos experimentos.

Às amigas e colegas do laboratório de Psicofarmacologia que fizeram de todos os momentos que passamos juntas muito agradáveis e de muito aprendizado. Sem falar no apoio, risadas e acima de tudo do clima de muita união e amizade. Vocês têm uma contribuição enorme nessa minha conquista.

A troca de idéias, o super apoio e o “choque de realidade” com Luísa Salles, a sinceridade inigualável e objetividade de Camila Boque Antônio, os ensinamentos de Andresa Heemann Betti, a doçura e força de Liz Girardi Muller, a maneira espontânea e transbordando inteligência de Milene Borsoi, às boas risadas com Fernanda Centurião e a prontidão de Vivian Herzfeldt em experimentos complementares, até quase o final do trabalho.

À Mônica Duarte pelos ensinamentos, amizade e acima de tudo, confiança. À Alice Viana, por me permitir conhecer a lenda “Viana et al.”. À Profa. Dr. Gilda por ter me acolhido e ter dado o “ponta-pé” inicial no aprendizado no grupo.

Um MUITO OBRIGADA por terem feito dessa etapa muito produtiva e feliz!

Aos meus anjinhos conterrâneos: Eveline Stolz, Ana Cristina Stein e Diego Hasse que aturaram minhas oscilações de humor me apoiaram em todos os momentos, um muito obrigada especialíssimo!

Por fim à minha família, meu alicerce, que compreenderam minha ausência em função dos compromissos assumidos. Mas que sempre me apoiaram e tranquilizaram, de maneira que pude me manter firme e forte diante das dificuldades.

ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA:	Análise de Variância
ALT:	Alanine aminotransferase
AST:	Aspartate aminotransferase
BA:	Braço aberto
BF:	Braço fechado
BZF:	Derivado benzoflavônico tri-substituído
CEP/UFRGS:	Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS
CEUA:	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFMV:	Conselho Federal de Medicina Veterinária
Cl ₅₀ :	Concentração Inibitória 50
CIOMS:	Council for International Organizations of Medical Sciences
COSAT:	Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho
CYP450:	Cytochrome P 450
DL50:	Dose Letal 50
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxiribunocléico
DZP:	Diazepam
FLA:	Fração enriquecida em flavonóides
FEPPS:	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
FMZ:	Flumazenil
GABA:	Ácido gama aminobutírico
GABA _A :	Receptor ionotrópico Ácido gama aminobutírico do tipo A
GABA _B :	Receptor metabotrópico Ácido gama aminobutírico do tipo B
GABA _C :	Receptor ionotrópico Ácido gama aminobutírico do tipo C
GLU:	Glucose
HDL-C:	High density
i.p.:	Intraperitoneal
MCLR:	Microcystin-LR
NaCl 0,9%:	Solução fisiológica

PA:	<i>Passiflora alata</i>
p.o.:	<i>per os</i>
SAL:	Solução salina 0,9%
SAP:	Fração enriquecida em saponinas
SNC:	Sistema Nervoso Central
[³ H] TBOB:	<i>t</i> -butil-biciclo-ortobenzoato
TC:	Total Cholesterol
TLC:	Thin-layer chromatography
TG:	Triglycerides
UFRGS:	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV:	Ultravioleta
v.o.:	Via oral

RESUMO

Resultados prévios do nosso grupo demonstraram atividade do tipo ansiolítica, no tratamento agudo em camundongos, para uma fração enriquecida em saponinas (SAP) e uma fração enriquecida em flavonóides (FLA) obtidas de *Passiflora alata*. Por outro lado, a administração repetida (14 dias) de um extrato aquoso de *P. alata* demonstrou tendência a comportamento do tipo ansiogênico e redução da evolução ponderal em ratos. **Objetivos:** Investigar o envolvimento do complexo receptor GABA_A no efeito ansiolítico de SAP e FLA obtidos das folhas de *P. alata*, bem como avaliar o efeito da administração repetida (14 dias) de um extrato aquoso (PA) sob parâmetros alimentares, atividade sobre o sistema nervoso central além de parâmetros bioquímicos, fisiológicos e histopatológicos em camundongos. **Materiais e Métodos:** As frações foram administradas agudamente, via oral, e os animais submetidos ao labirinto em cruz elevado. O estudo do tratamento repetido consistiu no tratamento com o extrato aquoso de *Passiflora alata* (uma vez/dia, v.o.) por 14 dias em camundongos, os quais foram expostos a diferentes parâmetros fisiológicos e comportamentais. **Resultados e Conclusões:** SAP 900 mg/kg e FLA 300 mg/kg apresentaram efeito do tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado, que não foi modulado pelo sítio benzodiazepínico, uma vez que a administração de flumazenil 10 mg/kg (i.p.) não reverteu o efeito, e também não agem diretamente no sítio GABA visto que não deslocaram a ligação de [³H]-muscimol em concentrações de até 10⁻³ µM. A administração repetida não alterou o comportamento nos testes do campo aberto, labirinto em cruz elevado, catatonia e tempo de sono barbitúrico, sugerindo o desenvolvimento de tolerância para o efeito sedativo observado no tratamento agudo, descrito por outros autores. Por outro lado, a administração repetida de PA 250 mg/kg reduziu o comportamento alimentar e o ganho de peso. Foi observada uma redução da massa hepática relativa, degeneração hidrópica e redução dos níveis séricos de ALT para os grupos tratados com PA 25 mg/kg e PA 250 mg/kg.

Palavras chaves: *Passiflora alata*, flavonóides, saponinas, ansiolítico, consumo alimentar, toxicidade.

ABSTRACT

Evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae) in animal models and neurochemical assay predictive of feeding behavior and GABA-benzodiazepine receptor action

Previous results from our group demonstrated anxiolytic activity in the acute treatment in mice for a fraction enriched in saponins (SAP) and a fraction enriched in flavonoids (FLA), obtained from *Passiflora alata*. Moreover, repeated treatment (14 days) with an aqueous extract of *P. alata* showed a tendency to anxiogenic behavior and reduction of weight gain in rats. **Objectives:** To evaluate the involvement of the GABA_A receptor complex in the anxiolytic-like effect of SAP and FLA obtained from the leaves of *P. alata* and evaluate the effect of repeated treatment (14 days), in mice, in the central nervous system general activity, feeding behavior, and biochemical, physiological and histopathological parameters of an aqueous extract (PA). **Materials and Methods:** The fractions were administrated acutely, by oral route, and evaluated on the plus maze test. Repeated treatment study was performed with an aqueous extract (once a day, *p.o.*) for 14 days. **Results and conclusions:** SAP 900 mg/kg and FLA 300 mg/kg showed anxiolytic-like effect on the plus maze test which was not prevented by flumazenil 10 mg/kg (*i.p.*), also the fractions showed no potency in displacing the [³H]-muscimol binding up to 10⁻³ μM, indicating that the anxiolytic-like effect is not mediated by direct interaction of the compounds in the GABA and benzodiazepine sites. The repeated treatment did not change the mice behavior on open field, elevated plus maze, catalepsy and barbiturate sleeping time tests, suggesting the development of tolerance to acute sedative effects previously reported by others authors to *P. alata*. On the other hand, the repeated administration of PA 250 mg/kg decreased mice feeding behavior and weight gain. There was a reduction in liver relative mass, degeneration and reduction of serum ALT to the groups treated with PA 25 mg/kg and PA 250 mg/kg.

Keywords: *Passiflora alata*, flavonoids, saponins, anxiolytic effect, feeding behavior, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1 Esquema empregado para a avaliação do efeito ansiolítico.....	40
Figura 2 Efeito da administração da fração enriquecida em saponinas e fração enriquecida em flavonóides no modelo do labirinto em cruz elevado.....	49
Figura 3 Curva de competição de SAP com a ligação no sítio ortostérico GABA do receptor GABA _A	50
Figura 4 Curva de competição de FLA com a ligação no sítio ortostérico GABA do receptor GABA _A	51

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 Dados relatados à atividades ansiolítica ou sedativa para as espécies de <i>Passiflora</i> em roedores.....	29
Tabela 2 Grupos experimentais empregados na avaliação do efeito ansiolítico da fração enriquecida em saponinas e fração enriquecida em flavonóides.....	41

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS	5
PARTE EXPERIMENTAL E RESULTADOS.....	9

CAPÍTULO I

Investigação da interação de frações enriquecidas em saponinas ou flavonóides obtidas de *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae), com os sítios GABA e benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A-benzodiazepínico, em roedores.....13

1. INTRODUÇÃO.....	15
---------------------------	-----------

2. OBJETIVOS.....	19
--------------------------	-----------

2.1 Objetivos gerais.....	21
---------------------------	----

2.2 Objetivos específicos.....	21
--------------------------------	----

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
--------------------------------------	-----------

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
------------------------------------	-----------

4.1 Material vegetal.....	37
---------------------------	----

4.2. Fármacos, drogas e solventes.....	37
--	----

4.3 Preparação do extrato.....	37
--------------------------------	----

4.4 Obtenção das frações a partir do extrato hidroetanólico.....	38
--	----

4.5. Animais.....	38
-------------------	----

4.6 Teste comportamental.....	39
-------------------------------	----

4.6.1 Tratamentos.....	39
------------------------	----

4.6.2 Avaliação da influência da administração de flumazenil no efeito ansiolítico da fração enriquecida em saponinas e fração enriquecida em flavonóides.....	39
--	----

4.7 Ensaio <i>in vitro</i>	41
----------------------------------	----

4.7.1 Radioligantes e drogas.....	42
-----------------------------------	----

4.7.2 Animais.....	42
--------------------	----

4.7.3 Preparação do tecido.....	42
---------------------------------	----

4.7.4 Ensaio de radioligação a receptores GABA _A	43
---	----

4.8 Análise estatística.....	43
------------------------------	----

4.9 Ética.....	44
5 RESULTADOS.....	45
5.1 Obtenção do extrato hidroetanólico e fração enriquecida em saponinas e fração enriquecida em flavonóides a partir do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Passiflora alata</i>	47
5.2 Influência da administração de flumazenil no efeito da fração enriquecida em saponinas (SAP) e fração enriquecida em flavonóides (FLA) no labirinto em cruz elevado.....	47
5.3 Deslocamento da radioligação de [³ H]-muscimol em membranas sinaptossomais de cérebro total de ratos.....	50
6 DISCUSSÃO.....	53
7 CONCLUSÃO.....	59
8 REFERÊNCIAS.....	63
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXO.....	81

INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* compreende aproximadamente 500 espécies, distribuídas em regiões tropicais temperadas. Para algumas espécies, como *Passiflora actinia*, *Passiflora alata*, *Passiflora edulis*, *Passiflora incarnata* e *Passiflora quadrangularis* são relatados usos na medicina popular, principalmente como tranqüilizante (DHAWAN *et al.*, 2004). Apesar dos inúmeros estudos demonstrando a atividade ansiolítica do gênero, somente *P. alata* e *P. edulis* possuem valor comercial no Brasil e são descritas na farmacopéia brasileira (ANVISA, 2010). *P. alata*, conhecida como maracujazeiro doce, é a espécie nativa do Rio Grande do Sul (BERNACCI *et al.*, 2003, KOEHLER *et al.*, 2006) e é empregada na composição de diversos medicamentos comercializados no Brasil. Porém, são poucos os estudos relatados para esta espécie. Desta forma, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo, há alguns anos, uma linha de trabalho que visa o estudo químico e farmacológico pré-clínico desta espécie.

Uma revisão sobre os resultados encontrados foi publicada recentemente por GOSMANN e colaboradores (2011). O corpo de dados não contradiz o uso popular desta espécie, mas sugere a necessidade da padronização na obtenção dos extratos e cautela no uso. A espécie *P. alata* apresenta efeito ansiolítico ou hipnótico-sedativo, em roedores, dependendo do solvente empregado para a obtenção dos extratos (PROVENSI *et al.*, 2008). Saponinas e flavonóides são os constituintes majoritários e contribuem para as atividades observadas. Algumas evidências sugerem ação sobre o complexo receptor GABA_A-benzodiazepínico, mas os resultados não permitem ainda concluir sobre qual sítio está sendo ativado, nem exatamente quais substâncias estão agindo. Além disso, nosso grupo também demonstrou que a administração repetida resulta em perda do efeito ansiolítico (BOEIRA *et al.*, 2010), induz comprometimento da evolução ponderal e genotoxicidade (GOSMANN *et al.*, 2011).

Nesta Dissertação, foram realizados experimentos, em roedores, visando aprofundar o estudo do mecanismo de ação das frações enriquecidas nos principais constituintes (flavonóides e saponinas), bem como a investigação dos efeitos decorrentes da administração repetida do extrato aquoso das partes

aéreas de *P.alata*, com atividade sedativa anteriormente relatada em estudos de tratamento agudo.

O trabalho está organizado em dois capítulos. No primeiro, será apresentada a investigação da interação de frações enriquecidas em saponinas ou flavonóides, obtidas de um extrato hidroetanólico das partes aéreas de *Passiflora alata*, com os sítios GABA e benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A-benzodiazepínico, em roedores. O segundo está apresentado na forma de um artigo a ser submetido para publicação na Revista *Food and Chemical Toxicology*, no qual foi avaliado o efeito da administração repetida de um extrato aquoso nebulizado contendo 2.5% de flavonóides totais, em modelos animais preditivos de atividade hipnótico-sedativa e ansiolítica e no comportamento alimentar de camundongos.

OBJETIVOS

Foram objetivos desta dissertação:

- Investigar o envolvimento do sítio benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A no efeito ansiolítico de frações enriquecidas em flavonóides e saponinas obtidas a partir de um extrato hidroetanólico das folhas de *Passiflora alata*, em camundongos;

PARTE EXPERIMENTAL E RESULTADOS

A parte experimental e os resultados desta Dissertação estão apresentados em um capítulo

Capítulo I: “Investigação da interação de frações enriquecidas em saponinas ou flavonóides obtidas de *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae), com os sítios GABA e benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A-benzodiazepínico, em roedores”.

CAPÍTULO I

“Investigação da interação de frações enriquecidas em saponinas ou flavonóides obtidas de *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae), com os sítios GABA e benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A-benzodiazepínico, em roedores”

1. INTRODUÇÃO

FENNER (2006), em sua Dissertação de mestrado desenvolvida neste Programa de Pós-Graduação, verificou que um extrato aquoso das folhas de *P. alata* não apresentou atividade ansiolítica, mas demonstrou efeito hipnótico/sedativo em camundongos. Em outro trabalho, nosso grupo verificou que um extrato hidroetanólico das folhas de *P. alata* apresentou atividade hipnótica/sedativa e ansiolítica, esta última bloqueada pela administração do antagonista do sítio benzodiazepínico flumazenil, apesar de não possuir afinidade por este sítio (PROVENSI *et al.*, 2008). Uma hipótese para tal efeito é a formação de um metabólito ativo que modula o sítio alostérico do receptor GABA_A de forma direta ou indireta (PROVENSI *et al.*, 2008). Com o objetivo de investigar o envolvimento dos principais compostos de *P. alata* no efeito ansiolítico e hipnótico/sedativo, obteve-se uma fração enriquecida em saponinas (SAP) e uma fração enriquecida em flavonóides (FLA) de um extrato aquoso das folhas de *P. alata*. As frações SAP e FLA apresentaram atividade ansiolítica em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado, sem alterar a atividade motora destes animais. Além da atividade ansiolítica, FLA apresentou efeito hipnótico-sedativo, sendo razoável supor que esta fração tenha um envolvimento no efeito observado para os extratos aquoso e hidroetanólico desta espécie (PROVENSI *et al.*, 2007; GOSMANN *et al.*, 2011).

Porém, em um ensaio de radioligação, estas frações não apresentaram afinidade importante pelo sítio benzodiazepínico. Além disso, diferente dos fármacos benzodiazepínicos clássicos, nenhuma das frações apresentou proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol, um antagonista não competitivo GABA_A. Por outro lado, foi demonstrado, através do deslocamento da ligação de [³H] TBOB em córtex total de ratos, que SAP e FLA modulam positivamente o canal de cloreto ativado por GABA (PROVENSI *et al.*, 2007; GOSMANN *et al.*, 2011).

Por fim, da mesma forma que sugerido para o extrato por PROVENSI e colaboradores (2008), não se pode descartar que a ação ansiolítica observada

para as frações *in vivo* se deva a um possível metabólito. Assim, o mecanismo de ação das frações permanece não esclarecido.

Este trabalho propõe a complementação da investigação da ação das frações SAP e FLA no complexo receptor GABA_A-benzodiazepínico, através da avaliação da possível interação das mesmas com o sítio alostérico benzodiazepínico, *in vivo*, e com sítio ortostérico GABA, *in vitro*.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste capítulo foi investigar a interação de frações enriquecidas em saponinas ou flavonóides, obtidas de um extrato hidroetanólico das partes aéreas de *Passiflora alata*, com os sítios GABA e benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A-benzodiazepínico, em roedores.

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar a influência do antagonista do sítio benzodiazepínico flumazenil no efeito ansiolítico das frações, no labirinto em cruz elevado, em camundongos.
2. Avaliar a interação das frações com o sítio ortostérico GABA através de ensaio de radioligação com [³H]-muscimol, em cérebro total de ratos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O gênero *Passiflora* tem sido objeto de estudo de alguns grupos de pesquisa (DHAWAN, *et al.* 2004). Recentemente nosso grupo de trabalho publicou uma revisão sobre este o gênero, na qual aborda dados químicos, farmacológicos e de comercialização das espécies mais utilizadas pela população e pela indústria farmacêutica na produção de medicamentos (GOSMANN *et al.*, 2011).

Diversos estudos demonstram a atividade ansiolítica e hipnótico-sedativa das espécies do gênero *Passiflora* (SOULIMANI *et al.*, 1997; PETRY *et al.*, 2001; DHAWAN *et al.*, 2001a; DHAWAN *et al.*, 2001b; DE PARIS *et al.*, 2002; COLETA *et al.*, 2006; REGINATTO *et al.*, 2006; DE CASTRO *et al.*, 2007; LOLLI *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.*, 2008; PROVENSÍ *et al.*, 2008; SENA *et al.*, 2009; DENG *et al.*, 2010) sendo que para a espécie *P. incarnata* são relatados estudos clínicos (AKHONDZADEH *et al.*, 2001a; AKHONDZADEH *et al.*, 2001b; MOVAFEGH *et al.*, 2008;). Porém, recentemente ELSAS e colaboradores (2010) demonstraram que o tratamento repetido com *P. incarnata* resulta em efeito ansiogênico em camundongos.

Os constituintes químicos descritos para o gênero compreendem alcalóides, fenóis, flavonóides glicosilados, compostos cianogênicos e saponinas (DHAWAN *et al.*, 2004; BIRK *et al.*, 2005).

Considerando que *Passiflora alata* Curtis é espécie em estudo esta revisão abordará um breve resumo sobre os principais dados relatados na literatura.

Em termos de constituição química *P. alata* possui saponinas como metabólitos majoritários, diferenciando-a de outras espécies do gênero que apresentam maior conteúdo de flavonóides na sua composição (BIRK *et al.*, 2005). Do extrato aquoso das folhas foram isoladas e identificadas cinco saponinas, uma esteroidal e quatro triterpênicas. A saponina triterpênica quadrangulosídeo é a que se apresenta em maior teor, determinado em 22,2% (m/m) do extrato aquoso, o que corresponde a 8,2% (m/m) das folhas secas (REGINATTO *et al.*, 2004). Os flavonóides encontrados na espécie são do tipo C-

glicosilados, dentre eles vitexina, isovitexina, orientina, 2'-xilosil-vitexina (ULUBELEN *et al.*, 1982) 2''-ramnosil-vitexina, 2''-ramnosil-escoparina, 2''-ramnosil-orientina e isorientina (DOYAMA *et al.*, 2005).

OGA e colaboradores (1984) verificaram a presença de traços de alcalóides β -carbonílicos, no entanto, outros estudos não detectaram estes compostos em extratos aquosos das folhas de *P. alata* (MULLER *et al.*, 2005; BOEIRA *et al.*, 2010).

Diversos estudos relatam o efeito depressor sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) de *P. alata* em roedores. Um extrato fluído obtido das folhas de *P. alata* nas doses de 75 e 150 mg/kg, i.p. prolongou o tempo de sono induzido por pentobarbital, apresentou um discreto efeito anticonvulsivante e reduziu a atividade motora espontânea em camundongos (OGA *et al.*, 1984). Também foi relatado efeito sedativo em animais submetidos aos testes do labirinto em cruz elevado e campo aberto, e um aumento do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda, após administração v.o. de um extrato fluído (100 e 300 mg/kg) e sua fração aquosa (100, 300 e 600 mg/kg) em camundongos (ROMANINI *et al.*, 2006).

Além disso, atividade ansiolítica também foi relatada para os extratos de *P. alata*. A administração pela via intraperitoneal (i.p.) de extratos aquosos e hidroetanólicos das folhas de *P. alata* (100 e 150 mg/kg), demonstrou efeito ansiolítico em ratos (PETRY *et al.*, 2001, DE PARIS *et al.*, 2002, BARBOSA *et al.*, 2008). O mesmo efeito também foi observado quando um extrato aquoso foi administrado pela via oral, porém em doses maiores (640 e 800 mg/kg) (REGINATTO *et al.*, 2006).

Nosso grupo de pesquisa também tem demonstrado efeitos de *P. alata* sobre o SNC em camundongos. A administração aguda do extrato aquoso das folhas de *P. alata* (300 mg/kg, v.o.) apresentou somente efeito hipnótico, enquanto o extrato hidroetanólico (70%), administrado na mesma dose e via, apresentou efeito ansiolítico e hipnótico/sedativo. O efeito ansiolítico foi revertido pela

administração de flumazenil, porém em estudos de radioligação o extrato não deslocou a ligação de [³H] flunitrazepam em concentrações de até 1000 µg/mL. Este resultado demonstra que o efeito ansiolítico não está relacionado diretamente a ação do extrato no sítio benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A (PROVENSI *et al.*, 2008).

Apesar dos inúmeros estudos existentes para o gênero *Passiflora* acerca dos seus efeitos sobre o SNC, as substâncias responsáveis pelas atividades farmacológicas não foram elucidadas até o momento (GOSMANN *et al.*, 2011). Diversos flavonóides tem sido apontados como os compostos responsáveis pelas atividades ansiolítica e sedativa do gênero *Passiflora* (MEDINA *et al.*, 1990; SOULIMANI *et al.*, 1997). Em um estudo com *P. incarnata*, foi isolado um derivado benzoflavônico tri-substituído, o qual demonstrou efeito ansiolítico na dose de 10 mg/kg (v.o.) no teste do labirinto em cruz elevado (Dhawan *et al.*, 2001c). Por outro lado, SAMPATH e colaboradores (2011), em um ensaio bioguiado, não encontraram o flavonóide benzoflavona (BZF) em nenhuma das frações (butanol, clorofórmio e éter de petróleo) obtidas a partir de um extrato hidroetanólico de *P. incarnata* em camundongos. O efeito ansiolítico foi observado para as frações butanol (contendo 1,2% de flavonóides) e clorofórmio (isento de flavonóides), demonstrando que os flavonóides não contribuem exclusivamente para o efeito observado.

DENG e colaboradores (2010) realizaram um estudo bioguiado com *P. edulis* flavicarpa, em busca do composto responsável por sua atividade ansiolítica. O extrato hidroetanólico contendo o flavonóide isoorientina apresentou atividade ansiolítica para o produto isolado e para fração butanólica. Os autores atribuem as atividades relatadas, pelo menos em parte, a presença do flavonóide isoorientina. Além disso, um extrato aquoso com 8,94% de saponinas, expressas como astragalosideo IV, e baixo teor de flavonóides, foi ativo no labirinto em cruz elevado em camundongos. Este resultado aponta que além dos flavonóides, outros compostos, como as saponinas, podem contribuir para a atividade ansiolítica do gênero *Passiflora*.

Com o objetivo de estudar o envolvimento dos flavonóides e das saponinas nas atividades farmacológicas observadas para *P. alata*, nosso grupo avaliou duas frações, uma enriquecida em saponinas (SAP) e outra enriquecida em flavonóides (FLA), obtidas a partir de um extrato aquoso de *P. alata*, nos modelos animais preditivos de atividade ansiolítica, hipnótico-sedativa, anticonvulsivante e em estudos de radioligação. As frações SAP (600 e 900 mg/kg, v.o.) e FLA (300 mg/kg, v.o.) apresentaram efeito do tipo ansiolítico em camundongos no teste do labirinto em cruz elevado. Contudo atividade hipnótico-sedativa foi demonstrada somente pela fração FLA na dose de 300 mg/kg (v.o.). Nenhuma das frações apresentou proteção contra convulsão induzida por pentilenotetrazol. Nos ensaios de radioligação as frações FLA e SAP, assim como os flavonóides isovitexina e vitexina, não foram capazes de deslocar a ligação de [³H] flunitrazepam em concentrações de até 450 µg/mL. No entanto, foi observado uma modulação positiva do canal de cloreto ativado por GABA no ensaio de deslocamento da ligação de [³H] TBOB, para as frações SAP e FLA (CI₅₀=23,4 µg/mL e CI₅₀=181,2 µg/mL, respectivamente), demonstrando que apesar de não interagirem com o sítio benzodiazepínico as frações modulam o complexo receptor GABA_A (PROVENSI, 2007; GOSMANN *et al.*, 2011).

As frações SAP e FLA apresentaram efeito ansiolítico sem apresentar afinidade pelo sítio benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A, da mesma forma que o extrato hidroetanólico 70 % estudado por PROVENSI e colaboradores (2008). Porém, a atividade ansiolítica demonstrada por este extrato foi revertida pela administração de flumazenil. Estes achados sugerem que o efeito ansiolítico dos extratos de *P. alata* possa ser devido à presença de metabólitos com ação sobre o sítio benzodiazepínico e/ou devido a sua ação em outros sítios do complexo receptor GABA_A/benzodiazepínico. Outra hipótese seria a modulação indireta do receptor benzodiazepínico através da mobilização de compostos endógenos com ação do tipo benzodiazepínica (BARALDI *et al.*, 2009).

Tabela 1. Atividade ansiolítica ou sedativa relatada para espécies de *Passiflora* em roedores em regime de administração aguda.

Espécie	Atividade biológica	Referência
<i>P. alata</i> Curtis	Extrato aquoso nebulizado 10 mg/kg (v.o.) atividade hipnótico/sedativa em camundongos.	PROVENSI <i>et al.</i> , 2008
	Extrato hidroetanólico (70%) 300 mg/kg (v.o.) atividade ansiolítica e hipnótico- sedativa em camundongos.	PROVENSI <i>et al.</i> , 2008
	Fração enriquecida em flavonóides (FLA), 300 mg/kg (v.o.) atividade ansiolítica e hipnótico-sedativa em camundongos.	PROVENSI <i>et al.</i> , 2007
	Fração enriquecida em saponinas (SAP) 600 e 900 mg/kg (v.o.) atividade ansiolítica em camundongos.	PROVENSI <i>et al.</i> , 2007
	Extrato hidroetanólico (40%) 100 e 150 mg/kg (i.p.) atividade ansiolítica em ratos.	PETRY <i>et al.</i> , 2001
	Extrato aquoso 100 e 150 mg/kg (i.p.) atividade ansiolítica em ratos.	DE PARIS <i>et al.</i> , 2002

Espécie	Atividade biológica	Referência
	Extrato aquoso 640 e 800 mg/kg (v.o.) atividade ansiolítica em ratos.	REGINATTO <i>et al.</i> , 2006
	Extrato aquoso 100 e 150 mg/kg (i.p.), atividade ansiolítica em ratos.	BARBOSA <i>et al.</i> , 2008
<i>P. alata</i> Curtis	Extrato fluído 75 e 150 mg/kg (i.p.) atividade hipnótico-sedativo em camundongos.	OGA <i>et al.</i> , 1984
	Extrato fluído 100 e 300 mg/kg (v.o.) efeito sedativo em camundongos.	ROMANINI <i>et al.</i> , 2006
	Extrato aquoso 100, 300 e 600 mg/kg (v.o.) efeito sedativo em camundongos.	ROMANINI <i>et al.</i> , 2006
	Extrato hidroetanólico (40%) 50, 100 e 150 mg/kg (i.p.) atividade ansiolítica em ratos.	PETRY <i>et al.</i> , 2001
<i>P. edulis</i> Sims	Extrato aquoso 50, 100 e 150 mg/kg (i.p.) atividade ansiolítica em ratos.	DE PARIS <i>et al.</i> , 2002
	Extrato aquoso 230 mg/kg (v.o.) atividade ansiolítica em camundongos.	COLETA <i>et al.</i> , 2006

Espécie	Atividade biológica	Referência
<i>P. edulis</i> Sims	Extrato aquoso 400 e 800 mg/kg (v.o.) atividade ansiolítica em ratos.	REGINATTO <i>et al.</i> , 2006
	Extrato metanólico 75, 200 e 300 mg/kg (v.o.), atividade ansiolítica em camundongos.	DHAWAN <i>et al.</i> , 2001a
<i>P. edulis</i> Sims	Extrato aquoso 100 e 125 mg/kg (v.o.) atividade ansiolítica em camundongos.	DHAWAN <i>et al.</i> , 2001a
	Fração flavonóides totais 100 mg/kg (v.o.) atividades ansiolítica e sedativa.	COLETA <i>et al.</i> , 2006
	Extrato aquoso 50, 100 e 150 mg/kg (i.p.) atividade ansiolítica em ratos.	BARBOSA <i>et al.</i> , 2008
<i>P. edulis</i> Flavicarpa	Extrato aquoso 200 e 300 mg/kg (v.o.) atividade ansiolítica em camundongos.	DENG <i>et al.</i> , 2010
	Extrato hidroetanólico 300 e 400 mg/kg (v.o.) e sua fração butanólica 125 e 200 mg/kg (v.o.) atividade ansiolítica em camundongos.	DENG <i>et al.</i> , 2010

Espécie	Atividade biológica	Referência
<i>P. actinia</i> Hooker	Extrato hidroetanólico (45%) 300 e 600 mg/kg (v.o.) atividade ansiolítica em camundongos.	LOLLI <i>et al.</i> , 2006
	Extrato metanólico 100 e 300 mg/kg (v.o.) atividade ansiolítica em camundongos.	LOLLI <i>et al.</i> , 2006
<i>P. incarnata</i> Linneaus	Extrato metanólico, 125 mg/kg (v.o.) atividade ansiolítica em camundongos.	DHAWAN <i>et al.</i> , 2001a DHAWAN <i>et al.</i> , 2001c
	Extrato hidroetanólico (30%) 400 mg/kg (i.p.), atividade ansiolítica em camundongos.	SOULIMANI <i>et al.</i> , 1997
<i>P. incarnata</i>	Fração butanol (1,2% flavonóides), fração clorofórmio (isento de flavonóides).	SAMPATH <i>et al.</i> , 2011
<i>P. quadrangularis</i> Linneaus	Extrato hidroetanólico 100, 250 e 500 mg/kg (v.o.) atividade ansiolítica em ratos.	DE CASTRO <i>et al.</i> , 2007

Poucos estudos objetivando verificar a toxicidade de *P. alata* são descritos na literatura. OGA e colaboradores (1984) demonstraram que um extrato hidroetanólico das folhas de *P. alata* apresentou uma DL50 de 456 mg/kg via i.p. em camundongos. Um extrato aquoso administrado diariamente em ratas

gestantes na dose de 800 mg/kg via oral não ocasionou toxicidade reprodutiva nem alterações na prole (AMARAL *et al.*, 2001).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a administração aguda de um extrato aquoso de *P. alata* contendo 2,6% de flavonóides, na dose de 300 mg/kg (v.o.), não alterou parâmetros comportamentais, bioquímicos e hematológicos em ratos, indicando baixa toxicidade aguda (BOEIRA *et al.*, 2010). Porém, no tratamento repetido (14 dias), nesta mesma dose e via, os animais não ganharam peso e apresentaram sinais de irritabilidade e tendência ao comportamento do tipo ansiogênico no labirinto em cruz elevado (BOEIRA *et al.*, 2010; GOSMANN *et al.*, 2011). Quando avaliado nos ensaios cometa e micronúcleo em camundongos, este extrato causou genotoxicidade. A administração aguda nas doses de 12,5, 25, 50, 150, 300 e 600 mg/kg ocasionou danos severos no DNA observados através do ensaio cometa, enquanto a administração na dose de 50 mg/kg por três dias consecutivos, confirmou a genotoxicidade no ensaio de micronúcleo com eritrócitos periféricos de camundongos (BOEIRA *et al.*, 2010).

Em um estudo de farmacovigilância foi notificado o desenvolvimento de diarreia, flatulência e perda de apetite, em um paciente que fez uso de um medicamento contendo *P. alata*, *Adonis vernalis*, *Erythrina mulungu* e *Leptolobio elegans* (BALBINO e DIAS, 2010).

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 botânica Dr. Lílian Auler Mentz (Programa de Pós Graduação em Botânica – UFRGS). Material testemunho encontra-se depositado no herbário do Departamento de Botânica sob registro ICN 133727.

4.2 Fármacos, drogas e solventes

Diazepam (Germed, São Paulo/BR), flumazenil (Cristália, São Paulo/BR). Acetato de etila, acetona, ácido acético, etanol, metanol, butanol (Nuclear[®]).

As frações SAP e FLA foram dissolvidas em solução salina (NaCl 0,9 %). Diazepam e flumazenil foram dissolvidos em uma solução de polissorbatato 80 (Tween 80[®]) 1% em salina, e a dissolução foi facilitada, quando necessário, com auxílio de aparelho de ultra-som.

4.3 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 etanol 70% numa proporção 1:10 (m/v) sob refluxo durante 60 minutos, resultando na solução extrativa hidroetanólica. Após arrefecimento e filtração, o extrato resultante foi levado à secura sob pressão reduzida em temperatura inferior a 40 °C.

4.4 Obtenção das frações a partir do extrato hidroetanólico

O extrato hidroetanólico foi submetido à cromatografia em coluna sobre gel de dextrano (Sephadex[®] LH20), tendo como eluente um gradiente de etanol:água (variando de 96% de etanol até 50% de água). As frações obtidas foram cromatografadas em cromatofolhas de gel de sílica (Aldrich[®]) utilizando a fase superior do sistema eluente butanol:ácido acético:água (4:1:5; v/v). As placas cromatográficas foram então aspergidas com reagente natural/UV₃₆₆, para a visualização dos flavonóides e em seguida com anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento para visualização das saponinas (WAGNER *et al.*, 1984).

Após a aspersão de anisaldeído sulfúrico e aquecimento, as bandas das saponinas de *P. alata* foram visualizadas como manchas de coloração violeta, cor característica de saponinas triterpênicas (BIRK *et al.*, 2005); para os flavonóides as bandas características apresentaram duas colorações após a revelação: amarelo ou verde visualizado em UV₃₆₆. As frações que apresentaram um perfil cromatográfico semelhantes foram reunidas e codificadas como SAP (fração enriquecida em saponinas) e FLA (fração enriquecida em flavonóides).

Os resíduos químicos gerados nesta etapa do trabalho foram descartados conforme 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.

4.5 Animais

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 ($23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), sistema de exaustão e umidade monitorada. Os camundongos foram mantidos em caixas plásticas (17 x 28 x 13 cm) com no máximo 4 animais por caixa. Os animais tiveram livre acesso à água e alimento (ração certificada, Nuvilab[®]). Nos experimentos realizados com a administração das substâncias teste por via oral, os animais passaram por um período de 6 horas de jejum antes do teste.

4.6 Teste comportamental

A influência do antagonista do sítio benzodiazepínico flumazenil foi avaliada sobre o efeito ansiolítico da fração enriquecida em saponinas (SAP) e a fração enriquecida em flavonóides (FLA), obtidas a partir do extrato hidroetanólico de *P. alata*, em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado.

4.6.1 Tratamentos

Os camundongos foram tratados com volumes proporcionais a 1mL/100g de peso corporal, tanto para a via oral quanto para a via intraperitoneal. O tratamento oral foi realizado 60 minutos e o intraperitoneal 30 minutos antes da exposição do animal ao aparato. Todos os grupos experimentais foram constituídos por, no mínimo, 8 animais. Foram selecionadas doses anteriormente determinadas como ativas por PROVENSI e colaboradores (2007).

4.6.2 Avaliação da influência da administração de flumazenil no efeito ansiolítico da fração enriquecida em flavonóides e fração enriquecida em saponinas

O labirinto empregado nesse estudo é construído de madeira e consiste de dois braços abertos com 30 x 7 cm e borda de proteção de 1cm, e de dois braços fechados com 30 x 7 x 16 cm, dispostos perpendicularmente aos braços abertos em forma de cruz grega. A cruz é elevada a 53 cm do chão.

Tabela 2. Grupos experimentais empregados para avaliação da influência da administração de flumazenil no efeito ansiolítico da fração enriquecida em flavonóides e fração enriquecida em saponinas

Grupo	Tratamento 1 (v.o.)	Tratamento 2 (i.p.)	n
SAL + SAL	solução salina (NaCl 0,9 %)	solução salina (NaCl 0,9 %)	9
DZP + SAL	diazepam 2 mg/kg	solução salina (NaCl 0,9 %)	9
SAP + SAL	fração enriquecida em saponinas 900 mg/kg	solução salina (NaCl 0,9 %)	9
FLA + SAL	fração enriquecida em flavonóides 300 mg/kg	solução salina (NaCl 0,9 %)	8
SAL + FMZ	solução salina (NaCl 0,9 %)	flumazenil 10 mg/kg	9
DZP + FMZ	diazepam 2 mg/kg	flumazenil 10 mg/kg	9
SAP + FMZ	fração enriquecida em saponinas 900 mg/kg	flumazenil 10 mg/kg	9
FLA + FMZ	fração enriquecida em flavonóides 300 mg/kg	flumazenil 10 mg/kg	9

4.7 Ensaio in vitro

Estes experimentos foram realizados no Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB), na Faculté de Médecine et Pharmacie, da Université de Rouen (França), sob supervisão do Prof. Dr. Jean-Claude do Rego.

4.7.1 Radioligantes e drogas

Para os ensaios *in vitro* foi utilizado o radioligante: [³H]-muscimol (35,6 Ci/mmol), proveniente da New England Nuclear Life Science Products, EUA. GABA foi adquirido da Sigma, França.

As substâncias teste FLA e SAP foram dissolvidas em DMSO para fins de obtenção de solução estoque. Diluições subsequentes e GABA foram preparados em tampão de incubação. Na concentração final, DMSO não apresenta efeito sobre os ensaios de *binding*.

4.7.2 Animais

Foram utilizados ratos Sprague Dawley, machos provenientes da colônia IFFA-CREDO/ Charles River Laboratories (Domaine des Oncins, Saint-Germain sur L'Arbresle, France). Os ratos foram mantidos em caixas plásticas (42 x 27,5 x 18cm) com 5 animais por caixa, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada (23° ± 2°C), sistema de exaustão e umidade monitorada. Os animais tiveram livre acesso à água e ração comercial.

4.7.3 Preparação do tecido

Ratos machos adultos foram sacrificados por decapitação e o cérebro rapidamente removido. O cérebro foi homogeneizado em 20 volumes de uma solução de sacarose 0,32 M a 4°C. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 1000g_{av} a 4°C durante 10 min. O sobrenadante resultante foi centrifugado a 14000g por 30 min. O *pellet* foi lavado duas vezes com 30 volumes de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) e centrifugado a 14000g por 30 min a 4°C. O *pellet* resultante foi ultracentrifugado a 50000g_{av} por 10 minutos. O *pellet* final foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 50 mM, resultando na solução com as membranas sinaptossomais para os ensaios de [³H]-muscimol.

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 Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

4.7.4 Ensaio de radioligação ao sítio GABA de receptores GABA_A

Para a determinação da ligação dos compostos aos receptores GABAérgicos do tipo GABA_A, os homogenatos de cérebro total (150 μg proteína/100 μL), foram incubados na presença do radioligante [^3H]-muscimol (5 nM) a 4°C , por 45 minutos na presença ou ausência da fração enriquecida em flavonóides (FLA) ou da fração enriquecida em saponinas (SAP) em concentrações de 10^{-13} a 10^{-3} M. A ligação não específica foi determinada pela incubação na presença de 100 μM de GABA. Após a incubação, as amostras foram rapidamente lavadas em 4 mL de Tris-HCl (3x) e imediatamente filtradas sobre filtros de fibra de vidro previamente umedecidos em tampão Tris-HCl. Os filtros foram, então, secos e colocados em *vials* individuais contendo líquido de cintilação (Ultima Gold). A radioatividade retida nos filtros foi contada em cintilômetro (AHBOUCHA *et al.*, 2005).

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 $p < 0,05$. Para a avaliação comportamental foi realizado o teste ANOVA de duas vias seguido por Student Newmann Keuls.

Para a análise estatística dos ensaios de radioligação a receptores GABA_A foi realizada uma análise de regressão não linear utilizando o *software* Prisma 4.0, GraphPad.

4.9 Ética

A manipulação animal foi realizada seguindo os princípios éticos relatados por GOLDIM (2000) e as normas do Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS), Resolução 714 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) e a Lei nº 11794 de outubro de 2008. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (CEP/UFRGS, nº 2005512). Imediatamente após a finalização dos experimentos, camundongos foram submetidos isoladamente à eutanásia pelo método de deslocamento cervical, enquanto que os ratos foram sacrificados por guilhotina para retirada das estruturas cerebrais de interesse. As carcaças dos camundongos foram acondicionadas em embalagens plástica apropriada e armazenadas em freezer a -20°C até o recolhimento (semanal) da Aborgama do Brasil.

5. RESULTADOS

5.1 Obtenção do extrato hidroetanólico, fração enriquecida em saponinas e fração enriquecida em flavonóides a partir do extrato hidroetanólico das folhas de *Passiflora alata*

A massa total de folhas utilizadas para a obtenção do extrato hidroetanólico foi de 140,57 g, o que resultou em 35,14 g de extrato hidroetanólico, correspondendo a um rendimento aproximado de 25% (m/m) em relação ao pó das folhas dessecadas. A utilização da cromatografia de exclusão com gel de dextrano (Sephadex LH20[®]) como adsorvente resultou na obtenção de uma massa total de 2,23 g para a fração enriquecida em saponinas (SAP) representando um rendimento aproximado de 51,55% (m/m) em relação ao extrato hidroetanólico (70%). A fração enriquecida em flavonóides (FLA) resultou em uma massa total de 194,6 mg, representando um rendimento aproximado de 5,06% (m/m) em relação ao extrato hidroetanólico (70%). O perfil cromatográfico das frações SAP, após a revelação com anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento, apontou a presença de saponinas triterpênicas, visualizado através da coloração violeta. A fração FLA após revelação com reagente natural, apresentou coloração amarela e verde, características de flavonóides, visualizadas em luz UV₃₆₆. Demonstrando, portanto, que as duas frações apresentaram perfil cromatográfico semelhante ao demonstrado em trabalho anterior (PROVENSI, 2007).

5.2 Influência da administração de flumazenil (FMZ) no efeito da fração enriquecida em flavonóides (FLA) e fração enriquecida em saponinas (SAP) no labirinto em cruz elevado.

A análise estatística (ANOVA de duas vias) revelou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos (SAP, FLA, DZP e SAL) em alguns parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado, bem como interação entre os tratamentos e o pós-tratamento (FMZ ou SAL), com diferentes influências da administração do FMZ na resposta comportamental dos animais tratados com DZP, SAP e FLA.

Como esperado, os animais tratados com diazepam e salina (DZP + SAL) apresentaram um aumento no tempo de permanência, número de entradas no braço aberto e número total de entradas, em todos os experimentos realizados (Figura 4). Todas essas respostas foram abolidas pela administração de flumazenil (DZP + FMZ) (Figura 4).

SAP e FLA aumentaram apenas o tempo de permanência dos animais nos braços abertos; não influenciaram o número de entradas no braço aberto, nem o número total de entradas. O tratamento com FMZ não afetou o aumento do tempo de permanência nos braços abertos induzido pelas frações FLA e SAP. Porém, a administração combinada das frações FLA e SAP com FMZ resultou em um aumento do número de entradas nos braços abertos, quando comparadas aos grupos SAL + FMZ (Figura 4B). A combinação SAP + FMZ resultou também em um aumento do número total de entradas quando comparado ao grupo SAP + SAL (Figura 4C).

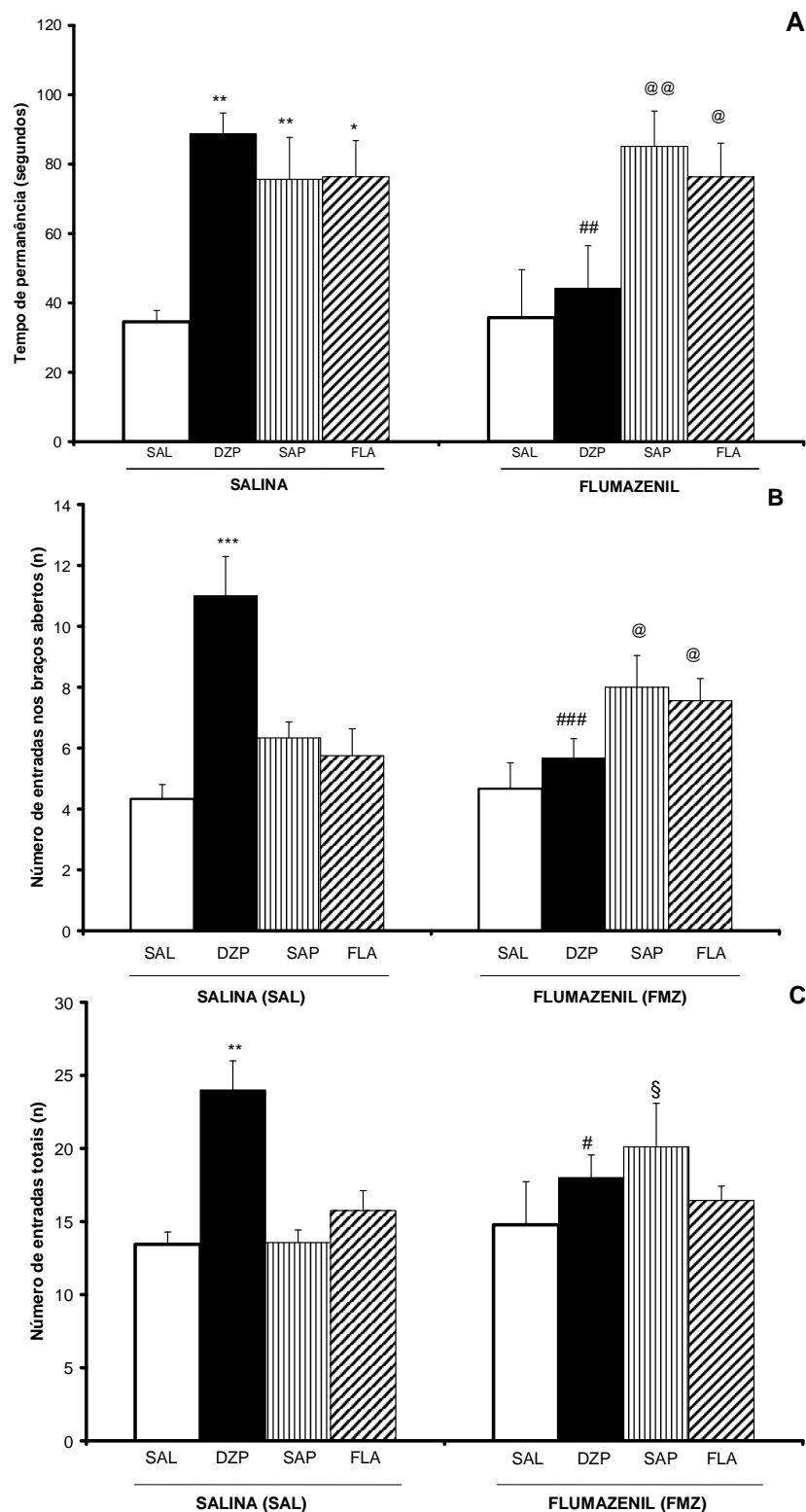


Figura 2. Efeito da administração fração enriquecida em saponinas (SAP 900 mg/kg, v.o.) e fração enriquecida em flavonóides (FLA 300 mg/kg, v.o.) em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado. Resultados expressos como média + erro padrão (n = 8-9 animais/grupo). Diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA de duas vias *post hoc* Student Newmann Keuls. Tempo de permanência no braço aberto (A) *p<0,05, **p<0,01 quando comparado ao grupo salina; @p<0,05; @@p<0,01 quando comparado ao grupo SAL + FMZ [F_{tratamento}(3,70)=8.029]; ###p<0,01 quando comparado ao grupo DZP + SAL [F_{interação tratamento x pós tratamento}(3,70)=2.866]. Número de entradas no braço aberto (B) ***p<0,001 quando comparado ao grupo SAL + SAL ; @p<0,05 quando comparado ao grupo SAL + FMZ [F_{tratamento}(3,70)=7,339], ###p<0,001 quando comparado ao grupo DZP + SAL; [F_{interação tratamento x pós tratamento}(3,70)=8.013]. Número de entradas totais (C) **p<0,01 quando comparado ao grupo SAL + SAL [F_{tratamento}(3,70)=4,754] ; #p<0,05 quando comparado ao grupo DZP + SAL; §p<0,05 quando comparado ao grupo SAP + SAL [F_{interação tratamento x pós tratamento}(3,70)=3,762].

5.3 Deslocamento da radioligação de [3H]-muscimol em membranas sinaptossomais de cérebro total de ratos

A fração enriquecida em saponinas (SAP) e a fração enriquecida em flavonóides (FLA) em concentrações de 10^{-3} a 10^{-13} M não afetaram a ligação do radioligante [3H]-muscimol (n=4), demonstrando que as frações não possuem afinidade pelo sítio ortostérico GABA do receptor GABA_A (Figuras 5 e 6).

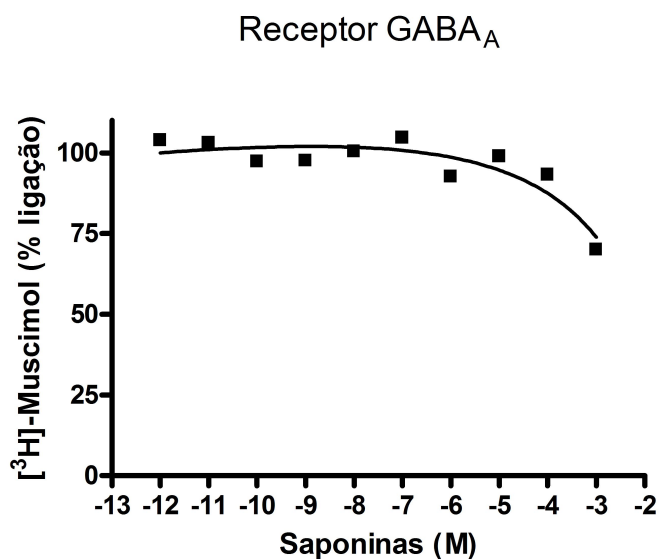


Figura 3: Curva de competição de SAP com a ligação no sítio ortostérico GABA ([3H]-muscimol, 5 nM). Resultados expressos como porcentagem (média) da ligação específica de [3H]-muscimol. Os ensaios foram realizados em duplicata.

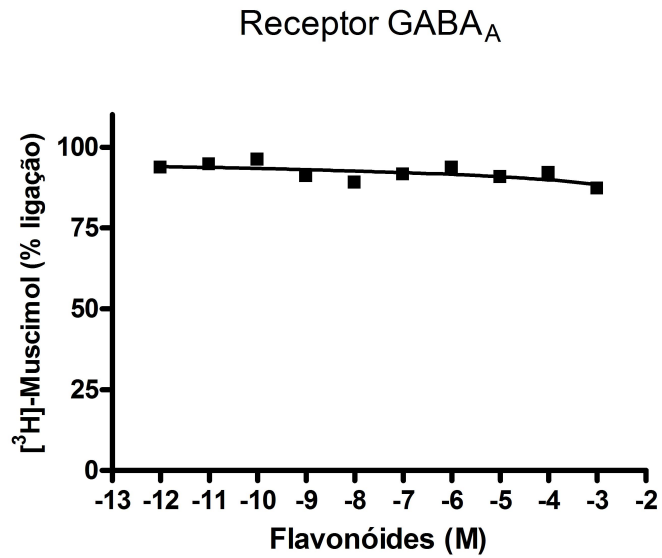


Figura 4: Curva de competição de FLA com a ligação no sítio ortostérico GABA ([³H]-muscimol, 5 nM). Resultados expressos como porcentagem (média) da ligação específica de [³H]-muscimol. Os ensaios foram realizados em duplicata.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que a SAP (900 mg/kg, v.o.) e a fração FLA (300 mg/kg, v.o.) obtidas de um extrato hidroetanólico (70%) das folhas de *P. alata* apresentaram efeito ansiolítico, avaliado pelo aumento do tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, sem alteração no número total de entradas. Estes dados corroboram com o observado em um estudo anterior, no qual as frações FLA (300 mg/kg, v.o.), e SAP (600 e 900 mg/kg, v.o.), apresentaram atividade ansiolítica sem alteração da atividade locomotora espontânea (PROVENSI, 2007). No estudo de PROVENSI (2007), as frações foram obtidas de um extrato aquoso, enquanto em nosso estudo, as frações foram obtidas de um extrato hidroetanólico. Porém, independente do solvente utilizado, as frações FLA e SAP possuem perfil cromatográfico semelhante, o que indica que os compostos responsáveis pela atividade farmacológica estão presentes em ambos os extratos.

É bem estabelecido na literatura o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica na atividade ansiolítica (MÖHLER, 2012). O GABA é o neurotransmissor inibitório majoritário do SNC de mamíferos e pode se ligar a três diferentes subtipos de receptor: GABA_A e GABA_C, que são canais transmembrana permeáveis à íons cloreto; e GABA_B, um receptor do tipo metabotrópico (BORMANN, 2000; CHEBIB e JOHNSTON, 2000; BETTLER e TIAO, 2006). O receptor GABA_A é formado por cinco subunidades protéicas (duas subunidades α , duas subunidades β e uma subunidade variável), as quais formam um poro central transmembrana capaz de carrear íons cloreto. Até o momento foram identificados 19 diferentes tipos de subunidades (α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , ρ_{1-3}) (MÖHLER, 2006) e distintas combinações entre as subunidades levam à expressão de diferentes sítios de ligação presentes no complexo. Este receptor possui sítios para ligação a álcool, benzodizépínico, barbitúrico, neuroesteróide, picrotoxina e GABA (JOHNSTON *et al.*, 1996). O sítio alostérico benzodiazepínico é expresso na interface entre as subunidades $\alpha_{(1,2,3 \text{ ou } 5)}$ e γ_2 , demonstrando a sua dependência da subunidade γ_2 (WAFFORD *et al.*, 1993), o sítio alostérico barbitúrico situa-se no domínio N terminal extracelular da subunidade α (DRAFTS e FISHER, 2006), o

sítio ortotestérico GABA está situado na interface das subunidades α e β (JACOB *et al.*, 2008), o sítio alostérico para álcool está localizado na subunidade α (MC CRACKEN *et al.*, 2010) e o sítio de ligação para picrotoxina encontra-se no canal de cloreto (KORPI *et al.*, 2002). Com relação aos neuroesteróides, este receptor possui dois sítios ativos, um no domínio transmembrana da subunidade α e outro entre as subunidades α e β . Portanto, os esteróides neuroativos possuem maior probabilidade de ligação ao receptor GABA_A quando comparado aos benzodiazepínicos, devido à diversidade de combinações das subunidades protéicas (NUTT e MALIZIA, 2001; AKK *et al.*, 2007).

Com o intuito de verificar o envolvimento do sítio benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A na atividade ansiolítica das frações, os animais foram também tratados com flumazenil (FMZ), na dose de 10 mg/kg (i.p.), e submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. A administração de FMZ não interferiu com a atividade ansiolítica das frações, sugerindo a ausência de interação direta das frações com o sítio benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A. Este achado está de acordo com PROVENSI e colaboradores (2008) que demonstraram que o extrato hidroetanólico, em concentrações de até 1000 μ g/mL, e as frações SAP e FLA, em concentrações de até 450 μ g/mL (PROVENSI, 2007), não deslocaram a ligação [³H]flunitrazepam em cérebro de ratos. No entanto, o extrato hidroetanólico na dose de 300 mg/kg (v.o.) apresentou efeito ansiolítico bloqueado pela administração de flumazenil (6 mg/kg, i.p.) em camundongos (PROVENSI *et al.*, 2008), sugerindo que a ação ansiolítica do extrato possa estar relacionada à outros compostos, não presentes nas frações FLA e SAP estudadas, ou a metabólitos formados após a administração do extrato aos roedores.

PROVENSI (2007) também investigou o envolvimento do sítio da picrotoxina e mostrou que as frações SAP (CI₅₀= 23,4 μ g/mL) e FLA (CI₅₀= 181,2 μ g/mL) inibiram a ligação de [³H]TBOB (*t*-butil-biciclo-ortobenzoato), evidenciando que as frações, apesar de não se ligarem de forma importante ao sítio benzodiazepínico, modulam positivamente o canal de cloreto do receptor GABA_A. Por outro lado, neste mesmo trabalho foi demonstrado que as frações não

alteraram o perfil de ação convulsivante do pentilenotetrazol, um antagonista do sítio picrotoxina, em camundongos. Efeito semelhante ao de SAP e FLA 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 e alguns dissacarídeos, que também são capazes de deslocar a ligação específica de [³H] TBOB (KUME *et al.*, 1996; PERICIC *et al.*, 1998; REZAI *et al.*, 2003; VAN RIJIN e BREE, 2003) e que se ligam em outros sítios do complexo.

Desta forma, decidimos investigar o envolvimento do sítio ortostérico do neurotransmissor GABA, através do ensaio de radioligação com [³H] muscimol. Nenhuma das frações afetou a ligação do radioligante, em membranas cerebrais de ratos, em concentrações de 10⁻¹³ a 10⁻³ μM, demonstrando que estes compostos não possuem ação direta neste sítio do receptor. Assim, o conjunto dos resultados obtidos por PROVENSÍ (2007), PROVENSÍ e colaboradores (2008) e neste trabalho demonstram que as frações SAP e FLA apresentam ação ansiolítica e modulam positivamente o canal de cloreto, porém não atuam nos sítios alostérico benzodiazepínico, nem no sítio ortostérico GABA do complexo receptor GABA_A-benzodiazepínico.

No entanto, é possível observar que há uma influência de SAP e FLA sobre a ação do flumazenil *in vivo*. A administração combinada de FMZ com SAP e FLA resultou em um aumento no número de entradas nos braços abertos, quando comparado ao tratamento SAL+FMZ, e no aumento do número total de entradas, quando se comparam os grupos SAP + FMZ com SAP+SAL, sugerindo que embora SAP e FLA não atuem diretamente no sítio benzodiazepínico, podem, de alguma forma, estar modulando o mesmo. Em um estudo de estímulo discriminativo em macacos, MCMAHON e FRANCE (2006) mostraram que a alfaloxona, um neuroesteróide agonista de baixa eficácia do receptor GABA_A, tem o efeito do estímulo discriminativo aumentado com a co-administração de flumazenil. Os autores sugerem que o flumazenil pode ter ação agonista ou antagonista do sítio benzodiazepínico dependendo se ele é avaliado em combinação com moduladores GABA_A de alta eficácia, com ação no mesmo sítio,

ou em sítios diferentes, como o sítio neuroesteróide. Há relatos na literatura de que as saponinas podem interagir com o sítio neuroesteróide do receptor GABA_A (HUONG *et al.*, 1997). Desta forma, o estudo da interação de compostos isolados de *P. alata* com o sítio neuroesteróide resulta como uma perspectiva de continuidade deste trabalho.

7. CONCLUSÃO

A fração enriquecida em saponinas (900 mg/kg, v.o.) e a fração enriquecida em flavonóides (300 mg/kg, v.o.), obtidas de um extrato hidroetanólico (70%) das folhas de *Passiflora alata*, demonstraram efeito ansiolítico que não é mediado pelo sítio alostérico benzodiazepínico, assim como não possuem interação direta com o sítio ortostérico GABA do receptor GABA_A-benzodiazepínico.

Os dados obtidos neste trabalho corroboram com trabalhos anteriores do nosso grupo, demonstrando que *P. alata* possui atividade ansiolítica mediado por um mecanismo diferenciado dos fármacos benzodiazepínicos.

8. REFERÊNCIAS

AHBOUCHA, S.; ARAQI, F.; LAYRARGUES, G.P.; BUTTERWORTH, R.F. Differential effects of ammonia on the benzodiazepine modulatory site on GABA-A receptor complex of human brain. **Neurochemistry International**, v. 47, n. 1-2, p. 58-63, 2005.

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.

AKK, G.; COVEY, D.F.; EVERS, A.S.; STEINBACH, J.H.; ZORUMSKI, C.F.; Mennerick, S. Mechanisms of neurosteroid interactions with GABA_A receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 116, p. 35–57, 2007.

AMARAL, P.A.; 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 Bonaerense**, v. 20, n. 3, p. 215-220, 2001.

BALBINO, E.E.; DIAS, M.F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 6, p. 992-100, 2010.

BARALDI, M.; AVALLONE, R.; CORSI, L.; VENTURINI, I.; BARALDI, C.; ZENEROLI, M.L. Natural endogenous ligands for benzodiazepine receptors in hepatic encephalopathy. **Metabolic Brain Disease**, v. 24, n. 1, p. 81-83, 2009.

BARBOSA, P.R.; VALVASSORI, S.S.; BORDIGNON, JR., C.L.; KAPPEL, V.D.; MARTINS, M.R.; GAVIOLI, E.C.; QUEVEDO, J.; REGINATTO, F.H. The Aqueous Extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 2, p. 282–288, 2008.

BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). Comunicação científica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 355-356, 2003.

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

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.

BOEIRA, J.M.; FENNER, R.; BETTI, A.H.; PROVENSÍ, G.; LACERDA, L.A.; BARBOSA, P.R.; GONZALEZ, F.H.D.; CORREA, A.M.R.; DRIEMEIER, D.; DALL'ALBA, M.P.; PEDROSO, A.P.; GOSMANN, G.; DA SILVA, J.; RATES, S.M.K. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 526-532, 2010.

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

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.

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.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução nº 714, de 26/08/2002.

COUNCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATIONS OF MEDICAL SCIENCES. **International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals**. Geneva: 1985.

DE CASTRO, P.C.; HOSHINO, A.; DA SILVA, J.C.; MENDES, F.R. Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in experimental models. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 5, p. 481-484, 2007.

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 extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 5-8, 2002.

DENG, J.; ZHOU, Y.; BAI, M.; LI, H.; LI, L. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 148–153, 2010.

DHAWAN, K.; KUMAR, S., SHARMA, A. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *Passiflora 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.; DHAWAN, 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.; CEREBA, 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.

DRAFTS, B.C.; FISHER, J.L. Identification of structures within GABA_A receptors α subunits that regulate the agonist action of pentobarbital. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 318, n. 3, p. 1094-1101, 2006.

ELSAS, S.M.; ROSSI D.J.; RABER, J.; WHITE, G.; SEELEY, C. A.; GREGORY, W.L.; MOHR, C.; PFANKUCH, T.; SOUMYANATH, A. *Passiflora incarnata* L. (Passionflower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons in vitro, and show anxiogenic and anticonvulsant effects in vivo, varying with extraction method. **Phytomedicine**, v 17, n. 12, p. 940-949, 2010.

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.

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

GOSMANN, G.; PROVENSÍ, G.; COMUNELLO, L.N.; RATES, S.M.K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v.9, s.1, p. 88-99, 2011.

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.

JACOB, T.C.; MOSS, S.J.; JURD, R. GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. **Nature Reviews-Neuroscience**, v. 9, n. 5, p. 331-343, 2008.

JOHNSTON, G.A.R. GABA_A receptor pharmacology. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 173-198, 1996.

KORPI, E.R.; GRÜNDER, G.; LÜDDENS, H. Drug interactions at GABA_A receptors. **Progress in Neurobiology**, v. 67, p. 113-159, 2002.

KUME, A.; GREENFIELD, L.J.Jr.; MACDONALD, R.L.; ALBIN, R.L. Felbamate inhibits [³H]-*t*-butylbicycloorthobenzoato (TBOB) binding and enhances Cl⁻ current at the gamma-aminobutyric AcidA (GABA_A) receptor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 277, n.3, p. 1784-1792, 1996.

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_A-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 308-314, 2007.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1; p. 265-275, 1951.

MCCRACKEN, M.L.; BORGHESE, C.M.; TRUDELL, J.R.; HARRIS, R.A. A transmembrane amino acid in the GABA_A receptor β_2 subunit critical for the actions of alcohols and anesthetics. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 335, n. 3, p. 600-606, 2010.

MCMAHON, L.R.; FRANCE, C.P. Differential behavioral effects of low efficacy positive GABA_A modulators in combination with benzodiazepines and a neuroactive steroid in rhesus monkeys. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 260-268, 2006.

MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C.; WOLFMAN, 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.

MÖLER, H. GABA_A receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia. **Journal of Receptors and Signal Transduction Research**, v. 26, n. 5-6, p. 731-740, 2006.

MÖLER, H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 42-53, 2012.

MOVAFEGH, A., ALIZADEH, R., HAJIMOHAMADI, F., ESFEHANI, F., NEJATFAR, M. Preoperative oral *Passiflora incarnata* reduces anxiety in ambulatory surgery patients: a Double-blind, placebo-controlled study **Anesthesia and Analgesia**, v. 106, n. 6, p. 1728-1732, 2008.

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.

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

OGA, S.; DE FREITAS, P.C.; GOMES DA SILVA, A.C.; HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Medica**, v. 50, v.4, p. 303-306, 1984.

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 the red ginseng and sun ginseng. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 6, p. 895-900, 2005.

PERICIC, D.; MIRKOVIC, K.; JAZVINSKAK, M.; BESNARD, F. [3H]-*t*-butylbicycloorthobenzoate binding to recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ GABA_A receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 360, p. 99-104, 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, n. 2, p. 162-164, 2001.

PROVENSI, G. **Investigação da atividade ansiolítica de *Passiflora alata* Curtis (PASSIFLORACEAE)**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em ciências Farmacêuticas – UFRGS, 152p, 2007.

PROVENSI, G.; NOËL, F.; LOPES, D.V.S.; FENNER, R.; BETTI, A.H.; COSTA, F.; MORAIS, E.C.; GOSMANN, G.; RATES, S.M.K. Participation of GABA-benzodiazepine receptor complex in the anxiolytic effect of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 845-851, 2008.

REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; SCHRIPSEMA, J.; SCHENKEL, 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 [³H]-TBOB binding to the rodent GABA_A receptor by simple disaccharides. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 619-623, 2003.

ROMANINI, C.V.; MACHADO, M.W.; BIAVATTI, M.W.; DE OLIVEIRA, R.M.W. Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato fluido e fração aquosa das folhas de *Passiflora alata* Curtis em camundongos. **Acta Scientiarum Health Science**, v.28, n.2, p. 159-164, 2006.

SAMPATH, C.; HOLBIK, M.; KRENN, L.; BUTTERWECK, V. Anxiolytic effects of fractions obtained from *Passiflora incarnata* L. in the elevated plus maze in mice. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 789-795, 2011.

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

SOULIMAN, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSILIN, 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.

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

VAN RIJIN, C.M.; BREE, E.W. A four-ligand hypercube model to quantify allosteric interactions within the GABA_A receptor complex. **European Journal of Pharmacology**, v. 485, p. 43-51, 2003.

WAFFORD, K.A.; BAIN, C.J.; WHITING, P.J.; KEMP, J.A. Functional comparison of the role of gamma subunits in recombinant human gamma-aminobutyric acidA/benzodiazepine receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 437-442, 1993.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta dissertação foi aprofundada a investigação do mecanismo de ação da atividade ansiolítica de *Passiflora alata* sobre o complexo receptor GABA_A e a avaliação da administração repetida sobre parâmetros comportamentais e toxicidade em camundongos.

A atividade ansiolítica observada para a fração enriquecida em flavonóides e a fração enriquecida em saponinas obtidas de um extrato hidroetanólico, não demonstrou envolvimento direto com o sítio benzodiazepínico, nem interação direta com o sítio ortostérico GABA do complexo receptor GABA_A. A administração de flumazenil, apesar de não reverter a atividade ansiolítica, sofreu interferência em sua ação quando administrado em combinação com as frações, sugerindo que FLA e SAP modulam de alguma forma o sítio benzodiazepínico. Além disso, estudo anterior do nosso grupo demonstrou que frações enriquecidas em saponinas e flavonóides obtidas de *Passiflora alata* modulam positivamente o canal de cloreto do complexo receptor GABA_A. Desta forma, uma perspectiva de continuidade deste trabalho é o estudo da interação de compostos isolados de *P. alata* em outros sítios do complexo receptor GABA_A, como o sítio alostérico neuroesteróide.

Ao contrário dos resultados prévios obtidos com tratamento agudo, o tratamento com doses repetidas (14 dias) de um extrato aquoso nebulizado das folhas de *Passiflora alata* não apresentou atividade ansiolítica e hipnótica-sedativa em camundongos, sugerindo o desenvolvimento de tolerância para o efeito depressor do Sistema Nervoso Central. Por outro lado, prejudicou a evolução ponderal, reduziu o comportamento e consumo alimentar, reduziu a massa hepática associada a degeneração hidrópica e os níveis séricos da enzima ALT. Estas alterações histopatológicas e bioquímicas podem ser um indicativo de dano hepático. Como perspectiva para esta etapa do trabalho, sugere-se aprofundar o estudo acerca da toxicidade bem como do potencial efeito anorexígeno produzidos pela administração repetida deste extrato.

O conjunto destes resultados é relevante considerando que *Passiflora alata* consta na Farmacopéia Brasileira e está presente em diversos medicamentos,

comercializados no Brasil, utilizados como tranqüilizantes. Apesar das frações enriquecidas apresentarem atividade ansiolítica no tratamento agudo, a administração repetida demonstrou indicativo de dano hepático, o que requer um uso cauteloso dos medicamentos contendo esta espécie em sua composição, bem como da planta *in natura*.

REFERÊNCIAS

ANVISA, 2010. http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm

BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *passiflora alata* (passifloraceae). Comunicação científica. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 355-356, 2003.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. Passiflora: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 1–23, 2004.

GOSMANN, G.; PROVENSÍ, G.; COMUNELLO, L.N.; RATES, S.M.K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v.9, s.1, p. 88-99, 2011.

KOEHLER-SANTOS, P.; LORENZ-LEMKE, A.P.; 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.

ANEXO



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética Na Utilização De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética Na Utilização De Animais analisou o projeto:

Número: 19431

Título: ESTUDO DO EFEITO DE *Passiflora alata* CURTIS (PASSIFLORACEAE) SOBRE O

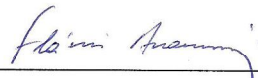
Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

STELA MARIS KUZE RATES - coordenador de 01/09/2010 até 30/03/2012

Comissão De Ética Na Utilização De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 25 de Agosto de 2010



FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética