

FILIPPE SILVEIRA DUARTE

**PARTICIPAÇÃO DAS DIHIDROESTIRIL-2-PIRONAS E ESTIRIL-2-PIRONAS
NAS AÇÕES CENTRAIS DO TIPO-BENZODIAZEPÍNICAS DA PLANTA
POLYGALA SABULOSA A.W. BENNETT (POLYGALACEAE) EM ROEDORES**

FLORIANÓPOLIS - SC

2007

FILIFE SILVEIRA DUARTE

**PARTICIPAÇÃO DAS DIHIDROESTIRIL-2-PIRONAS E ESTIRIL-2-PIRONAS
NAS AÇÕES CENTRAIS DO TIPO-BENZODIAZEPÍNICAS DA PLANTA
POLYGALA SABULOSA A.W. BENNETT (POLYGALACEAE) EM ROEDORES**

**Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Farmacologia da Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor em Farmacologia.**

**Orientador: Prof^a. Dra. Thereza Christina Monteiro
de Lima**

FLORIANÓPOLIS - SC

2007

DUARTE, Filipe Silveira. **Participação das dihidroestiril-2-pironas e estiril-2-pironas nas ações centrais do tipo-benzodiazepínicas da planta *Polygala sabulosa* A.W. Bennett (Polygalaceae) em roedores.** Florianópolis, 2007, 133 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof^a. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima

Defesa: 25/04/07

O presente estudo investigou os efeitos psicofarmacológicos do extrato bruto hidro-etanólico (EBH) e frações, bem como da 6-metoxi-7-preniloxicumarina, três dihidroestiril-2-pironas (DST) e três estiril-2-pironas (STY) isoladas da planta *Polygala sabulosa* (Polygalaceae). No labirinto em cruz elevado (LCE), o tratamento por via oral com o EBH e a fração acetato de etila (FAE) de *P. sabulosa* aumentou a porcentagem de tempo e a frequência de entradas nos braços abertos, bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça, além de uma redução dos estiramentos corporais protegidos, um perfil do tipo ansiolítico. No teste da hipnose, tanto o EBH como a FAE aumentaram a duração do sono induzido por pentobarbital, efeito hipnosedativo confirmado no teste do sono etéreo. Ambas as preparações reduziram a duração da primeira convulsão induzida por PTZ, além de diminuir a severidade das convulsões. A DST (1) e (3) ou STY (4) e (7), administradas i.c.v., induziram um efeito do tipo ansiolítico similar ao diazepam (DZP), no LCE. O antagonista benzodiazepínico (BDZ), flumazenil (FMZ), bloqueou parcialmente o efeito do tipo-ansiolítico da administração i.c.v. da DST (3) ou STY (4) e (7), porém não da DST (1). Registros eletroencefalográficos em ratos revelaram que a FAE protegeu as convulsões induzidas por PTZ, um efeito parcialmente bloqueado pelo FMZ. Os compostos isolados de *P. sabulosa* inibiram a ligação do [³H]-FNZ nos sítios BDZ em membranas sinaptossomais de córtex de ratos com valores de K_i superior a 100 μM [DST (1)], 41.7 μM [DST (2)], 35.8 μM [DST (3)], 90.3 μM [STY (4)], 31.0 μM [DST (5)] e 70.0 μM [DST (7)]. Nos ensaios de saturação, os compostos DST (3) e STY (7) inibiram competitivamente a ligação do [³H]-FNZ aos sítios BDZ, com uma diminuição significativa na afinidade aparente (K_d), sem nenhuma mudança no número máximo de sítios de ligação (B_{max}). Estudos de toxicidade aguda e sub-crônica (32 dias) mostraram que a FAE de *P. sabulosa* possui baixa toxicidade. O tratamento sub-crônico (30 dias) com a FAE aumentou todos os parâmetros de exploração dos braços abertos do LCE, sugerindo falta de tolerância aos efeitos do tipo ansiolítico. Em conclusão, a planta *P. sabulosa* apresenta efeitos do tipo ansiolítico, hipnosedativo e anticonvulsivante que podem ser atribuídos aos constituintes DST e STY. Estes efeitos farmacológicos parecem envolver, pelo menos em parte, uma interação com o sítio BDZ do complexo receptor GABA_A. Além disso, esta espécie de planta mostrou baixa toxicidade para os esquemas de tratamentos agudo e sub-crônico, indicando boa tolerabilidade e relativa segurança.

AGRADECIMENTOS

“A riqueza e qualidade de um trabalho é fruto da combinação de um conjunto de pessoas, cada qual com sua parcela de contribuição”

» À Professora **Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima**, pela orientação, sobretudo pelo voto de confiança desde o meu primeiro contato em 1997. Agradeço-lhe pela oportunidade, pela convivência durante toda esta jornada profissional, amizade, aprimoramento de minha educação e formação acadêmico-científica.

» A todos os **professores do Departamento de Farmacologia** da UFSC, pela qualidade do Curso de Pós-graduação e pelos conhecimentos transmitidos.

» À **direção e funcionários do Biotério Central e Setorial do Departamento de Farmacologia**, especialmente ao **Pedro e Redna**, pela amizade, auxílio técnico e zelo pelos animais: “Minha eterna gratidão”.

» Às secretárias do Departamento de Farmacologia e do PPGF, **Rita Maria Palma e Diana Lenzi**, pela colaboração e momentos de descontração.

» À minha família, em especial aos meus pais **Elbe e Vera**, meus irmãos **Alexandre e Rodrigo**, e suas esposas, pelo carinho, amizade, educação e apoio em todas as fases de minha vida.

» À minha namorada, **Josiane A. Kloeppe**, fonte de inspiração, em que sempre encontrei incentivo, companheirismo e amor incondicionais.

» Aos companheiros do Laboratório de Neurofarmacologia, **Ricardo Vieira (in memoriam)**, **Denise Mello**, **Rosane Schenkel de Aquino**, **Marcelo Duzzioni**, **Ana Valquíria Calixto**, **Rebeca Marques de Carvalho**, **Gilliard Lach**, **Lígia Moreiras Sena**, **Cristiane Felisbino**, **Dirk Petzsch**, **Laisa Luana**, **Saulo de Paiva Smith**, **Rafaela Parisoto** e **Ismael Nunes**, pela amizade, pela constante troca de conhecimentos e por tornarem este ambiente de trabalho minha segunda casa.

» A todos os colegas dos demais Laboratórios do Departamento de Farmacologia, pela troca de informações e amizade. Especialmente ao **Rodrigo Medeiros** e ao **Prof. Dr. Rui Prediger**, pelos momentos prazerosos no desenvolvimento do Projeto β -amilóide, fruto do talento e potencial de todos os seus contribuintes. Agradeço a oportunidade por esta experiência.

» Aos professores membros da banca de qualificação do doutorado: **Reinaldo Naoto Takahashi**, **Antônio de Pádua Carobrez**, **Gina Struffald Morato** e **Giles Alexander**

Rae, pelas críticas, sugestões e reflexões adicionais, que contribuíram dando maior consistência e qualidade à pró-forma da tese.

» Aos professores membros da banca examinadora do doutorado, **Roberto Andreatini**, **Antonio José Lapa**, **Reinaldo Naoto Takahashi**, **Antônio de Pádua Carobrez** e **Giles Alexander Rae**, pela atenção dispensada na leitura da tese e sugestões para o aprimoramento desta versão final.

» Ao **Alexandre Hoeller** (Laboratório de Neurofisiologia Comparada) e **Marcelo Duzzioni** (Departamento de Farmacologia), pela paciência e constante apoio no desenvolvimento dos registros do eletroencefalograma durante a execução desta tese. “Com perseverança vencemos os obstáculos”.

» À Professora **Dra. Mariel Marder** (Universidad de Buenos Aires, Argentina), por ter me acolhido em seu laboratório e ensinado a técnica de *binding*.

» Ao Farmacêutico-bioquímico **Rafael Luiz Prim** pela colaboração na realização das análises bioquímicas, e às Professoras **Alcibia Maia Cardoso** e **Cláudia Regina dos Santos** (Departamento de Patologia, UFSC), pelo apoio na execução dos estudos toxicológicos.

» À **Beatriz Garcia Mendes** e ao **Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti**, peças fundamentais na execução deste trabalho, não somente pelo fornecimento dos extratos e substâncias isoladas, mas pelo apoio, força de vontade, credibilidade em mim depositada e por sempre acreditar no potencial desenvolvimento desta tese.

» **Aos animais** que involuntariamente cederam suas vidas para o progresso da ciência.

» **Ao CNPq** pelo apoio financeiro.

» **A todas as pessoas não mencionadas** que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O presente estudo investigou os efeitos psicofarmacológicos do extrato bruto hidroetanólico (EBH), frações aquosa, hexânica e acetato de etila (FAE), e 6-metoxi-7-preniloxicumarina, três dihidroestiril-2-pironas (DST) e três estiril-2-pironas (STY) isoladas de *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), uma planta popularmente utilizada como anestésico tópico. No labirinto em cruz elevado (LCE), o tratamento por via oral com o EBH e FAE de *P. sabulosa* aumentaram a porcentagem de tempo de permanência e frequência de entradas nos braços abertos, bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça, além de uma redução dos estiramentos corporais protegidos, um perfil do tipo ansiolítico para esta espécie de planta. No teste da hipnose, o EBH e a FAE aumentaram a duração do sono induzido por pentobarbital, efeito hipno-sedativo confirmado no teste do sono etéreo. Ambas as preparações reduziram a duração da primeira convulsão induzida por PTZ, além de diminuir a severidade das convulsões. A DST (1) e (3) ou STY (4) e (7), administradas i.c.v., induziram um efeito do tipo ansiolítico similar ao diazepam (DZP), no LCE. Estes resultados sugerem que a *P. sabulosa* promove efeitos do tipo ansiolítico, hipno-sedativo e anticonvulsivante, e que estes efeitos podem ser atribuídos à presença dos compostos DST e STY. Além disso, este estudo investigou a participação do receptor GABA_A/benzodiazepínico (BDZ) nos efeitos centrais da FAE, bem como dos compostos DST e STY, utilizando o antagonista BDZ em modelos *in vivo* com o intuito de correlacionar estes efeitos com a posterior investigação de sua atividade *in vitro*. No LCE, o flumazenil (FMZ) bloqueou parcialmente o efeito do tipo ansiolítico da administração i.c.v. da DST (3) ou STY (4) e (7), porém não da DST (1). No registro do eletroencefalograma em ratos, a FAE protegeu as convulsões induzidas por PTZ, um efeito parcialmente bloqueado pelo FMZ, indicando a participação do receptor GABA_A/BDZ nesta ação. *In vitro*, os compostos isolados de *P. sabulosa* inibiram a ligação do [³H]-FNZ nos sítios BDZ em sinaptossomas de córtex de ratos com valores de K_i superior a 100 μM [DST (1)], 41.7 μM [DST (2)], 35.8 μM [DST (3)], 90.3 μM [STY (4)], 31.0 μM [STY (5)] e 70.0 μM [STY (7)]. Nos ensaios de saturação, os compostos DST (3) e STY (7) inibiram competitivamente a ligação do [³H]-FNZ nos sítios BDZ com uma diminuição significativa na afinidade aparente (K_d) e sem nenhuma mudança no número máximo de sítios de ligação (B_{max}). Estes resultados indicam que uma ação sobre os receptores GABA_A/BDZ modulando os efeitos do tipo ansiolíticos, hipno-sedativo e

anticonvulsivante da *P. sabulosa*, da FAE e de seus principais constituintes, é plausível. Além disso, a FAE protegeu os camundongos das convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo, indicando que outros sistemas de neurotransmissores podem estar contribuindo para as ações da *P. sabulosa*. Os possíveis efeitos tóxicos da administração oral aguda da FAE nas doses de 250-5.000 mg/kg (Teste de Irwin) ou 250-1.000 mg/kg (administração sub-crônica, 32 dias), em camundongos, também foram investigados. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos (hemograma completo) foram estudados, assim como o possível desenvolvimento de tolerância aos efeitos do tipo ansiolítico da FAE foi investigado no LCE após um tratamento por 30 dias. Nossos resultados mostraram que a DL_{50} da FAE é superior a 5.000 mg/kg, sugerindo baixa toxicidade. As razões para os efeitos sedativo/ansiolítico e mio-relaxante/ansiolítico calculadas após o tratamento com a FAE foram muito superiores àquelas do diazepam, sugerindo uma boa margem de segurança. O tratamento sub-crônico (32 dias) não revelou qualquer alteração na evolução do peso corporal. Somente um aumento do peso absoluto e relativo do fígado foi observado, em ambos os sexos (machos, 30 e 34 %, respectivamente, e fêmeas, 14 e 18 %, respectivamente). Camundongos machos apresentaram um aumento da ALT sérica, na dose de 1.000 mg/kg, sem quaisquer alterações nos demais parâmetros bioquímicos e hematológicos. Camundongos fêmeas, por sua vez, apresentaram uma redução de creatinina, nas doses de 250 e 500 mg/kg, bem como um aumento do volume corpuscular médio e de neutrófilos segmentados, na dose inferior, sem quaisquer alterações nos demais parâmetros bioquímicos e hematológicos. Estas mudanças isoladamente sugerem baixa toxicidade após a exposição à FAE em regimes de tratamento agudo e sub-crônico. O tratamento sub-crônico com a FAE (250-1.000 mg/kg) induziu um aumento na porcentagem de tempo de permanência e frequência de entradas nos braços abertos do LCE, bem como um aumento no número de imersões desprotegidas de cabeça, da atividade da região distal dos braços abertos, e uma redução dos estiramentos corporais protegidos, sugerindo ausência de tolerância aos efeitos do tipo ansiolítico. Em conclusão, a planta *P. sabulosa* apresenta efeitos do tipo ansiolítico, hipno-sedativo e anticonvulsivante, que podem ser atribuídos aos constituintes DST e STY. Estes efeitos farmacológicos parecem envolver, pelo menos em parte, uma interação com o sítio BDZ do complexo receptor $GABA_A$. Além disso, esta espécie de planta mostrou baixa toxicidade para os esquemas de tratamentos agudo e sub-crônico, indicando boa tolerabilidade e relativa segurança.

ABSTRACT

This study was undertaken to evaluate the psychopharmacological effects of the hydroethanolic extract (HE), aqueous, hexane and ethyl acetate (EA) fractions, and 6-methoxy-7-prenyloxycoumarin, three dihydrostyryl-2-pyrone (DST) and three styryl-2-pyrone (STY) isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine used as a topical anesthetic, in mice. In the elevated plus-maze test (EPM), the HE of *P. sabulosa* and its EA increased the percentage of time spent on, and the frequency of entries into the open arms, as well as the number of unprotected head-dippings (uHD), besides reducing the incidence of protected stretch-attend postures (pSAP), which indicates an anxiolytic-like profile of action for this plant species. In the hypnosis test, HE and EA enhanced the duration of pentobarbital-induced sleep. This hypno-sedative effect was confirmed in ethyl ether-induced hypnosis. Both preparations reduced the duration of the first convulsion induced by PTZ, besides decreasing the severity of the seizures. The DST (1) and (3), as well as STY (4) and (7), centrally injected, showed a similar anxiolytic-like effect in the EPM test, while the DST (2) and STY (5) were inactive. These results suggest that *P. sabulosa* is an herbal medicine which possesses anxiolytic-like, hypno-sedative and anticonvulsant effects, and these central effects can be attributed to the presence of the DST and STY compounds. Moreover, the present study investigated the participation of GABA_A/benzodiazepine (BDZ) receptors in the central effects of the EA, as well as DST and STY compounds isolated from *P. sabulosa*, using a BDZ antagonist in *in vivo* tests in order to correlate these effects with their *in vitro* activity. In the EPM test, flumazenil (FMZ) partially blocked the anxiolytic-like effect of i.c.v. administration of DST (3) or STY (4) and (7), but not DST (1). The EA protected rats against PTZ-induced electroencephalographic seizures, an effect partially blocked by FMZ, indicating the participation of GABA_A/BDZ receptors in this action. *In vitro*, DST (1), (2) and (3) inhibited [³H]-FNZ binding to BDZ-sites in rat cortical synaptosomes with a K_i of higher than 100 μM, 41.7 μM and 35.8 μM, respectively, while STY (4), (5) or (7) inhibited this binding with K_i of 90.3 μM, 31.0 μM and 70.0 μM, respectively. In the saturation assay, compounds (3) and (7) competitively inhibited the binding of [³H]-FNZ to BDZ-sites with a significant decrease in [³H]-FNZ binding apparent affinity (K_d) with no change in maximal binding (B_{max}). Thus, an action on GABA_A/BDZ receptors underlying the anxiolytic, hypno-sedative and anticonvulsant effects of *P. sabulosa*, its EA fraction and the main constituents is feasible. In addition, EA protected from the maximal electroshock-

induced convulsions, indicating that, besides the GABA_A/BDZ receptor, other mechanisms could be also underlying the central actions of *P. sabulosa*. In addition, the putative toxic effects of oral acute administration of EA in mice at doses of 250-5,000 mg/kg (Irwin's test) or 250-1,000 mg/kg (sub-chronic administration, 32 days) were evaluated. Biochemical and hematological parameters were studied. Furthermore, the putative development of tolerance to the anxiolytic-like effect of EA was investigated in EPM after a 30-day treatment protocol. Our results showed that oral DL₅₀ of EA is higher than 5,000 mg/kg in mice (both sexes) suggesting a low toxicity. The sedative/anxiolytic and myorelaxant/anxiolytic ratios calculated to the EA treatment were much higher than those of diazepam, indicating a good safety ratio. The sub-chronic treatment (30 days) did not reveal any alteration in body weight gain, only an increase in the absolute and relative liver weight was observed, in both sexes (male, 30 and 34 %, respectively, and female, 14 and 18 %, respectively). In biochemical and hematological parameters, EA at the 1,000 mg/kg dose promoted an increase in ALT in male mice and reduced creatinine, increased mean corpuscular volume as well as segmented neutrophils in female mice, at the minor doses. These isolated changes suggest that EA is probably devoid of acute and sub-chronic toxicity in mice. The sub-chronic treatment with EA (250-1,000 mg/kg) induced an increase in the exploration of open arms in the EPM, as well as in the amount of uHD, open-arms end activity besides a reduction in pSAP, suggesting a lack of tolerance to the anxiolytic-like effect promoted by this plant species. In conclusion, *P. sabulosa* presents anxiolytic-like, hypno-sedative and anticonvulsant effects that could be attributed to some of its DST and STY compounds. These pharmacological effects seem to involve, at least in part, an interaction with the BDZ-site at the GABA_A receptor complex. In addition, this plant species showed a low toxicity in acute and sub-chronic schedule of administration, indicating a relative safety.

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1 - Número de publicações científicas relacionadas à pesquisa com plantas medicinais distribuídos por revistas indexadas (A) e ao longo dos anos (B). Fonte: Adaptado de Zhang (2004).	7
Figura 2 - Estrutura de cada subunidade que compõe o receptor GABA _A , destacando-se os 4 domínios transmembrânicos (M ₁ , M ₂ , M ₃ e M ₄), a porção N e C-terminal extracelularmente e alça citoplasmática intracelularmente (a), e as diferentes subunidades do receptor GABA _A clonadas e seqüenciadas até o momento (b). Fonte: Adaptado de Whiting et al., 1999.	10
Figura 3 - Localização do sítio de ligação benzodiazepínico (BDZ) no complexo receptor GABA _A . Fonte: Adaptado de Czajkowski, 2006.	12
Figura 4 - Distribuição cerebral das quatro classes de subunidades α sensíveis aos benzodiazepínicos em cérebro de camundongos (secções cerebrais sagitais processadas por imunohistoquímica). Fonte: Adaptado de Möhler et al., 2002.	13
Figura 5 - <i>Polygala sabulosa</i> (Polygalaceae) (Foto gentilmente doada pelo Prof. Dr. Moacir Pizzolatti).	14
Figura 6 - Biossíntese de estirilpironas na espécie de planta <i>Polygala sabulosa</i> (proposto por Herderich et al., 1997).	15
Figura 7 - Dihidroestiril-2-pironas e estiril-2-pironas isoladas da planta <i>Polygala sabulosa</i> (Pizzolatti et al., 2000, 2004).	16
Figura 8 - Estrutura básica e substituições das dihidroestiril-2-pironas de <i>P. sabulosa</i> e das principais kavalactonas de <i>P. methysticum</i> * (Bilia et al., 2004).	17
Figura 9 - Labirinto em cruz elevado.	32
Figura 10 - Sono induzido por pentobarbital sódico.	33
Figura 11 - Sono induzido por éter etílico (sono etéreo).	34
Figura 12 - Convulsões induzidas por pentilenotetrazol.	35
Figura 13 - Convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo.	36
Figura 14 - Campo aberto (Open-field).	36
Figura 15 - Rota-rod.	37
Figura 16 - Temperatura retal.	38
Figura 17 - Cirurgia estereotáxica para o implante dos eletrodos bipolares.	39
Figura 18 - Efeito do tratamento oral com o extrato bruto hidro-etanólico (EBH)	51

- de *Polygala sabulosa* (250-1.000 mg/kg, v.o.) no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min.
- Figura 19** - Efeito do tratamento oral com o extrato bruto hidro-etanólico (EBH) 52 de *Polygala sabulosa* (250 - 1.000 mg/kg, v.o.) na latência para indução (A) e na duração do sono induzido por pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.).
- Figura 20** - Efeito do tratamento oral com o extrato bruto hidro-etanólico (EBH) 53 de *Polygala sabulosa* (250 - 1.000 mg/kg, v.o.) na latência para o primeiro episódio convulsivo (A), duração da primeira convulsão (B) e severidade das convulsões (C).
- Figura 21** - Efeito do tratamento oral com o extrato bruto hidro-etanólico (EBH) 54 250 - 1000 mg/kg, v.o.) de *Polygala sabulosa* ou diazepam (DZP 0,75 mg/kg, i.p.) na variação da temperatura retal em camundongos.
- Figura 22** - Efeito do tratamento oral com o extrato bruto hidro-etanólico (EBH) 55 500 mg/kg, v.o.) ou frações aquosa (FA), hexânica (HEX) e 6-metoxi-7-preniloxicumarina (6 MC) (250 - 1.000 mg/kg, v.o.) ou fração acetato de etila (FAE 125 - 1.000 mg/kg) isoladas de *Polygala sabulosa* na latência para indução do sono (A e B) e na duração da hipnose induzida por pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.).
- Figura 23** - Efeito do tratamento oral com a fração acetato de etila de *Polygala* 56 *sabulosa* (FAE, 250-1.000 mg/kg, v.o.) no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min.
- Figura 24** - Efeito do tratamento oral com a fração acetato de etila de *Polygala* 57 *sabulosa* (FAE, 250 - 1.000 mg/kg, v.o.) na latência para indução (A) e na duração do sono induzido por pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.).
- Figura 25** - Efeito do tratamento oral com a fração acetato de etila de *Polygala* 58 *sabulosa* (FAE, 250 - 1.000 mg/kg, v.o.) na latência para o primeiro episódio convulsivo (A), duração da primeira convulsão (B) e severidade das convulsões (C).
- Figura 26** - Efeito do tratamento oral com a fração acetato de etila de *Polygala* 59 *sabulosa* (FAE, 250 - 1.000 mg/kg, v.o.) ou diazepam (DZP 1,5 mg/kg, i.p.) na variação da temperatura retal em camundongos.
- Figura 27** - Efeito da administração central da dihidroestiril-2-pirona (**1**) (DST 1, 60 0,2 - 25 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de

camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min.

Figura 28 - Efeito da administração central da dihidroestiril-2-pirona (**3**) (DST 3, 0,3 fmol - 25 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. 61

Figura 29 - Efeito da administração central da dihidroestiril-2-pirona (**4**) (DST 4, 1 - 25 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. 62

Figura 30 - Efeito da administração central da dihidroestiril-2-pirona (**7**) (DST 7, 8 fmol - 25 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. 63

Figura 31 - Efeito da administração central da dihidroestiril-2-pirona (**2**) (DST 2, 0.2 pmol - 25 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. 65

Figura 32 - Efeito da administração central da estiril-2-pirona (**5**) (STY 5, 0.2 pmol - 25 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. 66

Figura 33 - Influência do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 10 mg/kg; s.c.) no efeito da fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE, 750 mg/kg; v.o.) na atividade eletroencefalográfica (EEG) avaliada durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ; 80 mg/Kg, i.p.), em ratos. 71

Figura 34 - Efeito da fração acetato de etila (FAE, 250-1000 mg/kg; v.o.) de *Polygala sabulosa* na duração da extensão tônica (A) e porcentagem de animais que apresentaram a extensão tônica das patas posteriores (B) no teste do eletrochoque transcorneal máximo (ECM) em camundongos. 72

Figura 35 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-5 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central da estiril-2-pirona (**1**) (STY 1, 5 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. 74

Figura 36 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central da dihidroestiril-2-pirona (**3**) (DST 3, 40 fmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. 76

Figura 37 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-10 mg/kg, i.p.) 15 77

min antes da administração central da estiril-2-pirona (**4**) (STY 4, 25 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min.

Figura 38 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central da estiril-2-pirona (**7**) (STY 7, 5 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. 79

Figura 39 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ 10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central do diazepam (DZP, 7 nmol, i.c.v.) no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. 80

Figura 40 - Curvas de competição entre dihidroestiril-2-pironas (**1**), (**2**) ou (**3**) e estiril-2-pironas (**4**), (**5**) ou (**7**) (0.1-600 μ M) e o [3 H]-flunitrazepam (0.42 nM) em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos. 82

Figura 41 - Efeito da dihidroestiril-2-pirona (**3**) 40 μ M ou estiril-2-pirona (**7**) 70 μ M na ligação do [3 H]-flunitrazepam ([3 H]-FNZ) no sítio benzodiazepínico. Isotermas de saturação e gráfico de *Scatchard* da ligação de [3 H]-FNZ (0.3-9 nM) em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratas na presença do veículo, dihidroestiril-2-pirona (**3**) (40 μ M) ou estiril-2-pirona (**7**) (70 μ M). 83

Figura 42 - Efeito da administração oral da fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE, 250 - 2.000 mg/kg, v.o.) ou diazepam (DZP, 2,5 - 10 mg/kg, v.o.) na atividade locomotora espontânea de camundongos avaliados no teste do campo-aberto (5 min). 86

Figura 43 - Efeito da administração oral da fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE, 250 - 2.000 mg/kg, v.o.) ou diazepam (DZP, 2,5 - 10 mg/kg, v.o.) no tempo de permanência na barra giratória (A) e no número de quedas de camundongos, avaliados no teste do rota-rod (1 min). 87

Figura 44 - Efeito da administração oral aguda da fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* em camundongos machos (FAE, 250 - 5.000 mg/kg, v.o.) (Painel A) e fêmeas (FAE, 2.500 - 5.000 mg/kg, v.o.) (Painel B) na evolução do peso corporal avaliado diariamente por um período de 15 dias. 88

Figura 45 - Efeito da administração sub-crônica diária da fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE, 250 - 1.000 mg/kg, v.o.) em camundongos machos 89

(Painel A) e fêmeas (Painel B) na evolução do peso corporal avaliado semanalmente por um período de 32 dias.

Figura 46 - Efeito do tratamento sub-crônico oral (30 dias) com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE, 250-1.000 mg/kg, v.o.) no comportamento de camundongos machos (painel da esquerda) e fêmeas (painel da direita) avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), durante 5 min. 95

LISTA DE TABELAS	Página
Tabela 1 - Número de espécies vegetais endêmicas por país/região. Retirado de Cunningham (1996).	5
Tabela 2 - Literatura acerca das atividades biológicas de extratos e compostos isolados de espécies de plantas do gênero <i>Polygala</i> .	18
Tabela 3 - Efeito do tratamento oral com o extrato bruto hidro-etanólico (EBH) de <i>Polygala sabulosa</i> nos demais parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).	51
Tabela 4 - Efeito do tratamento oral com a fração acetato de etila de <i>Polygala sabulosa</i> (FAE) nos demais parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).	57
Tabela 5 - Efeito da administração central da dihidroestiril-2-pirona (1) ou (3) e estiril-2-pironas (4) ou (7), isoladas de <i>Polygala sabulosa</i> , em outros parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).	64
Tabela 6 - Efeito da administração central da dihidroestiril-2-pirona (2) e estiril-2-pironas (5), isoladas de <i>Polygala sabulosa</i> , em outros parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).	67
Tabela 7 - Efeito da administração oral da fração acetato de etila de <i>Polygala sabulosa</i> (FAE; 750 mg/kg) na latência para e a duração do primeiro espasmo mioclônico/clônico (MC/C) e da primeira convulsão clônica generalizada (CCG), bem como na severidade das convulsões (SEVER) e letalidade no teste de convulsões induzidas por PTZ, em ratos.	69
Tabela 8 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-5 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central da estiril-2-pirona (1) (STY 1, 5 pmol, i.c.v.) isolada de <i>Polygala sabulosa</i> em outros parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).	74
Tabela 9 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central da dihidroestiril-2-pirona (3) (DST 3, 40 fmol, i.c.v.) isolada de <i>Polygala sabulosa</i> em outros parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).	76
Tabela 10 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central da estiril-2-pirona (4) (STY 4, 25 pmol, i.c.v.)	78

isolada de *Polygala sabulosa* em outros parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).

Tabela 11 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-5 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central da estiril-2-pirona (**7**) (STY 7, 5 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* em outros parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE). 79

Tabela 12 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central do diazepam (DZP, 7 nmol, i.c.v.) em outros parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE). 81

Tabela 13 - Valores da constante de afinidade aparente (K_d) e número máximo de sítios de ligação (B_{max}) do [3 H]-flunitrazepam na presença do veículo, dihidroestiril-2-pirona (**3**) ou estiril-2-pirona (**7**). 83

Tabela 14 - Sumário das observações no “screening” farmacológico inicial da fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE) em camundongos machos adultos. 85

Tabela 15 - Peso corporal inicial (dia 1) e final (dia 32) e porcentagem de aumento do peso corporal de camundongos machos e fêmeas tratados diariamente por 32 dias consecutivos por via oral, com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE) no estudo de toxicidade sub-crônica. 90

Tabela 16 - Efeito do tratamento sub-crônico (32 dias) com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE) nos parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos de ambos os sexos. 92

Tabela 17 - Peso absoluto e relativo dos órgãos vitais (g) de camundongos tratados com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE) no estudo de toxicidade sub-crônica (32 dias). 93

Tabela 18 - Efeito do tratamento sub-crônico oral (30 dias) com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE) em alguns parâmetros comportamentais adicionais de camundongos machos e fêmeas avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE). 96

LISTA DE ESQUEMAS**Página**

Esquema 1 - Resumo do protocolo experimental 1.	23
Esquema 2 - Resumo do protocolo experimental 2.	24
Esquema 3 - Resumo do protocolo experimental 3.	25
Esquema 4 - Resumo do protocolo experimental 4.	25
Esquema 5 - Resumo do protocolo experimental 5.	26
Esquema 6 - Resumo do protocolo experimental 6.	27
Esquema 7 - Resumo do protocolo experimental 7.	27
Esquema 8 - Resumo do protocolo experimental 8.	28
Esquema 9 - Resumo do protocolo experimental 9.	29
Esquema 10 - Resumo do protocolo experimental 10.	30
Esquema 11 - Preparação das membranas sinaptossomais.	41
Esquema 12 - Ensaio de <i>binding</i> por competição.	42
Esquema 13 - Ensaio de <i>binding</i> por saturação.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT - alanina aminotransferase

AST - aspartato aminotransferase

BDZ - benzodiazepínico(s)

CCG - convulsão clônica generalizada

DE₅₀ - dose efetiva 50 %

DL₅₀ - dose letal 50%

DMSO - dimetilsulfóxido

DST - dihidroestiril-2-pirona(s)

DZP - diazepam

ECp - estiramentos corporais protegidos

EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético di-sódico

EBF - entradas nos braços fechados

EBH - extrato bruto hidro-etanólico

ECM - eletrochoque transcorneal máximo

EEG - eletroencefalograma

FA - fração aquosa

FAE - fração acetato de etila

FMZ - flumazenil

GABA - ácido γ -aminobutírico

γ GT - gama-glutamil transferase

HEX - fração hexânica

[³H]-FNZ - [³H]-flunitrazepam

i.p. - intraperitoneal

i.c.v. - intracerebroventricular

6-MC - 6-metoxi-7-preniloxicumarina

MC/C - espasmo mioclônico/clônico

PBS - *phosphate buffered solution* (solução fisiológica tamponada)

PTZ - pentilenotetrazol

REA - *rearing* (comportamento de levantar)

STY - estiril-2-pirona (s)

v.o. - via oral

VCM - volume corpuscular médio

SUMÁRIO		Página
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos gerais da ansiedade generalizada	1
1.1.1	Tratamento farmacológico atual da ansiedade generalizada	2
1.2	Contribuição das plantas medicinais na descoberta de novas terapias alternativas	4
1.2.1	O sítio de ligação benzodiazepínico/GABA _A como alvo de substâncias isoladas de plantas medicinais	9
1.3	<i>Polygala sabulosa</i> A. W. Bennett (Polygalaceae)	14
2	OBJETIVOS	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Considerações éticas	20
3.2	Animais	20
3.3	Preparações, drogas e soluções	21
3.3.1	Material botânico	21
3.3.2	Obtenção dos extratos, fracionamento e isolamento de compostos	21
3.3.3	Drogas-padrão e soluções	22
3.4	Delineamento experimental	23
3.5	Equipamentos e testes farmacológicos	31
3.5.1	Testes comportamentais	31
3.5.1.1	<i>Labirinto em cruz elevado (Elevated plus-maze)</i>	31
3.5.1.2	<i>Sono induzido por pentobarbital sódico</i>	32
3.5.1.3	<i>Sono induzido por éter etílico (sono etéreo)</i>	33
3.5.1.4	<i>Convulsões induzidas quimicamente por pentilenotetrazol (PTZ)</i>	34
3.5.1.5	<i>Convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo (ECM)</i>	35
3.5.1.6	<i>Campo-aberto (Open-field)</i>	36
3.5.1.7	<i>Rota-rod</i>	37
3.5.1.8	<i>Temperatura retal</i>	37
3.5.1.9	<i>Cirurgias estereotáxicas para o implante dos eletrodos bipolares</i>	38
3.5.1.10	<i>Registros de eletroencefalograma (EEG)</i>	40
3.5.2	Ensaio bioquímicos	40
3.5.2.1	<i>Ensaio de ligação (binding do [³H]-flunitrazepam)</i>	41

3.5.2.1.1	<i>Animais e preparação das membranas sinaptossomais</i>	41
3.5.2.1.2	<i>Ensaio de binding do [³H]-flunitrazepam por competição e saturação</i>	42
3.5.3	Estudos complementares	43
3.5.3.1	<i>Toxicidade aguda</i>	43
3.5.3.1.1	<i>Triagem comportamental (teste hipocrático) e dose letal 50 % (DL₅₀)</i>	43
3.5.3.1.2	<i>Atividade locomotora espontânea (campo aberto) e desempenho motor (rota-rod)</i>	44
3.5.3.2	<i>Toxicidade sub-crônica</i>	45
3.5.3.2.1	<i>Análises biológicas</i>	46
	<i>(a) Procedimento para a coleta de sangue</i>	46
	<i>(b) Análise bioquímica do soro</i>	46
	<i>(c) Análise hematológica</i>	46
	<i>(d) Análise macroscópica dos órgãos nobres</i>	47
3.6	Análise estatística	47
4	RESULTADOS	50
4.1	Efeito do tratamento com extrato bruto hidroetanólico de <i>Polygala sabulosa</i>	50
4.1.1	Labirinto em cruz elevado	50
4.1.2	Sono induzido por pentobarbital sódico	52
4.1.3	Convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ)	52
4.1.4	Temperatura retal	53
4.2	Fracionamento biomonitorado para identificação da(s) fração(ões) ativa(s)	54
4.2.1	Sono induzido por éter etílico (sono etéreo)	54
4.3	Efeito do tratamento com fração acetato de etila de <i>Polygala sabulosa</i>	55
4.3.1	Labirinto em cruz elevado	55
4.3.2	Sono induzido por pentobarbital sódico	57
4.3.3	Convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ)	58
4.3.4	Temperatura retal	59
4.4	Efeito da administração central das dihidroestiril-2-pironas (1), (2) ou (3) e estiril-2-pironas (4), (5) ou (7) de <i>Polygala sabulosa</i>	59
4.4.1	Labirinto em cruz elevado	59

4.5	Efeito do flumazenil nas ações da FAE de <i>Polygala sabulosa</i> nas convulsões induzidas por PTZ avaliadas através do registro de eletroencefalograma	67
4.5.1	Observações comportamentais	67
4.5.2	Registro do eletroencefalograma (EEG)	69
4.6	Efeito da FAE de <i>Polygala sabulosa</i> nas convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo	72
4.7	Efeito do pré-tratamento com flumazenil nas alterações comportamentais induzidas pelas dihidroestiril-2-pironas (1) ou (3) e estiril-2-pironas (4) ou (7) no labirinto em cruz elevado	73
4.8	Ação das dihidroestiril-2-pironas (1), (2) ou (3) e estiril-2-pironas (4), (5) ou (7) no ensaio de <i>binding</i> do [³ H]-flunitrazepam	81
4.9	Efeito da dihidroestiril-2-pironas (3) e estiril-2-pironas (7) na afinidade e densidade dos sítios de ligação do [³ H]-flunitrazepam	82
4.10	Estudos complementares: avaliação da toxicidade aguda da fração acetato de etila de <i>Polygala sabulosa</i>	84
4.10.1	Observação geral (Teste de Irwin)	84
4.10.2	Avaliação da atividade locomotora (campo-aberto) e coordenação motora (rota-rod)	86
4.10.3	Determinação da DL ₅₀ oral aguda	87
4.10.4	Avaliação da evolução do peso corporal	88
4.11	Estudos complementares: Avaliação da toxicidade sub-crônica da fração acetato de etila de <i>Polygala sabulosa</i>	88
4.11.1	Determinação da DL ₅₀ oral sub-crônica	88
4.11.2	Avaliação da evolução do peso corporal	89
4.11.3	Análise bioquímica do soro	90
4.11.4	Análise hematológica	91
4.11.5	Avaliação do peso absoluto e relativo dos órgãos vitais	93
4.12	Efeito do tratamento sub-crônico (30 dias) com a fração acetato de etila de <i>Polygala sabulosa</i> no labirinto em cruz elevado	94
5	DISCUSSÃO	97
6	CONCLUSÕES	115
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da ansiedade generalizada

A ansiedade é um tipo de emoção amplamente experimentada pelo ser humano ao longo de sua vida, desde os tempos mais remotos. Trata-se de um sinal de alerta do organismo como um todo, que permite ao indivíduo ficar atento a um perigo iminente, porém difuso ou vago e, assim, tomar as medidas necessárias para lidar com a ameaça. Em outras palavras, representa um fenômeno emocional comum e útil aos seres humanos, sem o qual estaríamos vulneráveis aos perigos e ao desconhecido, funcionando com valor adaptativo frente às alterações do meio ambiente que nos cerca (Graeff, 1999; Graeff et al, 1999).

A ansiedade foi positivamente selecionada ao longo do processo evolutivo, estando presente não apenas em humanos, mas possivelmente também nas demais espécies de mamíferos, bem como em escalas filogenéticas mais antigas de vertebrados (LeDoux, 1995).

Como nos demais transtornos psiquiátricos, a ansiedade na sua forma patológica, parece depender da interação entre predisposição e fatores ambientais, aqui incluídos os de natureza sociocultural e situacional. A predisposição é em parte determinada geneticamente, sendo também influenciada pelo dueto experiências marcantes durante o desenvolvimento do indivíduo *versus* meio ambiente (Cutin et al., 2003). Estudos clássicos já mostraram a relação direta existente entre o nível de ansiedade e a eficiência do desempenho intelectual. Entretanto, quando a ansiedade atinge níveis excessivos, o desempenho cognitivo fica prejudicado, função conhecida como curva de *Yerkes-Dodson*, muito utilizada no mundo acadêmico para ilustrar os aspectos adaptativos e mal-adaptativos da ansiedade (Graeff, 1999; Brandão, 2001).

Os transtornos de ansiedade são considerados os mais prevalentes entre todas as doenças psiquiátricas, com a ansiedade generalizada representando a patologia mais comum no cenário de saúde pública primária (Wittchen et al., 2002). Durante muito tempo a ansiedade generalizada era vista como uma síndrome residual caracterizada através de critérios hierárquicos de exclusão. Assim, o diagnóstico de ansiedade generalizada só era confirmado caso nenhum outro transtorno (pânico, fobias, transtorno obsessivo-compulsivo, entre outros) estivesse presente, tornando baixa tanto a sua probabilidade entre os demais transtornos, quanto sua confiabilidade diagnóstica (DSM-III). Somente em

1994 é que a ansiedade generalizada foi classificada como uma entidade psiquiátrica distinta dos demais transtornos de ansiedade, quando divulgado na 4ª edição do Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais (DSM-IV, *American Psychiatric Association*, 1994).

A ansiedade generalizada é caracterizada por preocupação excessiva e tensão contínuas durante os vários eventos diários da vida, com duração de, pelo menos, 6 meses, e incapacidade em controlar estes sentimentos. Esta condição vem acompanhada por, no mínimo, três ou mais sintomas adicionais, que podem ser psíquicos, como agitação, dificuldade de concentração, irritabilidade, ou somáticos, incluindo fadiga, tensão muscular e distúrbios do sono (DSM-IV-TR, *American Psychiatric Association*, 2002). O início dos sintomas da ansiedade generalizada é gradual e os pacientes eventualmente experimentam prejuízos no seu potencial tanto no trabalho, como na escola e nas mais diversas situações sociais, com um curso inicial entre os 13 e 30 anos de idade (Rogers et al., 1999). Trata-se, portanto, de uma doença universal, crônica, recorrente, altamente incapacitante e, freqüentemente, associada ao abuso de drogas lícitas e/ou ilícitas, além de apresentar-se em comorbidade com outras psicopatologias, principalmente a depressão (Nutt et al., 2006).

Estudos epidemiológicos realizados em vários países da Europa, em populações na faixa etária entre 18 e 65 anos, estimaram uma prevalência para a ansiedade generalizada em 1,5 % ao ano e 5,1 % ao longo da vida, sendo duas vezes mais freqüente em mulheres do que em homens (Baldwin et al., 2005; Kinrys e Wygant, 2005; Wittchen e Jacob, 2005). Nos Estados Unidos, americanos adultos são acometidos por esta psicopatologia nas proporções de 2,1 % ao ano e 4,1 % ao longo da vida (Grant et al., 2005). No Brasil, particularmente nos bairros Jardim América e Vila Madalena do Estado de São Paulo, a estimativa de prevalência foi de 1,7 % ao ano e 4,2 % ao longo da vida (Andrade et al., 2002).

1.1.1. Tratamento farmacológico atual da ansiedade generalizada

Nos últimos 50 anos, grandes avanços ocorreram por parte da indústria farmacêutica no tocante aos tratamentos farmacológicos dos transtornos de ansiedade. Particularmente em relação à ansiedade generalizada, por muitos anos a única alternativa terapêutica eram os benzodiazepínicos (BDZ). Desde a introdução do clordiazepóxido em 1960, os BDZ foram considerados o maior sucesso da farmacologia comportamental

devido ao seu amplo espectro de propriedades farmacológicas, tais como ansiolítica, hipno-sedativa, relaxante muscular, anticonvulsivante e amnésica (Sanger et al., 2003). Além disso, outros fatores contribuíram para sua popularidade, como o rápido início de ação na sintomatologia da ansiedade e a boa margem de segurança (se comparados aos barbitúricos, seus antecessores) quando utilizados a curto-prazo.

Ao longo da história, os BDZ foram considerados as drogas mais prescritas no mundo. No Brasil, por exemplo, nos anos de 1988 e 1989, o consumo de BDZ foi de aproximadamente 20 doses diárias definidas, similar ao consumo diário nos Estados Unidos (Nappo e Carlini, 1993). Na década de 90, em Belo Horizonte (MG), o uso de agentes ansiolíticos/hipno-sedativos em idosos atingiu índices de 95 % dos entrevistados e em uma pequena cidade de São Paulo, 50 % dos entrevistados usavam BDZ (Noto et al., 2002). Em 1992, Woods e colaboradores estimaram que esta classe de medicamentos foi responsável por 83 % das prescrições mundiais de ansiolíticos. Em 2001, foram consumidos no mundo aproximadamente 27 bilhões de doses diárias de BDZ (CEBRID, 2001). Esses dados forneceram fortes motivos de inquietação mundial por parte das autoridades de saúde, já que inúmeros problemas referentes aos efeitos colaterais agudos e crônicos desta classe de drogas ficaram patententes ao longo do tempo.

Após a introdução da buspirona no mercado farmacêutico na década de 80, a única azaspirona disponível no Brasil, o leque de medicamentos eficazes no tratamento da ansiedade generalizada tem se ampliado. Assim, várias classes de drogas surgiram como alternativa terapêutica e demonstraram ser eficazes no controle da ansiedade generalizada. Entre elas estão os antidepressivos tricíclicos (imipramina, clomipramina), os inibidores da recaptação de serotonina (paroxetina, fluoxetina), os inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (venlafaxina), β -bloqueadores (propranolol) e anti-histamínicos H₁ (hidroxizina). Outras abordagens terapêuticas também vêm ganhando espaço na pesquisa científica destacando-se os inibidores da monoaminoxidase, antipsicóticos, estabilizadores do humor, agonistas e antagonistas de receptores de serotonina (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃), antagonistas de receptores neuropeptídicos (CCK, NPY, SP), inositol e agonistas parciais de receptores BDZ (para revisão, ver Argyropoulos et al., 2000).

Embora a buspirona e os antidepressivos sejam prescritos no tratamento atual da ansiedade generalizada, os BDZ ainda permanecem como a terapia medicamentosa preferida (Uhlenhuth et al., 1999; Stahl, 2002; Atack et al., 2003; Basile et al., 2004; Basile et al., 2006). Contudo, o uso dos BDZ é limitado devido aos seus vários efeitos indesejáveis no tratamento da ansiedade generalizada, tais como sedação, insônia rebote,

reações paradoxais, relaxamento muscular, ataxia, amnésia anterógrada, potencialização dos efeitos depressores do álcool, dependência e tolerância (Ashton, 1994), fatores que tornam a relação risco/benefício desfavorável para esta classe de drogas.

Até o presente momento, não existe um fator etiológico evidente que caracterize a ansiedade generalizada muito menos um tratamento eficaz desprovido de efeitos colaterais. Tendo em vista este conjunto de fatores, novas pesquisas são necessárias com o intuito de buscar compostos ansio-seletivos com menor potencial de induzir reações adversas, comuns nos BDZ. É neste contexto que está inserido o potencial uso de plantas medicinais como alternativa na pesquisa de novos medicamentos para o tratamento de psicopatologias (Andreatini, 2000; Beaubrum e Gray, 2000; LaFrance et al., 2000; Mantani et al., 2002; Carlini, 2003, Cass, 2004; Zhang, 2004; Roy-Byrne et al., 2005; Wheatley, 2005; Ernst, 2006), particularmente para a ansiedade generalizada, foco de estudo desta tese.

1.2. Contribuição das plantas medicinais na descoberta de novas terapias alternativas

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas em diversas partes do mundo no tratamento de várias doenças, dentro de um contexto cultural na medicina popular, como única opção pelas populações mais carentes, como alternativa terapêutica nos países ricos e desenvolvidos, e como fonte geradora de novas moléculas biológicas, prototípicas ou não, pela indústria farmacêutica mundial. Na área de saúde psiquiátrica, em 1998, nos Estados Unidos, se estimou que 43 % da população que sofria de transtornos de ansiedade usavam alguma forma de terapia complementar (Eiseberg et al., 1998), sendo as plantas medicinais as mais populares (Astin, 1998; Wong et al., 1998). No Brasil, país com a maior biodiversidade mundial (estimada em torno de 20 % do total mundial), as plantas superiores respondem por aproximadamente 24 % da biodiversidade (Guerra et al., 2001). Com o seu grande patrimônio genético representado pelos seus cinco biomas principais (floresta amazônica, floresta atlântica, cerrado, caatinga e pantanal), associado à rica diversidade étnico-cultural envolvendo grupos indígenas, europeus e africanos, o Brasil representa uma grande potência para o desenvolvimento de novos medicamentos a base de plantas medicinais (Rodrigues e Carlini, 2005; Giorgetti et al., 2007). Além do mais, mesmo na vegetação de restingas, dunas, bosques, campos nativos e áreas rurais, também são encontradas inúmeras espécies brasileiras as quais são atribuídas propriedades terapêuticas. Entretanto, em virtude da alta tecnologia e dos riscos inerentes ao desenvolvimento de novos medicamentos, alguns poucos países desenvolvidos, liderados

pelos Estados Unidos e alguns países da Europa, detêm as maiores indústrias farmacêuticas mundiais que dominaram as modernas tecnologias no mercado farmacêutico (Calixto, 2000).

Atualmente, aproximadamente 40 % dos medicamentos disponíveis na terapêutica foram desenvolvidos de fontes naturais, sendo 25 % a partir de plantas, 13 % de microorganismos e 3 % de animais (Calixto, 2001). Somente no período entre 1983-1994, das 520 novas drogas aprovadas pela Agência Americana de Controle de Medicamentos e Alimentos (FDA), 39 % (220 drogas) foram desenvolvidas a partir de fontes naturais (Cragg et al., 1997; Shu, 1998). No Brasil, 84 % de todos os medicamentos utilizados pela população são importados de outros países e 78 % do processamento local de medicamentos são conduzidos por companhias multinacionais. Por outro lado, sessenta por cento de todos os medicamentos disponíveis são consumidos por apenas 23 % da população, levando a maioria dos brasileiros buscar remédios caseiros à base de plantas medicinais como única alternativa terapêutica. Esta situação persiste desde o fim da 2ª. Guerra Mundial e, infelizmente, não é uma característica exclusiva do Brasil (Lapa et al, 2003). Ainda a este respeito, a OMS estimou que aproximadamente 80 % da população mundial utilizam diretamente da natureza as plantas medicinais como principal fonte de tratamento em seus cuidados básicos de saúde. Neste sentido, as plantas medicinais representam uma via alternativa na redução da importação de produtos medicamentosos, que são onerosos e inviabilizam seu acesso por parte da população (Elisabetsky e Costa-Campos, 1996).

Segundo Joffe e Thomas (1989), 50% das espécies vegetais do mundo estão localizadas em sete países “megadiversidades”: Brasil, Colômbia, México, Zaire, Madagascar, Indonésia e Austrália. Se compararmos o número de espécies endêmicas por país/região é possível entender melhor porque os trópicos representam foco de perspectiva da descoberta de novas drogas, conforme ilustra a Tabela 1.

Tabela 1 - Número de espécies vegetais endêmicas por país/região. Retirado de Cunningham, 1996.

País/Região	Número de espécies vegetais endêmicas
Suíça	1
Alemanha	16
Reino Unido	73
México	3.376
Região Amazônica	25.000 a 30.000

Com isso, o Brasil, pelo fato de estar entre as sete “megadiversidades”, deveria ser o foco prioritário de investigação farmacológica de novos medicamentos, e da realização de pesquisas que resgatassem o conhecimento popular em relação aos recursos genéticos, para que eles pudessem ser conhecidos, estudados e conservados.

Até pouco tempo, os levantamentos etnofarmacológicos no estudo de plantas priorizavam a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica, dando-se pouca importância aos demais biomas do Brasil. A situação atual vem sendo revertida e um crescente interesse em pesquisas no cerrado e no Pantanal-Matogrossense tem ocorrido, diante da especulação do promissor potencial farmacológico presente em suas floras (Rodrigues e Carlini, 2004; 2005).

Oitenta por cento dos laboratórios que utilizam pesquisas com plantas medicinais para o desenvolvimento de futuros medicamentos, obtêm informações no que concerne a este tema com base na literatura e bancos de dados, sobrepondo-se à pesquisa de campo, que poderia resgatar o conhecimento empírico de determinados grupos humanos e favorecer a taxa de sucesso nos testes de investigação farmacológica (Kate e Laird, 1999). Neste sentido, os lucros oriundos do desenvolvimento de tais medicamentos desconsideram a população que, de alguma maneira, representa a base de toda a informação a respeito de plantas.

Embora apenas cerca de 10 % da biodiversidade mundial tenha sido estudada, 140 mil metabólitos intermediários oriundos, sobretudo, de plantas superiores e microorganismos, foram isolados e caracterizados, mas uma esmagadora maioria ainda não foi avaliada biologicamente (Verpoorte, 1998). O Brasil, por sua vez, das 60 mil espécies vegetais superiores catalogadas, apenas 8 % foi estudada para pesquisa de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (Guerra et al., 2001). Neste sentido, parece irônico que o Brasil, com uma das maiores floras medicinais, ainda não utilize adequadamente produtos à base de plantas brasileiras, resultado tanto do uso insatisfatório da sua biodiversidade e conhecimento popular quanto à pesquisa e o desenvolvimento de agentes fitoterapêuticos.

Por outro lado, o grande aumento no número de publicações científicas relacionadas ao estudo de plantas medicinais é um retrato do crescente interesse que tal assunto despertou na última década, tanto na comunidade científica, quanto na indústria farmacêutica (Briskin, 2000; De Smet, 2002; Carlini, 2003). Nota-se, inclusive, nas autoridades de saúde, a grande importância e respeito que foi dado ao tratamento à base de plantas medicinais, especialmente nos países menos desenvolvidos, que não possuem

acesso aos produtos sintéticos, normalmente mais onerosos (Akerle, 1992; De Smet, 2002). A Figura 1 mostra o número de publicações em revistas científicas internacionalmente indexadas, ilustrando o cenário do crescente interesse pela comunidade científica no tocante às plantas medicinais, durante o período de 1994-2003.

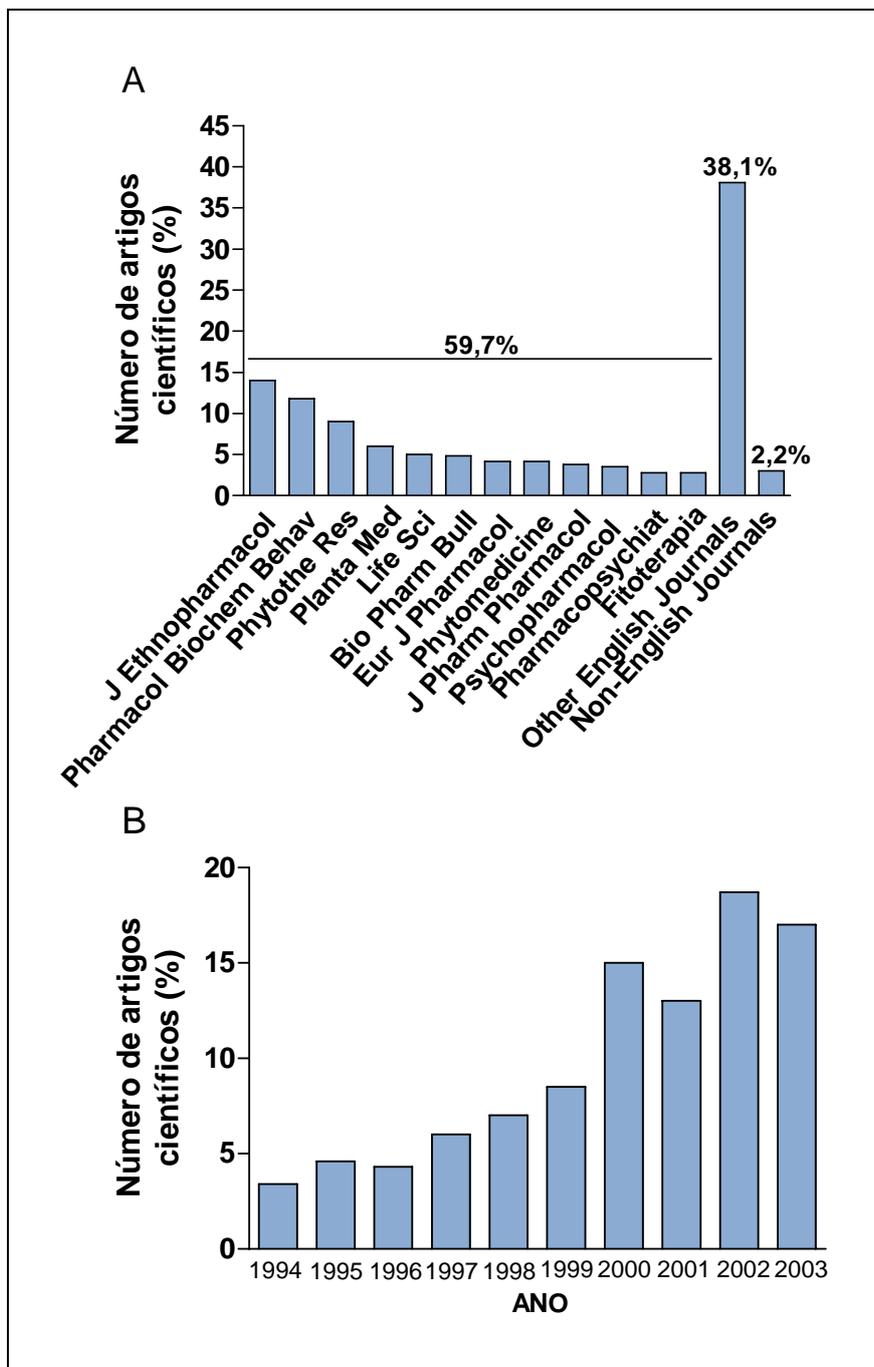


Figura 1 – Número de publicações científicas relacionadas à pesquisa com plantas medicinais distribuídos por revistas indexadas (A) e ao longo dos anos (B). Fonte: Adaptado de Zhang, 2004.

Existe assim um conjunto de fatores que levaram ao rápido crescimento do mercado internacional e o interesse da população por medicamentos à base de plantas medicinais. Entre eles, podemos destacar: a preferência por parte da população por terapias de origem natural; a grande variedade de efeitos colaterais promovidos pela terapia de origem sintética, associada à crença popular errônea de que os medicamentos a base de plantas são desprovidos de efeitos colaterais; a falta de êxito dos medicamentos sintéticos no tratamento de determinadas doenças; a propagação e divulgação de estudos científicos comprovando a eficácia clínica e segurança de alguns produtos fitoterápicos e, às vezes, o menor custo destes produtos quando comparados aos sintéticos (Wagner, 1999; Calixto, 2000, Elvin-Lewis, 2001).

Vários estudos clínicos já demonstraram os benefícios do tratamento com plantas medicinais em certas condições psiquiátricas, mais notavelmente na depressão, ansiedade, transtorno de pânico, insônia, demência e esquizofrenia (Wong et al, 1998; Fugh-Bernam e Cott, 1999; Ishikawa et al., 2000; Lake, 2000; Zhang et al., 2001; Mantani et al., 2002; Desai e Grossberg, 2003; Perry et al., 2003). No Brasil, alguns exemplos de sucessos terapêuticos à base de plantas na área da psicofarmacologia podem ser citados: Valmane[®] ou Valeriane[®], à base de um extrato padronizado de *Valeriana officinalis*; Tebonin[®], Tanakan[®], Kiadon[®], Equitan[®] ou Ginkoba[®], a base de extrato de *Ginkgo biloba*; Laytan[®] ou Kawa-kawa[®], extratos padronizados de *Piper methysticum*; Hyperico[®], Iperisan[®], Börnin[®], Fiotan[®], Jarsin[®] ou Hiperex[®], extratos padronizados de *Hypericum perforatum*. Recentemente, num estudo abordando a utilização de fitoterápicos na região de Florianópolis/SC, Alexandre e Simões (2004) identificaram como fitoterápicos mais utilizados pela população o Kava-kava e o Hipérico, utilizados como ansiolítico e antidepressivo, respectivamente. Entretanto, é importante ressaltar que todos estes produtos comercialmente disponíveis e prescritos por nossa medicina são constituídos à base de vegetais importados de outros países e sem comprovação de eficácia e segurança.

Um dos produtos fitoterápicos que fez bastante sucesso nos últimos anos no tratamento clínico da ansiedade foi o Kava-kava (Laytan[®] ou Kawa-kawa[®]), citado anteriormente. A Kava-kava, uma espécie de planta nativa das Ilhas do Pacífico, é ainda amplamente utilizada em várias partes do mundo no tratamento da ansiedade e insônia pela medicina tradicional. Diversos estudos mostraram suas propriedades ansiolíticas (Pittler e Ernst, 2000; Smith et al., 2001; Bilia et al., 2002; Rex et al., 2002; Garret et al., 2003; Pittler e Ernst, 2003; Witte et al., 2005), sendo seus efeitos atribuídos às kavalactonas,

especialmente à dihidrokavaína (Smith et al., 2001). Entretanto, relatos de hepatotoxicidade de preparações comerciais de kava foram relatados, levando vários países a remover estes produtos do mercado farmacêutico (Strahl et al., 1998; Escher et al., 2001; Russman et al., 2001; Blumenthal, 2002; Brauer et al., 2003). Contudo, enquanto as origens desta suposta toxicidade permanecem sem uma explicação adequada, até o momento, elas parecem não estar relacionadas às kavalactonas (Singh et al., 2005).

1.2.1. O sítio de ligação benzodiazepínico/GABA_A como alvo de substâncias isoladas de plantas medicinais

O ácido γ -aminobutírico (GABA) foi descoberto em 1950 e é o principal neurotransmissor do sistema nervoso central de mamíferos, possuindo importância fundamental no controle do balanço global entre a excitação e a inibição da atividade neuronal, regulando assim, inúmeras funções neurofisiológicas, entre elas, convulsões, ansiedade e o sono (Nutt, 2001).

O conhecimento detalhado da composição estrutural do complexo receptor GABA_A/BDZ, bem como o de sua distribuição ao longo do sistema nervoso central, é de grande importância farmacológica, pois permite, por exemplo, a descoberta de drogas ansiolíticas mais específicas que atuem em regiões encefálicas de interesse, evitando ou atenuando, portanto, os efeitos indesejáveis que acompanham as drogas com menor especificidade de ligação. Assim, o receptor GABA_A é uma glicoproteína estrutural heteroligomérica constituído de cinco subunidades polipeptídicas pertencentes a diferentes famílias ou classes, cada qual com suas respectivas isoformas, a saber: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π e θ (Korpi et al., 2002). Entre as classes, há cerca de 30 % de homologia na seqüência de aminoácidos, ao passo que entre as isoformas de uma mesma classe, esta homologia está situada em torno de 70 % (Korpi et al., 2002). No entanto, é de fundamental importância lembrar que, embora exista uma variedade de subunidades, apenas é necessária a presença das subunidades α , β e γ , com suas múltiplas variantes, para que o receptor seja totalmente funcional (Fritschy e Mohler, 1995). A estequiometria das subunidades mais abundantes é $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, representando 60-90 % dos receptores GABA_A no encéfalo adulto, enquanto as subunidades α_2 , α_3 , α_5 , β_3 e δ representam entre 15-30 % destes receptores. Já as subunidades α_4 , α_6 , β_1 , γ_1 e γ_3 representam menos de 10 % dos receptores GABA_A (Fritschy e Mohler, 1995) e as subunidades restantes, que são menos abundantes, se localizam

significativamente apenas em discretos circuitos neuronais encefálicos (Korpi et al., 2002). Cada subunidade do receptor GABA_A é constituído por um grande domínio N-terminal extracelular, de aproximadamente 220 aminoácidos, 4 domínios transmembrânicos (M_1 , M_2 , M_3 e M_4), uma grande alça intracelular localizada entre os domínios M_3 e M_4 , que possui sítios de fosforilação e participa do mecanismo regulatório intracelularmente (ver Figura 2).

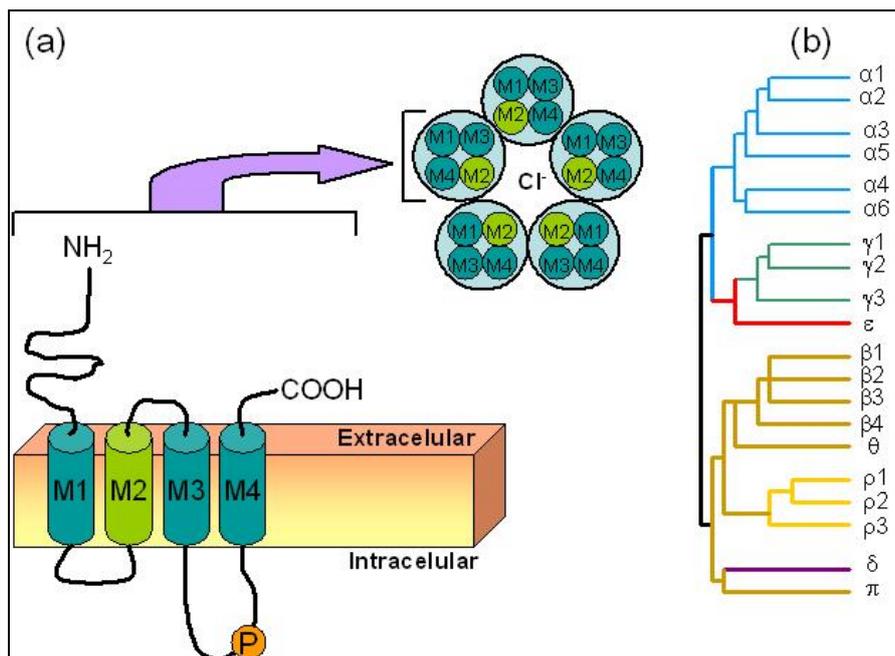


Figura 2 - Estrutura de cada subunidade que compõe o receptor GABA_A , destacando-se os quatro domínios transmembrânicos (M_1 , M_2 , M_3 e M_4), a porção N e C-terminal extracelularmente e alça citoplasmática intracelularmente (a), e as diferentes subunidades do receptor GABA_A clonadas e seqüenciadas até o momento (b). Fonte: Adaptado de Whiting et al., 1999.

O complexo receptor GABA_A expressa vários sítios de ligação, que por sua vez, estão direta ou indiretamente ligados ao canal de cloreto. Com isso, este receptor é capaz de interagir com o neurotransmissor GABA, mas também com drogas como barbitúricos, BDZ, etanol, picrotoxina, neuroesteróides, anti-helmínticos (por exemplo, avermectina B1a), furosemida, clozapina e anestésicos voláteis, além de cátions (por exemplo, Zn^{2+} ; Korpi et al., 2002).

Vários agentes farmacológicos, interagindo com o receptor GABA_A , podem ser eficazes na ansiedade, bem como nas crises de ausência, por aumentarem ou reduzirem a inibição sináptica rápida mediada por estes receptores (Brabcova, 1993; Lydiard, 2003;

Brevard et al., 2006). Neste sentido, agonistas GABAérgicos agem como moduladores positivos, promovendo um aumento do influxo de íons cloreto, hiperpolarizando a membrana pós-sináptica neuronal e dificultando a passagem do potencial de ação; resultando, conseqüentemente, nas propriedades hipno-sedativa, ansiolítica e/ou anticonvulsivante. Por outro lado, agonistas inversos são moduladores alostéricos negativos, que ocasionam uma diminuição no influxo de íons cloreto em resposta ao GABA, induzindo respostas ansiogênicas e/ou pró-convulsivantes. Por sua vez, antagonistas GABAérgicos são destituídos de qualquer efeito farmacológico direto, mas são capazes de antagonizar as ações de agonistas e agonistas inversos (para revisão, ver Korpi et al., 2002).

Os agonistas parciais seletivos para determinadas subunidades do complexo receptor GABA_A têm sido alvo de grande interesse na pesquisa científica, e por parte da indústria farmacêutica, na busca de novas terapias com propriedades ansiolíticas desprovidas ou com menos efeitos colaterais comuns aos agonistas totais, como o diazepam (DZP; Kleven e Koek, 1999; Basile et al., 2004; Atack, 2005). A resposta biológica sub-máxima dos agonistas parciais pode ser modificada pela sensibilidade do tecido alvo, que é dependente da densidade de receptores e da eficiência do mecanismo de transdução de sinal do tecido. Em um órgão de grande heterogeneidade celular e funcional, como o cérebro, existem diferenças na distribuição regional dos subtipos de receptores GABA_A, podendo refletir em diferenças na sua funcionalidade (Basile et al., 2006). Estudos indicam que para os efeitos ansiolíticos de determinadas drogas é requerida uma ativação parcial dos receptores GABA_A constituídos por subunidades α_2 , enquanto que para os efeitos mio-relaxantes é necessária uma maior ocupação/ativação dos receptores GABA_A (Reynolds et al., 2001; Atack, 2003). Recentemente, o agonista parcial de receptores GABA_A ocinaplon mostrou propriedades ansiolíticas em roedores, primatas e humanos, comparável aos benzodiazepínicos, porém com menor índice de sedação e incoordenação motora (Lippa et al., 2005). Estes dados, em conjunto, servem de estímulo para a condução de novos estudos na busca de uma melhor compreensão dos substratos moleculares envolvidos na modulação da ansiedade generalizada, bem como no desenvolvimento de novas drogas ansioseletivas para o seu tratamento.

Nos últimos anos, têm sido detectadas em várias plantas substâncias capazes de se ligarem no receptor GABA_A (Johnston e Beart, 2004; Kavvadias et al., 2004; Baur et al., 2005). Entre os diferentes sítios alostéricos presentes neste receptor, um dos mais extensivamente estudados, e que apresenta maior importância clínica, é o sítio BDZ (ver

Figura 3). Este sítio está localizado na interface das subunidades α e γ (McKernan e Whiting, 1996), sendo que a presença deste sítio ocorre somente quando da co-expressão das subunidades $\alpha_x, \beta_x, \gamma_2$ ou $\alpha_x, \beta_x, \gamma_3$ (Luddens et al., 1995).

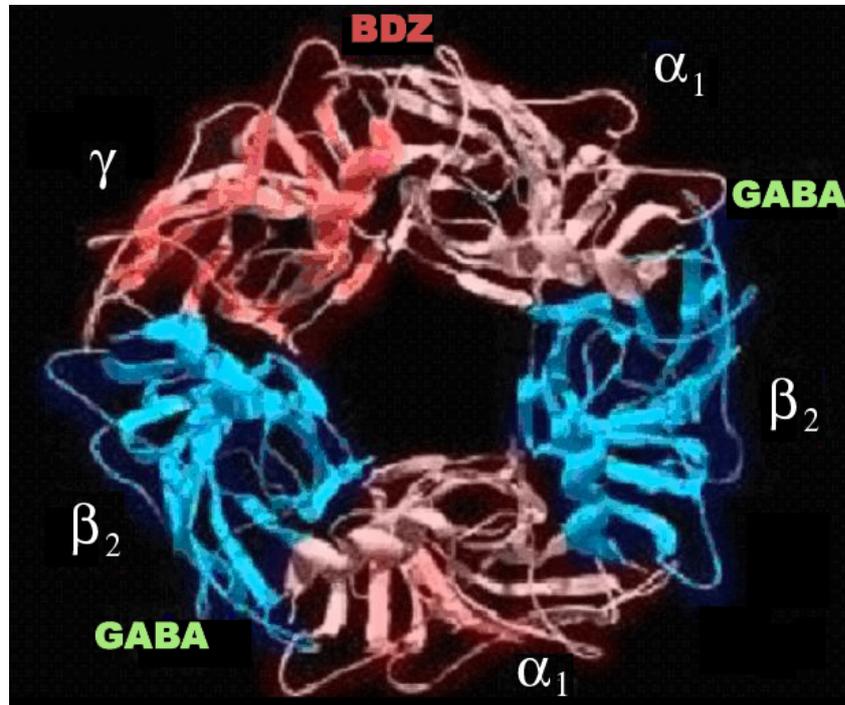


Figura 3 - Localização do sítio de ligação benzodiazepínico (BDZ) no complexo receptor GABA_A. Fonte: Adaptado de Czajkowski, 2006.

Das subunidades α , somente as do tipo α_1, α_2 e α_3 e α_5 permitem a ligação de drogas BDZ, mas a subunidade γ_2 também é necessária para a afinidade dos BDZ em mamíferos (Korpi et al., 2002). A Figura 4 mostra a distribuição das subunidades α_1, α_2 e α_3 e α_5 do receptor GABA_A no cérebro de camundongos, além de destacar as principais ações farmacológicas mediadas pelas subunidades α_1 e α_2 .

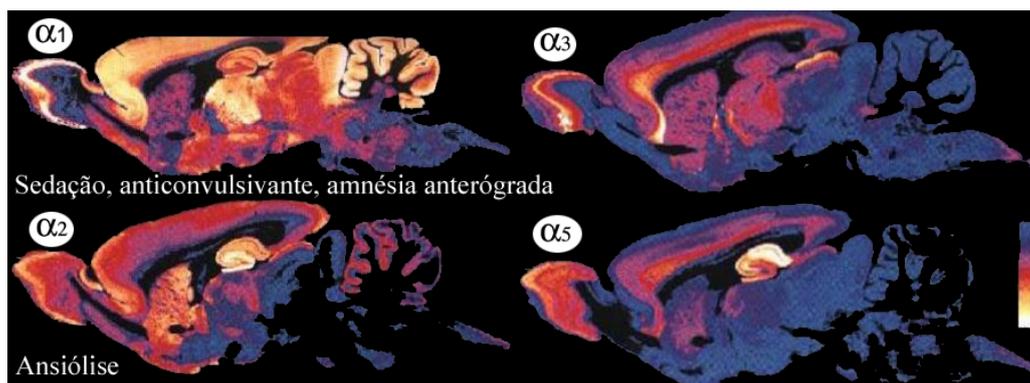


Figura 4 - Distribuição cerebral das quatro classes de subunidades α sensíveis aos benzodiazepínicos em cérebro de camundongos (secções cerebrais sagitais processadas por imunohistoquímica). Fonte: Adaptado de Möhler et al., 2002.

Para a busca de novos ligantes do sítio de ligação BDZ que conservem algumas das propriedades terapêuticas dos BDZ (por exemplo, os efeitos ansiolíticos) e que careçam dos efeitos indesejáveis destas drogas, diferentes estratégias podem ser utilizadas. Uma delas é buscar agonistas parciais dos receptores BDZ, ou seja, que possuam menor eficácia comparada aos agonistas totais, como por exemplo, o bretazenil (Costa e Guidotti, 1996; Atack, 2005); investigar compostos agonistas totais com afinidade seletiva por determinados subtipos de receptores BDZ (Mohler et al., 2001); buscar agonistas parciais para um determinado subtipo de receptor BDZ, como por exemplo, o alpidem e zolpidem (Morton e Lader, 1990; Nazar et al., 1997; Mohler et al., 2001).

A este respeito, os metabólitos secundários de plantas têm servido como uma grande fonte de drogas por séculos. O interesse na busca de compostos como fonte de novos medicamentos deriva das necessidades terapêuticas e da grande diversidade tanto em suas estruturas químicas, quanto em suas atividades biológicas.

1.3. *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (Polygalaceae)

O gênero *Polygala* é o maior representante da família Polygalaceae, que inclui aproximadamente 600 espécies de ampla distribuição geográfica, abundantes e diversificadas na América Central e do Sul, África e Ásia e ausentes na Nova Zelândia, Polinésia e regiões polares. Wurdack e Smith, em 1971, descreveram a presença de 19 espécies diferentes deste gênero no estado de Santa Catarina, dentre as quais se destacam a *Polygala sabulosa*, *Polygala cyparissias* e *Polygala paniculata*.

A *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (Figura 5), popularmente denominada de “timutu-pinheirinho”, é uma planta que cresce abundantemente nas “ilhas” meridionais do Brasil e tem sido popularmente utilizada na medicina popular como anestésico tópico, devido à grande presença de salicilatos (Marques, 1996). Sua presença estende-se desde o Sudeste, nos Estados de Minas Gerais e São Paulo, até os Estados da região Sul, destacando-se as zonas de campos do planalto meridional catarinense.



Figura 5 - *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) (Foto gentilmente doada pelo Prof. Dr. Moacir Pizzolatti).

O estudo fitoquímico da espécie *P. sabulosa*, através do isolamento de derivados de estiril-pironas, colocou esta espécie de planta em uma posição quimiotaxonômica diferenciada no gênero Polygalaceae devido ao acúmulo destes compostos e a ausência de xantonas (Pizzolatti et al., 2000; Pizzolatti et al., 2004). As estiril-pironas ou estiril-lactonas são consideradas um grupo de metabólitos relativamente incomum em produtos naturais e possuem como característica molecular básica um anel γ -, δ -, ζ -lactona conectado a um fragmento estiril ou dihidroestiril. Acredita-se que a biossíntese desta classe de compostos seja resultante da rota metabólica do ácido chiquímico (Figura 6; Herderich et al., 1997). O ácido chiquímico é conhecido como uma espécie química essencial para o metabolismo secundário dos vegetais, pois a partir dele é sintetizada a maioria dos constituintes com núcleos benzênicos. Assim, ao precursor ácido cinâmico (1) são incorporadas duas moléculas de malonil-CoA, sob ação da enzima estirilpirona-sintase, formando o policetídeo como intermediário-chave (2), que, por sua vez, sofre lactonização, resultando nas estiril-pironas (3). É postulado que a síntese destes compostos nesta espécie de planta seja devido a um desvio metabólico da biossíntese de xantonas (Herderich et al., 1997).

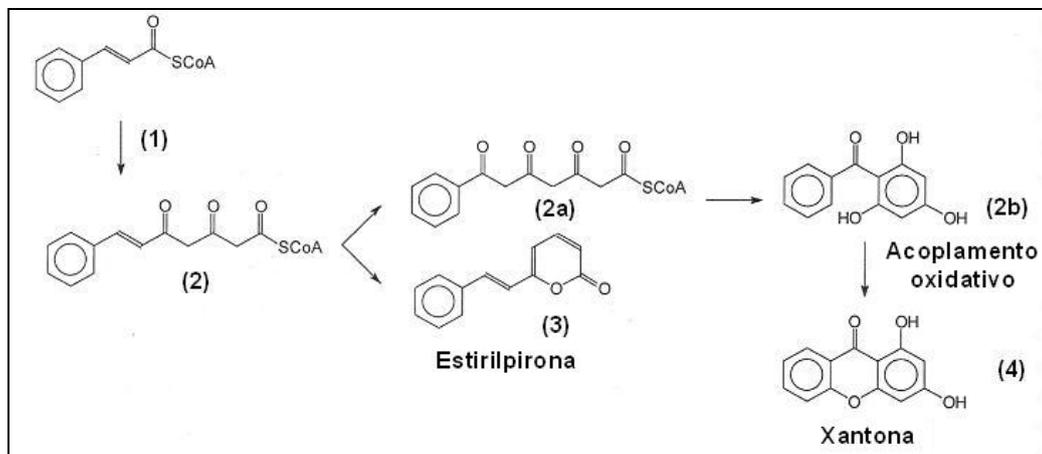


Figura 6 - Biossíntese de estirilpironas na espécie de planta *Polygala sabulosa* (proposto por Herderich et al., 1997).

Assim, a planta *P. sabulosa* é a única espécie do gênero estudada até o momento cuja rota bioquímica produz dihidroestiril-2-pironas e estiril-2-pironas com ausência de xantonas. No total, sete estiril-pironas foram isoladas até o momento, sendo três dihidroestiril-2-pironas como dihidroestiril-2-pironas (1), (2) ou (3) e quatro estiril-2-pironas como estiril-2-pironas (4), (5), (6) ou (7) (ver Figura 7; Pizzolatti et al., 2000, 2004).

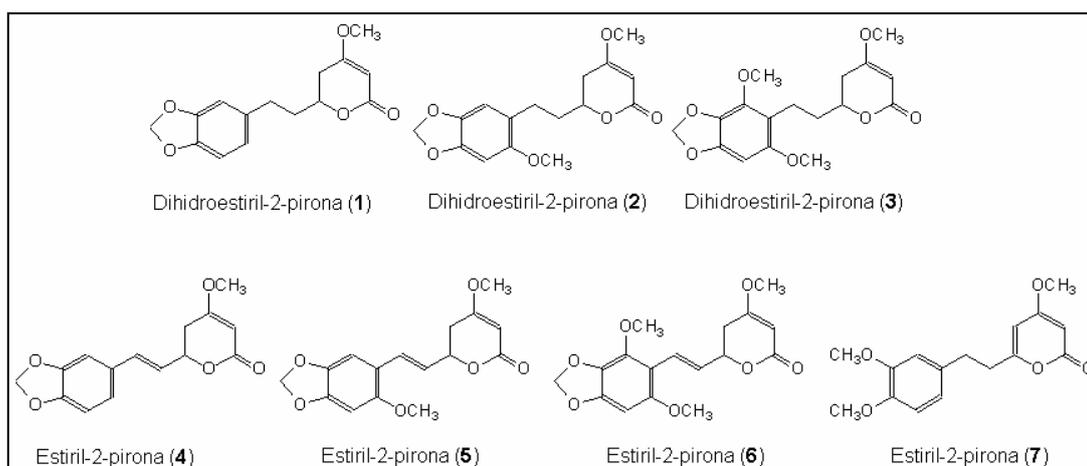
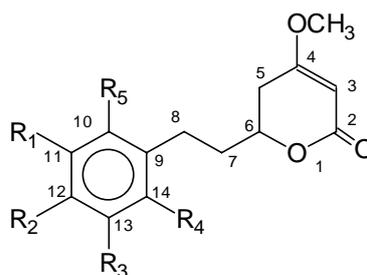


Figura 7 - Dihidroestiril-2-pironas e estiril-2-pironas isoladas da planta *Polygala sabulosa* (Pizzolatti et al., 2000, 2004).

No entanto, as estiril-lactonas que ganharam bastante destaque no meio acadêmico e vêm sendo estudadas intensamente ao longo dos anos são aquelas isoladas da planta kava-kava (como citado anteriormente), onde são conhecidas como kavalactonas ou kavapironas. Mais de 20 kavalactonas já foram isoladas e identificadas, entretanto, a metisticina, dihidrometisticina, kavaína, dihidrokavaína e iangonina são as mais abundantes, correspondendo a 96 % do extrato lipídico (Bilia et al., 2004). Na verdade, as propriedades ansiolíticas da kava-kava ainda não foram totalmente elucidadas quanto ao seu mecanismo farmacológico de ação e a maioria dos estudos pré-clínicos e clínicos foram realizados com extratos padronizados e não com cada substância isoladamente (Jussofie et al., 1994; Wheatley, 2001; Rex et al., 2002; Garret et al., 2003; Capasso e Sorrentino, 2005).

Como a planta *P. sabulosa* é fonte originária de dihidroestiril-2-pironas (DST) e estiril-2-pironas (STY), cujo esqueleto estrutural é similar às kavalactonas (kava-kava) (Figura 8), utilizando-se o princípio da similaridade estrutural, podemos ver a espécie *P. sabulosa* como uma planta com potencial atividade no sistema nervoso central, e que poderia servir como fonte de estudos para, quiçá, sua aplicação futura no tratamento da ansiedade generalizada.

A figura 8, a seguir, mostra o esqueleto carbonado básico e as diferenças estruturais observadas entre as kavapironas (kava-kava, *Piper methysticum*) e as estiril-pironas (*P. sabulosa*).



Compostos	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	C5-C6	C7-C8
DST (1)	OCH ₂ O		H	H	H	=	
DST (2)	OCH ₂ O		H	OCH ₃	H	=	
DST (3)	OCH ₂ O		H	OCH ₃	OCH ₃	=	
STY (4)	OCH ₂ O		H	H	H	=	=
STY (5)	OCH ₂ O		H	OCH ₃	H	=	=
STY (6)	OCH ₂ O		H	OCH ₃	OCH ₃	=	=
STY (7)	OCH ₃	OCH ₃		H	H	=	OCH ₃
Metisticina*	H	OCH ₂ O		H	H		=
Dihidrometisticina*	H	OCH ₂ O		H	H		
Kavaína*	H	H	H	H	H		H
7,8-dihidrokaivaína*	H	H	H	H	H		H
5,6-dihidrokaivaína*	H	H	H	H	H	=	H
Iangonina*	H	OCH ₃	H	H	H	=	H

Figura 8 - Estrutura básica e substituições das dihidroestiril-2-pironas (DST) e estiril-2-pironas (STY) de *P. sabulosa* e das principais kavalactonas de *P. methysticum** (Bilia et al., 2004).

Apesar do grande número de representantes da família *Polygalaceae*, apenas 29 espécies foram estudadas do ponto de vista químico e, entre estas, 16 apresentaram propriedades farmacológicas, destacando-se as atividades antiinflamatória, antifúngica, tripanomicida, antitumoral e hipoglicemiante (Mak et al, 1999; El Sayah et al., 1999; Kako et al, 1997; Dall'Acqua et al., 2002). Quanto às ações no sistema nervoso central, a Tabela 2 resume as principais atividades biológicas observadas para as diferentes espécies do gênero *Polygala*. Esta revisão da literatura identifica alguns trabalhos pré-clínicos realizados com este gênero, destacando as propriedades neurogênica e neuroprotetora, redução dos sinais de abstinência induzida pela retirada abrupta de opióides, efeitos mnemônicos e atividades antipsicótica, antidepressiva e anti-estresse. Além disso, a espécie *P. tenuifolia* merece destaque pelo seu amplo estudo por diversos grupos de pesquisa, conforme pode ser visualizado abaixo.

Tabela 2 - Literatura acerca das atividades biológicas de extratos e compostos isolados de espécies de plantas do gênero *Polygala*.

Espécie	Extratos/compostos	Atividade	Tipo de Estudo	Referências
<i>P. caudata</i>	xantonas	neurogênica	cultura de céls	Mak et al., 2001 Ha et al., 2006
<i>P. japonica</i>	saponinas	antidepressiva	camundongos	Li et al., 2006
<i>P. paniculata</i>	extrato	neuroprotetora	camundongos	Farina et al., 2005
<i>P. telephioides</i>	extrato metanólico	↓ sinais de abstinência induzida pela retirada abrupta de opióides	camundongos	Egashira et al., 2006
<i>P. tenuifolia</i>	extrato aquoso	anti-inflamatória (mal de Alzheimer)	cultura de céls	Kim et al., 1998
	extrato	neuroprotetora efeito mnemônico	cultura de céls ratos	Park et al., 2002
	saponinas	neuroprotetora (mal de Alzheimer)	cultura de céls	Yabe et al., 2003
	oligossacarídeo acilado	neuroprotetora	camundongos e ratos	Ikeya et al., 2004
	tenuigenina	↓ secreção da β -amilóide (mal de Alzheimer)	cultura de céls	Jia et al., 2004
	extrato aquoso	efeito mnemônico	ratos	Chen et al., 2004
	extrato aquoso	neuroprotetora	cultura de céls	Naito e Tohda, 2006
	polygalasaponinas	antipsicótica	camundongos e ratos	Chung et al., 2002
	extrato ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico	antipsicótica anti-estresse	camundongos ratos	Shin et al., 2004 Kawashima et al., 2004
	polygalatenosídeos	inibe recaptção de NA (antidepressivo)	sinaptossomas	Cheng et al., 2006
<i>P. radix</i>	tenuifolisídeo B e 3,6-disinapoilsacarose	neuroprotetora efeito mnemônico	camundongos ratos	Karakida et al., 2007

Conforme pode ser observado na Tabela 2, até o momento, não há relatos na literatura quanto às possíveis ações centrais da planta *P. sabulosa*, objeto de nosso estudo nesta tese de Doutorado.

2. OBJETIVOS

Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar a atividade farmacológica central, bem como a toxicidade aguda e sub-crônica, da planta *Polygala sabulosa* em roedores. Para tal finalidade, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

Específicos

- Investigar o perfil de atividade farmacológica central do extrato bruto hidroetanólico (EBH), frações aquosa (FA), hexânica (HEX) e acetato de etila (FAE), bem como as substâncias isoladas 6-metoxi-7-preniloxicumarina, dihidroestiril-2-pironas e estiril-2-pironas de *P. sabulosa* avaliadas, em camundongos, nos modelos do labirinto em cruz elevado, sono induzido por pentobarbital sódico, sono etéreo, convulsões induzidas por pentilenotetrazol e convulsões induzidas por eletrochoque máximo. Assim, através do fracionamento biomonitorado, esta etapa tem o intuito de determinar qual(is) a(s) fração(ões) bem como a(s) substância(s) isolada(s) é(são) responsável (is) pelas ações centrais da planta *P. sabulosa*.
- Caracterizar o mecanismo farmacológico primário envolvido nas ações centrais da(s) fração(ões), bem como da(s) substância(s) isolada(s) responsável(is) pelas ações centrais da planta *P. sabulosa* através de estudos *in vivo* e *in vitro*.
- Caracterizar os possíveis efeitos tóxicos da planta *P. sabulosa* em camundongos após o tratamento agudo e sub-crônico (32 dias).
- Investigar o possível desenvolvimento de tolerância aos efeitos centrais da planta *P. sabulosa* após o tratamento sub-crônico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Considerações éticas

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os padrões internacionais de bem-estar dos animais recomendados pela Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC) e pela *Society for Neuroscience* (SFN). Os procedimentos experimentais envolvidos neste estudo foram delineados de tal maneira a minimizar ao máximo o sofrimento dos animais. Além disso, foi utilizado um tamanho de amostra mínimo e adequado para as análises estatísticas e extraído o máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos, de acordo com os protocolos comportamentais aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (processos números 315/CEUA e 23080.027554/2004-49/UFSC).

3.2. Animais

Na maior parte deste estudo foram utilizados camundongos Swiss (albinos) machos e fêmeas, não-isogênicos, pesando entre 30 a 40 g, com cerca de 3 meses de idade. Nos estudos do registro do eletroencefalograma (convulsões induzidas por pentilenotetrazol, PTZ) foram utilizados ratos Wistar machos, pesando 300 a 350 g (3 meses de idade). Todos os animais, exceto os utilizados nos ensaios de *binding*, como indicado posteriormente, foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e, mantidos, após o desmame, no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, UFSC. Os camundongos foram alojados em número de 30 por caixa plástica e os ratos em número de 8 por caixa. Ratos e camundongos foram mantidos em salas separadas, ambas sob condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h, com luz ligada às 7:00 h), com livre acesso à água e ração. Os animais foram então transferidos do Biotério Setorial para o Biotério do Laboratório de Neurofarmacologia (com as mesmas condições de controle automático de temperatura e iluminação) e re-alojados em 20 camundongos ou 4 ratos por caixa plástica, permanecendo aí por um período de, no mínimo, 7 dias para habituação antes dos testes farmacológicos.

Para os ensaios bioquímicos (*binding* do [³H]-flunitrazepam) foram utilizados ratos Wistar machos de 200-300 g obtidos do Biotério Central da Faculdade de Farmácia e Bioquímica (Universidad de Buenos Aires, UBA), alojados em grupos de 10 por caixa plástica, e mantidos em condições ambientais similares às dos Biotérios da UFSC.

3.3. Preparações, drogas e soluções

3.3.1. Material botânico

A planta *P. sabulosa* foi coletada na região de Rancho Queimado, planalto meridional catarinense (Santa Catarina, Brasil), em Fevereiro de 2003, nas margens da rodovia 282, local onde ela foi previamente coletada e identificada pelo Prof. Dr. Olavo de Araújo Guimarães (UFPR). Uma exsicata foi catalogada sob o número 19640 e depositada no Herbário do Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná (Curitiba, PR, Brasil). A planta total foi separada de possíveis contaminantes e submetida à secagem em estufa de ar circulante com temperatura de 50°C. Após a secagem, a planta total foi triturada.

3.3.2. Obtenção dos extratos, fracionamento e isolamento de compostos

Os extratos foram obtidos através da maceração exaustiva em temperatura ambiente com etanol 96 %. Todos os extratos obtidos foram filtrados e o solvente evaporado sob pressão reduzida em temperatura inferior a 50°C, fornecendo os respectivos extratos brutos hidroetanólicos (EBH) que, em seguida, foram submetidos ao fracionamento em soluções de hexano e acetato de etila. A fração acetato de etila foi submetida a sucessivos procedimentos de cromatografia em coluna de gel de sílica eluída com concentrações crescentes de acetato de etila em hexano. As frações obtidas foram então processadas em cromatografia em coluna *flash* e os compostos purificados através de lavagens sucessivas e recristalização, resultando nos compostos isolados: 6-metoxi-7-preniloxicumarina, 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxidihidroestiril)-2-pirona (**1**) [dihidroestiril-2-pirona (**1**)], 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxo-14-metoxi-dihidroestiril)-2-pirona (**2**) [dihidroestiril-2-pirona (**2**)], 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxo-10,14-dimetoxidihidroestiril)-2-pirona (**3**) [dihidroestiril-2-pirona (**3**)], 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxiestiril)-2-pirona (**4**) [estiril-2-pirona (**4**)], 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxo-14-metoxiestiril)-2-pirona (**5**) [estiril-2-pirona (**5**)] e 4-metoxi-6-(11,12-dimetoxiestiril)-2-pirona (**7**) [estiril-2-pirona (**7**)]. Os

compostos foram identificados por suas propriedades físicas e espectroscópicas como ponto de fusão, infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , além da comparação dos índices de retenção (cromatografia gasosa) e com dados da literatura.

Os procedimentos de preparo do extrato bruto hidro-etanólico, bem como o seu fracionamento, foram realizados no Laboratório de Química Orgânica (Departamento de Química) da UFSC, pela Doutoranda Beatriz Garcia Mendes, sob a supervisão do Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, que gentilmente forneceram os referidos materiais para a realização deste estudo.

3.3.3. Drogas-padrão e soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas-padrão e soluções:

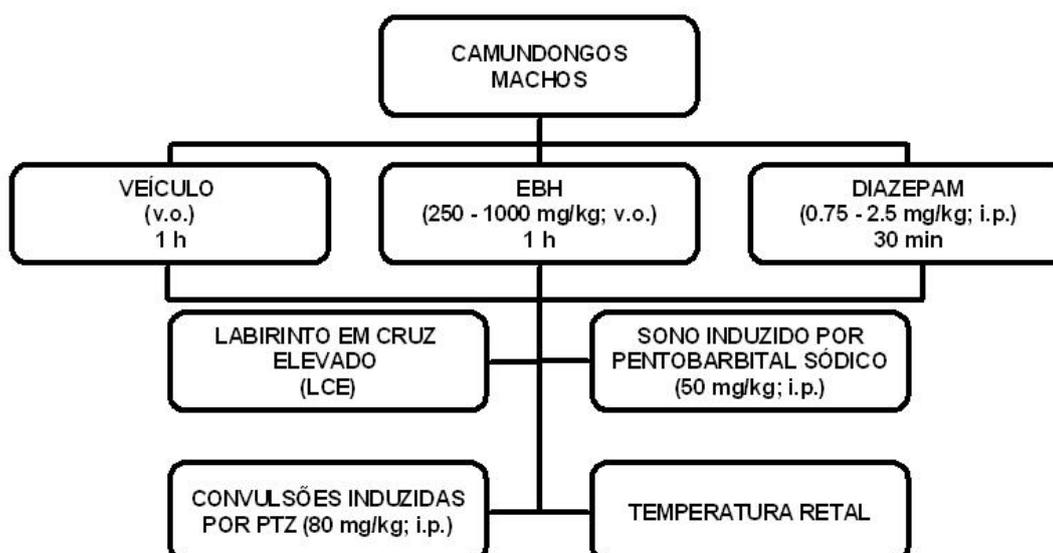
- Ácido 5-etil-5-fenilbarbitúrico (Fenobarbital[®]; Cristália Ltda, Butantã, SP, Brasil). Dissolvido em soro fisiológico com Tween-80 a 10 %;
- Ácido etilenodiaminotetraacético di-sódico (EDTA) (Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A., RJ, Brasil).
- Ácido 2-propil-pentanóico (Ácido valpróico). Dissolvido em soro fisiológico com Tween-80 a 10 %;
- PBS (*phosphate buffered solution*) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA): NaCl 137 mM, KCl 1.17 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,4;
- Cloridrato de xilazina (Anasedan[®], Vetbrands Saúde Animal, SP, Brasil);
- Cloridrato de quetamina (Francotar[®], Eurofarma Lab. Ltda, SP, Brasil);
- 7-Cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-dibenzodiazepin-2-ona (Diazepam, Dienpax[®], Sanofi-Winthrop Lab., São Paulo, SP, Brasil). Diluído em soro fisiológico com propilenoglicol a 10 % (para tratamentos i.p. ou v.o.) ou solução de PBS com DMSO a 0.8 % (para tratamento i.c.v.);
- 5H-Dibenz[b,f]azepina-5-carboxamida (Carbamazepina[®], Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Dissolvido em soro fisiológico com Tween-80 a 10 %;
- 5,5-Difenil-hidantoína sódica (Fenitoína[®]; Cristália Ltda, Butantã, SP, Brasil). Dissolvido em soro fisiológico com Tween-80 a 10 %;
- Dimetilsulfóxido (DMSO, CAQ Ltda, SP, Brasil);
- Éter etílico (F. Maia Indústria e Comércio Ltda., Cotia, São Paulo, SP, Brasil);

- Flumazenil (Tocris, MO, USA). Dissolvido em soro fisiológico (NaCl 0.9 %).
- Pentilenotetrazol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Dissolvido em soro fisiológico (NaCl 0.9 %);
- Pentobarbital sódico (Lab. Abbot, São Paulo, SP, Brasil). Dissolvido em soro fisiológico (NaCl 0.9 %);
- Propilenoglicol (CAQ Ltda, SP, Brasil).

3.4. Delineamento experimental

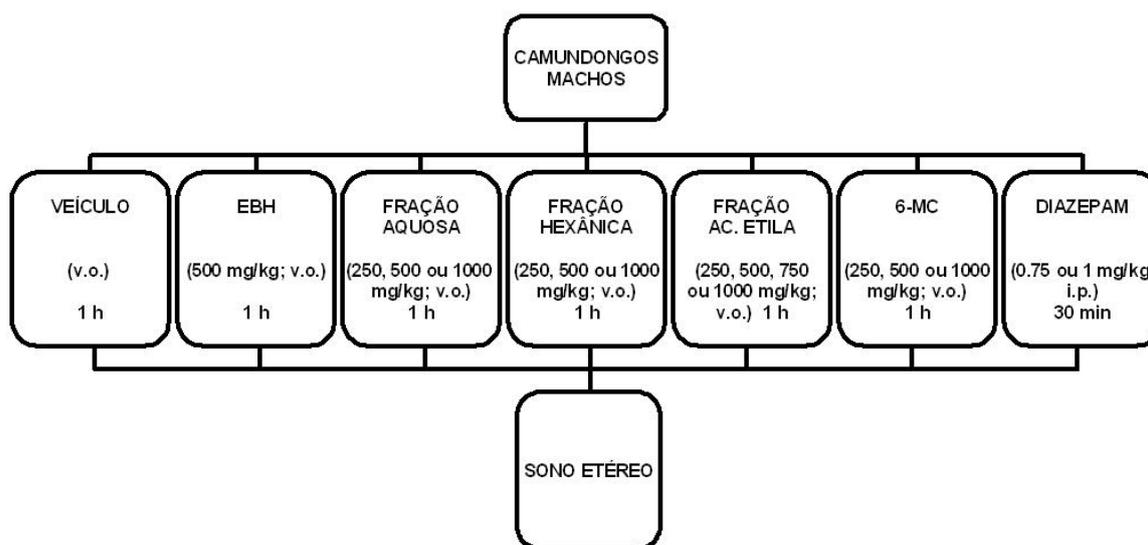
No protocolo 1, camundongos machos receberam, através de uma cânula intra-gástrica (via oral, v.o.), o EBH de *P. sabulosa* (250 - 1.000 mg/kg), em um volume constante de 0.1 mL/10 g de peso corporal. Camundongos controle foram tratados, pela mesma via e volume, com o veículo (solução aquosa a 10 % de Tween-80), e o diazepam (DZP, 0,75 - 2,5 mg/kg; i.p.) foi utilizado como controle positivo. Uma hora após os tratamentos v.o. e 30 min após a injeção i.p. de DZP, os animais foram submetidos aos diferentes testes farmacológicos: labirinto em cruz elevado (LCE), hipnose induzida por pentobarbital sódico, convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) ou temperatura retal (neste teste, a temperatura basal dos animais foi mensurada antes dos tratamentos).

Esquema 1 - Resumo do protocolo experimental 1

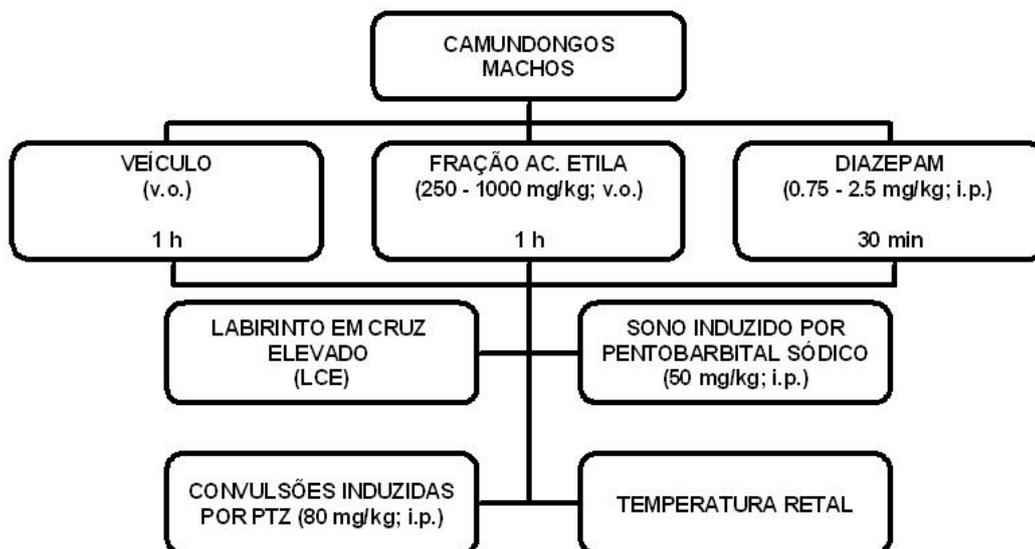


No protocolo 2, camundongos machos receberam, por v.o., veículo (solução aquosa a 10 % de Tween-80), EBH (500 mg/kg), as frações aquosa e hexânica bem como 6-metoxi-7-preniloxicumarina (250, 500 e 1.000 mg/kg) ou FAE (250, 500, 750 ou 1.000 mg/kg) isoladas de *P. sabulosa* e, 1 h após, foram submetidos ao teste da hipnose induzida por éter etílico. Este teste foi utilizado com o intuito de biomonitorar o processo de purificação e isolamento do(s) constituinte(s) ativo(s) de *P. sabulosa*. Outros camundongos receberam o veículo (controle) ou DZP (0,75 mg/kg ou 1 mg/kg; i.p.; controle positivo).

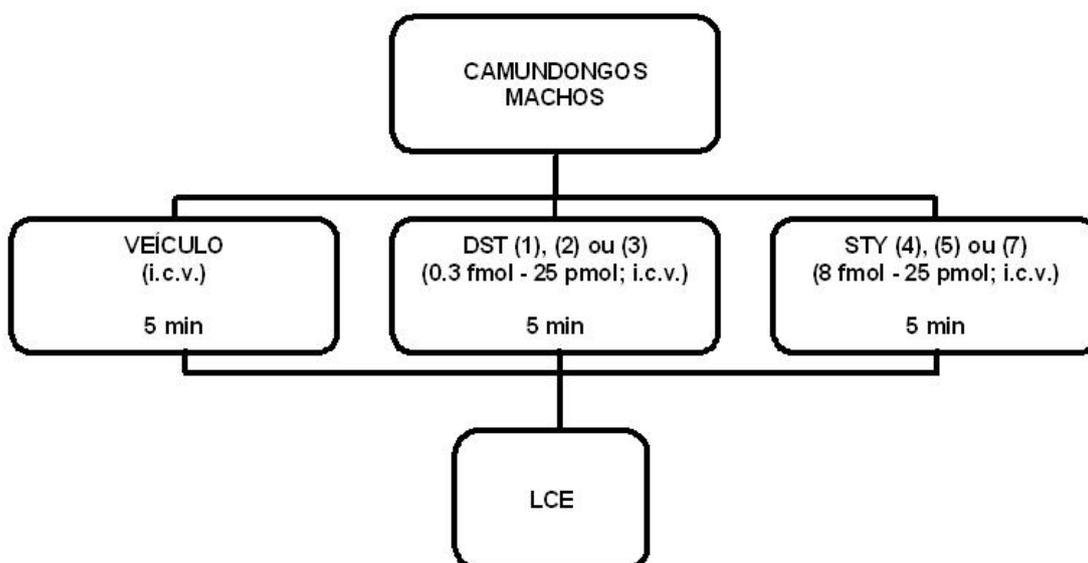
Esquema 2 - Resumo do protocolo experimental 2



No protocolo 3, camundongos machos foram tratados, por v.o., com o veículo (solução aquosa a 10 % de Tween-80) ou FAE de *P. sabulosa* (250, 500 e 1.000 mg/kg) e, 1 h após, foram submetidos aos seguintes testes farmacológicos: LCE, hipnose induzida por pentobarbital sódico, convulsões induzidas por PTZ ou temperatura retal. O veículo foi utilizado como controle e DZP (0,75 - 2,5 mg/kg; i.p.) como controle positivo.

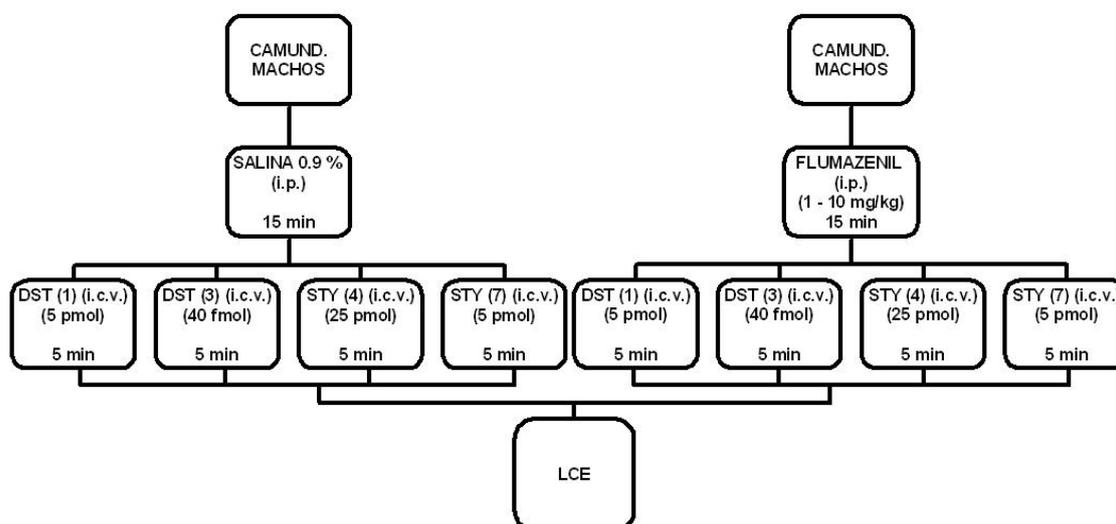
Esquema 3 - Resumo do protocolo experimental 3

No protocolo 4, camundongos machos receberam, por via intracerebroventricular (i.c.v.), o veículo (PBS a 0,8 % de DMSO) ou DST (1), (2) e (3) ou STY (4), (5) e (7), nas doses de 0,3 fmol a 25 pmol, em um volume constante de 2 μ L, e, 5 min após a recuperação postural, foram submetidos ao teste do LCE. O composto estiril-2-pirona (6) não foi testado uma vez que o rendimento durante o procedimento de extração química foi extremamente baixo, resultando em quantidade insuficiente para a realização dos testes farmacológicos.

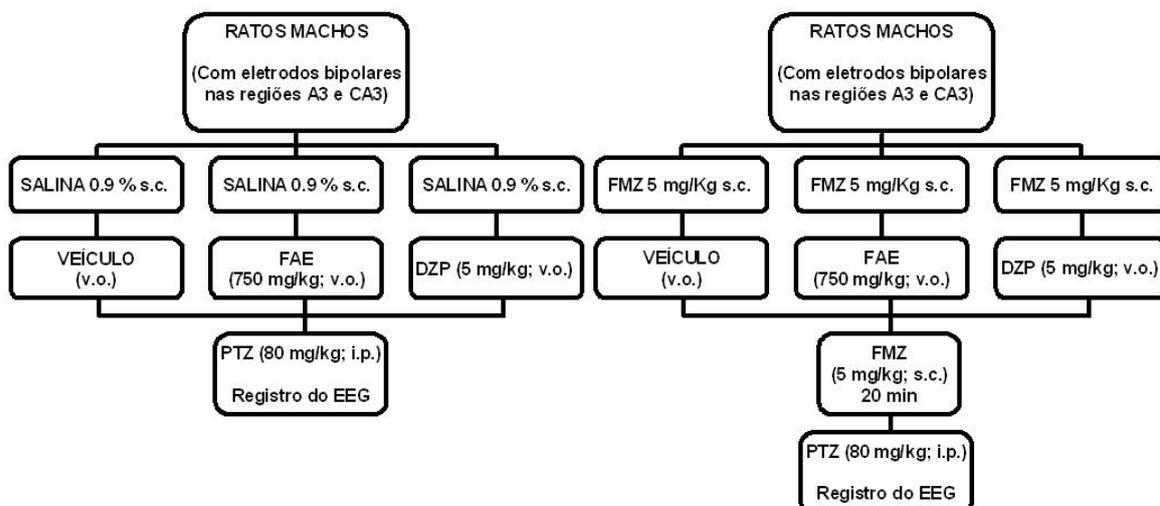
Esquema 4 - Resumo do protocolo experimental 4

No protocolo 5, camundongos machos receberam salina ou flumazenil (FMZ, 1 - 10 mg/kg) i.p., e, 15 min após, foram tratados por via i.c.v. com veículo ou DST (1) ou (3), STY (4) ou (7) (40 fmol - 25 pmol). Cinco min após as injeções centrais, os camundongos foram avaliados no LCE.

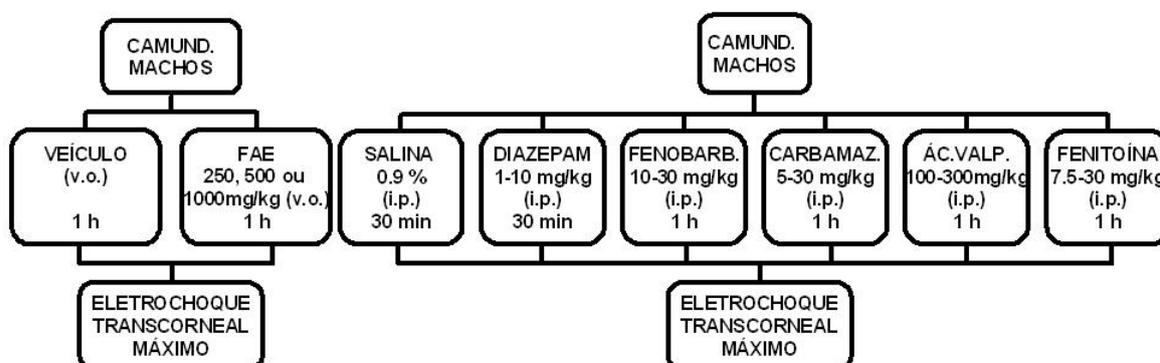
Esquema 5 - Resumo do protocolo experimental 5



No protocolo 6, ratos machos foram divididos em 6 grupos de 6 animais cada. Nos três primeiros grupos, os ratos receberam uma injeção por via subcutânea (s.c.) de salina seguido da administração por v.o. de veículo (solução aquosa a 10 % de Tween-80) (grupo 1), FAE de *P. sabulosa* (750 mg/kg) (grupo 2) ou DZP (5 mg/kg) (grupo 3) e, 1 h após, receberam uma injeção de PTZ (80 mg/kg; i.p.), sendo em seguida os registros do EEG analisados. Os demais grupos receberam FMZ (5 mg/kg) s.c. seguido da administração por v.o. de veículo (grupo 4), FAE (750 mg/kg) (grupo 5) ou DZP (5 mg/kg) (grupo 6) e, 40 min após, cada grupo recebeu uma dose suplementar de FMZ (5 mg/kg; s.c.). Vinte minutos após a última injeção de FMZ, as convulsões foram induzidas com PTZ e os registros do EEG foram analisados.

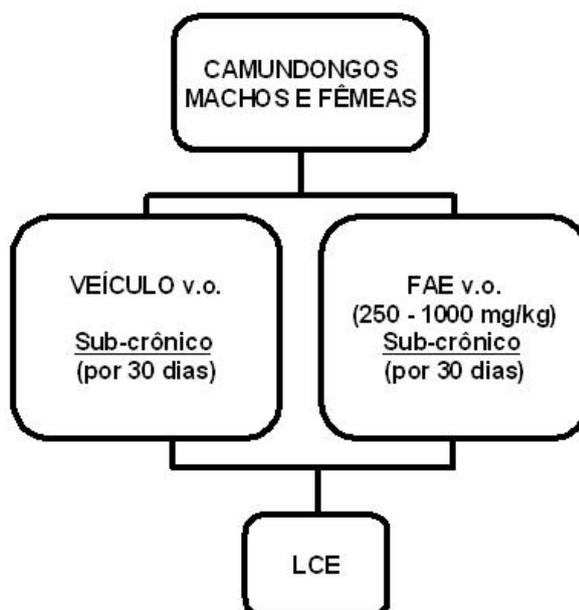
Esquema 6 - Resumo do protocolo experimental 6

No protocolo 7, camundongos machos foram tratados, por v.o., com o veículo (solução aquosa a 10 % de Tween-80) ou FAE de *P. sabulosa* (250, 500 e 1.000 mg/kg) e, 1 h após, foram submetidos às convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo (ECM). Outros grupos experimentais receberam por via i.p., salina ou DZP (1, 5, 7,5 ou 10 mg/kg), fenitoína (7,5, 15 ou 30 mg/kg), fenobarbital (10, 15, 20 ou 30 mg/kg), carbamazepina (5, 10, 20 ou 30 mg/kg) ou ácido valpróico (100, 200 ou 300 mg/kg). Trinta minutos após salina ou DZP e 1 h após fenobarbital, carbamazepina, ácido valpróico ou fenitoína, os animais foram submetidos às convulsões por ECM.

Esquema 7 - Resumo do protocolo experimental 7

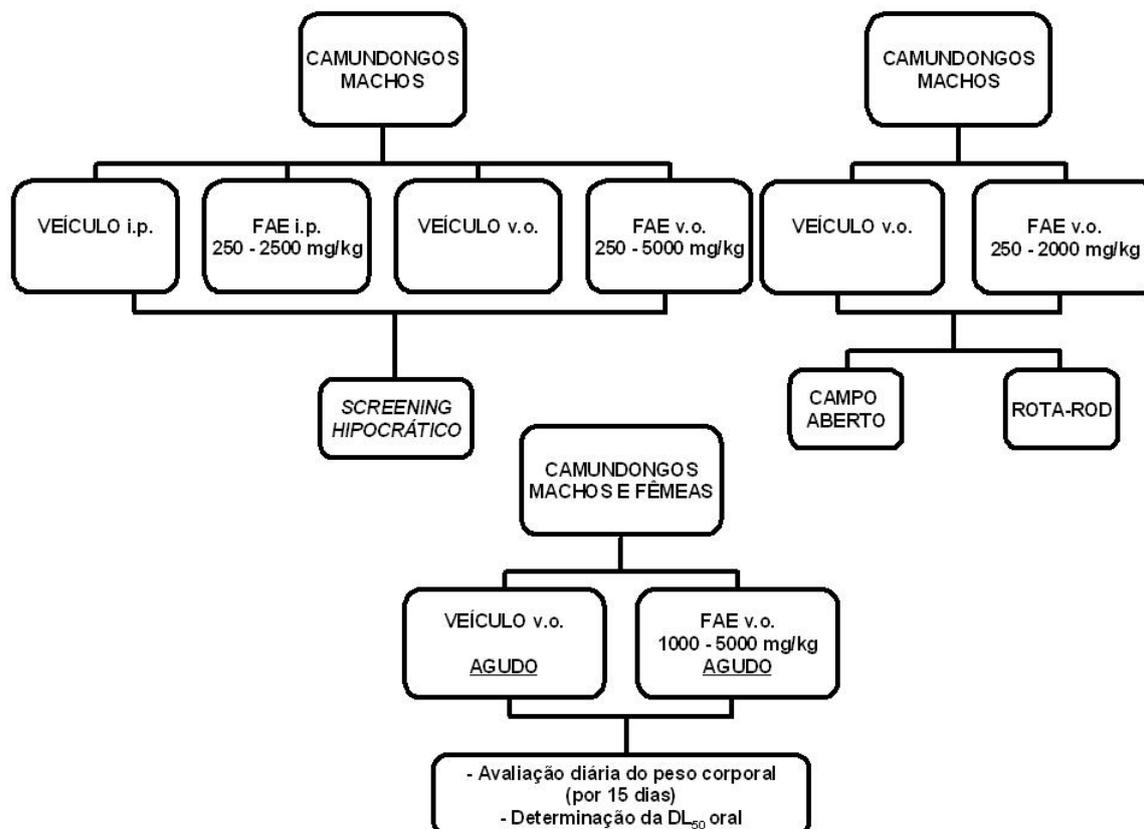
No protocolo 8, camundongos de ambos os sexos foram tratados oralmente com veículo (solução aquosa a 10 % de Tween-80) ou FAE (250, 500 ou 1.000 mg/kg), por 30 dias consecutivos e, 1 h após o último tratamento, foram submetidos ao modelo do LCE.

Esquema 8 - Resumo do protocolo experimental 8

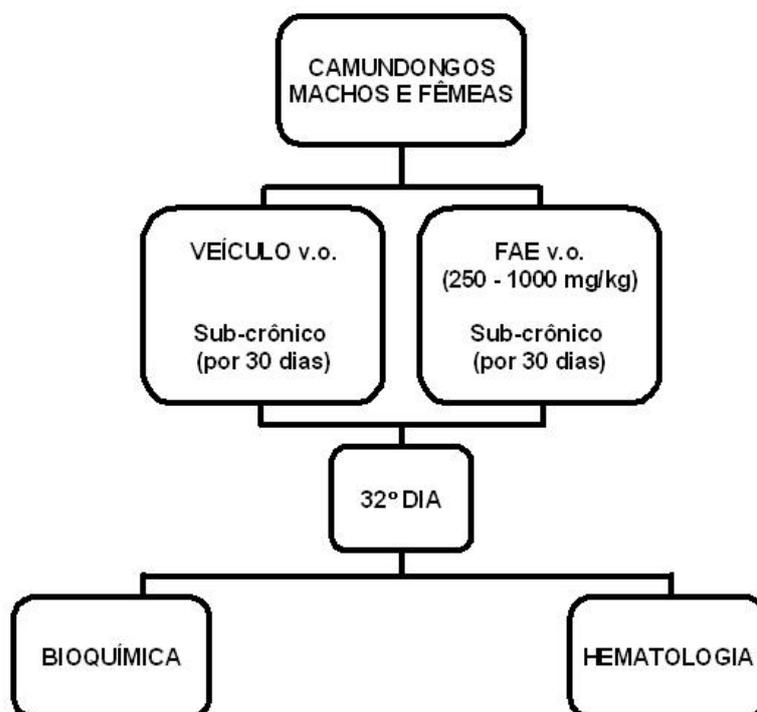


No protocolo 9 (toxicidade aguda), camundongos machos receberam por via i.p. veículo (solução aquosa a 10 % de Tween-80) ou FAE (250 - 2.500 mg/kg), enquanto que outros animais receberam por v.o. veículo (solução aquosa a 10 % de Tween-80) ou FAE (250 - 5.000 mg/kg), sendo em seguida avaliados no teste de *screening* Hipocrático. Outros grupos experimentais receberam veículo (solução aquosa a 10 % de Tween-80) ou FAE (250 - 2.000 mg/kg) por v.o. e, 1 h após, foram submetidos aos testes do campo aberto ou rota-rod. Para o cálculo da DL_{50} oral, camundongos machos e fêmeas receberam veículo (solução aquosa a 10 % de Tween-80) ou FAE (1.000 - 5.000 mg/kg; v.o.), e foram observados durante 15 dias consecutivos (sempre no mesmo horário) para identificação de possíveis sinais de toxicidade e avaliação do peso corporal diário.

Esquema 9 - Resumo do protocolo experimental 9



No estudo de toxicidade sub-crônica (Protocolo 10), camundongos de ambos os sexos receberam oralmente veículo (solução aquosa a 10 % de Tween-80) ou FAE (250, 500 e 1.000 mg/kg) por 32 dias consecutivos, sendo que no 30º dia os animais foram avaliados no LCE. A observação de possíveis sinais de toxicidade e a mensuração do peso corporal foi realizada diariamente (sempre no mesmo horário). No 32º dia, os animais foram sacrificados por anestesia profunda para a realização dos ensaios bioquímicos e hematológicos. Os animais utilizados neste protocolo são os mesmos que passaram pelo protocolo 8.

Esquema 10 - Resumo do protocolo experimental 10

3.5. Equipamentos e testes farmacológicos

3.5.1. Testes comportamentais

3.5.1.1. *Labirinto em cruz elevado (Elevated plus-maze)*

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um teste de ansiedade animal desenvolvido por Handley e Mithany (1984) e surgiu a partir da adaptação do labirinto em Y criado por Montgomery, em 1955. Este teste foi validado inicialmente para ratos por Pellow et al. (1985) e, posteriormente, para camundongos por Lister (1987).

O LCE consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 25 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), opostos em forma de cruz grega e elevados a 45 cm do nível do chão. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). Os braços abertos são circundados por barras laterais de 0,25 cm de altura para evitar a queda dos animais. A plataforma e as paredes laterais dos braços fechados são confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto. O teste foi realizado em uma sala com luz vermelha de forma que a intensidade de luminosidade no assoalho do equipamento foi de 3 lux.

Após os diferentes tratamentos, os animais foram colocados individualmente na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi avaliado durante 5 min (Pellow *et al.*, 1985). As medidas comportamentais registradas neste equipamento foram: tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos e fechados (considerou-se a entrada em um dos braços quando a maior parte do corpo do animal estava dentro do respectivo braço), medidas etológicas de avaliação de risco tais como imersões de cabeça desprotegidas (*unprotected head-dipping*), estiramentos corporais protegidos (*protected stretch-attend postures*), exploração da região distal dos braços abertos (*open-arms end activity*) e comportamento de levantar (*rearing*).

O LCE é um dos testes etologicamente fundamentados, baseando-se nas respostas inatas de medo/ansiedade de diferentes espécies animais diante de situações naturalmente aversivas, enfatizando padrões relativamente estáveis de comportamento que são herdados para garantir a reprodução e a sobrevivência de cada espécie. Os comportamentos etológicos são definidos como movimentos ou posturas que sinalizam, para outros animais da mesma espécie ou de outras espécies, disposições comportamentais de agressão, de submissão, de afiliação e sexuais. Os parâmetros etológicos têm grande utilidade no estudo de drogas ansiolíticas/ansio gências e foram utilizados neste trabalho, associados aos

parâmetros clássicos (espaço-temporais), para aumentar a sensibilidade do método, como proposto por Rodgers e Cole (1994).

Para a análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a porcentagem de entradas nos braços abertos foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, e esse índice multiplicado por 100. De maneira semelhante foi calculada a porcentagem do tempo em que os animais permanecerem nos braços abertos em relação ao somatório do tempo de permanência nos braços abertos e fechados, sendo o quociente obtido multiplicado por 100. Para os demais parâmetros observados, fez-se a soma simples das frequências obtidas.



Figura 9 - *Labirinto em cruz elevado*. Fonte: Foto do pesquisador.

3.5.1.2. Sono induzido por pentobarbital sódico

Grupos de camundongos receberam os pré-tratamentos por via oral (veículo, EBH ou FAE de *P. sabulosa*) 1 h antes da administração de pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). A latência (s) para (tempo de indução do “sono”) e a duração (min) da perda do reflexo de endireitamento dos animais, após a injeção do barbitúrico, foi registrada com um *cutoff* de 3 h ou 10 h, para avaliar os efeitos do EBH ou FAE, respectivamente (Carlini et al., 1986). O DZP 0,75 ou 1 mg/kg (i.p.) foi utilizada como droga hipno-sedativa padrão.



Figura 10 - Sono induzido por pentobarbital sódico. Fonte: Foto do pesquisador.

3.5.1.3. Sono induzido por éter etílico (sono etéreo)

A predição do sono etéreo segue, em linhas gerais, os mesmos princípios do sono barbitúrico, porém o agente indutor obviamente difere, neste caso é o éter etílico. Camundongos pré-tratados por via oral com o veículo, 6-metoxi-7-preniloxicumarina ou frações aquosa, hexânica ou acetato de etila de *P. sabulosa* foram colocados em uma câmara saturada (30 cm X 20 cm de diâmetro), de vidro transparente hermeticamente fechada. A saturação deu-se através do umedecimento de uma bola de algodão de tamanho padrão (6 g) com 5 ml de éter etílico colocado em uma plataforma localizada à 20 cm de altura em relação à superfície da câmara, 5 min antes da realização dos testes farmacológicos (Vieira, 2001; Duarte et al., 2007). Transcorrido o tempo para saturação da câmara, os animais foram introduzidos individualmente na mesma, registrando-se a latência para e a duração da perda do reflexo de endireitamento. Uma vez perdido o reflexo, esperou-se mais 1 min para a retirada de cada animal da câmara de saturação, e em seguida colocando-os em decúbito dorsal para registro da duração da hipnose, cujo término foi caracterizado pela recuperação da postura normal (Vieira, 2001; Duarte et al., 2007). DZP 0,75 ou 1 mg/kg (i.p.) foi utilizada como droga hipno-sedativa padrão.



Figura 11 - Sono induzido por éter etílico (sono etéreo). Fonte: Foto do pesquisador.

3.5.1.4. Convulsões induzidas quimicamente por pentilenotetrazol

Camundongos foram injetados com pentilenotetrazol (PTZ, 80 mg/kg, i.p.), e colocados em gaiolas de plástico para as observações. O tempo para manifestação da primeira convulsão (latência), assim como a duração, a incidência e a severidade das convulsões foram observadas e registradas até 30 min após a injeção de PTZ. A severidade das convulsões foi avaliada pela escala de reatividade convulsiva proposta por Czuczwar e Frey (1986): (0) = nenhum comportamento convulsivo, (1) abalos mioclônicos (*myoclonic jerks*), (2) crises clônicas sem perda do reflexo de endireitamento, (3) crises clônicas com perda do reflexo postural, (4) extensão tônica das patas posteriores e (5) extensão tônica com morte. O índice de severidade foi obtido pelo somatório total dos graus obtidos pela escala de reatividade.

Em ratos, após o registro basal do EEG por 20 min, os animais receberam PTZ (80 mg/kg, i.p.) e as convulsões foram observadas. A latência para e a duração do primeiro espasmo mioclônico/clônico ou latência para e a duração da primeira convulsão clônica generalizada, bem como a severidade e a letalidade, foram registrados. Seiscentos segundos foi o tempo máximo (*cutoff*) utilizado no cálculo dos parâmetros de latência e duração. A severidade foi registrada durante 1 h utilizando a escala de reatividade convulsiva de Racine modificada (1972): estágio 0: nenhuma alteração comportamental, estágio 1: contração das orelhas e face, estágio 2: espasmos mioclônicos isolados, estágio 3: clonias das patas anteriores, pescoço e/ou cabeça, estágio 4: clonias das patas anteriores, pescoço e/ou cabeça com comportamento de levantar (*rearing*) e queda, estágio 5: convulsão clônica generalizada (sem a extensão tônica das patas posteriores) iniciando

com *running* seguido da perda do reflexo de endireitamento. O índice de severidade foi considerado o maior escore convulsivo alcançado por cada animal.



Figura 12 - *Convulsões induzidas por pentilenotetrazol.*
Fonte: Foto do pesquisador.

3.5.1.5. *Convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo*

Após os tratamentos com as diversas preparações, os camundongos foram submetidos ao eletrochoque transcorneal máximo (ECM) utilizando corrente alternada produzida por um gerador de choque (PLAT-2) e liberada a partir de dois eletrodos de aço inoxidável. O estímulo supra-limiar do ECM foi ajustado com pulsos retangulares de 50 mA de intensidade liberados a 60 Hz com duração de 200 ms. Este estímulo resulta em convulsão tônico-clônica em 100 % dos animais testados em nossas condições de laboratório. O tempo total da extensão tônica das patas posteriores (em s) e a porcentagem dos animais que apresentaram a extensão tônica foram registrados (Swinyard *et al.*, 1952).

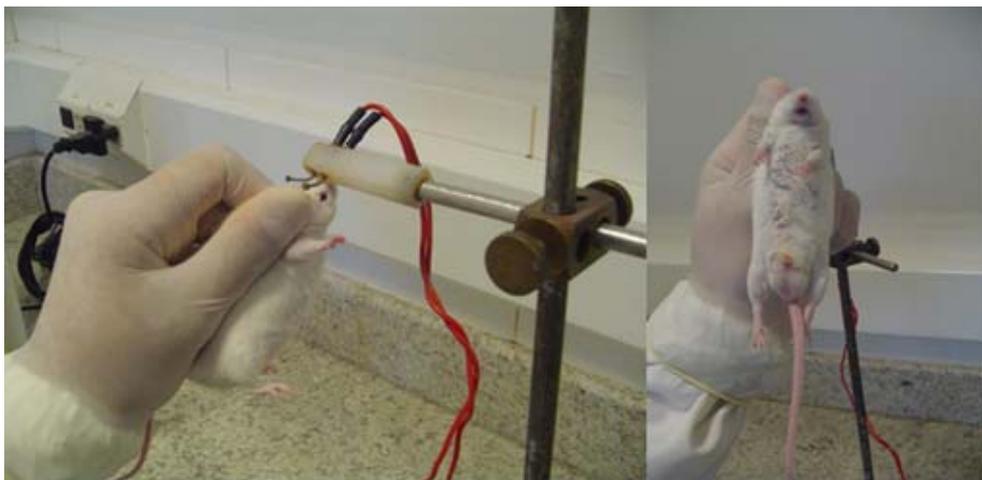


Figura 13 - Convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo. Fonte: Foto do pesquisador.

3.5.1.6. Campo-aberto (*Open-field*)

O campo-aberto (30 X 30 X 15 cm) foi confeccionado em acrílico (paredes transparentes e chão preto) e dividido em 9 quadrantes de 10 x 10 cm. A atividade exploratória dos animais teve como parâmetro a movimentação espontânea dos animais, aferida a partir da contagem do número de cruzamentos transpassados com as quatro patas e o número de comportamentos de levantar (*rearing*), registrados durante um período de 5 min, após os tratamentos. Esse teste permite uma avaliação da atividade estimulante ou depressora de um dado composto (Siegel, 1946; Archer, 1973).

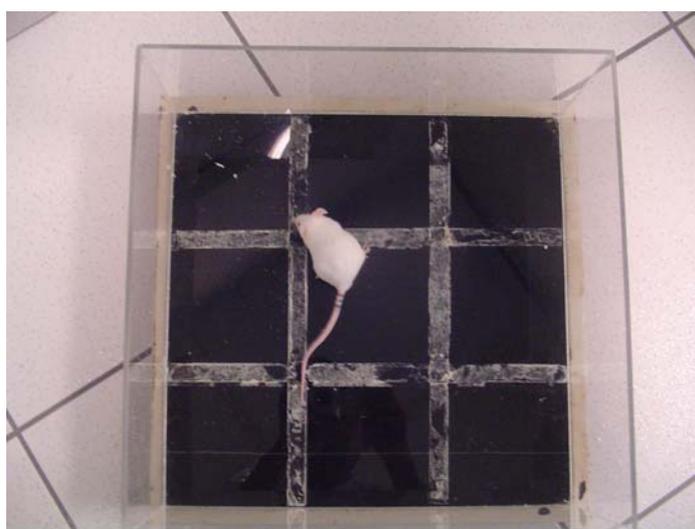


Figura 14 - Campo aberto (*Open-field*). Fonte: Foto do pesquisador.

3.5.1.7. Rota-rod

O aparelho constitui-se de uma barra horizontal de 2,5 cm de diâmetro subdividida em seis compartimentos, colocada a 25 cm de altura e girando a 12 r.p.m. Camundongos pré-selecionados (animais que permaneceram por pelo menos 1 min sobre a barra giratória do rota-rod em uma sessão de 2 min, 24 h antes do teste), foram colocados sobre a barra giratória 1 h após os tratamentos. O tempo total de permanência na barra giratória (em s) e o número de quedas durante a sessão foram registrados. Este teste permite avaliar se os tratamentos promovem incoordenação motora nos animais, por sedação e/ou relaxamento muscular (Duham e Myia, 1957).



Figura 15 - Rota-rod. Fonte: Foto do pesquisador.

3.5.1.8. Temperatura retal

A temperatura retal dos camundongos foi medida pela inserção de um *termistor probe* dentro do reto de cada animal. A leitura do registro da temperatura foi realizada por meio de um termômetro digital (Dixtal[®]). A sonda térmica foi colocada com vaselina e inserida 2 cm dentro do reto até a estabilização da temperatura (aproximadamente 20 s). A temperatura retal foi mensurada duas vezes, antes (T1) e 1 h após os diferentes tratamentos

(T2). A variação da temperatura (ΔT) foi estimada como $\Delta T = T2 - T1$, para cada animal (Carlini et al., 1986).

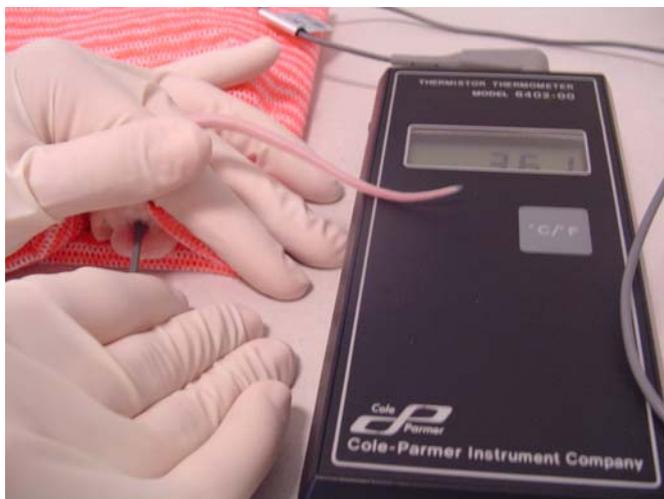


Figura 16 - *Temperatura retal.* Fonte: Foto do pesquisador.

3.5.1.9. Cirurgias estereotáxicas para o implante dos eletrodos bipolares

Os procedimentos estereotáxicos para a implantação dos eletrodos bipolares foram realizados sob anestesia geral. A anestesia foi realizada com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) (i.p.). Após a perda do reflexo álgico (“pedal withdrawal reflex”), verificada pela compressão da pata do animal (Cassella *et al.*, 1997), procedeu-se à tricotomia a fim de expor a pele que recobre o crânio. Os ratos foram imobilizados individualmente no aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, USA), sendo fixados por duas barras auriculares colocadas nos meatos auditivos e uma presilha nasal fixada nos incisivos e no osso nasal. Em seguida, injetou-se lidocaína (com 2 % de vasoconstrictor) na face rostral da cabeça, por via subcutânea, para anestesia local e redução do extravasamento sangüíneo no momento da incisão. Realizou-se a raspagem do periósteo, expondo-se bem a superfície óssea e limpou-se a calota craniana com algodão embebido em água oxigenada, a fim de se visualizarem nitidamente as suturas cranianas, que foram utilizadas como referências na cirurgia estereotáxica. O crânio foi posicionado no aparelho estereotáxico de forma que o bregma e o lambda ficassem num mesmo plano horizontal. A calota craniana foi perfurada com uma broca odontológica para a fixação dos eletrodos profundos. Os eletrodos profundos eram bipolares e constituídos por dois filamentos de níquel-cromo de 150 μm de diâmetro, revestidos por uma fina camada de poliéster (7 μm)

em toda a sua extensão, exceto nas extremidades. Para a avaliação do registro eletroencefalográfico profundo, cada eletrodo bipolar foi colocado na região CA₃ esquerda do hipocampo. O registro do EEG superficial (cortical) foi realizado através do implante de um parafuso de aço inoxidável (1 mm de diâmetro) posicionado na região A₃ direita, colocado de forma que sua extremidade apenas tocasse a superfície do córtex. A região CA₃ hipocampal foi identificada pela sua coordenada antero-posterior (AP = - 3,3 mm), medial-lateral (ML = + 2,5 mm) e dorso-ventral (DV = - 3,8 mm), enquanto que a região A₃ cortical pela coordenada antero-posterior (AP = - 1,5 mm) e medial-lateral (ML = - 3,0 mm), ambas determinadas segundo o Atlas Estereotático de Paxinos & Watson (1986). Um parafuso adicional foi implantado no seio frontal e serviu como eletrodo de referência (indiferente). Tanto o eletrodo bipolar quanto o eletrodo cortical foram conectados a um micro-conector de saída e, em seguida, a área aberta foi preenchida com acrílico auto-polimerizável (JET Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, Brasil), que se solidifica rapidamente, formando uma proteção aos eletrodos e mantendo-os fixos. A seguir, a pele rebatida foi suturada na região anterior e posterior de forma que o soquete (conjunto de eletrodos mais micro-conector) ficasse exposto.



Figura 17 - *Cirurgia estereotáxica para o implante dos eletrodos bipolares.* Fonte: Foto do pesquisador.

Após o término das cirurgias, cada animal foi aquecido embaixo de uma lâmpada de 40 W, a fim de amenizar a hipotermia induzida pela anestesia geral e, depois da recuperação total, foram reconduzidos aos pares às suas caixas recebendo água e ração à

vontade, por 5 dias antes do teste experimental. Neste período de recuperação os animais foram manipulados somente durante a troca de maravalha das caixas.

3.5.1.10. Registros de eletroencefalograma (EEG)

O eletroencefalograma (EEG) foi obtido através de um sistema digital poligráfico (BIOPAC System, MP-100/WSW, Inc) no período das 13 às 17 h. No dia dos registros do EEG (5 dias após a estereotaxia), cada animal foi colocado individualmente em uma caixa de vidro (0,3 x 0,5 x 0,4 m) contendo serragem no chão, e esta caixa inserida dentro da gaiola de Faraday (1,0 x 0,6 x 0,7 m). O micro-conector do animal foi acoplado a um cabo elétrico de aquisição que transmitia os sinais de atividade elétrica cerebral para o sistema de amplificação e polígrafo. Os sinais elétricos foram amplificados 20.000 vezes, filtrados em 0.5-30 Hz, em uma taxa amostral de 256 Hz e registrados através do *software* ACQ-Knowledge versão 3.2. Após um período de habituação de 30 min, fez-se um registro eletrográfico basal de 20 min seguido pelos tratamentos. Durante os tratamentos (ver item 3.4), o EEG foi registrado continuamente por 1 h. Subseqüentemente, as convulsões foram induzidas pela injeção intraperitoneal de PTZ (80 mg/kg) e o EEG foi registrado com um *cutoff* de 1 h. O comportamento de cada animal foi observado, concomitantemente ao registro eletroencefalográfico, através de uma *webcam* localizada dentro da gaiola de Faraday e gravado em um computador. A análise do EEG foi realizada pela inspeção visual direta, buscando-se detectar achados eletrográficos característicos de atividade epileptiforme.

3.5.2. Ensaios bioquímicos

Os ensaios de ligação foram utilizados para avaliar a possível interação dos compostos isolados de *P. sabulosa* com o sítio de ligação BDZ do complexo receptor GABA_A, em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratas. Os compostos estudados foram: 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxihidroestiril)-2-pirona (1) [dihidroestiril-2-pirona (1)], 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-14-metoxi-dihidroestiril)-2-pirona (2) [dihidroestiril-2-pirona (2)], 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxioxi-10,14-dimetoxidihidroestiril)-2-pirona (3) [dihidroestiril-2-pirona (3)], 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxiestiril)-2-pirona (4) [estiril-2-pirona (4)], 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxioxi-

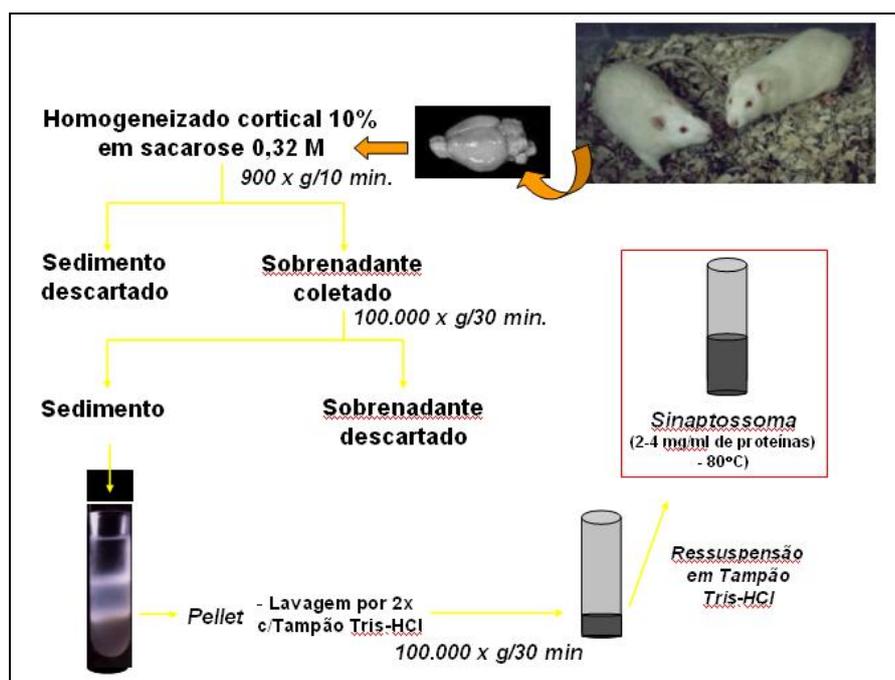
14-metoxiestiril)-2-pirona (5) [estiril-2-pirona (5)] e 4-metoxi-6-(11,12-dimetoxiestiril)-2-pirona (7) [estiril-2-pirona (7)]. Os nomes dos compostos foram abreviados da seguinte forma: DST (1), (2) e (3) ou STY (4), (5) ou (7), respectivamente.

3.5.2.1. Ensaio de ligação (binding do [3 H]-flunitrazepam)

3.5.2.1.1. Animais e preparação das membranas sinaptossomais

Os animais foram sacrificados com guilhotina e os cérebros foram rapidamente removidos e os córtices dissecados sobre gelo e congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, os córtices foram homogeneizados em 10 volumes de uma solução de sacarose 0,32 M, seguido de centrifugação a 900 g durante 10 min. O sobrenadante foi centrifugado a 100.000 g durante 30 min. O *pellet* foi lavado duas vezes com 30 volumes de tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4. Em seguida foi realizada uma nova centrifugação por 30 min a 100.000 g para recuperar o *pellet* de cada lavado. A ressuspensão final foi realizada com o mesmo tampão do lavado de tal forma que a concentração de proteínas, medida pela técnica de Bradford, foi de 2-4 mg/ml. As membranas sinaptossomais assim obtidas foram conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de uso nos ensaios de ligação.

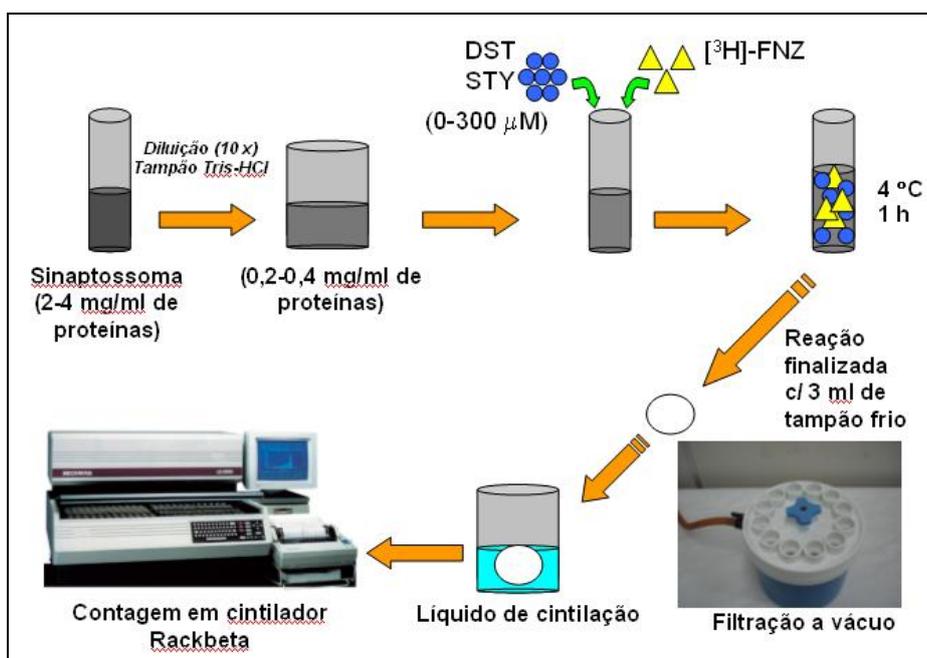
Esquema 11 - Preparação das membranas sinaptossomais.

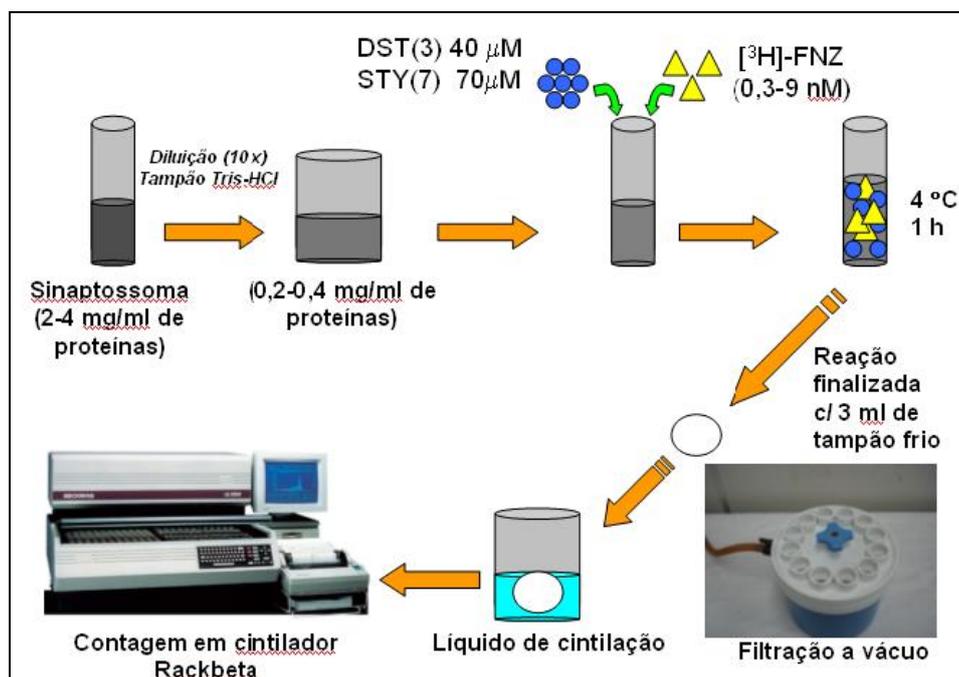


3.5.2.1.2. Ensaio de binding do [³H]-flunitrazepam por competição e saturação

No dia dos ensaios, as membranas sinaptossomais foram descongeladas e diluídas 10 vezes com tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4. Para os ensaios de competição a mistura de incubação foi preparada em um volume final de 1 ml agregando-se as amostras já dissolvidas em 10 µl de etanol absoluto, a suspensão de membranas contendo 0,2-0,4 mg de proteína e, finalmente, 10 µl de uma solução de [³H]-FNZ (84.5 Ci/mmol) de maneira tal que a concentração final do mesmo foi de 0,42 nM. A incubação se realizou a 4° C durante 1 h. Nos ensaios de saturação, concentrações crescentes de [³H]-FNZ (0.3 - 9 nM) foram incubadas na presença dos compostos DST-3 (40 µM) ou STY-7 (70 µM). A união inespecífica foi determinada em paralelo através da incubação de uma mistura similar contendo [³H]-FNZ em uma concentração de 10 µM, e em nenhum caso representou mais do que 15 % do total. A reação foi finalizada pela adição de 3 ml de tampão frio e a solução resultante rapidamente filtrada a vácuo através de filtros Whatman GF/A, que foram lavados duas vezes com 3 ml do mesmo tampão. Os filtros secos foram suspensos em 1.5 ml de líquido de cintilação (Optiphase 'Hisafe' 3 Wallac Company, Turku, Finland). O conteúdo de radioatividade foi mensurado 24 h após em um contador Wallac Rackbeta 1214.

Esquema 12 - Ensaio de *binding* por competição.



Esquema 13 - Ensaio de *binding* por saturação.

Os ensaios de *binding* foram realizados no Instituto de Química e Físicoquímica Biológicas, Faculdade de Farmácia e Bioquímica (Universidad de Buenos Aires, UBA, Argentina), sob supervisão da Prof^a. Dra. Mariel Marder.

3.5.3. Estudos complementares

3.5.3.1. Toxicidade aguda

3.5.3.1.1. Triagem comportamental (teste hipocrático) e dose letal 50 % (DL_{50})

Essa etapa experimental constituiu uma avaliação estimativa e preliminar das possíveis propriedades tóxicas da FAE de *P. sabulosa*, fornecendo informações acerca do risco para a saúde resultante de uma exposição de curta duração pela via escolhida. As doses selecionadas para este ensaio foram entre 1.000 e 5.000 mg/kg pela via oral e entre 500 e 2.500 mg/kg pela via intraperitoneal. Camundongos machos foram separados por grupos de cinco (tratados e controle) e colocados em caixas plásticas, sendo mantidos num ciclo claro/escuro de 12 h, com temperatura controlada (22 ± 2 °C). Após dois dias de

adaptação ambiental, os camundongos foram tratados com veículo (controle) ou FAE, pela respectiva via de administração, e observados em diferentes tempos durante 3 h consecutivas e após 24 e 48 h. Os parâmetros de observação neste teste foram: a presença ou ausência de contorções abdominais, ptose palpebral, nistagmo, lacrimejamento, hiperemia, cianose, sialorréia, frequência respiratória, piloereção, micção, diarreia, movimentação circular, atividade locomotora, comportamento agressivo, ataxia, perda do reflexo de endireitamento, resposta à pressão da cauda, paralisia de membros e cabeça, convulsões, contorções abdominais (*writhing*), sinal de *Straub* e mortes (Irwin, 1968; Carlini, 1972; Brito, 1994).

Grupos de 10 camundongos machos e 10 fêmeas foram tratados por via oral com veículo ou FAE (1.000, 2.500, 3.500 ou 5.000 mg/kg), sendo avaliados diariamente quanto à evolução do peso corporal durante os quinze dias subseqüentes. A incidência de mortalidade foi anotada e a dose letal mediana oral (DL_{50}) foi determinada (Lichfield e Wilcoxon, 1949). A DL_{50} foi determinada para a via oral porque esta é a única via utilizada pelos humanos no uso popular de plantas medicinais, sob a forma de chás e garrafadas. Findo o período de quinze dias, os animais foram anestesiados com éter etílico, sacrificados por deslocamento cervical e submetidos a uma laparotomia, que permitiu a observação macroscópica (aspecto geral dos órgãos, disposição, cor e tamanho) de alguns órgãos vitais, tais como: coração, pulmões, baço, fígado e rins (Brito, 1994). Os animais que não sobreviveram até o período de 15 dias também foram submetidos à laparotomia para a observação macroscópica dos principais órgãos nobres.

3.5.3.1.2. Atividade locomotora espontânea (campo aberto) e desempenho motor (rota-rod)

Para verificar o efeito do tratamento com a FAE de *P. sabulosa* (250-2.000 mg/kg, v.o.) na atividade locomotora espontânea e no desempenho motor, camundongos machos foram avaliados nos testes do campo aberto e rota-rod, respectivamente. Cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e o número total de quadrantes percorridos e de comportamentos de levantar (*rearing*) foram registrados. Para o cálculo da dose efetiva 50% (DE_{50}) para os efeitos sedativos da FAE foi utilizado o comportamento de levantar, já que o mesmo mostrou maior sensibilidade aos efeitos depressores quando comparado ao número de quadrantes percorridos. No teste do rota-rod, camundongos (pré-selecionados

24 h antes) foram colocados individualmente sobre a barra giratória do equipamento e o tempo total de permanência na barra foi cronometrado e o número total de quedas mensurado durante o período de 1 min. O tempo total na barra giratória do rota-rod foi utilizado para o cálculo da DE₅₀ para os efeitos mio-relaxantes da FAE. Em ambos os testes, DZP (2,5 - 30 mg/kg, v.o.) foi utilizado, como droga sedativa/mio-relaxante, para comparação com os efeitos induzidas pela FAE.

3.5.3.2. Toxicidade sub-crônica

O objetivo deste estudo foi obter informações a respeito da toxicidade da FAE de *P. sabulosa* quando administrada repetidamente em camundongos, por um período de 32 dias (ANVISA, 2004). Este estudo é importante na coleta de informações acerca dos riscos potenciais para a saúde, resultantes da exposição oral de doses repetidas da FAE de *P. sabulosa* em um período limitado de tempo. O estudo prevê ainda a determinação da dose máxima tolerada sem efeitos tóxicos aparentes e do efeito cumulativo da droga nos órgãos de choque. De acordo com as recomendações da ANVISA (Resolução nº 90, de 16 de março de 2004), as doses utilizadas na etapa de toxicologia sub-crônica (doses repetidas) devem ser pelo menos em número de 3, de forma que a dose mínima seja a menor dose que tenha o efeito terapêutico, a maior dose deve produzir um efeito adverso detectável e a dose intermediária pode ser obtida através da média geométrica entre a dose maior e menor.

Assim, camundongos de ambos os sexos foram separados por grupos (experimentais e controle) e colocados em caixas separadas, sendo mantidos num ciclo claro/escuro de 12 h, com temperatura controlada (22 ±2 °C). As doses de FAE selecionadas para este ensaio foram 250, 500 e 1.000 mg/kg. Os animais foram tratados por via intragástrica com o veículo ou FAE uma vez ao dia, durante 32 dias subsequentes. Em paralelo, os animais foram pesados semanalmente (Balança BIOPRECISA modelo BS3000). Findo o período de tratamento, os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) (i.p.) e submetidos às análises biológicas e histológicas, conforme os próximos itens.

3.5.3.2.1. Análises biológicas

(a) Procedimento para a coleta de sangue

As amostras de sangue foram coletadas a partir da veia cava inferior através de seringas descartáveis de 1 ml. De cada camundongo foi obtido aproximadamente 800 a 900 μ l. A primeira alíquota de 300 μ l foi transferida a um tubo *Eppendorf* contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0,1 % (anticoagulante), sendo manualmente homogeneizado e, em seguida, conduzido às análises hematológicas. O sangue remanescente foi transferido a um outro tubo *Eppendorf* sem anticoagulante e, após 30 min, centrifugado (centrífuga Labnet, USA) à 3.000 rpm durante 15 min. Imediatamente após, o soro foi separado do coagulado e armazenado por um dia à 4 C antes de ser encaminhado às análises bioquímicas.

(b) Análise bioquímica do soro

Vários parâmetros bioquímicos foram determinados no soro, tais como creatinina, uréia, fosfatase alcalina, γ -glutamil transferase (γ GT), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), proteínas totais, albumina e globulina. Os parâmetros bioquímicos foram determinados a partir do soro obtido de dois camundongos. As análises foram realizadas automaticamente no aparelho Mira Cobas (Roche).

(c) Análise hematológica

O sangue com anticoagulante, obtido na etapa anterior, foi utilizado para avaliar os seguintes parâmetros hematológicos: contagem de eritrócitos, leucócitos, linfócitos, plaquetas, hemoglobina e volume corpuscular médio (PENTRA 120, ABX Diagnostics), bem como a determinação do hematócrito (através da utilização da centrífuga de microhematócrito). A diferenciação das células sanguíneas (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos) foi realizada através da confecção de esfregaço sanguíneo (lâminas) e coloração pelo método de May Grünward-Giemsa sob microscopia óptica (Microscópio Olympus, BX41).

(d) *Análise macroscópica dos órgãos nobres*

Imediatamente após o procedimento de coleta de sangue e posterior morte dos animais, cada camundongo foi individualmente submetido à necropsia. As cavidades abdominal e torácica foram cuidadosamente abertas e uma primeira inspeção visual foi realizada com o intuito de identificar possíveis anormalidades macroscópicas nos órgãos-alvos, como aspecto, cor e tamanho. Cada órgão como baço, fígado, pulmão direito, rim direito, coração e cérebro, foi retirado e cuidadosamente separado da gordura e tecido conectivo. Em seguida, foram pesados em balança analítica (SHIMADZU AY220), com exceção dos pulmões. A razão peso órgão/peso corporal de cada camundongo foi calculada. Cada órgão foi preservado em tampão formalina 10 % para posterior procedimento histológico.

3.6. Análise estatística

Para as análises estatísticas foram utilizados os programas Statistica® versão 6.0 e GraphPad Prism versão 4.0. As comparações estatísticas foram inicialmente realizadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via, para os protocolos 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 e 10 e, em seguida, os grupos experimentais foram comparados entre si utilizando-se o teste *post-hoc* de Dunnett, com o tratamento sendo a variável independente. Para os protocolos 5 e 6, foi utilizada a ANOVA de duas vias, com o pré-tratamento e tratamento sendo as variáveis independentes, seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. O grau de severidade das convulsões em ratos (Protocolo 6) foi comparado pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc* de Mann-Whitney. A letalidade (Protocolo 6) e as proporções (protocolo 7) foram comparadas através do teste de probabilidade exata de Fisher. Nos protocolos 9 e 10, onde a evolução do peso corporal dos animais foi avaliada por vários dias (toxicidade aguda e sub-crônica), realizou-se a ANOVA de duas vias para medidas repetidas, com o tratamento e os dias (fator repetição) sendo as variáveis independentes. Os valores da DE₅₀ para as ações sedativas e mio-relaxantes da FAE de *P. sabulosa* e diazepam foram calculadas por regressão linear utilizando-se o Programa GraphPad Prism versão 4.0.

Para os ensaios de competição foi realizada a *plotagem* gráfica representando a % de ligação específica de [³H]-FNZ 0,42 nM nas ordenadas em função do logaritmo de concentrações crescentes do inibidor (compostos isolados de *P. sabulosa*) nas abscissas.

Primeiramente, os dados foram analisados mediante regressão linear para verificar se inclinação da reta era significativamente diferente de zero. Assim sendo, foi considerado que os dados e os efeitos se ajustaram mediante regressão não-linear, de acordo com a equação que segue:

$$Y = \text{Mínimo} + \frac{\text{Máximo} - \text{Mínimo}}{1 + 10^{(\log \text{CI}_{50} - X) \text{Hill's slope}}}$$

Onde Y é a % de ligação específica do [^3H]-FNZ, Mínimo é a menor resposta obtida pelo [^3H]-FNZ na presença do inibidor, Máximo é a resposta obtida na ausência do inibidor (100 % de ligação do [^3H]-FNZ), CI_{50} é a concentração do inibidor que produziu 50 % de inibição da ligação específica do [^3H]-FNZ, X é o logaritmo da concentração do inibidor; *Hill's slope* é o fator de inclinação da reta. Em seguida, foi estimada a constante de inibição (K_i) pela equação de Cheng-Prusoff (1973):

$$K_i = \text{CI}_{50} / (1 + [X]/K_d)$$

Onde X é a concentração utilizada do [^3H]-FNZ (0,42 nM) e K_d é a constante de dissociação do radioligante (2 nM).

Nos ensaios de saturação foi realizada a *plotagem* gráfica representando nas ordenadas a ligação específica de [^3H]-FNZ e nas abscissas as concentrações crescentes de [^3H]-FNZ. Os modelos de 1 e 2 sítios de ligação foram comparados pelo teste F da extra soma dos quadrados. De acordo com o modelo de melhor ajuste, estimou-se os valores da constante de dissociação (K_d) e o número máximo de sítios de ligação (B_{max}), de acordo com a seguinte equação:

$$Y = B_{\text{max}} \cdot X / (K_d + X)$$

Onde Y é a ligação específica do [^3H]-FNZ, B_{max} é a ligação máxima; K_d é a constante de dissociação; X é a concentração livre do radioligante. Esta equação descreve uma hipérbole retangular e é matematicamente equivalente à equação de Michaelis-Menten da cinética enzimática. Entretanto, este tipo de gráfico dificilmente nos permite determinar os valores de K_d e do B_{max} já que esta é uma relação não-linear. Sendo assim, fez-se necessária a transformação em uma relação linear utilizando-se a equação de *Scatchard*:

$$Y = -(1.B/K_d) - (B_{\max}/K_d)$$

A equação de *Scatchard* segue exatamente uma função linear do tipo $Y = mX + C$ e, através dela, podemos determinar seguramente o valor do K_d , que é o inverso negativo da inclinação da reta (*slope*), e o B_{\max} , que é a intersecção do eixo X.

Os resultados foram representados através da média \pm E.P.M., com níveis de probabilidade igual ou inferiores a 5 % sendo considerados indicativos de significância estatística ($P \leq 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do tratamento com extrato bruto hidroetanólico de *Polygala sabulosa*

4.1.1. Labirinto em cruz elevado

A Figura 18 mostra o efeito do tratamento oral com o EBH de *P. sabulosa* nos parâmetros avaliados no LCE. A administração do EBH aumentou significativamente a porcentagem do tempo de permanência (18A) [$F_{(4,39)}=4.16$; $P<0.01$] e porcentagem de entradas nos braços abertos (18B) [$F_{(4,39)}=4.34$; $P<0.01$] do LCE, bem como o número de comportamentos de imersões desprotegidas de cabeça (18C) [$F_{(4,39)}=4.38$; $P<0.01$], na dose de 500 mg/kg ($P<0.01$). Além disso, o EBH reduziu o número de estiramentos corporais protegidos [$F_{(4,39)}=7.53$; $P<0.01$], nesta mesma dose ($P<0.01$) (Tabela 3). Este conjunto de alterações comportamentais foi similar àquele induzido pelo tratamento i.p. com DZP, a droga ansiolítica padrão, na dose de 0,75 mg/kg ($P<0.01$). Os demais parâmetros avaliados no LCE como exploração da região distal dos braços abertos (Figura 18D), entradas nos braços abertos e número de comportamentos de levantar (Tabela 3) não foram alterados de forma significativa por nenhum dos tratamentos ($P>0.05$).

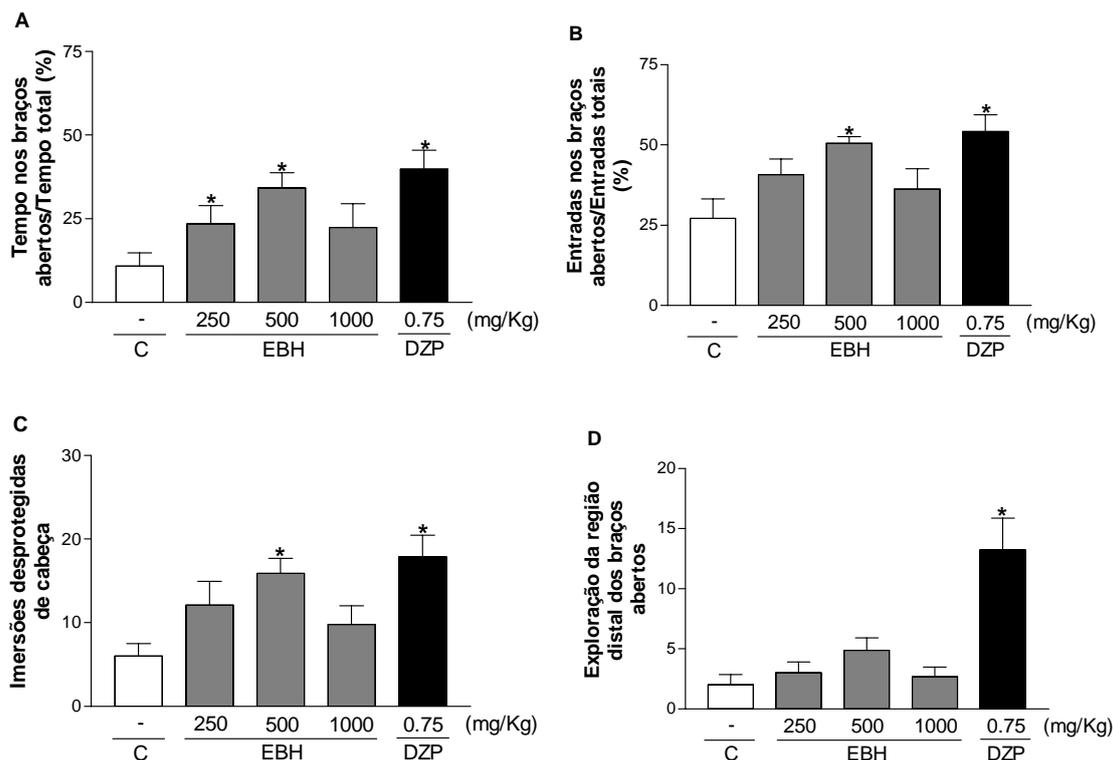


Figura 18 - Efeito do tratamento oral com o extrato bruto hidro-etanólico (EBH) de *Polygala sabulosa* (250-1.000 mg/kg, v.o.) no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. Diazepam (DZP 0,75 mg/kg, i.p.) foi utilizado como droga ansiolítica padrão. Porcentagem de tempo de permanência (A) e frequência de entradas nos braços abertos (B), bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça (C) e a exploração da região distal dos braços abertos (D) do LCE são mostrados. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 8-9 animais. * $P \leq 0.05$ e ** $P \leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

Tabela 3 - Efeito do tratamento oral com o extrato bruto hidro-etanólico (EBH) de *Polygala sabulosa* em alguns parâmetros comportamentais adicionais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).

Drogas	Dose (mg/kg)	LCE			
		ECp	EBF	REA	N
C	-	12.44 ± 1.65	6.33 ± 0.78	12.78 ± 1.06	9
EBH	250	4.67 ± 1.47**	6.33 ± 0.82	12.89 ± 1.55	9
EBH	500	3.25 ± 1.11**	8.38 ± 0.68	11.50 ± 0.89	8
EBH	1.000	4.78 ± 0.94**	6.78 ± 0.76	11.11 ± 1.87	9
DZP	0,75	6.00 ± 1.24**	8.22 ± 0.91	11.00 ± 1.52	9

Cada valor representa a média ± E.P.M de 8-10 animais (N = número de animais). * $P < 0.05$ ou ** $P < 0.01$, quando comparado ao grupo controle. Dados analisados por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Abreviações: C = controle, EBH = extrato bruto hidro-etanólico, DZP = diazepam, ECp = estiramentos corporais protegidos, EBF = entradas nos braços fechados, REA = rearing (comportamento de levantar).

4.1.2. Sono induzido por pentobarbital sódico

O tratamento oral com o EBH de *P. sabulosa*, 1 h antes da injeção i.p. de pentobarbital sódico, não modificou a latência para indução do sono ($P>0.05$; Figura 19A). Entretanto, o tratamento aumentou significativamente a duração da hipnose [$F_{(4,40)}=3.69$; $P<0.01$], nas doses de 500 ($P<0.05$) e 1.000 mg/kg ($P<0.01$; Figura 19B), um efeito hipno-sedativo similar àquele induzido por DZP ($P<0.01$), o BDZ padrão utilizado para comparação.

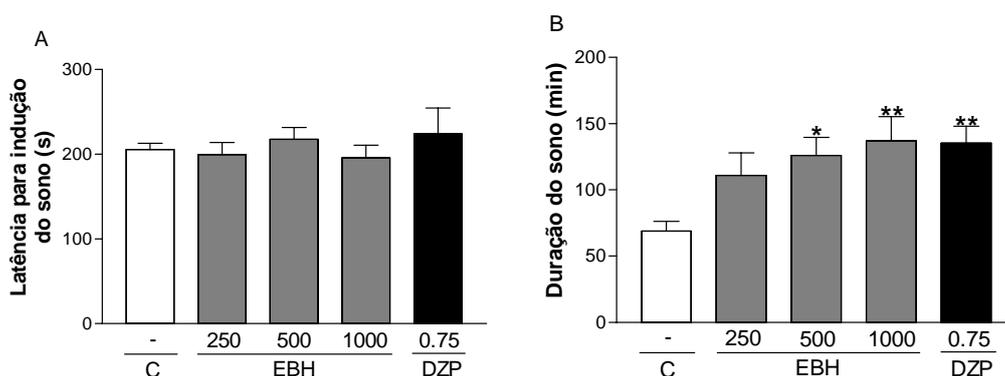


Figura 19 - Efeito do tratamento oral com o extrato bruto hidro-etanólico (EBH) de *Polygala sabulosa* (250 - 1.000 mg/kg, v.o.) na latência para indução (A) e na duração do sono induzido por pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). Diazepam (DZP 0,75 mg/kg, i.p.) foi utilizado como droga hipno-sedativa padrão. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 9-10 animais. * $P\leq 0.05$ e ** $P\leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.1.3. Convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ)

Como mostrado na Figura 20, o pré-tratamento com o EBH de *P. sabulosa* não modificou a latência para o primeiro episódio convulsivo no teste de convulsões induzidas por PTZ (80 mg/kg, i.p.) ($P>0.05$; Figura 20A). No entanto, o EBH reduziu significativamente a duração da primeira convulsão [$F_{(5,48)}=24.16$; $P<0.0001$; Figura 20B], nas doses de 500 ($P<0.01$) e 1.000 mg/kg ($P<0.01$). Além disso, o tratamento foi capaz de reduzir significativamente a severidade das convulsões [$F_{(5,48)}=15.76$; $P<0.0001$] nestas mesmas doses ($P<0.05$; Figura 20C). Ambas as doses de DZP (0.75 e 1 mg/kg, i.p.) foram capazes de aumentar a latência para (Figura 20A) e reduzir a duração do primeiro episódio convulsivo (Figura 20B) bem como a severidade das convulsões (Figura 20C) ($P<0.01$). A

maior dose de DZP (1 mg/kg) utilizada protegeu completamente os animais das convulsões quando comparada ao grupo controle (Figuras 20A, 20B e 20C).

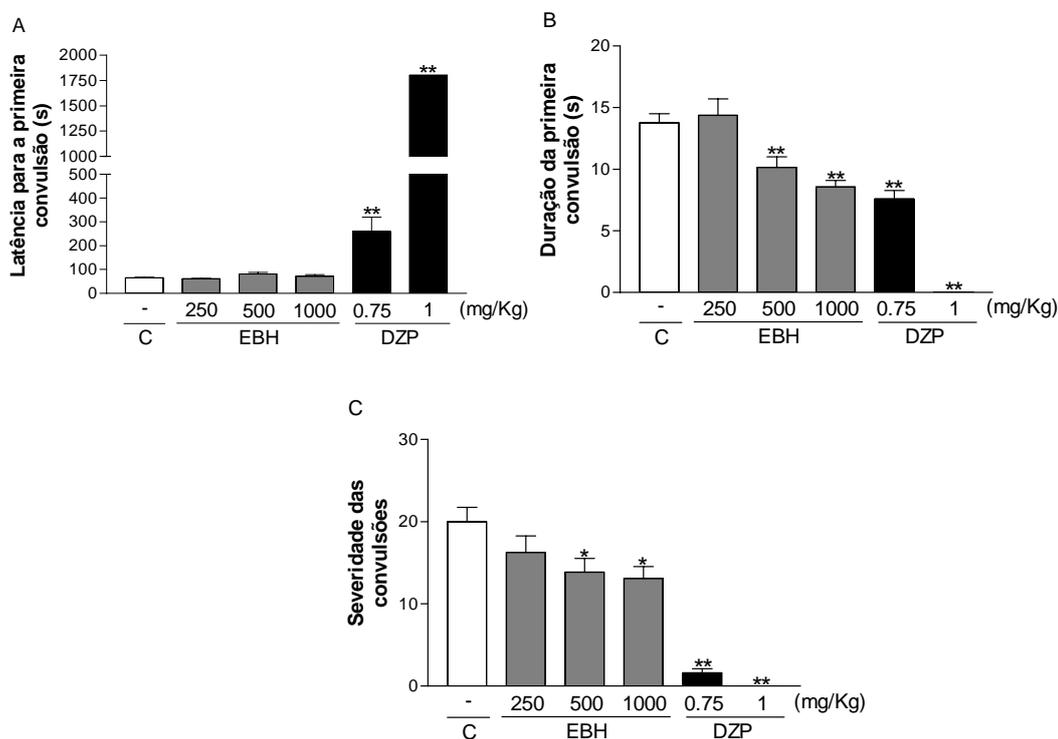


Figura 20 - Efeito do tratamento oral com o extrato bruto hidro-etanólico (EBH) de *Polygala sabulosa* (250 - 1.000 mg/kg, v.o.) na latência para o primeiro episódio convulsivo (A), duração da primeira convulsão (B) e severidade das convulsões (C). Diazepam (DZP 0,75 - 1 mg/kg, i.p.) foi utilizado como droga anticonvulsivante padrão. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 5-14 animais. * $P \leq 0.05$ e ** $P \leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.1.4. Temperatura retal

O tratamento oral com o EBH de *P. sabulosa* não foi capaz de alterar significativamente a temperatura retal dos camundongos ($P > 0.05$), conforme pode ser observado na Figura 21. O DZP, por sua vez, reduziu significativamente a temperatura retal quando comparado ao grupo controle [$F_{(4,34)} = 11.88$; $P < 0.0001$], na dose de 1,5 mg/kg ($P < 0.01$).

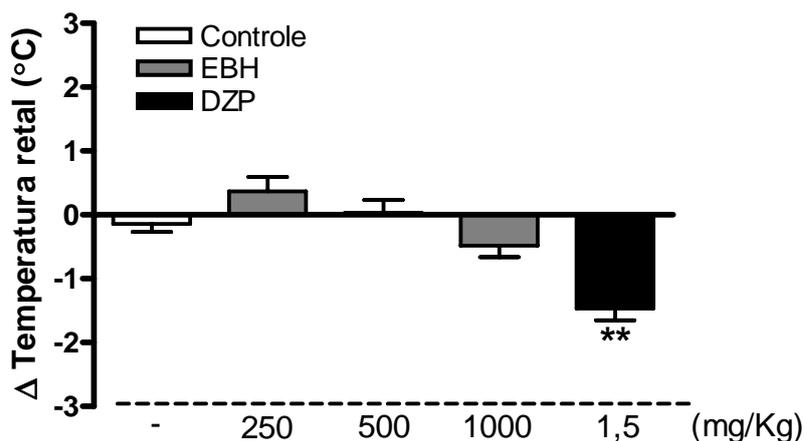


Figura 21 - Efeito do tratamento oral com o extrato bruto hidro-etanólico (EBH 250 - 1000 mg/kg, v.o.) de *Polygala sabulosa* ou diazepam (DZP 1,5 mg/kg, i.p.) na variação da temperatura retal em camundongos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 6-9 animais. * $P \leq 0.05$ e ** $P \leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.2. Fracionamento biomonitorado para identificação da(s) fração(ões) ativa(s)

4.2.1. Sono induzido por éter etílico (sono etéreo)

O efeito da administração oral do EBH de *P. sabulosa* na hipnose induzida por éter etílico é mostrado na Figura 22. O EBH não modificou a latência para indução do sono (Figura 22A) ($P > 0.05$), mas aumentou significativamente a duração da hipnose (Figura 22C) induzida por éter etílico [$F_{(2,17)} = 7.15$; $P < 0.01$], na dose de 500 mg/kg ($P < 0.05$). As frações aquosa (FA) e hexânica (HEX), bem como a 6-metoxi-7-preniloxicumarina (6-MC) (250, 500 ou 1.000 mg/kg) obtidas de *P. sabulosa*, administradas por via oral, não modificaram a latência para indução (Figura 22B) ou a duração do sono ($P > 0.05$) (Figura 22D). Apenas a fração acetato de etila (500, 750 ou 1.000 mg/kg) foi capaz de aumentar significativamente a duração do sono ($P < 0.01$) (Figura 22D), sem modificar a latência para sua indução ($P > 0.05$) (Figura 22B).

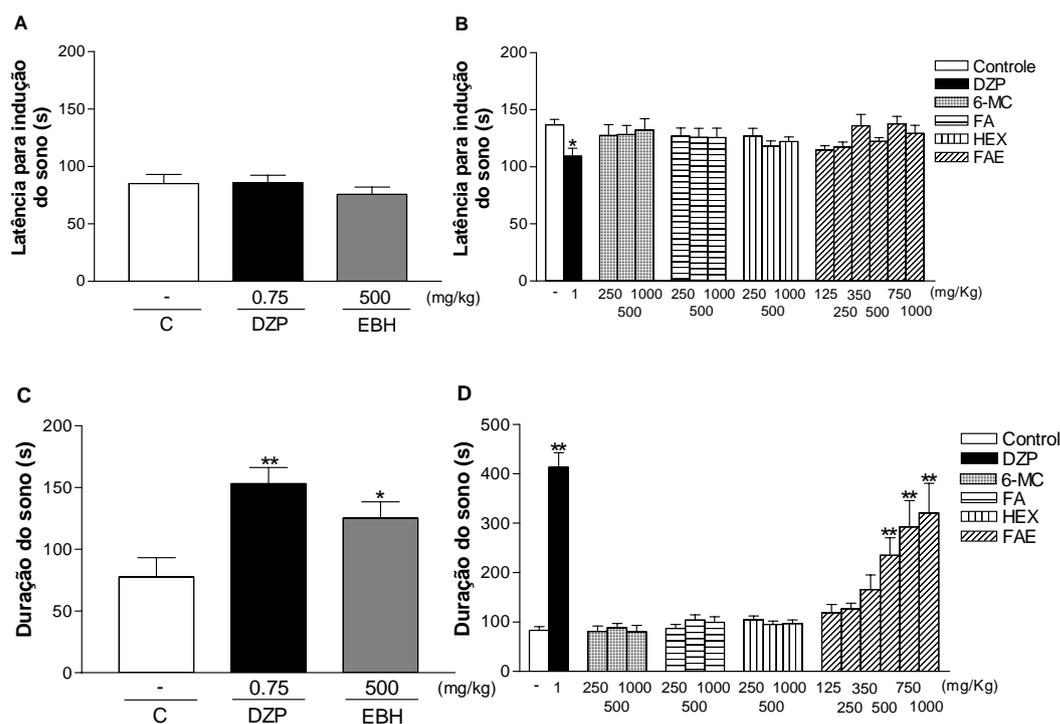


Figura 22 - Efeito do tratamento oral com o extrato bruto hidro-etanólico (EBH 500 mg/kg, v.o.) ou frações aquosa (FA), hexânica (HEX) e 6-metoxi-7-preniloxicumarina (6-MC) (250 - 1.000 mg/kg, v.o.) ou fração acetato de etila (FAE 125 - 1.000 mg/kg) isoladas de *Polygala sabulosa* na latência para indução do sono (A e B) e na duração da hipnose induzida por pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). Diazepam (DZP 0,75 mg/kg, i.p.) foi utilizado como droga hipno-sedativa padrão. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 6-11 animais. * $P \leq 0.05$ e ** $P \leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.3. Efeito do tratamento com fração acetato de etila de *Polygala sabulosa*

4.3.1. Labirinto em cruz elevado

A Figura 23 mostra o efeito do tratamento oral com a FAE de *P. sabulosa* nos parâmetros avaliados no LCE. A administração da FAE aumentou significativamente a porcentagem do tempo de permanência (Figura 23A) [$F_{(4,34)}=6.92$; $P<0.001$] e de entradas nos braços abertos (Figura 23B) [$F_{(4,34)}=6.20$; $P<0.001$] do LCE, nas doses de 250 ($P<0.05$), 500 ($P<0.05$) e 1.000 mg/kg ($P<0.01$), bem como reduziu o número de estiramentos corporais protegidos [$F_{(4,34)}=10.06$; $P<0.0001$], nestas mesmas doses ($P<0.01$) (Tabela 4). Além disso, a FAE aumentou o número de comportamentos de imersões desprotegidas de cabeça (Figura 23C) [$F_{(4,34)}=6.96$; $P<0.001$], nas doses de 500 e 1.000

mg/kg ($P<0.01$) e a exploração da região distal dos braços abertos do LCE [$F_{(4,34)}=11.56$; $P<0.0001$], nas mesmas doses ($P<0.05$ e $P<0.01$, respectivamente) (Figura 23D).

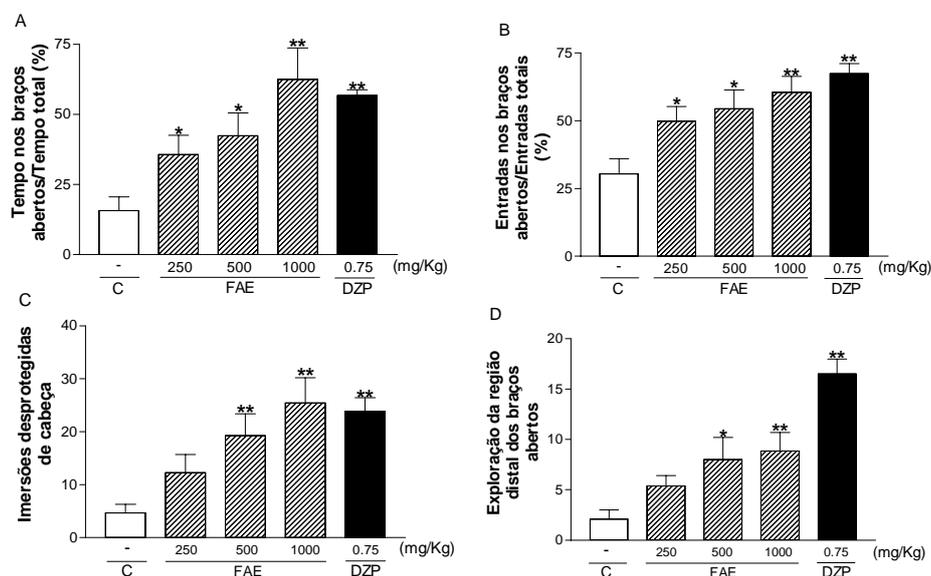


Figura 23 - Efeito do tratamento oral com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE, 250-1.000 mg/kg, v.o.) no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. Diazepam (DZP 0,75 mg/kg, i.p.) foi utilizado como droga ansiolítica padrão. Porcentagem de tempo de permanência (A) e frequência de entradas nos braços abertos (B), bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça (C) e a exploração da região distal dos braços abertos (D) do LCE são mostrados. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 6-10 animais. * $P\leq 0.05$ e ** $P\leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

Este conjunto de alterações comportamentais foi similar àquele induzido pelo tratamento i.p. com DZP, droga ansiolítica padrão, na dose de 0,75 mg/kg ($P<0.01$). Os demais parâmetros avaliados no LCE como entradas nos braços abertos e número de comportamentos de levantar (Tabela 4), não foram alterados de forma significativa por nenhuma das doses de FAE ou DZP ($P>0.05$).

Tabela 4 - Efeito do tratamento oral com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE) em alguns parâmetros comportamentais adicionais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).

Drogas	Dose (mg/kg)	LCE			
		ECp	EBF	REA	N
C	-	16.80 ± 1.37	7.90 ± 0.75	18.00 ± 1.26	10
FAE	250	7.25 ± 1.84**	8.00 ± 1.09	18.50 ± 0.89	8
FAE	500	7.12 ± 2.36**	8.12 ± 1.22	16.63 ± 1.68	8
FAE	1.000	3.86 ± 1.74**	6.86 ± 1.06	12.71 ± 1.57	7
DZP	0,75	4.17 ± 0.98**	10.33 ± 1.33	15.67 ± 1.98	6

Cada valor representa a média ± E.P.M de 6-10 animais (N = número de animais). * $P < 0.05$ ou ** $P < 0.01$, quando comparado ao grupo controle. Dados analisados por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Abreviações: C = controle, FAE = fração acetato de etila, DZP = diazepam, ECp = estiramentos corporais protegidos, EBF = entradas nos braços fechados, REA = *rearing* (comportamento de levantar).

4.3.2. Sono induzido por pentobarbital sódico

O tratamento oral com a FAE de *P. sabulosa*, 1 h antes da injeção i.p. de pentobarbital sódico, reduziu significativamente a latência para a perda do reflexo postural [$F_{(4,31)}=2.57$; $P < 0.05$], na dose de 1.000 mg/kg ($P < 0.05$) (Figura 24A) e aumentou a duração da hipnose induzida por pentobarbital [$F_{(4,31)}=48.43$; $P < 0.0001$], nas doses de 500 ($P < 0.0001$) e 1.000 mg/kg ($P < 0.0001$) (Figura 24B), um efeito hipno-sedativo semelhante àquele induzido por DZP ($P < 0.01$), o BDZ padrão.

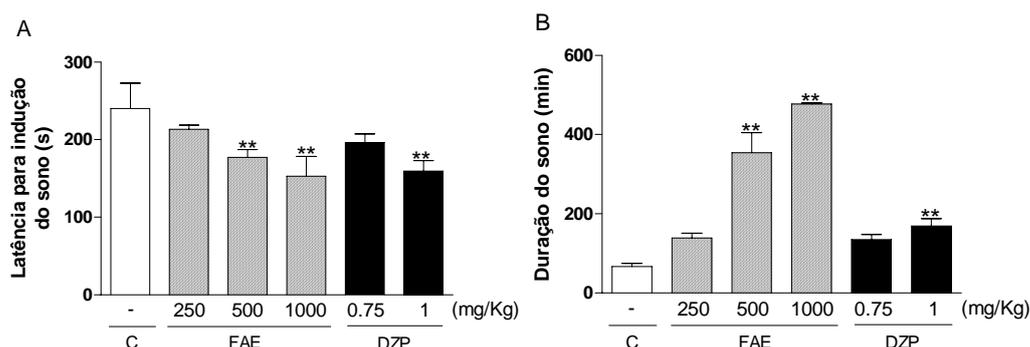


Figura 24 - Efeito do tratamento oral com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE, 250 - 1.000 mg/kg, v.o.) na latência para indução (A) e na duração do sono induzido por pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). Diazepam (DZP 0,75 - 1 mg/kg, i.p.) foi utilizado como droga hipno-sedativa padrão. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 9-10 animais. * $P \leq 0.05$ e ** $P \leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.3.3. Convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ)

Como mostrado na Figura 25, o pré-tratamento com a FAE de *P. sabulosa* aumentou significativamente a latência para o primeiro episódio convulsivo no teste de convulsões induzidas por PTZ (80 mg/kg, i.p.) [$F_{(5,41)}=423.20$; $P<0.0001$] em camundongos, nas doses de 500 ($P<0.05$) e 1.000 mg/kg ($P<0.01$) (Figura 25A). Além disso, o tratamento com a FAE reduziu a duração da primeira convulsão [$F_{(5,41)}=16.17$; $P<0.0001$], nas doses de 500 e 1.000 mg/kg ($P<0.01$) (Figura 25B), bem como a severidade das convulsões [$F_{(5,41)}=7.01$; $P<0.0001$] (Figura 25C), nestas mesmas doses ($P<0.05$), um perfil anticonvulsivante similar ao DZP. O tratamento i.p. com DZP 1 mg/kg protegeu completamente as convulsões quando os animais tratados foram comparados aos do grupo controle (Figuras 25A, 25B e 25C).

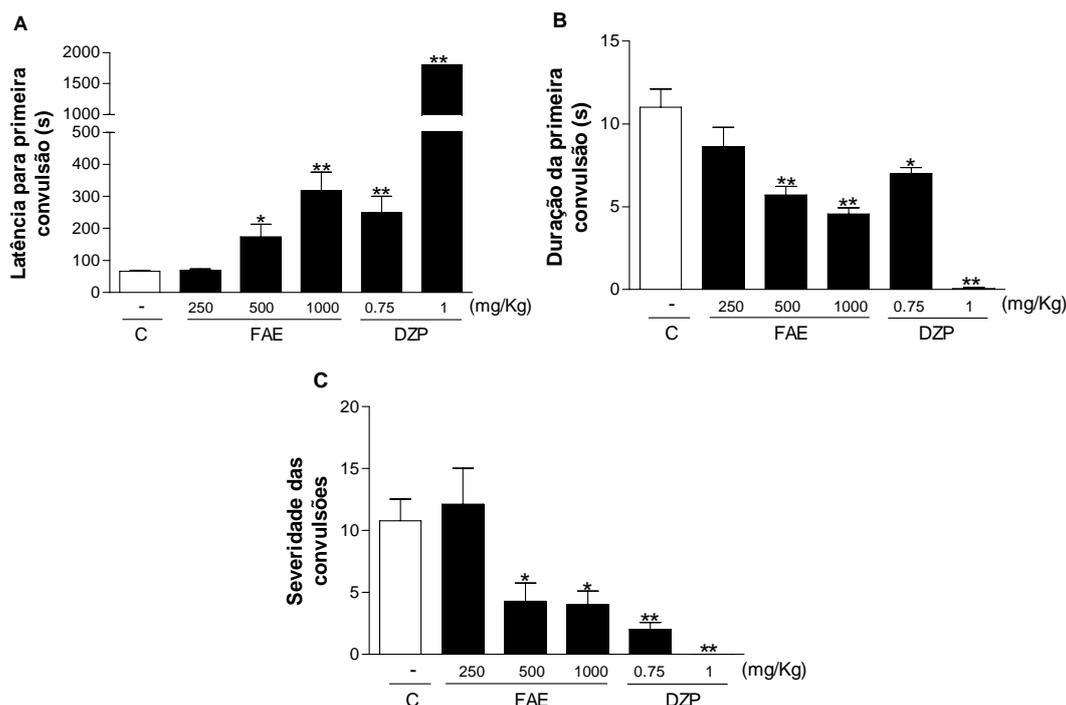


Figura 25 - Efeito do tratamento oral com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE, 250 - 1.000 mg/kg, v.o.) na latência para o primeiro episódio convulsivo (A), duração da primeira convulsão (B) e severidade das convulsões (C). Diazepam (DZP 0,75 - 1 mg/kg, i.p.) foi utilizado como droga anticonvulsivante padrão. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 5-14 animais. * $P\leq 0.05$ e ** $P\leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.3.4. Temperatura retal

O tratamento oral com a FAE de *P. sabulosa* reduziu significativamente a temperatura retal dos camundongos [$F_{(4,33)}=8.03$; $P<0.0001$], nas doses de 500 ($P<0.05$) e 1.000 mg/kg ($P<0.01$), efeito similar ao do DZP 1.5 mg/kg ($P<0.01$), conforme pode ser observado na Figura 26.

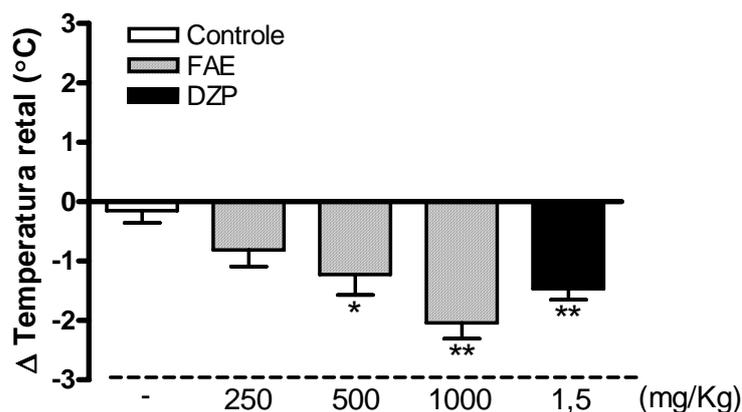


Figura 26 - Efeito do tratamento oral com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE, 250 - 1.000 mg/kg, v.o.) ou diazepam (DZP 1,5 mg/kg, i.p.) na variação da temperatura retal em camundongos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 6-9 animais. * $P\leq 0.05$ e ** $P\leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.4. Efeito da administração central das dihidroestiril-2-pironas (1), (2) ou (3) e estiril-2-pironas (4), (5) ou (7) de *Polygala sabulosa*

4.4.1. Labirinto em cruz elevado

A administração central (i.c.v.) da DST (1), em camundongos, aumentou significativamente a porcentagem de tempo de permanência (Figura 27A) nos braços abertos do LCE e o número de imersões desprotegidas de cabeça (Figura 27C) [$F_{(7,59)}=5.23$ e $F_{(7,59)}=6.91$; $P<0.0001$, respectivamente], na dose de 5 pmol ($P<0.05$ e $P<0.01$, respectivamente), bem como reduziu o número de estiramentos corporais protegidos [$F_{(7,59)}=7.02$; $P<0.0001$], nesta mesma dose ($P<0.01$) (Tabela 5). Este composto, na dose de 5 pmol, promoveu uma tendência ($P=0.06$) a aumentar a frequência de entradas nos

braços abertos (Figura 27B) do LCE, porém sem apresentar diferença significativa quando comparado ao grupo controle.

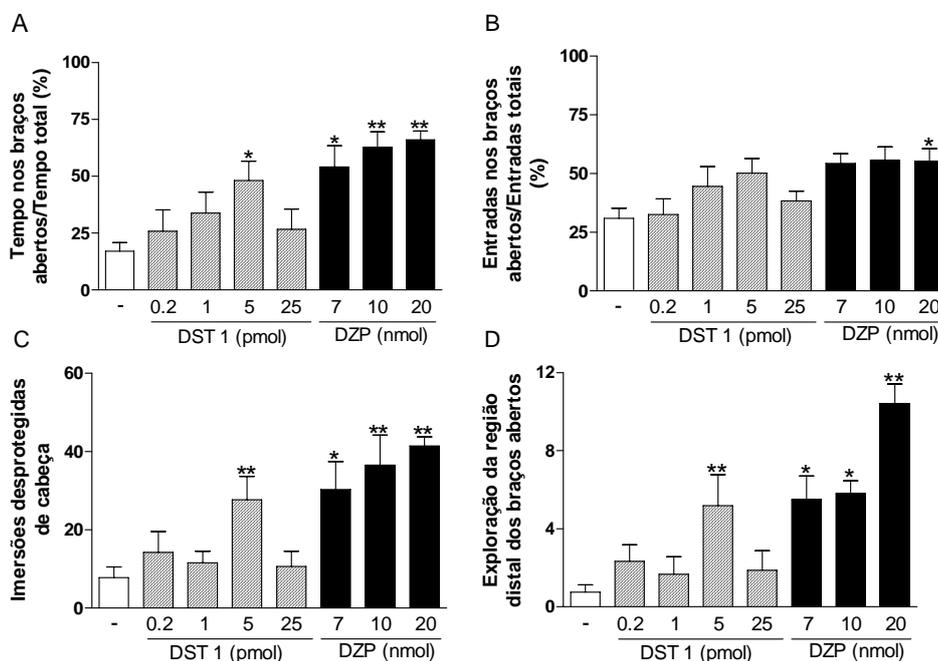


Figura 27 - Efeito da administração central da dihidroestiril-2-pirona (**1**) (DST 1, 0,2 - 25 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. Diazepam (DZP, 7 - 20 nmol, i.c.v.) foi utilizado como droga ansiolítica padrão. Porcentagem de tempo de permanência (A) e freqüência de entradas nos braços abertos (B), bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça (C) e a exploração da região distal dos braços abertos (D) do LCE são mostrados. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 5-12 animais. * $P \leq 0.05$ e ** $P \leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

A administração central da DST (**3**), em camundongos, aumentou a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos do LCE [$F_{(9,109)}=4.05$; $P < 0.0001$], com diferença significativa entre as doses de 0,3 ($P < 0.05$), 1,6, 8 e 40 fmol ($P < 0.01$) quando comparadas ao grupo controle (Figura 28A). A DST (**3**) também promoveu um aumento nos seguintes parâmetros: freqüência de entradas nos braços abertos [$F_{(9,109)}=3.30$; $P < 0.0001$], nas doses de 0,3 ($P < 0.05$), 8 e 40 fmol ($P < 0.01$) (Figura 28B), o número de imersões desprotegidas de cabeça [$F_{(9,109)}=4.76$; $P < 0.0001$], nas doses de 0,3 ($P < 0.05$), 1,6 ($P < 0.01$), 8 ($P < 0.01$) e 40 fmol ($P < 0.05$) (Figura 28C), e a exploração da região distal dos braços abertos [$F_{(9,109)}=3.10$; $P < 0.0001$], nas doses de 1,6 ($P < 0.01$), 8 ($P < 0.01$) e 40 fmol ($P < 0.05$)

(Figura 28D). Além disso, a DST (**3**) foi capaz de reduzir significativamente o número de estiramentos corporais protegidos [$F_{(9,109)}=7.02$; $P<0.0001$], nas doses de 1,6 ($P<0.05$), 8 ($P<0.05$) e 40 fmol ($P<0.01$) (Tabela 5).

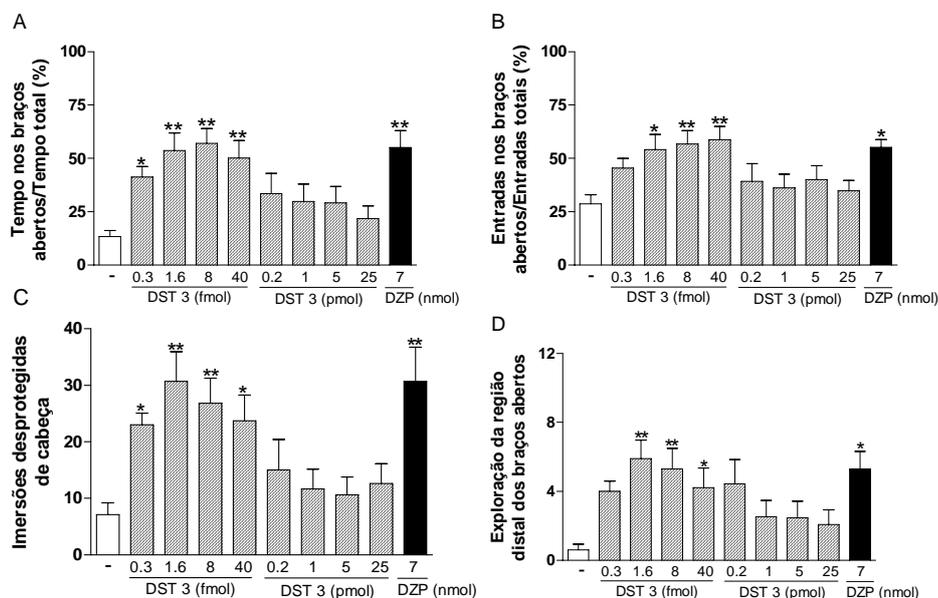


Figura 28 - Efeito da administração central da dihidroestiril-2-pirona (**3**) (DST 3, 0,3 fmol - 25 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. Diazepam (DZP, 7 nmol, i.c.v.) foi utilizado como droga ansiolítica padrão. Porcentagem de tempo de permanência (A) e freqüência de entradas nos braços abertos (B), bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça (C) e a exploração da região distal dos braços abertos (D) do LCE são mostrados. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 5-12 animais. * $P<0.05$ e ** $P<0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

A administração central da STY (**4**) promoveu um aumento na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos [$F_{(4,34)}=7.65$; $P<0.0001$], nas doses de 5 ($P<0.05$) e 25 pmol ($P<0.01$) (Figura 29A), e na freqüência de entradas nestes braços do LCE [$F_{(4,34)}=5.64$; $P<0.0001$], nestas mesmas doses ($P<0.01$ e $P<0.05$, respectivamente) (Figura 29B). Além disso, STY (**4**) reduziu significativamente o número de estiramentos corporais protegidos [$F_{(4,34)}=20.85$; $P<0.0001$], nas doses de 5 e 25 pmol ($P<0.01$) (Tabela

5), bem como aumentou o número de imersões desprotegidas de cabeça e a exploração da região distal dos braços abertos do LCE [$F_{(4,34)}=4.36$; $P<0.0001$ e $F_{(4,34)}=4.89$; $P<0.0001$, respectivamente], na doses de 5 e 25 pmol ($P<0.05$). (Figuras 29C e 29 D, respectivamente).

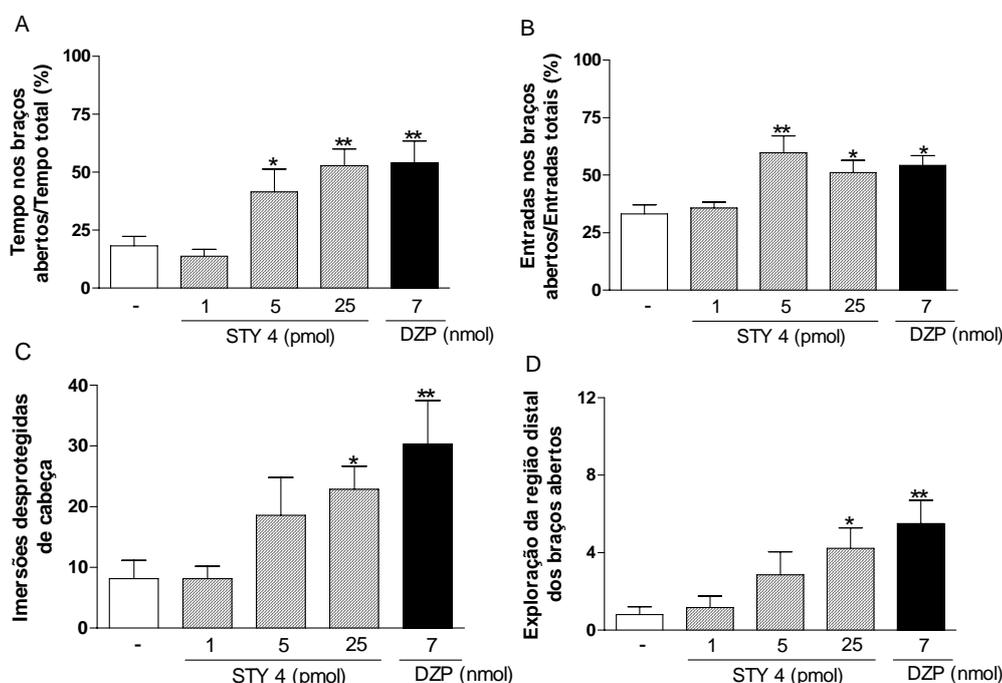


Figura 29 - Efeito da administração central da dihidroestiril-2-pirona (**4**) (DST 4, 1 - 25 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. Diazepam (DZP, 7 nmol, i.c.v.) foi utilizado como droga ansiolítica padrão. Porcentagem de tempo de permanência (A) e frequência de entradas nos braços abertos (B), bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça (C) e a exploração da região distal dos braços abertos (D) do LCE são mostrados. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 5-12 animais. * $P\leq 0.05$ e ** $P\leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

A administração central da STY (**7**), por sua vez, induziu um conjunto de alterações comportamentais similares àquelas observadas para os demais compostos supracitados. Ou seja, a injeção da STY (**7**), em camundongos, foi capaz de aumentar a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos [$F_{(7,77)}=2.81$; $P<0.0001$], nas doses de 0.2 e 5 pmol ($P<0.05$) (Figura 30A), e a frequência de entradas nestes braços do LCE [$F_{(7,77)}=2.57$;

$P < 0.0001$], na dose de 5 pmol ($P < 0.01$) (Figura 30B). Além disso, a injeção central de STY (7) aumentou o número de imersões desprotegidas de cabeça [$F_{(7,77)} = 3.17$; $P < 0.0001$], nas doses de 0,2, 1 e 5 pmol ($P < 0.05$) (Figura 30C), e reduziu os estiramentos corporais protegidos [$F_{(7,77)} = 4.82$; $P < 0.0001$], na dose de 5 pmol ($P < 0.05$) (Tabela 5).

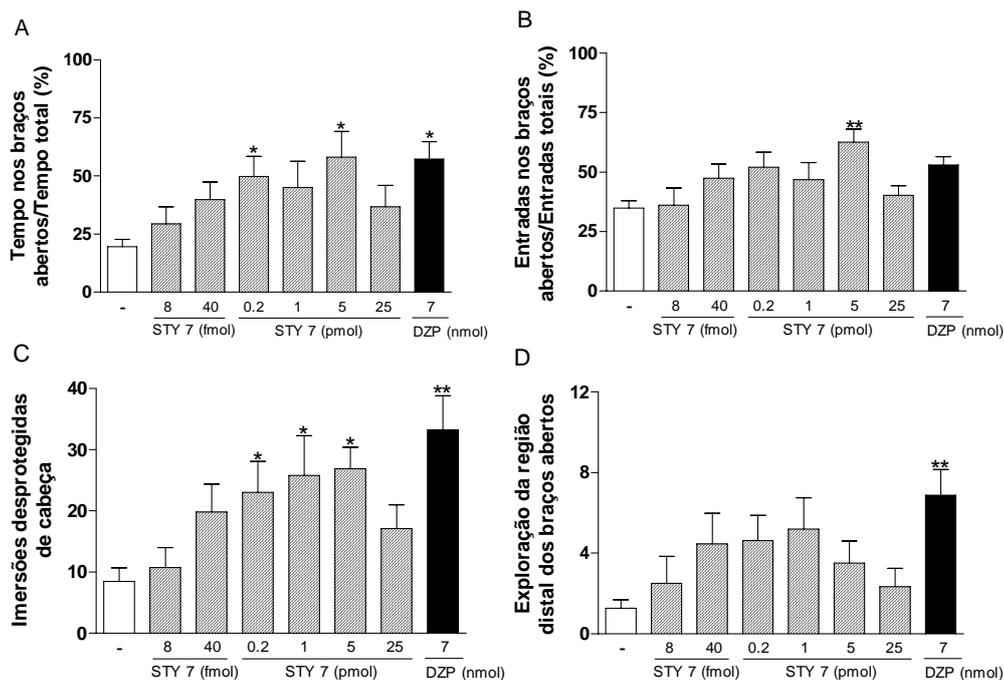


Figura 30 - Efeito da administração central da dihidroestiril-2-pirona (7) (DST 7, 8 fmol - 25 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. Diazepam (DZP, 7 nmol, i.c.v.) foi utilizado como droga ansiolítica padrão. Porcentagem de tempo de permanência (A) e frequência de entradas nos braços abertos (B), bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça (C) e a exploração da região distal dos braços abertos (D) do LCE são mostrados. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 5-12 animais. * $P \leq 0.05$ e ** $P \leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

Os demais parâmetros comportamentais avaliados no LCE como entradas nos braços fechados e comportamento de levantar, não foram modificados por quaisquer dos tratamentos ($P > 0.05$; Tabela 5). O conjunto de alterações comportamentais induzidas pela injeção central dos compostos DST (1) ou (3) e STY (4) ou (7), em camundongos, foram

similares àquelas induzidas por DZP, o BDZ padrão (Figuras 30A, 30B, 30C, 30D e Tabela 5).

Tabela 5 - Efeito da administração central da dihidroestiril-2-pirona (**1**) ou (**3**) e estiril-2-pironas (**4**) ou (**7**), isoladas de *Polygala sabulosa*, em outros parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).

Drogas	Dose/sítio	LCE			
		ECp	EBF	REA	N
C	-	13.83 ± 2.28	7.83 ± 1.03	9.00 ± 0.77	12
DST (1)	0.2 pmol	14.22 ± 2.54	9.56 ± 1.47	12.33 ± 1.77	9
DST (1)	1 pmol	7.11 ± 1.44*	8.44 ± 1.47	10.00 ± 1.51	9
DST (1)	5 pmol	5.09 ± 1.55**	7.73 ± 1.07	7.91 ± 0.82	11
DST (1)	25 pmol	8.62 ± 1.60	7.00 ± 1.62	8.38 ± 2.11	8
DZP	7 nmol	2.50 ± 0.76**	6.83 ± 1.14	7.83 ± 1.01	6
DZP	10 nmol	4.60 ± 1.29*	7.80 ± 1.16	7.20 ± 1.66	5
DZP	20 nmol	0.71 ± 0.47**	10.00 ± 1.97	9.86 ± 1.77	7
C	-	16.60 ± 2.22	6.93 ± 0.74	9.07 ± 0.63	15
DST (3)	0.3 fmol	11.30 ± 2.53	6.90 ± 0.80	7.70 ± 0.60	10
DST (3)	1.6 fmol	7.80 ± 2.49*	6.30 ± 0.60	8.80 ± 1.46	10
DST (3)	8 fmol	7.31 ± 1.48**	5.23 ± 0.67	7.31 ± 0.89	13
DST (3)	40 fmol	8.71 ± 2.11*	5.79 ± 0.91	7.43 ± 0.92	14
DST (3)	0.2 pmol	14.44 ± 2.77	7.44 ± 0.99	9.67 ± 1.13	9
DST (3)	1 pmol	12.13 ± 1.55	7.27 ± 0.78	7.80 ± 0.73	15
DST (3)	5 pmol	13.00 ± 2.07	6.92 ± 0.76	8.08 ± 0.73	13
DST (3)	25 pmol	13.92 ± 2.04	9.31 ± 0.98	8.15 ± 0.73	13
DZP	7 nmol	2.57 ± 0.65**	7.43 ± 1.13	8.43 ± 1.04	7
C	-	11.91 ± 1.33	7.18 ± 0.87	8.73 ± 0.79	11
STY (4)	1 pmol	12.83 ± 1.45	8.67 ± 0.71	10.80 ± 1.36	6
STY (4)	5 pmol	3.14 ± 0.99**	6.00 ± 2.14	6.57 ± 2.15	7
STY (4)	25 pmol	3.22 ± 0.52**	6.67 ± 0.94	7.67 ± 0.80	9
DZP	7 nmol	2.50 ± 0.76**	6.83 ± 1.14	7.83 ± 1.01	6
C	-	13.53 ± 1.37	7.47 ± 0.70	10.33 ± 0.85	15
STY (7)	8 fmol	15.50 ± 3.13	8.75 ± 1.16	7.88 ± 1.25	8
STY (7)	40 fmol	10.27 ± 2.25	5.54 ± 0.59	8.18 ± 1.07	11
STY (7)	0.2 pmol	7.94 ± 2.05	6.31 ± 1.32	7.25 ± 1.18	16
STY (7)	1 pmol	7.50 ± 1.48	6.20 ± 0.87	9.40 ± 1.14	10
STY (7)	5 pmol	3.38 ± 1.16*	5.12 ± 0.99	7.25 ± 1.44	8
STY (7)	25 pmol	7.44 ± 2.20	7.00 ± 1.24	9.22 ± 1.08	9
DZP	7 nmol	1.88 ± 0.69*	7.75 ± 1.03	9.25 ± 1.36	8

Cada valor representa a média ± E.P.M de 5-15 animais (N = número de animais). * $P < 0.05$ ou ** $P < 0.01$, quando comparado ao grupo controle. Dados analisados por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Abreviações: C = controle, DST = dihidroestiril-2-pirona, STY = estiril-2-pirona, DZP = diazepam, ECp = estiramentos corporais protegidos, EBF = entradas nos braços fechados, REA = *rearing* (comportamento de levantar).

Os dados obtidos após o tratamento central com os compostos DST (2) e STY (5) não foram estatisticamente diferentes do grupo controle, em nenhum dos parâmetros comportamentais analisados, conforme ilustra as figuras 31, 32 e Tabela 6.

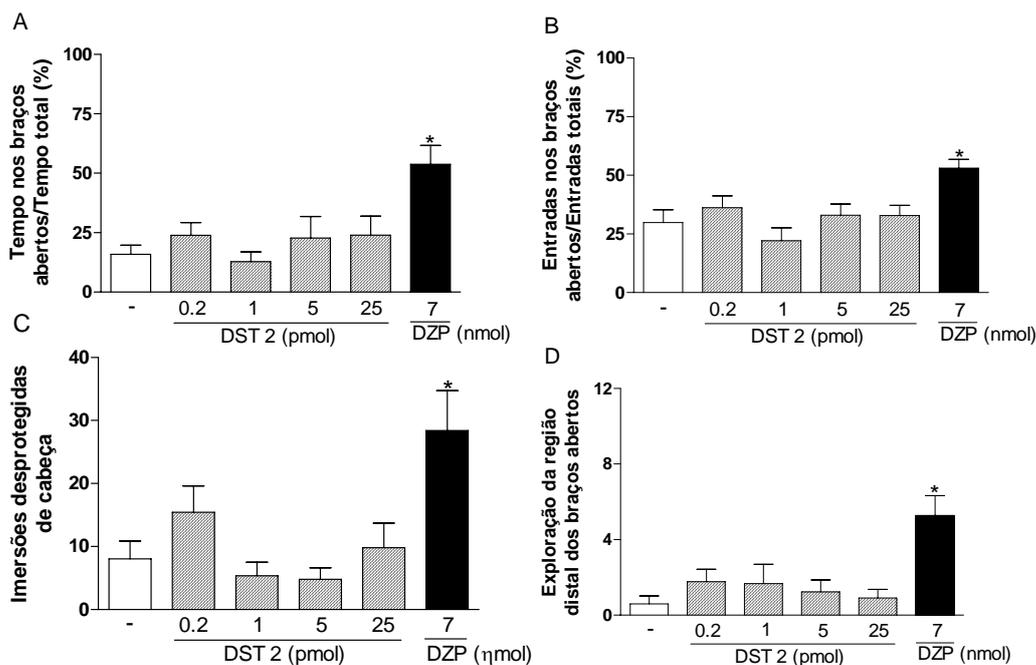


Figura 31 - Efeito da administração central da dihidroestiril-2-pirona (2) (DST 2, 0.2 pmol - 25 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. Diazepam (DZP, 7 nmol, i.c.v.) foi utilizado como droga ansiolítica padrão. Porcentagem de tempo de permanência (A) e frequência de entradas nos braços abertos (B), bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça (C) e a exploração da região distal dos braços abertos (D) do LCE são mostrados. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 5-12 animais. * $P \leq 0.05$ e ** $P \leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

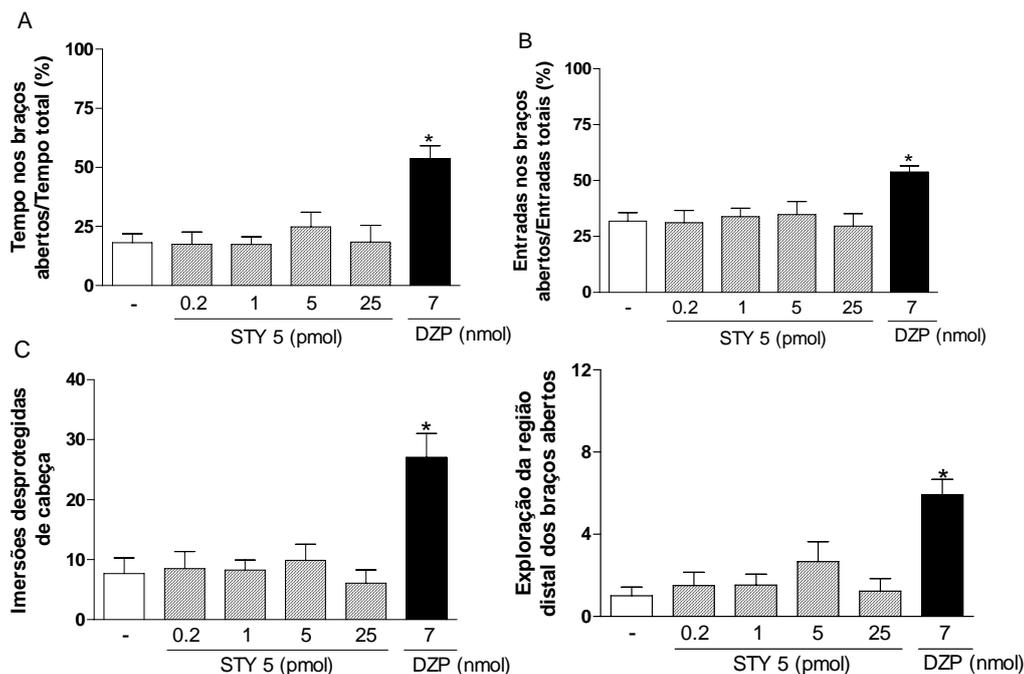


Figura 32 - Efeito da administração central da estilil-2-pirona (**5**) (STY 5, 0.2 pmol - 25 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. Diazepam (DZP, 7 nmol, i.c.v.) foi utilizado como droga ansiolítica padrão. Porcentagem de tempo de permanência (A) e freqüência de entradas nos braços abertos (B), bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça (C) e a exploração da região distal dos braços abertos (D) do LCE são mostrados. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 5-12 animais. * $P \leq 0.05$ e ** $P \leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

Tabela 6 - Efeito da administração central da dihidroestiril-2-pirona (**2**) e estiril-2-pironas (**5**), isoladas de *Polygala sabulosa*, em outros parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).

Drogas	Dose/sítio	LCE			
		ECp	EBF	REA	N
C	-	12.56 ± 1.58	7.00 ± 1.04	8.56 ± 0.84	9
DST (2)	0.2 pmol	17.78 ± 3.24	9.33 ± 0.80	11.89 ± 1.99	9
DST (2)	1 pmol	17.44 ± 2.14	9.89 ± 1.22	11.33 ± 1.33	9
DST (2)	5 pmol	13.56 ± 2.82	8.22 ± 1.32	7.33 ± 1.08	9
DST (2)	25 pmol	11.00 ± 1.91	6.92 ± 0.80	9.00 ± 1.72	12
DZP	7 nmol	2.86 ± 0,74**	6.86 ± 0.96	8.43 ± 1.04	7
C	-	14.62 ± 2.24	7.31 ± 0.74	9.23 ± 0.74	13
DST (5)	0.2 pmol	15.25 ± 2.03	7.06 ± 0.94	8.81 ± 0.94	16
DST (5)	1 pmol	16.47 ± 2.38	8.35 ± 1.47	10.94 ± 0.52	17
DST (5)	5 pmol	17.47 ± 2.16	8.20 ± 0.79	10.64 ± 0.99	15
DST (5)	25 pmol	19.23 ± 3.03	7.85 ± 0.77	12.31 ± 1.83	13
DZP	7 nmol	6.00 ± 1.21**	8.42 ± 1.17	10.17 ± 1.21	12

Cada valor representa a média ± E.P.M de 7-17 animais (N = número de animais). * $P < 0.05$ ou ** $P < 0.01$, quando comparado ao grupo controle. Dados analisados por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Abreviações: C = controle, DST = dihidroestiril-2-pirona, STY = estiril-2-pirona, DZP = diazepam, ECp = estiramentos corporais protegidos, EBF = entradas nos braços fechados, REA = *rearing* (comportamento de levantar).

4.5. Efeito do flumazenil nas ações da FAE de *Polygala sabulosa* nas convulsões induzidas por PTZ avaliadas através do registro de eletroencefalograma

4.5.1. Observações comportamentais

Ratos pré-tratados com salina/veículo (controle), após a injeção de PTZ (80 mg/kg; i.p.), apresentaram espasmos mioclônicos da cabeça e pescoço com clonias se espalhando para as patas anteriores. Em seguida, os animais apresentaram convulsões clônicas generalizadas iniciando com *running* (“corrida selvagem”), seguido da perda do reflexo postural e culminando em clonias do corpo inteiro. Os parâmetros de latência e duração do primeiro espasmo mioclônico e da convulsão clônica generalizada bem como a severidade das convulsões e letalidade foram registrados e estão resumidos na Tabela 7.

A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do pré-tratamento [$F(5,30)=7.90$, $P < 0.01$ e $F(5,30)=7.74$, $P < 0.01$, respectivamente], tratamento

[$F(5,30)=4.49$, $P<0.05$ e $F(5,30)=5.75$, $P<0.01$, respectivamente] e pré-tratamento x tratamento [$F(5,30)=3.73$, $P<0.05$ e $F(5,30)=4.17$, $P<0.05$, respectivamente] na latência e duração do primeiro espasmo mioclônico. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que a FAE (750 mg/kg) aumentou a latência ($P<0.01$) e reduziu a duração do primeiro espasmo mioclônico ($P<0.01$), similar ao DZP (5 mg/kg) (latência, $P<0.05$ e duração, $P<0.01$) (Tabela 7). O FMZ (10 mg/kg) *per se* não foi capaz de modificar nenhum dos parâmetros convulsivos registrados ($P>0.05$), entretanto, bloqueou o efeito anticonvulsivante da FAE, bem como do DZP nos parâmetros de latência e duração do primeiro espasmo mioclônico (ambos $P<0.05$) (Tabela 7).

A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do pré-tratamento [$F(5,30)=258.14$, $P<0.0001$ e $F(5,30)=100.37$, $P<0.0001$, respectivamente], tratamento [$F(5,30)=872.24$, $P<0.0001$ e $F(5,30)=284.65$, $P<0.0001$, respectivamente] e pré-tratamento x tratamento [$F(5,30)=296.99$, $P<0.0001$ e $F(5,30)=113.65$, $P<0.0001$, respectivamente] nos parâmetros de latência e duração da primeira convulsão clônica generalizada. A análise *post-hoc* indicou que a FAE aumentou significativamente a latência para a primeira convulsão clônica generalizada ($P<0.0001$) e reduziu a sua duração ($P<0.0001$), de forma similar ao DZP (ambos $P<0.0001$) (Tabela 7). Além disso, o FMZ foi capaz de bloquear totalmente o efeito anticonvulsivante do DZP nos parâmetros de latência e duração da primeira convulsão clônica generalizada (ambos $P<0.0001$), mas o antagonista não bloqueou o efeito protetor da FAE nestes mesmos parâmetros convulsivos analisados (Tabela 7).

O teste de Kruskal-Wallis revelou um efeito significativo entre os diferentes tratamentos na severidade das convulsões [$\chi^2(5) = 36.00$, $P<0.0001$]. A análise *post-hoc* de Mann-Whitney mostrou que o tratamento salina/FAE reduziu significativamente a severidade das convulsões [salina/veículo, 5 (5-5) escores; salina/FAE, 3 (3-3) escores] ($P<0.01$), de forma similar ao grupo salina/DZP [salina/salina, 5 (5-5) escores; salina/DZP, 3 (3-3) escores] ($P<0.01$). O tratamento FMZ/veículo *per se* não foi capaz de alterar o grau de severidade das convulsões ($P>0.05$), porém bloqueou totalmente o efeito protetor do DZP na severidade das convulsões [salina/DZP, 3 (3-3) escores; FMZ/veículo, 5 (5-5) escores] ($P<0.01$), sem modificar o efeito protetor da FAE neste mesmo parâmetro comportamental ($P>0.05$). De maneira similar, os tratamentos salina/FAE bem como salina/DZP protegeram completamente os ratos contra as mortes induzidas por PTZ (ambos $P<0.01$, teste de Fischer). O FMZ, por sua vez, bloqueou o efeito protetor do DZP

na letalidade induzida pelo PTZ ($P < 0.01$, teste de Fischer), porém sem modificar o efeito da FAE neste parâmetro convulsivo ($P > 0.05$, teste de Fischer) (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito da administração oral da fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE; 750 mg/kg) na latência para e a duração do primeiro espasmo mioclônico/clônico (MC/C) e da primeira convulsão clônica generalizada (CCG), bem como na severidade das convulsões (SEVER) e letalidade no teste de convulsões induzidas por PTZ, em ratos.

Tratamentos		Variáveis					
s.c	v.o	1° MC/C		1° CCG		SEVER	LET
		Latência (s)	Duração (s)	Latência (s)	Duração (s)		(%)
SAL	VEÍC	59.00±6.20	22.83±2.70	120.20±7.82	66.50±3.07	5 (5-5)	100
SAL	FAE	93.50±10.53**	14.50±1.18**	600.00±0.00** ^a	0.00±0.00** ^a	3 (3-3)**	0**
FMZ	VEÍC	64.67±4.74	21.00±1.03	141.33±11.33	63.67±5.72	5 (5-5)	100
FMZ	FAE	68.00±5.28 [#]	22.00±1.92 [#]	600.00±0.00** ^a	0.00±0.00** ^a	3 (3-3)**	0**
SAL	DZP	89.17±6.70*	12.83±1.83**	600.00±0.00** ^a	0.00±0.00** ^a	3 (3-3)**	0**
FMZ	DZP	63.50±4.14 [#]	19.17±1.35 [#]	136.70±23.83 ^{##}	69.83±1.58 ^{##}	5 (5-5) ^{##}	100 ^{##}

Os valores da latência e duração representam a média \pm E.P.M de 6 animais por grupo (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student Newman-Keuls). A severidade foi medida pela escala modificada de Racine e os valores representam a mediana \pm intervalo interquartil (Q1-Q3) (Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney). A porcentagem de mortes em 24 h foi analisada pelo teste de Fischer. * $P < 0.05$ ou ** $P < 0.01$, quando comparado ao grupo controle (SAL/VEÍC) e [#] $P < 0.05$ ou ^{##} $P < 0.01$, quando comparado aos grupos SAL/FAE ou SAL/DZP. Abreviações: s.c. = via subcutânea, v.o. = via oral, SAL = salina, VEÍC = veículo, FMZ = flumazenil, DZP = diazepam, ^a = animais que não apresentaram CCG, sendo os tempos de latência e duração considerados de 600 s e 0 s, respectivamente.

4.5.2. Registro do eletroencefalograma (EEG)

O registro A da figura 33 ilustra as convulsões eletrográficas induzidas por PTZ (80 mg/kg, i.p.) em um animal controle (salina/veículo). Um minuto após administração de PTZ, observou-se um início de atividade eletrográfica rápida de alta voltagem, característico de descargas epileptiformes, tanto no córtex quanto no hipocampo (Fig. 33A, c). Esta resposta fica visível se comparamos este traçado eletrográfico (Ac) com o registro basal (Aa). A atividade epileptiforme ocorreu no segundo período, evidenciado pela presença de espículas-ondas sincrônicas isoladas no registro (Fig. 33A, d), caracterizando o primeiro espasmo mioclônico. Aproximadamente no terceiro minuto, os animais apresentaram *bursts* de alta voltagem eletrográfica (Fig. 33A, e), caracterizando a primeira convulsão clônica generalizada. Nos períodos subsequentes, 6 e 9 minutos, oscilações

ocorreram no registro com atividade rápida de baixa voltagem e algumas espículas-ondas isoladas (Fig. 33A, f e g). Doze minutos após a injeção de PTZ, uma outra convulsão clônica generalizada ocorreu (Fig. 33A, h) com um perfil eletrográfico similar ao terceiro período.

Na Figura 33B, mostra-se o efeito do tratamento oral com a salina/FAE (750 mg/kg) de *P. sabulosa* nas convulsões induzidas por PTZ. O tratamento foi capaz de suprimir quase completamente as convulsões eletrográficas conforme pode ser visualizado através da redução das descargas de alta voltagem induzidas pelo PTZ (Fig. 33B, c-h). Este grupo de animais não apresentou nenhum *burst* de alta voltagem eletrográfica que caracterize uma convulsão clônica generalizada, confirmando a ausência visual de *status epilepticus*. Entretanto, aproximadamente no terceiro minuto, houve a presença de atividade rápida de alta voltagem que coincidiu com o primeiro espasmo mioclônico (Fig. 33B, e). Além disso, espículas-ondas isoladas estavam presentes no nono e décimo segundo minutos, mostrando que o tratamento salina/FAE foi capaz de promover um bloqueio parcial das convulsões eletrográficas induzidas por PTZ.

No registro 33C, estão os traçados eletrográficos das convulsões induzidas por PTZ na presença de FMZ, um antagonista BDZ. A administração de FMZ/veículo *per se* não foi capaz de modificar o padrão de convulsões eletrográficas induzidas por PTZ (Fig. 33C, c-h), já que o perfil deste registro foi similar ao do grupo controle (Fig. 33A, c-h). O grupo de animais tratados com FMZ/FAE mostrou a presença de *bursts* de alta voltagem típica de atividade eletroconvulsiva (Fig. 33D, c-h), similar ao grupo controle (Fig. 33A, c-h). Interessantemente, embora estes animais tenham exibido achados eletrográficos indicativos de atividade epileptiforme, nenhum deles apresentou convulsões clônicas generalizadas durante todo o período de observação, sugerindo que o FMZ foi capaz de bloquear parcialmente o efeito anticonvulsivante da FAE. Finalmente, o tratamento com salina/DZP suprimiu as descargas eletroconvulsivas induzidas pelo PTZ, como mostrado na Figura 33E (c-h). Este efeito foi totalmente antagonizado pelo FMZ, uma vez que foram identificados achados eletrográficos indicativos de atividade epileptiforme (Figura 33F, c-h), similar ao grupo controle.

Figura 33

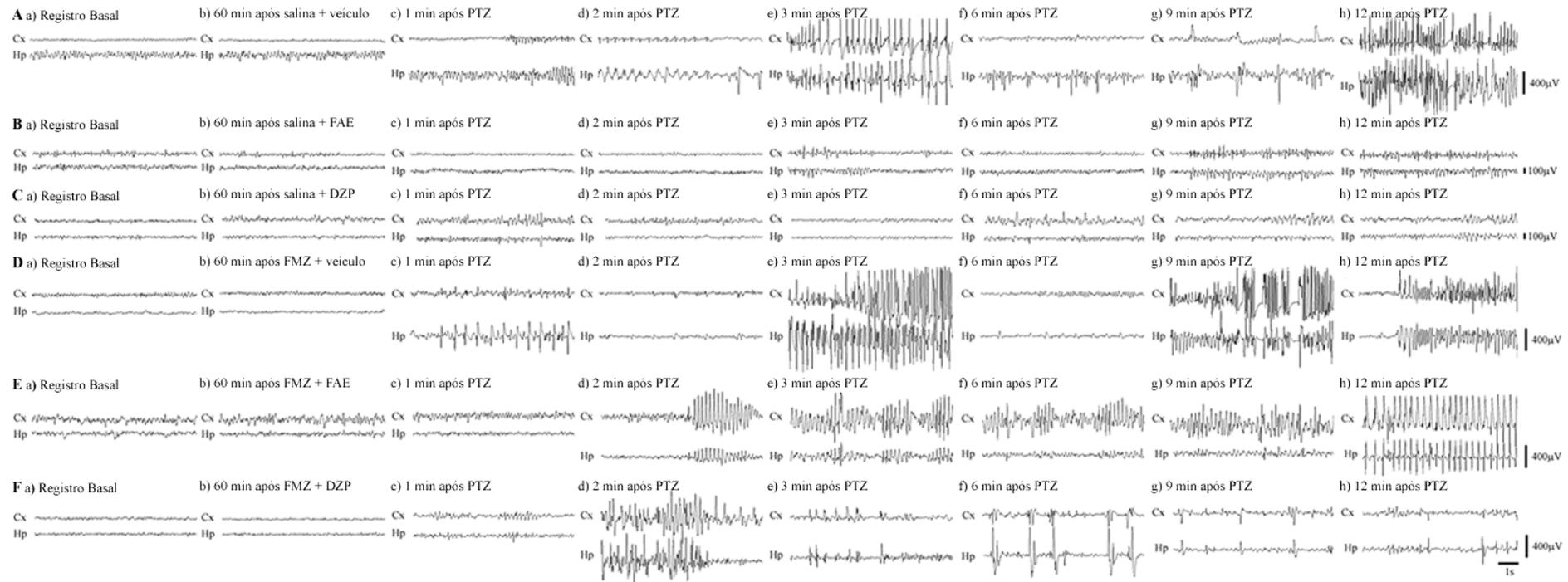


Figura 33 - Influência do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 10 mg/kg; s.c.) no efeito da fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE, 750 mg/kg; v.o.) na atividade eletroencefalográfica (EEG) avaliada durante as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ; 80 mg/Kg, i.p.), em ratos. Períodos representativos do EEG (8 s) das regiões A₃-cortical (Cx; superior) e CA₃-hipocampal (Hp; inferior) são mostrados. **A.** (a) Registro do EEG basal; (b) EEG 60 min após o tratamento com salina s.c. + veículo v.o.; (c), (d), (e), (f), (g) e (h) EEG 1, 2, 3, 6, 9 e 12 min após a injeção de PTZ (80 mg/kg; i.p.). **B.** (a) Registro do EEG basal; (b) EEG 60 min após o tratamento com salina s.c. + FAE (750 mg/kg) v.o.; (c), (d), (e), (f), (g) e (h) EEG 1, 2, 3, 6, 9 e 12 min após a injeção de PTZ (80 mg/kg; i.p.). **C.** (a) Registro do EEG basal; (b) EEG 60 min após o tratamento com salina s.c. + DZP (5 mg/kg) v.o.; (c), (d), (e), (f), (g) e (h) EEG 1, 2, 3, 6, 9 e 12 min após a injeção de PTZ (80 mg/kg; i.p.). **D.** (a) Registro do EEG basal; (b) EEG 60 min após o tratamento com FMZ 10 mg/kg s.c. (duas doses de 5 mg/kg em um intervalo de 40 min) + veículo v.o.; (c), (d), (e), (f), (g) e (h) EEG 1, 2, 3, 6, 9 e 12 min após a injeção de PTZ (80 mg/kg; i.p.). **E.** (a) Registro do EEG basal; (b) EEG 60 min após o tratamento com FMZ 10 mg/kg s.c. (duas doses de 5 mg/kg em um intervalo de 40min) + FAE 750 mg/kg v.o.; (c), (d), (e), (f), (g) e (h) EEG 1, 2, 3, 6, 9 e 12 min após a injeção de PTZ (80 mg/kg, i.p.). **F.** (a) Registro do EEG basal; (b) EEG 60 min após o tratamento com FMZ 10 mg/kg s.c. (duas doses de 5 mg/kg em um intervalo de 40min) + DZP 5 mg/kg v.o.; (c), (d), (e), (f), (g) e (h) EEG 1, 2, 3, 6, 9 e 12 min após a injeção de PTZ (80 mg/kg, i.p.).

4.6. Efeito da FAE de *Polygala sabulosa* nas convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo

Como mostrado na Figura 34, o pré-tratamento com a FAE de *P. sabulosa* também protegeu os camundongos das convulsões induzidas por ECM, observado através da diminuição significativa da duração da extensão tônica das patas posteriores [$F_{(3,44)}=7.68$; $P<0.001$], nas doses de 500 e 1.000 mg/kg ($P<0.01$) (Figura 34A). Além disso, o tratamento com a FAE, nas doses de 500 e 1.000 mg/kg, reduziu a porcentagem de animais que apresentaram o componente extensor tônico ($P<0.01$, teste de Fischer) (Figura 34B).

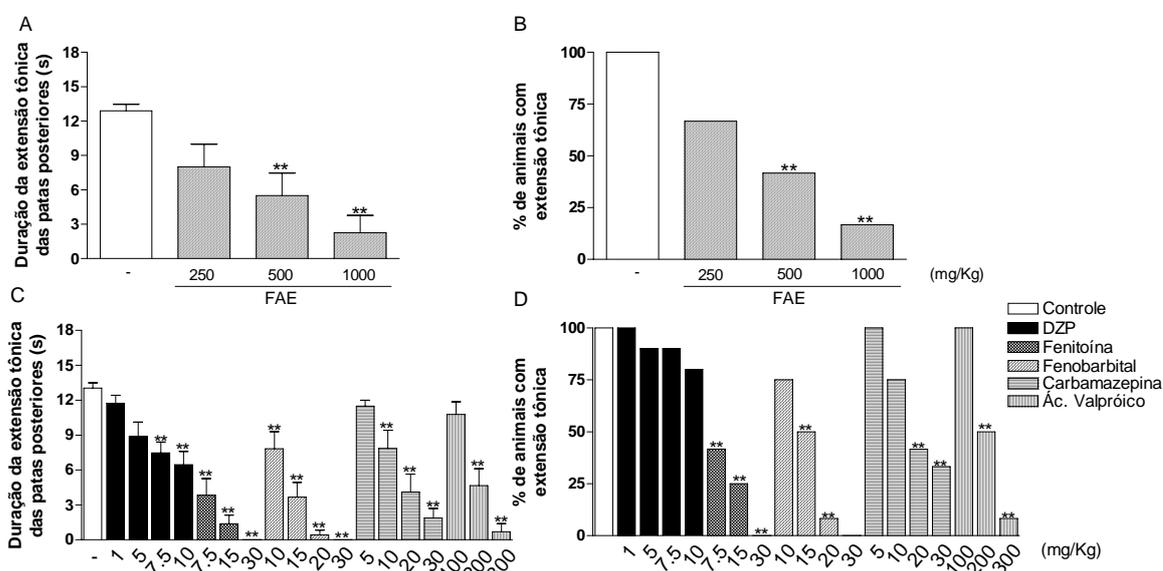


Figura 34 – Efeito da fração acetato de etila (FAE, 250-1000 mg/kg; v.o.) de *Polygala sabulosa* na duração da extensão tônica (A) e porcentagem de animais que apresentaram a extensão tônica das patas posteriores (B) no teste do eletrochoque transcorneal máximo (ECM) em camundongos. O efeito de drogas anticonvulsivantes efetivas (DZP, 1-10 mg/kg; fenitoína, 7.5-30 mg/kg, fenobarbital, 10-30 mg/kg, carbamazepina, 5-30 mg/kg, e ácido valpróico, 100-300 mg/kg) na extensão tônica e porcentagem de animais que apresentaram a extensão tônica das patas posteriores é mostrado nos painéis C e D, respectivamente. Cada valor representa a média \pm E.P.M. ou porcentagem, respectivamente, de 10-12 animais. * $P\leq 0.05$ e ** $P\leq 0.01$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett ou teste de probabilidade exata de Fisher, respectivamente).

Os efeitos induzidos pela FAE neste teste foram similares àqueles obtidos com animais pré-tratados com drogas efetivas contra as convulsões induzidas por ECM, tais como fenitoína, fenobarbital, carbamazepina e ácido valpróico. Todas estas drogas foram

capazes de reduzir a duração total da extensão tônica das patas posteriores (Figura 34C), bem como a porcentagem de animais que apresentaram o componente extensor tônico (Figura 34D), diferentemente do DZP, que promoveu somente uma pequena redução na duração da extensão tônica e em doses consideradas tóxicas (Figura 34C).

4.7. Efeito do pré-tratamento com flumazenil nas alterações comportamentais induzidas pelas dihidroestiril-2-pironas (1) ou (3) e estiril-2-pironas (4) ou (7) no labirinto em cruz elevado

A Figura 35 (A-D) mostra as alterações comportamentais induzidas pela injeção central da DST (1) bem como o efeito do pré-tratamento i.p. com FMZ, nas ações da DST (1) no modelo do LCE.

A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator tratamento i.c.v. sobre a porcentagem de tempo de permanência [$F_{(5,56)}=16.58$; $P<0.0001$] e frequência de entradas [$F_{(5,56)}=17.05$; $P<0.0001$] nos braços abertos do LCE, bem como sobre os parâmetros etológicos imersões desprotegidas de cabeça [$F_{(5,56)}=31.73$; $P<0.000001$], exploração da região distal dos braços abertos do LCE [$F_{(5,56)}=28.16$; $P<0.000001$] e estiramentos protegidos corporais [$F_{(5,56)}=30.52$; $P<0.000001$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que o tratamento com DST (1) 5 pmol aumentou a porcentagem de tempo de permanência ($P<0.001$) (Figura 35A) e a frequência de entradas ($P<0.001$) nos braços abertos do LCE (Figura 35B). Além disso, a DST (1) 5 pmol promoveu um aumento significativo no número de imersões desprotegidas de cabeça (Figura 35C) e exploração da região distal dos braços abertos do LCE ($P<0.001$) (Figura 35D), bem como reduziu os estiramentos corporais protegidos ($P<0.001$) (Tabela 8). A ANOVA de duas vias não revelou diferença no fator pré-tratamento, sugerindo que o FMZ não induz qualquer alteração comportamental *per se*. O FMZ quando administrado 15 min antes da DST (1), não foi capaz de bloquear os efeitos induzidos pela DST (1) no LCE, embora tenha reduzido a diferença estatística em dois parâmetros particulares tais como porcentagem de tempo de permanência e frequência de entradas nos braços abertos do LCE (Figuras 35A e 35B, respectivamente). O pré-tratamento com FMZ 1 ou 5 mg/kg não exerceu qualquer influência nos parâmetros imersões desprotegidas de cabeça (Figura 35C), exploração da região distal dos braços abertos (Figura 35D) e estiramentos corporais protegidos (Tabela 8).

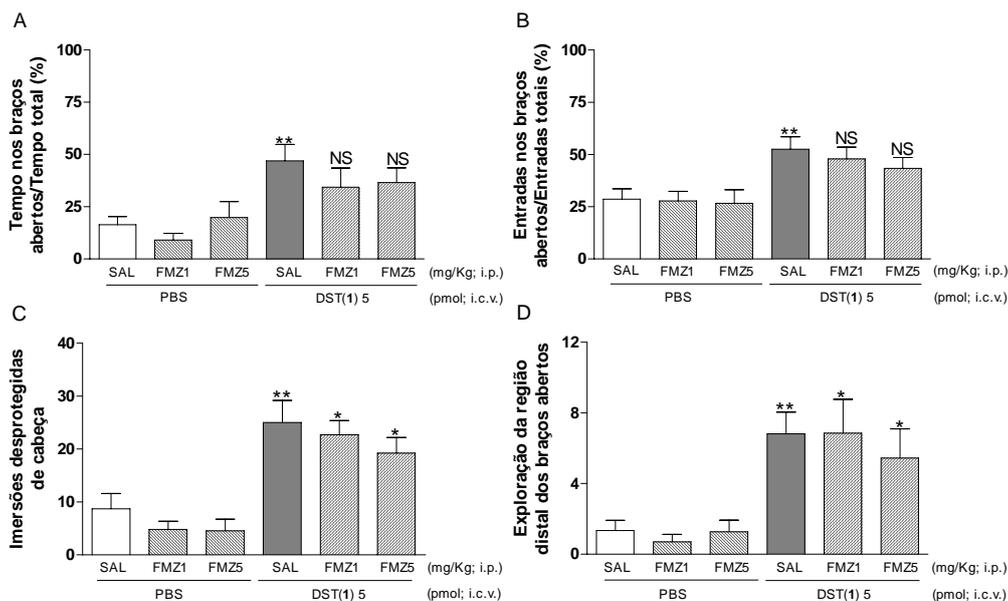


Figura 35 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-5 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central da estiril-2-pirona (1) (STY 1, 5 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. Porcentagem de tempo de permanência (A) e freqüência de entradas nos braços abertos (B), bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça (C) e a exploração da região distal dos braços abertos (D) do LCE são mostrados. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 7-16 animais. NS = sem diferença estatística em relação ao grupo controle (SAL + PBS). * $P \leq 0.05$ e ** $P \leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student Newman-Keuls).

Tabela 8 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-5 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central da estiril-2-pirona (1) (STY 1, 5 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* em outros parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).

Drogas		LCE			
i.p. (mg/kg)	i.c.v. (pmol)	ECp	EBF	REA	N
SAL	PBS	19.42 ± 2.57	8.08 ± 1.05	8.33 ± 0.71	12
FMZ 1	PBS	22.20 ± 4.02	6.40 ± 0.96	9.80 ± 1.09	10
FMZ 5	PBS	18.13 ± 1.61	5.62 ± 0.42	9.12 ± 1.44	8
SAL	DST (1) 5	7.19 ± 1.37**	6.12 ± 0.78	6.31 ± 0.46	16
FMZ 1	DST (1) 5	10.43 ± 1.40*	6.14 ± 1.06	8.43 ± 1.00	7
FMZ 5	DST (1) 5	8.44 ± 2.13*	7.89 ± 1.51	9.89 ± 1.39	9

Cada valor representa a média ± E.P.M de 7-16 animais (N = número de animais). * $P < 0.05$ ou ** $P < 0.01$, quando comparado ao grupo controle. Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student Newman-Keuls. Abreviações: SAL = salina, FMZ = flumazenil, DST = dihidroestiril-2-pirona, ECp = estiramentos corporais protegidos, EBF = entradas nos braços fechados, REA = rearing (comportamento de levantar).

A Figura 36 (A-D) mostra as alterações comportamentais induzidas pela injeção central da DST (**3**) bem como o efeito do pré-tratamento i.p. com FMZ sobre as ações deste composto no modelo do LCE.

A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator tratamento i.c.v. para a porcentagem de tempo de permanência [$F_{(7,63)}=26.47$, $P<0.000001$] e frequência de entradas [$F_{(7,63)}=24.89$, $P<0.000001$] nos braços abertos do LCE, bem como para os parâmetros etológicos imersões desprotegidas de cabeça [$F_{(7,63)}=35.69$; $P<0.000001$], exploração da região distal dos braços abertos do LCE [$F_{(7,63)}=27.92$; $P<0.000001$] e estiramentos corporais protegidos [$F_{(7,63)}=12.70$; $P<0.001$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que o tratamento com DST (**1**) 5 pmol aumentou a porcentagem de tempo de permanência ($P<0.001$) (Figura 36A) e a frequência de entradas ($P<0.001$) nos braços abertos do LCE (Figura 36B). Além disso, DST (**3**) 40 fmol promoveu um aumento significativo no número de imersões desprotegidas de cabeça (Figura 36C) e exploração da região distal dos braços abertos do LCE ($P<0.001$) (Figura 36D), bem como reduziu os estiramentos corporais protegidos ($P<0.001$) (Tabela 9). Embora a ANOVA de duas vias não tenha revelado diferença no fator pré-tratamento x tratamento, a administração i.p. de FMZ (1-10 mg/kg) bloqueou parcialmente o aumento nos parâmetros porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (Figura 36A), frequência de entradas nos braços abertos (Figura 36B), imersões desprotegidas de cabeça (Figura 36C) e exploração da região distal dos braços abertos do LCE (Figura 36D), bem como bloqueou parcialmente a redução do número de estiramentos corporais protegidos induzidas pela administração central da DST (**3**) (Tabela 9).

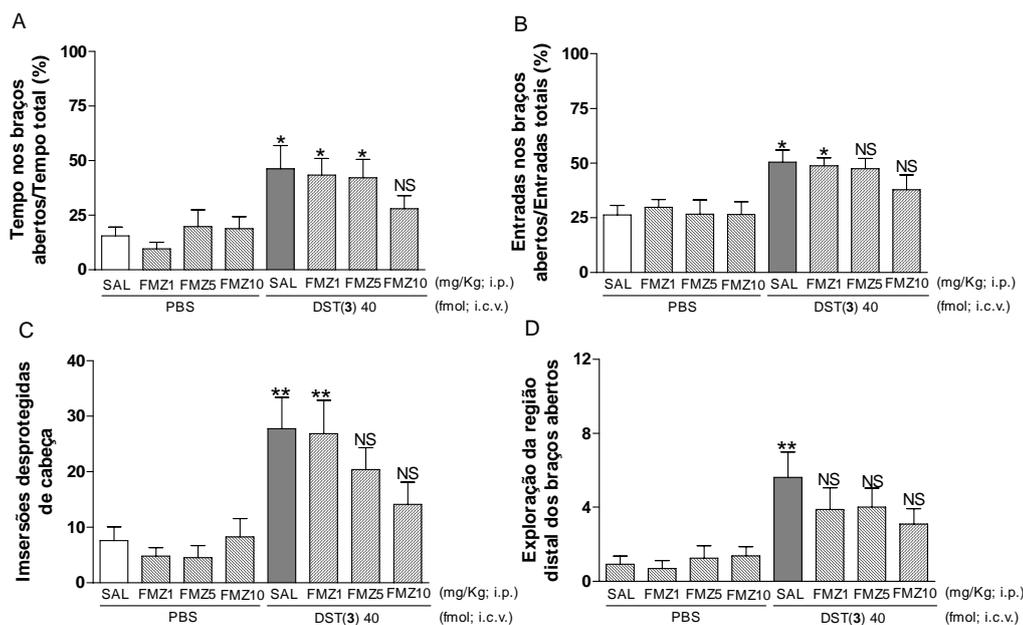


Figura 36 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central da dihidroestiril-2-pirona (3) (DST 3, 40 fmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. Porcentagem de tempo de permanência (A) e freqüência de entradas nos braços abertos (B), bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça (C) e a exploração da região distal dos braços abertos (D) do LCE são mostrados. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 7-12 animais. NS = sem diferença estatística em relação ao grupo controle (SAL + PBS). * $P \leq 0.05$ e ** $P \leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student Newman-Keuls).

Tabela 9 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central da dihidroestiril-2-pirona (3) (DST 3, 40 fmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* em outros parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).

Drogas		LCE			
i.p. (mg/kg)	i.c.v. (fmol)	ECp	EBF	REA	N
SAL	PBS	19.17 ± 1.86	7.50 ± 0.88	9.08 ± 0.93	12
FMZ 1	PBS	21.10 ± 3.74	6.20 ± 0.99	9.60 ± 1.17	10
FMZ 5	PBS	18.13 ± 1.61	5.62 ± 0.42	9.12 ± 1.44	8
FMZ 10	PBS	19.13 ± 2.28	7.88 ± 0.91	10.50 ± 1.57	8
SAL	DST (3) 40	9.62 ± 2.26**	7.88 ± 0.64	9.62 ± 0.89	8
FMZ 1	DST (3) 40	12.63 ± 3.86 ^{NS}	5.62 ± 1.07	7.00 ± 1.12	8
FMZ 5	DST (3) 40	12.14 ± 1.72 ^{NS}	8.43 ± 1.54	7.43 ± 1.06	7
FMZ 10	DST (3) 40	16.30 ± 2.26 ^{NS}	9.30 ± 1.14	10.60 ± 1.18	10

Cada valor representa a média ± E.P.M de 7-12 animais (N = número de animais). NS = sem diferença estatística em relação ao grupo controle. * $P < 0.05$ ou ** $P < 0.01$, quando comparado ao grupo controle. Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student Newman-Keuls. Abreviações: SAL = salina, FMZ = flumazenil, DST = dihidroestiril-2-pirona, ECp = estiramentos corporais protegidos, EBF = entradas nos braços fechados, REA = rearing (comportamento de levantar) NS = sem diferença estatística em relação ao grupo controle (SAL + PBS).

Como mostrado na Figura 37 (A-D), a administração central da STY (4) 25 pmol induziu um aumento significativo nos parâmetros porcentagem de tempo de permanência [$F(5,64)=16.05$, $P<0.0001$], frequência de entradas [$F(5,64)=14.66$, $P<0.0001$] nos braços abertos do LCE, imersões desprotegidas de cabeça [$F(5,64)=20.61$, $P<0.00001$], exploração da região distal dos braços abertos [$F(5,64)=9.90$, $P<0.001$], bem como reduziu significativamente o número de estiramentos corporais protegidos [$F(6,64)=9.44$, $P<0.001$]. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças significativas entre os fatores pré-tratamento x tratamento, entretanto, o FMZ 1 ou 5 mg/kg bloqueou parcialmente os efeitos induzidos pela administração central da STY (4) nos parâmetros porcentagem de tempo (Figura 37A) e frequência de entradas nos braços abertos (Figura 37B) do LCE, bem como nos parâmetros etológicos imersões desprotegidas de cabeça (Figura 37C), exploração da região distal dos braços abertos (Figura 37D) e estiramentos corporais protegidos (Tabela 10).

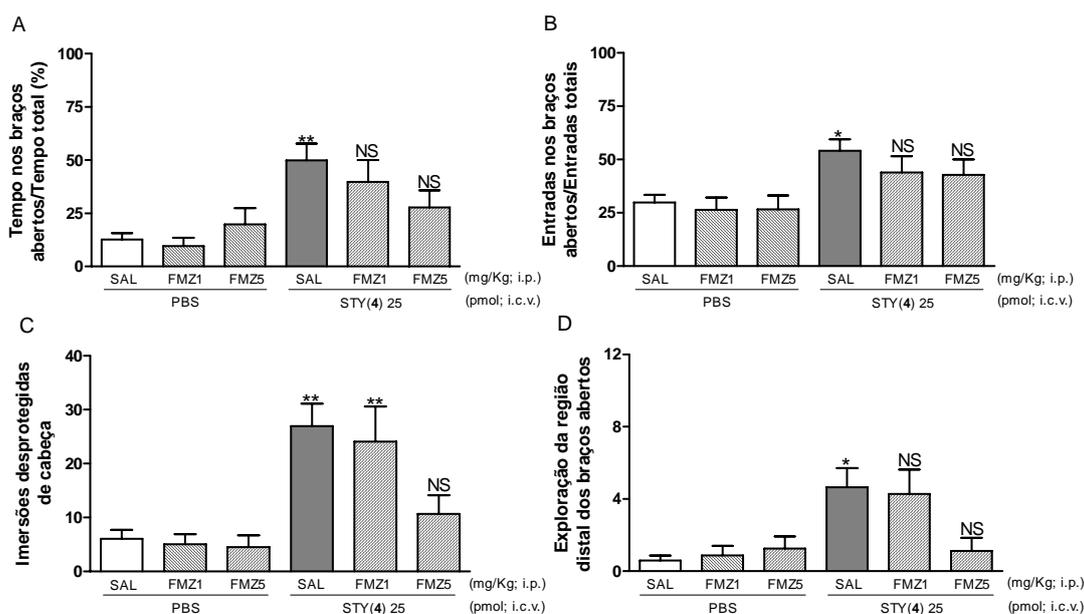


Figura 37 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central da estilil-2-pirona (4) (STY 4, 25 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. Porcentagem de tempo de permanência (A) e frequência de entradas nos braços abertos (B), bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça (C) e a exploração da região distal dos braços abertos (D) do LCE são mostrados. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 8-17 animais. NS = sem diferença estatística em relação ao grupo controle (SAL + PBS). * $P\leq 0.05$ e ** $P\leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student Newman-Keuls).

Tabela 10 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central da estiril-2-pirona (**4**) (STY 4, 25 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* em outros parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).

Drogas		LCE			
i.p. (mg/kg)	i.c.v. (pmol)	ECp	EBF	REA	N
SAL	PBS	17.76 ± 1.51	8.82 ± 1.02	9.77 ± 1.03	17
FMZ 1	PBS	19.50 ± 3.44	6.75 ± 1.03	10.50 ± 1.19	8
FMZ 5	PBS	18.13 ± 1.61	5.62 ± 0.42	9.12 ± 1.44	8
SAL	DST (4) 25	7.24 ± 1.62*	5.12 ± 0.61	7.94 ± 0.72	17
FMZ 1	DST (4) 25	15.45 ± 4.32 ^{NS}	6.46 ± 1.16	7.00 ± 1.05	11
FMZ 5	DST (4) 25	13.33 ± 1.95 ^{NS}	6.22 ± 1.29	9.33 ± 1.44	9

Cada valor representa a média ± E.P.M de 8-17 animais (N = número de animais). NS = sem diferença estatística em relação ao grupo controle. *P<0.05 ou **P<0.01, quando comparado ao grupo controle. Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student Newman-Keuls. Abreviações: SAL = salina, FMZ = flumazenil, STY = estiril-2-pirona, ECp = estiramentos corporais protegidos, EBF = entradas nos braços fechados, REA = rearing (comportamento de levantar).

Como mostrado na Figura 38 (A-D), a administração central da STY (**7**) induziu alterações comportamentais no LCE similares àquelas induzidas pelos demais compostos supracitados. Assim, a STY (**7**) 5 pmol aumentou de forma significativa a porcentagem de tempo de permanência [F(5,45)=14.95, $P<0.0001$], frequência de entradas [F(5,45)=8.61, $P<0.005$] nos braços abertos do LCE, imersões desprotegidas de cabeça [F(5,45)=12.09, $P<0.001$], exploração da região distal dos braços abertos [F(5,45)=13.81; $P<0.0005$], bem como reduziu significativamente o número de estiramentos protegidos corporais [F(5,45)=16.19, $P<0.0001$]. A ANOVA de duas vias não revelou diferença significativa entre os fatores pré-tratamento x tratamento, entretanto, o FMZ 1 ou 5 mg/kg bloqueou parcialmente os efeitos induzidos pela administração central da STY (**7**) sobre os parâmetros porcentagem de tempo (Figura 38A) e frequência de entradas nos braços abertos (Figura 38B) do LCE, bem como sobre os parâmetros etológicos imersões desprotegidas de cabeça (Figura 38C), exploração da região distal dos braços abertos (Figura 38D) e estiramentos corporais protegidos (Tabela 11).

O número de entradas nos braços fechados e comportamentos de levantar, avaliados no LCE, não foram modificados por quaisquer dos tratamentos (Tabela 11).

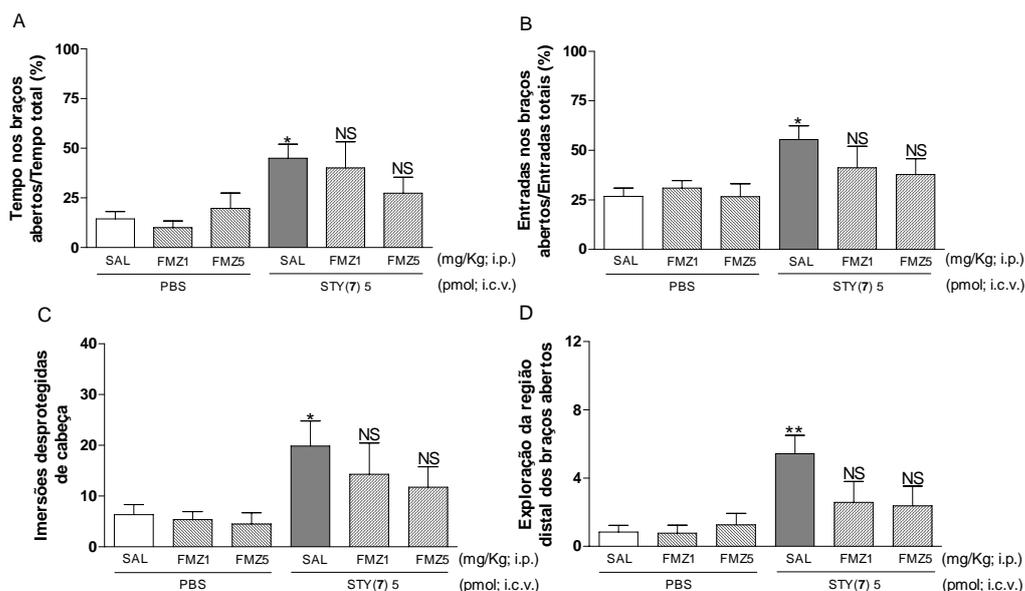


Figura 38 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central da estiril-2-pirona (7) (STY 7, 5 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. Porcentagem de tempo de permanência (A) e frequência de entradas nos braços abertos (B), bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça (C) e a exploração da região distal dos braços abertos (D) do LCE são mostrados. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 7-12 animais. NS = sem diferença estatística em relação ao grupo controle (SAL + PBS). * $P \leq 0.05$ e ** $P \leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student Newman-Keuls).

Tabela 11 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1-5 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central da estiril-2-pirona (7) (STY 7, 5 pmol, i.c.v.) isolada de *Polygala sabulosa* em outros parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).

Drogas		LCE			
i.p. (mg/kg)	i.c.v. (pmol)	ECp	EBF	REA	N
SAL	PBS	21.33 ± 2.64	8.08 ± 0.89	8.50 ± 0.74	12
FMZ 1	PBS	20.67 ± 4.16	6.44 ± 1.07	10.11 ± 1.17	9
FMZ 5	PBS	18.13 ± 1.61	5.62 ± 0.42	9.12 ± 1.44	8
SAL	DST (7) 5	6.14 ± 1.61*	7.71 ± 1.90	8.14 ± 1.10	7
FMZ 1	DST (7) 5	10.57 ± 3.93 ^{NS}	5.29 ± 1.19	7.43 ± 1.25	7
FMZ 5	DST (7) 5	13.75 ± 2.24 ^{NS}	6.00 ± 0.84	7.50 ± 1.05	8

Cada valor representa a média ± E.P.M de 7-12 animais (N = número de animais). NS = sem diferença estatística em relação ao grupo controle. * $P < 0.05$ ou ** $P < 0.01$, quando comparado ao grupo controle. Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student Newman-Keuls. Abreviações: SAL = salina, FMZ = flumazenil, STY = estiril-2-pirona, ECp = estiramentos corporais protegidos, EBF = entradas nos braços fechados, REA = rearing (comportamento de levantar).

O efeito do pré-tratamento com FMZ (10 mg/kg) nos efeitos induzidos pelo DZP no LCE está resumido na Figura 39 e Tabela 12. A ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa para o fator tratamento nos parâmetros porcentagem de tempo de permanência [$F(3,23)=23.71$, $P<0.0001$] e frequência de entradas [$F(3,23)=20.08$, $P<0.0001$] nos braços abertos do LCE, bem como no número de imersões desprotegidas de cabeça [$F(3,23)=16.73$, $P<0.001$], exploração da região distal dos braços abertos [$F(3,23)=45.21$, $P<0.0001$] e estiramentos corporais desprotegidos [$F(3,23)=41.32$, $P<0.0001$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que o DZP (7 nmol) foi capaz de aumentar a porcentagem de tempo de permanência e frequência de entradas ($P<0.001$) (Figura 39A e 39B, respectivamente) nos braços abertos do LCE e reduzir os estiramentos corporais desprotegidos ($P<0.001$) (Tabela 12). Além disso, o DZP aumentou o número de imersões desprotegidas de cabeça ($P<0.001$) (Figura 39C) e a exploração da região distal dos braços abertos ($P<0.0001$) (Figura 39D).

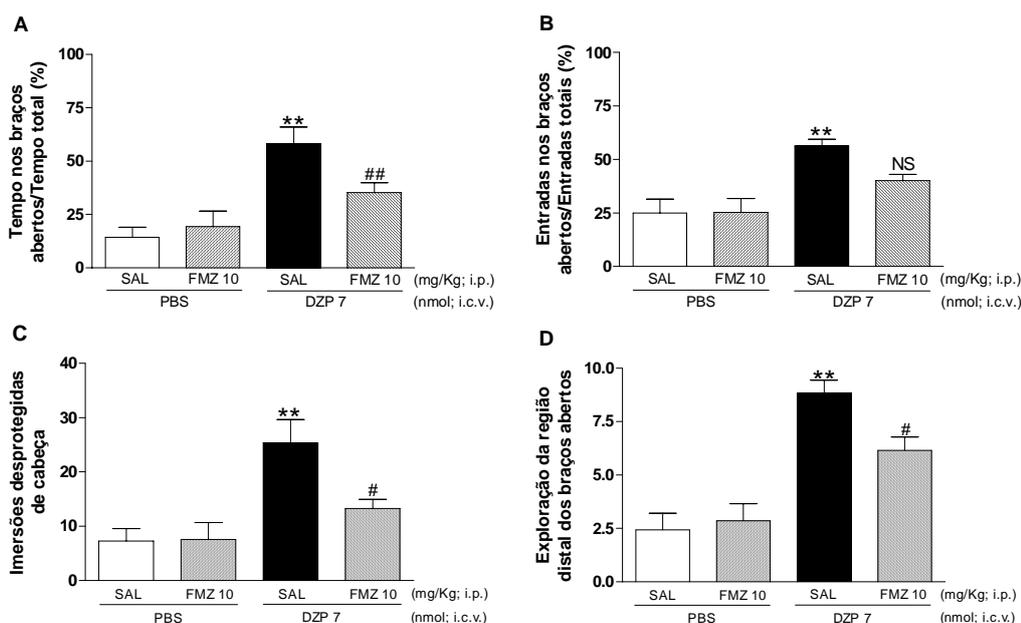


Figura 39 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ 10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central do diazepam (DZP, 7 nmol, i.c.v.) no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), registrado por 5 min. Porcentagem de tempo de permanência (A) e frequência de entradas nos braços abertos (B), bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça (C) e a exploração da região distal dos braços abertos (D) do LCE são mostrados. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 7-12 animais. NS = sem diferença estatística em relação ao grupo controle (SAL + PBS). * $P\leq 0.05$ e ** $P\leq 0.01$, quando comparado ao grupo controle; # $P\leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL+DZP (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student Newman-Keuls).

A ANOVA de duas vias revelou também uma diferença significativa para o fator interação pré-tratamento x tratamento. A análise de Newman-Keuls mostrou que o FMZ (10 mg/kg) bloqueou o efeito do DZP nos parâmetros porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (Figura 39A), número de imersões desprotegidas de cabeça (Figura 39C) e exploração da região distal dos braços abertos ($P < 0.01$) (Figura 39D), sem modificar o efeito do DZP nos parâmetros frequência de entradas nos braços abertos bem como nos estiramentos corporais protegidos ($P > 0.05$) (Figura 39B e Tabela 12, respectivamente).

Tabela 12 - Efeito do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central do diazepam (DZP, 7 nmol, i.c.v.) em outros parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).

Drogas		LCE			
i.p. (mg/kg)	i.c.v. (nmol)	ECp	EBF	REA	N
SAL	PBS	21.43±1.19	11.00±0.95	10.43±1.27	7
FMZ 10	PBS	21.14±1.67	9.00±1.25	10.71±1.06	7
SAL	DZP 7	10.50±0.96**	13.00±2.18	11.00±1.81	6
FMZ 10	DZP 7	15.29±1.19 ^{NS}	11.00±0.65	10.71±1.41	6

Cada valor representa a média \pm E.P.M de 6-7 animais (N = número de animais). NS = sem diferença estatística em relação ao grupo controle. * $P < 0.05$ ou ** $P < 0.01$, quando comparado ao grupo controle (SAL+PBS). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student Newman-Keuls. Abreviações: SAL = salina, FMZ = flumazenil, STY = estiril-2-pirona, ECp = estiramentos corporais protegidos, EBF = entradas nos braços fechados, REA = *rearing* (comportamento de levantar).

4.8. Ação das dihidroestiril-2-pironas (1), (2) ou (3) e estiril-2-pironas (4), (5) ou (7) no ensaio de *binding* do [³H]-flunitrazepam

Curvas de deslocamento da ligação do ³H-FNZ em membranas sinaptossomais de córtex de ratos na presença de concentrações crescentes de cada dihidroestiril-2-pirona ou estiril-2-pirona são mostradas na Figura 40. Pode-se observar que todos os compostos isolados de *P. sabulosa* foram capazes de inibir a ligação do ³H-FNZ ao sítio BDZ, com diferentes potências. As DST (1), (2) ou (3) inibiram a ligação do ³H-FNZ com valores de K_i (IC_{95%}) superior a 100 μ M, 41.7 (20 - 86) μ M e 35.8 (28-45) μ M (Figuras 40A, 40B e 40C, respectivamente), enquanto as STY (4), (5) ou (7) inibiram a ligação do ³H-FNZ com

K_i ($IC_{95\%}$) de 90.3 (67 - 122) μ M, 31.0 (22 - 41) μ M e 70.0 (60-79) μ M (Figuras 40D, 40E e 40F, respectivamente).

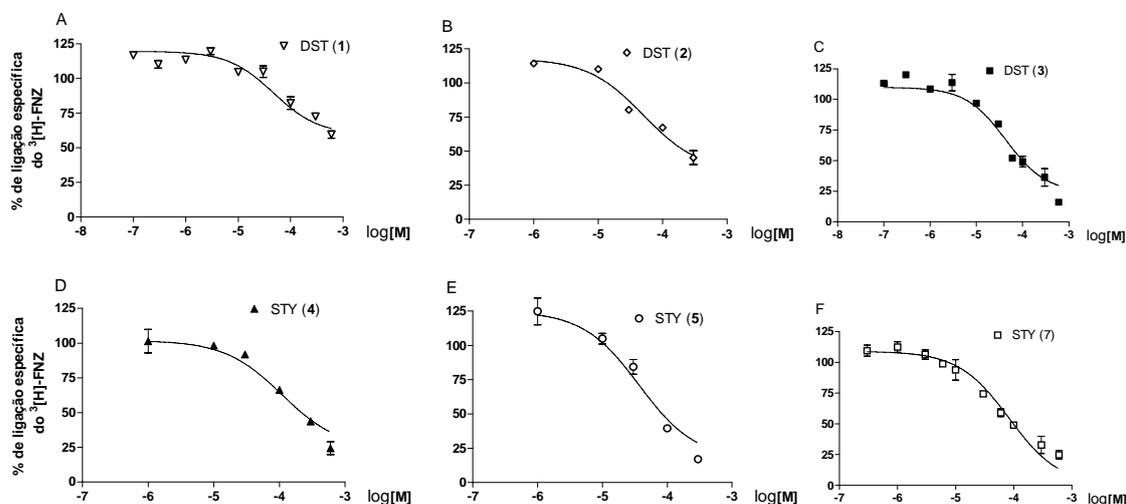


Figura 40 - Curvas de competição entre dihidroestiril-2-pironas (1), (2) ou (3) e estiril-2-pironas (4), (5) ou (7) (0.1-600 μ M) e o [3 H]-flunitrazepam (0.42 nM) em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 2 a 5 experimentos independentes realizados em duplicatas. Abreviações: DST (1), (2) ou (3) = dihidroestiril-2-pironas (1), (2) ou (3); DST (4), (5) ou (7) = estiril-2-pironas (4), (5) ou (7).

4.9. Efeito da dihidroestiril-2-pironas (3) e estiril-2-pironas (7) na afinidade e densidade dos sítios de ligação do [3 H]-flunitrazepam

Curvas de saturação da ligação do [3 H]-FNZ foram realizadas em membranas sinaptossomais de córtex de ratos incubadas com concentrações crescentes de [3 H]-FNZ (0.3 a 9 nM) na presença do veículo, DST (3) (30 μ M) ou STY (7) (70 μ M), conforme mostradas na Figura 41. A análise de *Scatchard* das curvas de saturação da DST (3) e da STY (7) revelou que os mesmos inibem competitivamente a ligação do [3 H]-FNZ ao sítio BDZ, com uma diminuição na afinidade aparente (K_d) [$F_{(2,9)} = 5.8$, $P < 0.05$] sem modificação do número máximo de sítios de ligação ($B_{m\acute{a}x}$) [$F_{(2,9)} = 1.4$, $P > 0.3$] (teste F da extra soma dos quadrados, Figura 41). Além disso, esta análise mostrou que os dados obtidos melhor se ajustaram a uma hipérbole de um único sítio de ligação. Os valores do K_d e $B_{m\acute{a}x}$ são mostrados na Tabela 13.

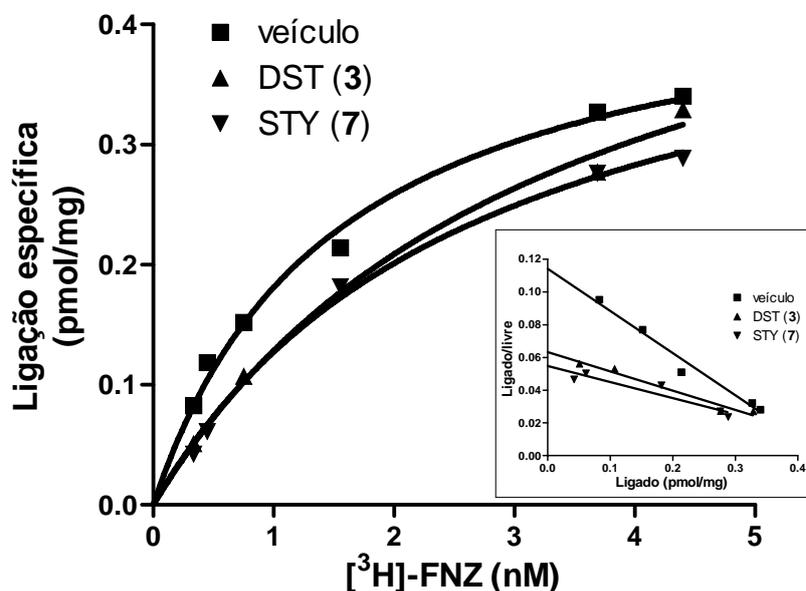


Figura 41 - Efeito da diidroestiril-2-pirona (**3**) 40 μM ou estiril-2-pirona (**7**) 70 μM na ligação do [^3H]-flunitrazepam ([^3H]-FNZ) no sítio benzodiazepínico. Isotermas de saturação e gráfico de *Scatchard* da ligação de [^3H]-FNZ (0.3-9 nM) em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratas na presença do veículo (■), diidroestiril-2-pirona (**3**) (▲, 40 μM) ou estiril-2-pirona (**7**) (▼, 70 μM) são mostrados. Os pontos foram ajustados ao modelo hiperbólico de um sítio de ligação estimando-se a constante de afinidade (K_d) e o número máximo de sítios de ligação (B_{max}). Resultados obtidos de 1 experimento representativo realizado em duplicata. Abreviações: DST (**3**) = diidroestiril-2-pirona (**3**); STY (**7**) = estiril-2-pirona (**7**).

Tabela 13 - Valores da constante de afinidade aparente (K_d) e número máximo de sítios de ligação (B_{max}) do [^3H]-flunitrazepam na presença do veículo, diidroestiril-2-pirona (**3**) ou estiril-2-pirona (**7**).

Drogas	K_d (IC _{95%}) (nM)	B_{max} (IC _{95%}) (pmol/mg)
Veículo	1.5 (1.0-2.0)	0.45 (0.39-0.52)
DST (3) (40 μM)	3.3 (0-8) *	0.56 (0.18-0.94)
STY (7) (70 μM)	2.7 (1.2-4.2) *	0.48 (0.35-0.60)

Os dados estão expressos como média e os limites de confiança inferior e superior. K_d e B_{max} foram calculados através da análise de Scatchard. Abreviações: DST (**3**) = diidroestiril-2-pirona (**3**); STY (**7**) = estiril-2-pirona (**7**). * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo controle (Teste de F da extra soma dos quadrados).

4.10. Estudos complementares: avaliação da toxicidade aguda da fração acetato de etila de *Polygala sabulosa*

4.10.1. Observação geral (Teste de Irwin)

Sinais de toxicidade aguda ocorreram nas doses entre 500 e 2.500 mg/kg i.p. ou entre 1.000 e 5.000 mg/kg v.o de FAE. A Tabela 14 resume os principais sinais de toxicidade induzidos pelo tratamento com a FAE de *P. sabulosa*. O tratamento i.p. com FAE nas doses de 500 ou 1.000 mg/kg induziu ptose palpebral e uma redução da atividade locomotora nos animais observados em suas próprias caixas moradias. As doses de 2.000 ou 2.500 mg/kg induziram ptose palpebral, cianose, sialorréia, ataxia, perda do reflexo de endireitamento, bem como uma redução da atividade locomotora e da resposta à pressão da cauda e uma aparente diminuição da frequência respiratória (Tabela 14). O tratamento com a FAE por via oral, por sua vez, na dose de 1.000 mg/kg induziu somente ptose palpebral enquanto que a dose de 2.500 mg/kg promoveu ptose palpebral, perda do reflexo de endireitamento e uma redução da atividade locomotora. Os animais tratados com FAE nas doses de 3.500 ou 5.000 mg/kg mostraram todos os sinais mencionados na Tabela 14. Os demais sinais indicativos de toxicidade avaliados tais como lacrimejamento, hiperemia, piloereção, volume urinário, diarreia, movimento circular, comportamento agressivo, paralisia de cabeça e/ou membros, convulsões, contorção abdominal (*writhing*) e sinal de *Straub*, não foram observados em nenhuma das doses utilizadas da FAE. Embora as observações, em alguns casos, permitissem aferir a maior ou menor ocorrência de certos sinais tóxicos, os dados não foram quantificados (somente foi procedida a observação qualitativa).

Tabela 14 - Sumário das observações no “screening” farmacológico inicial da fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE) em camundongos machos adultos.

Efeitos observados	FAE (mg/kg; i.p.)					FAE (mg/kg; p.o.)				
	C	500	1.000	2.000	2.500	C	1.000	2.500	3.500	5.000
Ptose palpebral	-	10 min (2/5)	10 min (3/5)	10 min (3/5)	5 min (5/5)	-	30 min (2/5)	10 min (4/5)	10 min (4/5)	10 min (5/5)
	-	15 min (3/5)	15 min (5/5)	15 min (5/5)	10 min (5/5)	-	60 min (2/5)	15 min (5/5)	15 min (5/5)	15 min (5/5)
	-	-	-	15 min (2/5)	10 min (2/5)	-	-	-	30 min (2/5)	15 min (5/5)
	-	-	-	30 min (2/5)	15 min (2/5)	-	-	-	60 min (5/5)	30 min (5/5)
Sialorréia	-	-	-	30 min (2/5)	15 min (4/5)	-	-	-	30 min (1/5)	30 min (2/5)
	-	-	-	60 min (3/5)	30 min (5/5)	-	-	-	60 min (1/5)	60 min (2/5)
	-	-	-	20 min (3/5)	20 min (3/5)	-	-	-	30 min (2/5)	30 min (2/5)
FR (↓)	-	-	-	60 min (5/5)	60 min (5/5)	-	-	-	60 min (5/5)	60 min (5/5)
	-	5 min (2/5)	5 min (4/5)	10 min (5/5)	5 min (5/5)	-	-	10 min (4/5)	10 min (4/5)	10 min (5/5)
Atividade locomotora (↓)	-	10 min (3/5)	10 min (5/5)	15 min (5/5)	15 min (5/5)	-	-	15 min (5/5)	15 min (5/5)	15 min (5/5)
	-	-	-	15 min (2/5)	10 min (3/5)	-	-	-	30 min (3/5)	5 min (3/5)
Ataxia	-	-	-	30 min (3/5)	15 min (5/5)	-	-	-	60 min (5/5)	10 min (5/5)
	-	-	-	10 min (1/5)	10 min (3/5)	-	-	15 min (1/5)	15 min (2/5)	5 min (2/5)
	-	-	-	15 min (1/5)	15 min (5/5)	-	-	30 min (3/5)	30 min (3/5)	10 min (5/5)
PRE	-	-	-	15 min (3/5)	15 min (3/5)	-	-	-	15 min (1/5)	15 min (2/5)
	-	-	-	30 min (3/5)	30 min (3/5)	-	-	-	30 min (1/5)	30 min (2/5)
RPC (↓)	-	-	-	30 min (3/5)	30 min (3/5)	-	-	-	15 min (1/5)	15 min (2/5)
	-	-	-	15 min (3/5)	15 min (3/5)	-	-	-	30 min (1/5)	30 min (2/5)
Mortalidade	-	-	-	-	-	-	-	24 h 10 % (fêmeas)	24 h 30 % (fêmeas)	24 h 40 % (fêmeas)
	-	-	-	-	-	-	-	10 % (machos)	10 % (machos)	30 % (machos)

Os dados mostram o tempo e o número de camundongos machos que apresentaram sinais anormais quando comparados ao grupo controle após a administração da fração acetato de etila (FAE) de *Polygala sabulosa*, $n=5$. (-) = ausência do efeito; (\downarrow) = diminuição. Abreviações: FR = frequência respiratória, AL = atividade locomotora, PRE = perda do reflexo de endireitamento, RPC = resposta de pressão à cauda.

4.10.2. Avaliação da atividade locomotora (campo-aberto) e coordenação motora (rota-rod)

O tratamento por via oral com FAE de *P. sabulosa* reduziu significativamente o número de comportamentos de levantar observado no teste do campo aberto [$F_{(4,35)}=5.501$, $P<0.01$], nas doses de 1.000 ($P<0.05$) e 2.000 mg/kg ($P<0.01$), sem modificar o número total de quadrantes percorridos ($P>0.05$) (Figuras 42A e 42B, respectivamente). O tratamento por via oral com DZP, a droga sedativa padrão, reduziu o número total de quadrantes percorridos [$F_{(6,49)}=9.669$, $P<0.0001$] na dose de 30 mg/kg ($P<0.01$) (Figura 42A), bem como o número de comportamentos de levantar [$F_{(6,49)}=35.19$, $P<0.0001$] nas doses de 2,5 ($P<0.05$), 3, 5, 10, 20 e 30 mg/kg ($P<0.01$) (Figura 42B). A DE_{50} da FAE calculada para os efeitos sedativos no teste do campo aberto foi de 1.788 mg/kg, enquanto que a DE_{50} para o DZP foi de 3,7 mg/kg.

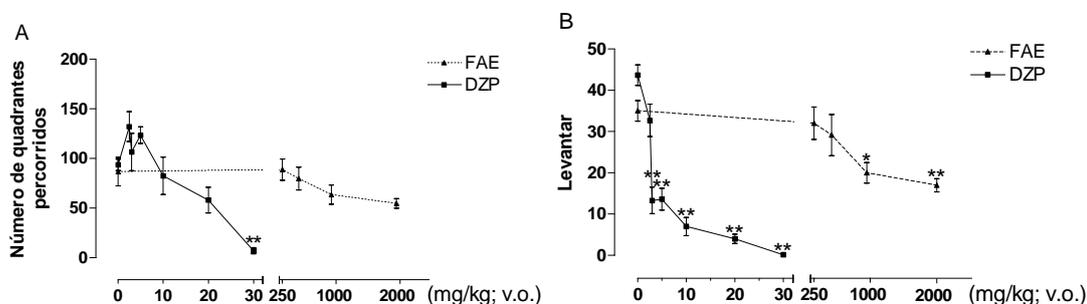


Figura 42 - Efeito da administração oral da fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE, 250 - 2.000 mg/kg, v.o.) ou diazepam (DZP, 2,5 - 10 mg/kg, v.o.) na atividade locomotora espontânea e comportamento de levantar em camundongos avaliados no teste do campo-aberto (5 min). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. do número total de quadrantes percorridos (A) e o número de comportamentos de levantar (B) ($n = 7-9$). * $P<0.05$ ou ** $P<0.01$, quando comparado aos respectivos grupos controles (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

No teste do rota-rod, o tratamento oral com a FAE de *P. sabulosa* promoveu uma redução do tempo total de permanência na barra giratória [$F_{(4,39)}=11.28$, $P<0.0001$], na dose de 1.000 ($P<0.05$) e 2.000 mg/kg ($P<0.01$) (Figura 43A), bem como aumentou o

número de quedas do rota-rod [$F_{(4,39)}=11.28$, $P<0.0001$], nestas mesmas doses ($P<0.05$ e $P<0.01$, respectivamente) (Figura 43B). O tratamento por via oral com DZP, a droga mio-relaxante padrão, reduziu o tempo de permanência na barra giratória [$F_{(6,50)}=39.31$, $P<0.0001$], nas doses de 3 e 5 mg/kg ($P<0.05$), 10, 20 e 30 mg/kg ($P<0.01$) (Figura 43A) e aumentou o número de quedas do rota-rod [$F_{(4,39)}=11.28$, $P<0.0001$] nas mesmas doses (Figura 43B). Não foi possível calcular a DE_{50} oral da FAE calculada para os efeitos mio-relaxantes no teste do rota-rod não foi possível calcular uma vez que o tratamento com a FAE, nas doses aqui utilizadas, não foi capaz de reduzir em 50 % o tempo total de permanência dos animais na barra giratória. Assim, a DE_{50} oral da FAE foi considerada superior a 2.000 mg/kg, enquanto a DE_{50} oral para os efeitos mio-relaxantes do DZP no teste do rota-rod foi de 9,7 mg/kg.

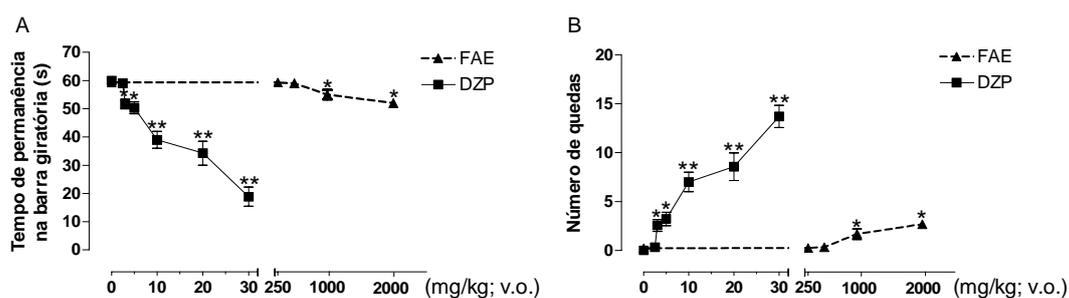


Figura 43 - Efeito da administração oral da fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE, 250 - 2.000 mg/kg, v.o.) ou diazepam (DZP, 2,5 - 10 mg/kg, v.o.) no tempo de permanência na barra giratória e no número de quedas de camundongos, avaliados no teste do rota-rod (1 min). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. do tempo total de permanência (A) ou número de quedas da barra giratória (B) ($n = 7-9$). * $P<0.05$ ou ** $P<0.01$ quando comparado aos respectivos grupos controles (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.10.3. Determinação da DL_{50} oral aguda

O tratamento por via oral com FAE de *P. sabulosa* em camundongos machos, promoveu 10 % de mortes na dose de 3.500 mg/kg e 30 % na dose de 5.000 mg/kg. Em camundongos fêmeas, o tratamento oral com FAE promoveu 10 % de mortes na dose de 2.500 mg/kg, 30 % na dose de 3.500 mg/kg e 40 % na dose de 5.000 mg/kg. Como para ambos os sexos de camundongos a porcentagem de mortes não alcançou 50 %, não foi possível calcular a DL_{50} , sendo então considerada superior a 5.000 mg/kg.

4.10.4. Avaliação da evolução do peso corporal

A evolução do peso corporal em função do tempo (15 dias) é mostrada na Figura 44A para camundongos machos e Figura 44B para camundongos fêmeas. Em ambos os sexos, a ANOVA de duas vias (fator tratamento x fator repetição) não revelou efeito significativo para o fator tratamento [machos: $F_{(6,59)}=0.79$; $P=0.578616$ e fêmeas: $F_{(3,28)}=0.59$; $P=0.626892$] e fator interação tratamento x repetição [machos: $F_{(6,59)}=1.16$; $P=0.152925$ e fêmeas: $F_{(3,28)}=1.344$; $P=0.074277$] para o ganho de peso corporal, mas ocorreu um efeito significativo no fator repetição [machos: $F_{(6,59)}=154.48$; $P<0.000001$ e fêmeas: $F_{(3,28)}=22.53$; $P<0.000001$].

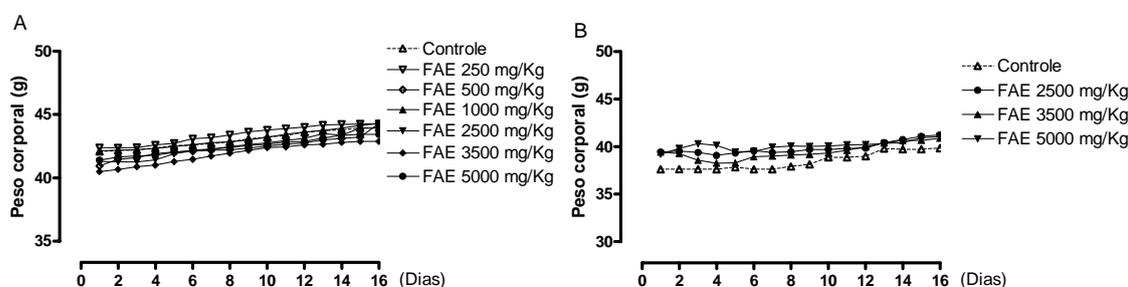


Figura 44 - Efeito da administração oral aguda da fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* em camundongos machos (FAE, 250 - 5.000 mg/kg, v.o.) (Painel A) e fêmeas (FAE, 2.500 - 5.000 mg/kg, v.o.) (Painel B) na evolução do peso corporal avaliado diariamente por um período de 15 dias. Os dados estão representados como média \pm E.P.M. do peso corporal (n = 6-10). * $P<0.05$ ou ** $P<0.01$, quando comparado aos respectivos grupos controle (ANOVA de duas vias para medidas repetidas).

4.11. Estudos complementares: Avaliação da toxicidade sub-crônica da fração acetato de etila de *Polygala sabulosa*4.11.1. Determinação da DL_{50} oral sub-crônica

O tratamento sub-crônico (32 dias) de camundongos machos e fêmeas com FAE de *P. sabulosa* não foi capaz de induzir mortes nem sinais de toxicidade aparente durante todo o período do tratamento. Entretanto, os camundongos machos (em todas as doses de FAE utilizadas) mostraram maior resistência ao procedimento de administração intra-gástrica

durante todo esse período. Como não houve mortes na faixa de dose utilizada da FAE de *P. sabulosa*, em ambos os sexos, a DL₅₀ oral foi considerada como superior a 1.000 mg/kg.

4.11.2. Avaliação da evolução do peso corporal

Em ambos os sexos, a ANOVA de duas vias (fator tratamento x fator repetição) não revelou efeito significativo para o fator tratamento [machos: $F_{(3,43)}=2.66$; $P<0.060061$ e fêmeas: $F_{(3,43)}=2.68$; $P<0.060029$] e fator interação tratamento x repetição [machos: $F_{(3,43)}=0.89$; $P<0.556546$ e fêmeas: $F_{(3,43)}=1.61$; $P<0.091642$] no ganho de peso corporal, mas ocorreu um efeito significativo no fator repetição [machos: $F_{(3,43)}=46.50$; $P<0.000001$ e fêmeas: $F_{(3,43)}=33.72$; $P<0.000001$].

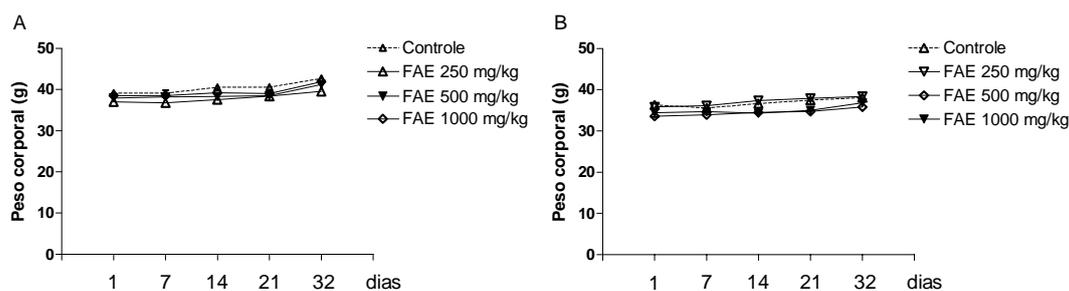


Figura 45 - Efeito da administração sub-crônica diária da fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE, 250 - 1.000 mg/kg, v.o.) em camundongos machos (Painel A) e fêmeas (Painel B) na evolução do peso corporal avaliado semanalmente por um período de 32 dias. Os dados estão representados como média \pm E.P.M. do peso corporal ($n = 11-12$). * $P<0.05$ ou ** $P<0.01$, quando comparado aos respectivos grupos controles (ANOVA de duas vias para medidas repetidas).

A média do peso corporal antes dos tratamentos no dia 1 (basal) e após o último dia de tratamento (dia 32), bem como o aumento médio do peso corporal do controle e grupos experimentais (FAE 250, 500 e 1.000 mg/kg), são mostrados na Tabela 15. Nenhuma diferença estatística foi observada no ganho médio do peso corporal entre os grupos tratados com FAE e o grupo controle ($P>0.05$).

Tabela 15 - Peso corporal inicial (dia 1) e final (dia 32) e porcentagem de aumento do peso corporal de camundongos machos e fêmeas tratados diariamente por 32 dias consecutivos por via oral, com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE) no estudo de toxicidade sub-crônica.

Peso corporal	Controle (10 % Tween 80) (n = 12)	FAE 250 mg/kg (n = 11)	FAE 500 mg/kg (n = 12)	FAE 1.000 mg/kg (n = 12)
<i>Machos</i>				
Inicial	39.16 ± 0.67	37.03 ± 0.93	38.52 ± 0.73	37.96 ± 0.66
Final	42.67 ± 0.63	39.54 ± 0.93	41.90 ± 0.44	41.22 ± 0.69
Ganho de peso (%)	8.20 ± 1.00	6.35 ± 1.19	8.01 ± 1.70	7.74 ± 1.49
<i>Fêmeas</i>				
Inicial	36.32 ± 0.88	35.86 ± 0.97	34.08 ± 0.52	34.44 ± 1.06
Final	38.11 ± 0.76	38.38 ± 0.74	36.29 ± 0.49	36.84 ± 0.88
Ganho de peso (%)	4.62 ± 1.60	6.63 ± 1.42	6.02 ± 1.22	6.54 ± 1.74

Os dados estão expressos como média ± E.P.M. do peso corporal em camundongos machos e fêmeas (n=11-12). Dados analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett. Não houve diferenças significativas entre os grupos tratados com FAE e o controle correspondente.

4.11.3. Análise bioquímica do soro

O tratamento sub-crônico dos camundongos machos com a FAE de *P. sabulosa* (250-1.000 mg/kg) administrada diariamente por 32 dias consecutivos por via oral, não causou alterações significativas dos níveis de creatinina, uréia, fosfatase alcalina, γ -glutamil transferase (γ GT), aspartato aminotransferase (AST), proteínas totais, albumina e globulina no soro (ver Tabela 16). No entanto, o tratamento dos camundongos machos com a FAE de *P. sabulosa* aumentou significativamente os níveis de alanina aminotransferase (ALT) [$F_{(3,18)}=3.65$, $P<0.05$] na dose de 1.000 mg/kg ($P<0.05$) em relação ao grupo controle. Em camundongos fêmeas tratadas com FAE de *P. sabulosa*, nenhum dos parâmetros bioquímicos analisados foi alterado de forma significativa quando comparados ao grupo controle ($P>0.05$). Entretanto, o mesmo tratamento foi capaz de reduzir significativamente os níveis de creatinina [$F_{(3,20)}=4.55$, $P<0.05$] nas doses de 250 ($P<0.05$) e 500 mg/kg ($P<0.01$) da FAE quando comparados ao grupo controle (ver Tabela 16).

4.11.4. Análise hematológica

O tratamento sub-crônico dos camundongos machos com a FAE de *P. sabulosa* (250-1.000 mg/kg) administrada diariamente por 32 dias consecutivos por via oral, não foi capaz de promover alterações significativas na atividade hematopoiética da medula óssea determinada através dos seguintes parâmetros hematológicos: eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio, leucócitos, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos e plaquetas ($P>0.05$), conforme mostra a Tabela 16. Em fêmeas, o tratamento com a FAE de *P. sabulosa* não foi capaz de promover alteração em quaisquer dos parâmetros hematológicos. Entretanto, a FAE aumentou significativamente o volume globular médio [$F_{(3,39)}=14.02$, $P<0.001$] e o número de neutrófilos segmentados [$F_{(3,39)}=4.46$, $P<0.01$], na dose de 250 mg/kg ($P<0.01$), quando comparados ao grupo controle (Tabela 16).

Tabela 16 - Efeito do tratamento sub-crônico (32 dias) com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE) nos parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos de ambos os sexos.

PARÂMETROS	MACHOS				FÊMEAS			
	Controle	FAE (mg/kg)			Controle	FAE (mg/kg)		
		250	500	1.000	0	250	500	1.000
Bioquímicos	n=5	n=5	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6
Creatinina (mg/dL)	0.45±0.02	0.46±0.03	0.39±0.01	0.40±0.04	0.21±0.02	0.15±0.01*	0.13±0.01*	0.17±0.02
Uréia (mg/dL)	47.54±4.17	46.22±2.40	50.13±2.02	53.05±1.90	48.28±2.39	50.28±1.38	45.80±1.10	42.68±2.68
Fosfatase alcalina (U/L)	155.00±15.80	142.00±15.62	148.17±14.53	137.67±21.45	116.50±9.66	112.17±12.63	152.17±15.42	134.83±14.10
γGT	1.20±0.20	1.40±0.40	1.17±0.17	1.33±0.21	1.17±0.17	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
AST (U/L)	49.00±3.56	60.40±4.76	58.67±5.11	74.83±10.34	60.17±3.24	54.67±2.89	63.67±2.78	64.83±4.08
ALT (U/L)	36.00±3.73	42.80±3.76	37.17±3.99	51.17±3.28*	43.50±3.35	35.67±1.89	40.33±1.45	45.33±5.29
Proteínas totais (g/dL)	5.72±0.16	5.48±0.08	5.87±0.07	6.08±0.10	5.53±0.08	5.60±0.10	5.78±0.11	5.70±0.16
Albumina (g/dL)	1.66±0.05	1.74±0.04	1.70±0.02	1.68±0.07	1.68±0.03	1.75±0.03	1.78±0.04	1.72±0.07
Globulina (g/dL)	4.06±0.12	4.10±0.08	4.17±0.08	4.40±0.09	3.85±0.06	3.85±0.11	4.00±0.10	3.98±0.11
Hematológicos	n=10	n=10	n=11	n=11	n=11	n=11	n=11	n=10
Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³)	8.79±0.24	8.31±0.27	8.06±0.12	8.23±0.16	8.28±0.18	8.31±0.12	8.55±0.12	8.10±0.21
Hematócrito (%)	40.97±1.17	42.35±1.63	39.90±0.50	40.69±0.87	38.74±0.99	40.81±0.82	39.90±0.65	38.49±0.71
Hemoglobina (g/dL)	14.00±0.41	13.31±0.41	12.93±0.18	13.24±0.32	13.43±0.30	13.45±0.20	13.81±0.22	13.41±0.23
VCM (μm ³)	46.60±0.54	48.88±1.40	49.54±0.37	49.45±0.80	46.64±0.34	49.00±0.57*	46.64±0.43	47.80±0.68
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	7.57±0.51	5.04±0.68	5.31±0.91	5.56±0.62	5.65±0.56	4.78±0.44	5.42±0.31	6.26±0.55
Neutrófilos segment. (%)	4.60±0.40	4.70±0.58	6.45±1.14	4.09±0.71	3.54±0.36	6.39±0.73*	4.18±0.57	4.60±0.62
Linfócitos (%)	94.00±0.47	91.90±0.89	90.36±1.52	92.54±1.35	94.82±0.57	82.27±8.10	94.27±0.95	94.10±0.71
Monócitos (%)	2.10±0.89	3.40±0.76	2.73±0.36	3.27±1.10	1.45±0.47	2.73 ± 0.66	1.36±0.34	1.20±0.20
Eosinófilos (%)	0.10±0.10	0.00±0.00	0.36±0.20	0,09±0.09	0.00±0.00	0.09±0.09	0.18±0.18	0.10±0.10
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	678.80±65.34	874.30±61.25	855.82±36.80	817.36±60.13	703.64±17.10	702.18±35.00	638.36±27.20	629.60±23.13

Os dados estão expressos como média ± E.P.M. dos parâmetros bioquímicos (n=5-6) e hematológicos (n=10-11) de camundongos machos e fêmeas. Dados analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett. * $P < 0.05$ ou ** $P < 0.01$ quando comparado aos respectivos grupos controle.

4.11.5. Avaliação do peso absoluto e relativo dos órgãos vitais

O tratamento sub-crônico (32 dias) com FAE de *P. sabulosa* (250-1000 mg/kg), tanto para camundongos machos quanto para fêmeas, não causou alterações macroscópicas quanto ao aspecto e a cor de alguns órgãos analisados como o baço, fígado, rins, pulmões, coração e cérebro quando comparado com o grupo controle e avaliado durante o procedimento de no final do experimento em nenhuma das doses, promoveu alteração significativa no peso absoluto e relativo dos órgãos vitais como baço, rim direito, coração e cérebro de camundongos machos e fêmeas em relação aos respectivos grupos controles ($P>0.05$). Entretanto, a FAE, na dose de 1000 mg/kg, aumentou significativamente o peso absoluto e relativo do fígado, em ambos os sexos, quando comparado aos respectivos grupos controle ($P<0.01$), conforme mostra a Tabela 17.

Tabela 17 - Peso absoluto e relativo dos órgãos vitais (g) de camundongos tratados com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE) no estudo de toxicidade sub-crônica (32 dias).

Peso absoluto do órgão (g) Peso relativo do órgão (%)	Controle (n = 12)	FAE 250 mg/kg (n = 11)	FAE 500 mg/kg (n = 12)	FAE 1000 mg/kg (n = 12)
<i>Machos</i>				
Baço	0.15620±0.00734	0.13020±0.00600	0.14760±0.01294	0.12940±0.00789
	0.36840±0.02123	0.32940±0.01341	0.35260±0.03095	0.31430±0.01866
Fígado	1.86100±0.06790	1.89900±0.09233	2.01500±0.05057	2.42300±0.09287**
	4.36700±0.16200	4.79500±0.17740	4.81200±0.11510	5.86700±0.17080**
Rim direito	0.24010±0.00567	0.22790±0.00796	0.24530±0.00700	0.24310±0.00549
	0.56400±0.01562	0.57790±0.02036	0.58710±0.02009	0.59040±0.01289
Coração	0.15070±0.00346	0.14630±0.00674	0.16030±0.00740	0.15200±0.00262
	0.35380±0.00863	0.37010±0.01584	0.38230±0.01673	0.36990±0.00888
Cérebro	0.32350±0.00626	0.32280±0.00401	0.33650±0.00592	0.31010±0.00338
	0.76020±0.01959	0.78670±0.01583	0.80370±0.01506	0.75460±0.01500
<i>Fêmeas</i>				
Baço	0,1720±0,006630	0.15920±0.00893	0.15090±0.01382	0.15950±0.01117
	0.45330±0.01929	0.41710±0.02635	0.41930±0.04240	0.43020±0.02423
Fígado	1.70400±0.08005	1.65600±0.04775	1.60900±0.06633	1.94100±0.05223**
	4.47800±0.20580	4.33700±0.17240	4.42900±0.16020	5.29600±0.17650**
Rim direito	0.18920±0.00979	0.19460±0.00384	0.17360±0.00847	0.17950±0.00653
	0.49680±0.02379	0.50800±0.01011	0.47750±0.02084	0.48840±0.01596
Coração	0.13250±0.00272	0.13270±0.00287	0.12290±0.00426	0.13070±0.00437
	0.34850±0.00806	0.34650±0,00819	0.33900±0.01166	0.35440±0.00736
Cérebro	0.34930±0.00547	0.34170±0.00621	0.33700±0.00637	0.33670±0.00519
	0.91840±0.01404	0.89150±0.01515	0.93030±0.02083	0.91800±0.02012

Os dados estão expressos como média ± E.P.M. dos pesos absoluto e relativo dos órgãos vitais de camundongos machos e fêmeas (n=11-12). Dados analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett. * $P<0.05$ ou ** $P<0.01$ quando comparados aos respectivos grupos controles.

4.12. Efeito do tratamento sub-crônico (30 dias) com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* no labirinto em cruz elevado

A Figura 46 mostra o efeito do tratamento sub-crônico oral (30 dias) com a FAE de *P. sabulosa* nos parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no LCE. Em camundongos machos, a administração da FAE aumentou significativamente a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos [$F_{(3,39)}=9.99$; $P<0.0001$], nas doses de 250 ($P<0.05$), 500 ($P<0.01$) e 1000 mg/kg ($P<0.01$) (Figuras 46A), e a frequência de entradas nestes mesmos braços do LCE [$F_{(3,39)}=14.61$; $P<0.0001$], nas três doses ($P<0.01$) (Figura 46C). Além disso, a FAE aumentou o número de imersões desprotegidas de cabeça [$F_{(3,39)}=6.39$; $P<0.0001$] nas doses de 250 ($P<0.05$), 500 ($P<0.01$) e 1000 mg/kg ($P<0.05$) (Figuras 46E), aumentou a exploração da região distal dos braços abertos [$F_{(3,39)}=4.82$; $P<0.0001$] nas doses de 500 e 1000 mg/kg ($P<0.01$) (Figuras 46G), bem como reduziu o número de estiramentos corporais protegidos [$F_{(3,39)}=21.50$; $P<0.0001$], nas três doses utilizadas ($P<0.01$) (Tabela 18). Em camundongos fêmeas, o tratamento com a FAE aumentou significativamente a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos [$F_{(3,30)}=8.18$; $P<0.0001$], nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg ($P<0.01$) (Figuras 46B), e a frequência de entradas nestes mesmos braços do LCE [$F_{(3,30)}=5.77$; $P<0.0001$], nas três doses ($P<0.05$; $P<0.05$ e $P<0.01$, respectivamente) (Figuras 46D). Além disso, a FAE aumentou o número de imersões desprotegidas de cabeça [$F_{(3,30)}=5.87$; $P<0.01$], nas doses de 250 ($P<0.01$), 500 ($P<0.01$) e 1.000 mg/kg ($P<0.05$) (Figuras 46F), e a exploração da região distal dos braços abertos do LCE [$F_{(3,30)}=5.79$; $P<0.01$], nas mesmas doses ($P<0.01$, $P<0.05$ e $P<0.05$, respectivamente) (Figura 46H), bem como reduziu os estiramentos corporais protegidos [$F_{(3,30)}=5.79$; $P<0.001$], nas três doses utilizadas ($P<0.01$) (Tabela 18). Em ambos os sexos, os demais parâmetros comportamentais avaliados no LCE, tais como entradas nos braços fechados e comportamento de levantar, não foram alterados pela FAE ($P>0.05$), conforme mostra a tabela 18.

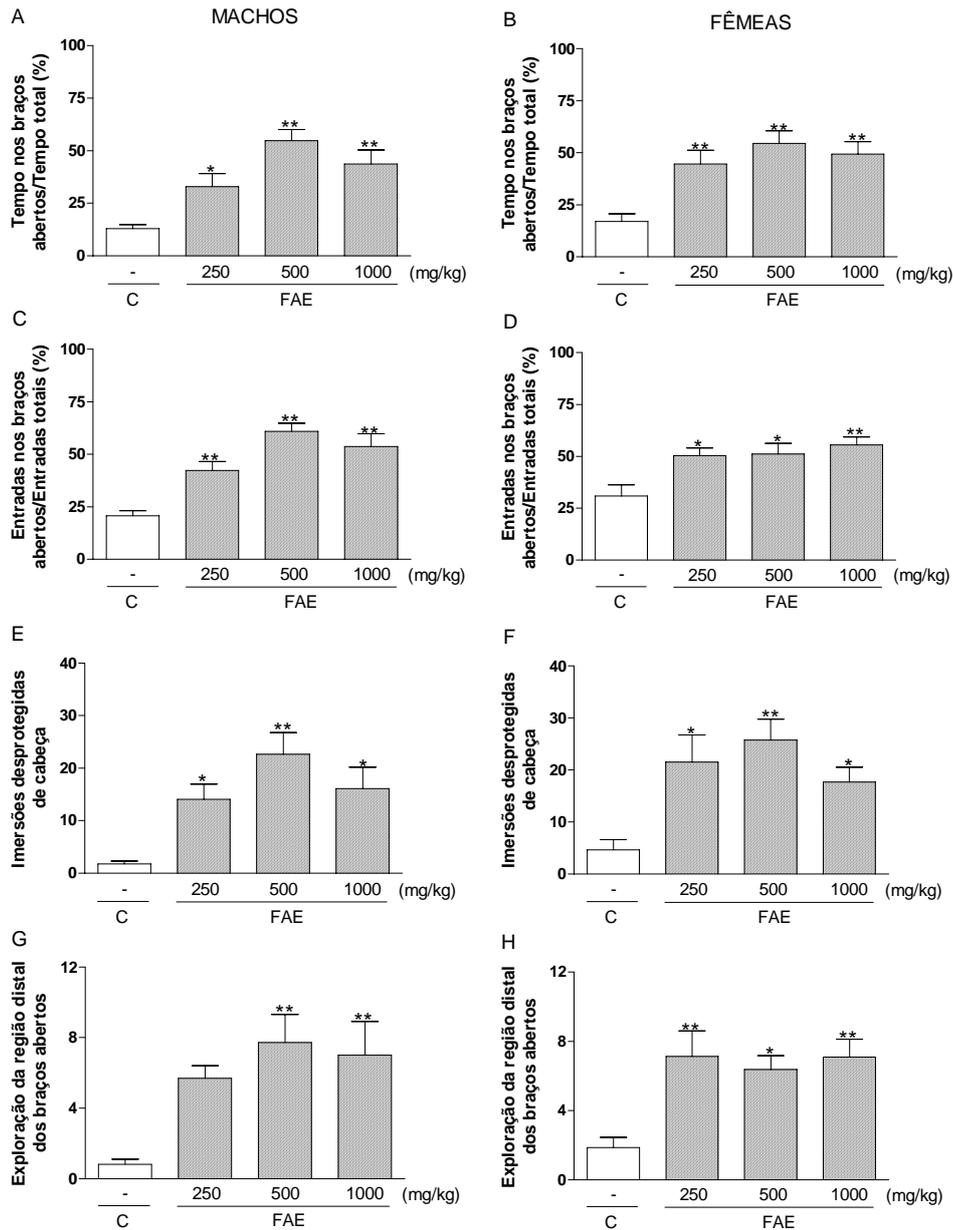


Figura 46 - Efeito do tratamento sub-crônico oral (30 dias) com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE, 250-1.000 mg/kg, v.o.) no comportamento de camundongos machos (painel da esquerda) e fêmeas (painel da direita) avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), durante 5 min. Porcentagem de tempo de permanência (A e B) e frequência de entradas nos braços abertos (C e D), bem como o número de imersões desprotegidas de cabeça (E e F) e a exploração da região distal dos braços abertos (G e H) do LCE são mostrados. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 8-12 animais. * $P \leq 0.05$ e ** $P \leq 0.01$, quando comparado ao respectivo grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

Tabela 18 - Efeito do tratamento sub-crônico oral (30 dias) com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa* (FAE) em alguns parâmetros comportamentais adicionais de camundongos machos e fêmeas avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).

Drogas	Dose (mg/kg)	LCE			
		EBF	ECp	REA	N
Machos					
C	-	8.10 ± 1.10	18.00 ± 2.05	11.10 ± 1.12	10
FAE	250	6.10 ± 0.43	7.90 ± 0.99**	8.80 ± 1.26	10
FAE	500	6.64 ± 0.83	3.09 ± 1.16**	9.73 ± 1.18	11
FAE	1000	7.00 ± 0.71	5.17 ± 1.25**	11.17 ± 1.15	12
Fêmeas					
C	-	6.12 ± 1.06	11.88 ± 2.33	12.25 ± 1.16	8
FAE	250	9.25 ± 1.56	4.50 ± 1.88**	11.13 ± 0.95	8
FAE	500	7.25 ± 1.08	2.25 ± 0.96**	9.25 ± 1.22	8
FAE	1000	6.50 ± 0.99	3.30 ± 0.91**	8.80 ± 1.42	10

Cada valor representa a média ± E.P.M de 8-12 animais (N = número de animais). * $P < 0.05$ ou ** $P < 0.01$, quando comparado ao grupo controle correspondente. Dados analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett. Abreviações: C = controle, FAE = fração acetato de etila, EBF = entradas nos braços fechados, ECp = estiramentos corporais protegidos, REA = *rearing* (comportamento de levantar).

5. DISCUSSÃO

A terapia a base de plantas ditas medicinais tem desempenhado função essencial na saúde mundial, especialmente nos países menos desenvolvidos. Estudos destas plantas constituem uma ferramenta alternativa na esperança de se descobrir novas moléculas biológicas e desenvolver fitoterápicos com eficácia clinicamente comprovada na prática neuropsiquiátrica em especial, particularmente no tratamento da ansiedade generalizada, uma doença que carece de opções terapêuticas efetivas e com menor número de efeitos colaterais. O surgimento de novas técnicas e metodologias mais sensíveis e eficazes no isolamento, purificação e identificação de substâncias bioativas, bem como a oportunidade da interação de caráter multidisciplinar entre vários grupos de pesquisa com as diferentes técnicas de biologia molecular, química, bioquímica e farmacologia, têm originado muitas investigações exitosas (Johnston e Beart, 2004; Baur et al., 2005; Patwardhan, 2005; Gurib-Fakim, 2006; Newman e Crag, 2007).

Várias plantas medicinais são dotadas de propriedades ansiolíticas ou sedativas e têm sido utilizadas com grande aceitação por parte da população em diversos países. A planta *P. methysticum* (Kava-kava) é apenas um dos exemplos de planta amplamente prescrita e disponível livremente em farmácias do Brasil, Europa e Estados Unidos, para o alívio da ansiedade moderada e em casos de insônia. Entretanto, em 2001, o fitoterápico Kava-kava foi retirado do mercado farmacêutico devido a vários relatos de hepatotoxicidade na Alemanha e Suíça, incluindo casos de pacientes que necessitaram transplantes hepáticos, assim como ocorrência de óbitos (Centers for Disease Control and Prevention, 2003; Currie e Clough, 2003). Embora o mecanismo e a(s) substância(s) do Kava-kava responsáveis pela sua toxicidade sejam desconhecidos, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Resolução nº 356 de 28 de fevereiro de 2002, promulgou uma medida de interesse sanitário de apreensão dos produtos à base de Kava-kava que não possuam tarja vermelha contendo os dizeres "venda sob prescrição médica", bem como os que não possuíam registro na ANVISA, restringindo, dessa forma, o uso indiscriminado deste fitoterápico.

A seleção de espécies vegetais para a pesquisa científica, quando baseada na alegação de um dado efeito terapêutico tradicional em humanos, pode representar um valioso atalho para a descoberta de medicamentos, uma vez que seu uso tradicional pode ser encarado como uma espécie de pré-triagem quanto à utilidade terapêutica em humanos (Elisabestky, 2000). Um exemplo disso foi a própria Kava-kava, espécie nativa das Ilhas

do Pacífico utilizada tradicionalmente por populações aborígenes, que saiu do seu “anonimato” em contraposição à sua presença atual em farmácias sob indicação terapêutica para casos de ansiedade. Entretanto, embora os resultados de pesquisas sejam mais favoráveis quanto à descoberta de substâncias biologicamente ativas quando o procedimento científico segue uma abordagem etnofarmacológica (seleção de plantas a partir do seu uso popular; Elisabetsky, 2003), este tipo de triagem impede a oportunidade de se estudar fontes ainda não exploradas com grande potencial na origem de novas moléculas terapêuticas, como por exemplo, a planta *P. sabulosa*, objeto de nosso estudo.

A planta *P. sabulosa* foi selecionada a partir de estudos fitoquímicos prévios, realizados no laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de Santa Catarina, aos quais revelaram a presença de substâncias com estrutura química similar às kavalactonas, presentes na Kava-kava, motivo pelo qual, propusemos a investigação das possíveis ações desta planta no sistema nervoso central, em roedores. Assim, este trabalho mostrou, inicialmente, os efeitos psicofarmacológicos do extrato bruto hidroetanólico, frações aquosa, hexânica e acetato de etila, bem como as substâncias isoladas 6-metoxi-7-preniloxicumarina, DST (1), (2), (3) e STY (4), (5) e (7) de *P. sabulosa* no comportamento de camundongos, utilizando metodologias experimentais que ajudam a apontar uma eventual atividade do tipo ansiolítica, mais particularmente do tipo BDZ.

A justificativa para a utilização de animais em estudos pré-clínicos está baseada na premissa que considera que as raízes da ansiedade humana encontram analogia nas reações de defesa que os animais exibem frente a estímulos ou situações de perigo (Graeff, 1990). Assim, admitindo-se o princípio da continuidade filogenética e o isomorfismo existente entre o comportamento animal e humano, dentro de um contexto da teoria evolutiva, fica mais claro entender a contribuição dos modelos-animais para a melhor compreensão da ansiedade, bem como a descoberta de novas abordagens terapêuticas (Andrews e Stephens, 1991; Belzung e Griebel, 2001). Diante o exposto, a possível atividade do tipo-ansiolítica do EBH de *P. sabulosa* foi inicialmente investigada no teste do LCE.

O LCE é um dos testes animais mais utilizados no estudo das bases neurobiológicas da ansiedade experimental (Carobrez e Bertoglio, 2005) e é uma ferramenta bastante importante na busca de novas moléculas bioativas com potencial atividade ansiolítica. Neste teste, a “ansiedade” é inferida a partir das respostas comportamentais de defesa dos roedores frente a estímulos aversivos. Ele é baseado no fato de que os espaços abertos deste equipamento são extremamente aversivos aos roedores (Pellow e File, 1986), sendo o nível de ameaça categoricamente classificada como potencial. Assim, o LCE tenta

simplificar e mimetizar a “ansiedade-estado”, ou seja, aquela que surge de forma intensificada diante de condições pela presença de estímulos estressantes ou ansiogênicos (Belzung e Griebel, 2001). Os índices primários de “ansiedade” avaliados no LCE, como porcentagem de tempo de exploração bem como a frequência de entradas nos braços abertos, refletem a aversão natural dos roedores por ambientes abertos. Com isso, o animal adota um conjunto de estratégias de exploração e avaliação de risco frente a este ambiente desconhecido. Estes índices são bidirecionalmente sensíveis podendo ser modificados por agentes anti- e pró-aversivos. A efetividade de uma determinada droga ansiolítica é ilustrada através de um aumento significativo nestes parâmetros de exploração dos braços abertos, enquanto o oposto é válido para drogas ansiogênicas (Rodgers e Cole, 1994).

O tratamento oral com o EBH de *P. sabulosa* aumentou os parâmetros de exploração dos braços abertos do LCE, como porcentagem de tempo e frequência de entradas nos braços abertos, bem como as imersões desprotegidas de cabeça, além de uma redução dos estiramentos protegidos corporais, índices com validade no fator ansiedade (Cruz et al., 1994; Setem et al., 1999). Em outras palavras, este conjunto de alterações comportamentais indica uma elevada atividade exploratória de áreas ditas potencialmente perigosas (Cole e Rodgers, 1993), efeito similar ao do DZP, BDZ padrão utilizado como controle positivo, sugerindo uma propriedade do tipo ansiolítico para esta espécie vegetal.

Em estudos de neurofarmacologia pré-clínica, como no caso da abordagem comportamental, o uso de um único teste animal não nos permite precisar inequivocamente o perfil comportamental dos animais em estudo. De forma similar às avaliações psiquiátricas em humanos, onde escalas com várias expressões/dimensões comportamentais são utilizadas com o intuito de melhor enquadrar o indivíduo em um determinado diagnóstico clínico ou avaliar a resposta destes a uma determinada medicação, em estudos com roedores é necessário o uso de vários testes comportamentais para avaliar a resposta emocional dos animais aos estímulos externos (Do Rego et al., 2006).

Complementando assim nossa investigação de uma possível atividade do tipo ansiolítica, que poderia ser ou não similar à dos BDZ, foi necessário investigar uma possível atividade do tipo hipno-sedativa do EBH de *P. sabulosa*, utilizando o teste de sono induzido por pentobarbital sódico. Em contraste às ações dos BDZ, que parecem ser restritas a subtipos específicos de receptores GABA_A, as ações dos barbitúricos, como o pentobarbital, são mais amplas e menos específicas (Johnston, 1996). O pentobarbital é uma droga capaz de induzir sono em roedores e humanos por sua ação direta sobre o sítio de ligação de barbitúricos, localizado especificamente entre as subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$, que

compõem o canal de cloreto do complexo receptor GABA_A (Koch-Weser e Greenblatt, 1974; Gottesmann, 2002), aumentando a sua influência inibitória sobre o sistema nervoso central. Os barbitúricos, de maneira geral, induzem sono de ondas lentas e são capazes de inibir o sono paradoxal. A estimulação dos sítios de ligação pelos barbitúricos, particularmente na área pré-óptica ventrolateral, inibe o núcleo tuberomamilar hipotalâmico, os núcleos da rafe e o *locus coeruleus* (na formação reticular), estruturas que causam ativação cortical e excitação comportamental. Assim, a inibição destas estruturas suprime o alerta e a ativação comportamental resultando no sono ou hipnose (Carlson, 2002; Gottesmann, 2002).

O efeito depressor central de uma determinada droga em estudo, quando não evidente *per se*, pode ser investigado através do teste da potencialização da hipnose induzida por pentobarbital, através da interação inibitória sinérgica entre esta última e a substância-teste no sistema nervoso central (Lancel, 1999). Neste estudo, o tratamento oral com EBH de *P. sabulosa* (250-1.000 mg/kg), 1 h antes da injeção de pentobarbital sódico, não foi capaz de modificar a latência para a indução do sono. Entretanto, o EBH aumentou significativamente a duração total do sono nas doses de 500 e 1.000 mg/kg, um efeito hipno-sedativo similar ao do DZP, o BDZ padrão utilizado.

Várias evidências vêm demonstrando a habilidade de extratos de plantas serem capazes de potencializar a hipnose induzida por pentobarbital. Este efeito tem sido atribuído a uma ação em mecanismos centrais envolvidos na regulação do sono (N'Gouemo et al., 1994; Chindo et al., 2003), reforçando a utilidade deste teste na investigação das propriedades centrais de plantas em animais de laboratório (Lu, 1998; Carpendo et al., 1994; Gamaniel et al., 1998). No entanto, um resultado positivo neste teste não garante um efeito hipno-sedativo puro, uma vez que a interferência de fatores farmacocinéticos não pode ser descartada, já que os barbitúricos são metabolizados hepaticamente. O pentobarbital, assim como o tiopental, são metabolizados no fígado pela via oxidativa que envolve o citocromo P₄₅₀, NADPH e O₂ (Benet, 1996; Shah et al., 1996). Compostos que interferem com a biotransformação do pentobarbital pelo complexo citocromo P₄₅₀ podem assim produzir o mesmo perfil comportamental que drogas depressoras do sistema nervoso central (Goloubkova et al., 1998; Blumenthal, 2000; Blumenthal et al., 1998; Cupp, 1999; WHO, 1999). Assim, uma possibilidade que poderia explicar o aumento na duração do sono induzido pelo pentobarbital seria a inibição do sistema enzimático hepático pelo EBH de *P. sabulosa*, hipótese que não poder ser

totalmente descartada, mostrando que resultados falso-positivos podem ser encontrados com esta classe de indutores de sono.

Um outro teste que também pode ser utilizado durante o *screening* pré-clínico de drogas ansiolíticas é o teste de convulsões induzidas por PTZ, embora sua sensibilidade seja focalizada particularmente em drogas com mecanismos BDZ (Tallman et al., 1980; Hansen et al., 2004). Tanto a ansiedade como as convulsões epiléticas podem ser consideradas, em parte, como decorrentes de um desequilíbrio entre a excitabilidade de determinados circuitos neuronais e a inibição dos disparos elétricos. Sugere-se que este desequilíbrio possa ser, dentre outros fatores que não podem ser menosprezados, decorrente de uma diminuição da neurotransmissão inibitória GABAérgica mediada pelo receptor GABA_A (MacDonald e Olsen, 1994). Assim, drogas que aumentam a atividade GABAérgica, tais como agonistas GABAérgicos e moduladores alostéricos positivos do receptor GABA_A, apresentam, dependendo da dose, efeitos ansiolítico e anticonvulsivante (MacDonald e Olsen, 1994; Hansen et al., 2004). Em contrapartida, drogas que diminuem a atividade GABAérgica, como os antagonistas GABAérgicos, moduladores alostéricos negativos e bloqueadores do canal de cloreto deste receptor, produzem efeitos ansiogênico em doses menores e convulsivante em doses mais elevadas (Zorumski e Isenberg, 1991; MacDonald e Olsen, 1994).

Ao contrário de drogas como o PTZ, os BDZ interagem com seu próprio sítio receptor, aumentando alostericamente a afinidade de ligação do GABA pelo receptor GABA_A, amplificando a frequência de abertura do canal de cloreto, e diminuindo, portanto, a excitabilidade nervosa. Por sua vez, o PTZ é capaz de diminuir esta afinidade, com conseqüente diminuição da frequência de abertura do canal de cloreto, desencadeando, desta forma, um aumento da excitabilidade neuronal e diminuindo o limiar de convulsão (Löscher e Schmidt, 1988). O mecanismo exato pelo qual o PTZ exerce suas ações ainda não é bem compreendido; entretanto, sugere-se que esta droga atue como um antagonista do sítio sensível à picrotoxina (domínio transmembrânico TM2, que forma o canal de cloreto) do complexo receptor GABA_A (Ramanjaneyulu e Ticku, 1984), deprimindo a corrente mediada pelo GABA. No presente trabalho, o pré-tratamento com o EBH de *P. sabulosa* não modificou a latência para o primeiro episódio convulsivo em camundongos avaliados no teste de convulsões induzidas por PTZ. Entretanto, EBH reduziu significativamente a duração da primeira convulsão, nas doses de 500 e 1.000 mg/kg, sugerindo que, possivelmente, mecanismos GABAérgicos possam estar envolvidos na modulação dos efeitos induzidos pelo EBH.

Grande parte das metodologias empregadas na investigação de efeitos de compostos sintéticos ou naturais no sistema nervoso central, na fase pré-clínica, são testes inespecíficos, portanto, estão sujeitos à interferência de outros fatores, fazendo parte, assim, de uma triagem geral no processo da determinação de sua possível atividade farmacológica.

Considerando que extratos de plantas são constituídos por uma grande variedade de substâncias, o próximo passo foi identificar qual(is) a(s) substância(s) seria(m) responsável(is) por estas ações centrais observadas com o uso do EBH de *P. sabulosa*. Assim, através do uso de diferentes solventes com polaridades crescentes, objetivando a semi-purificação das substâncias, obteve-se: as frações aquosa (FA), hexânica (HEX) e acetato de etila (FAE), bem como a substância isolada 6-metóxi-7-preniloxicumarina (6-MC). Para localizar os princípios ativos responsáveis pelas ações centrais inicialmente observadas com o uso do EBH, todas as frações e 6-MC foram testadas *in vivo*. Com o intuito de investigar uma possível ação central destas, um único ensaio comportamental, o teste de sono etéreo, foi utilizado para biomonitorar a análise fitoquímica da planta *P. sabulosa*. Este teste segue o mesmo princípio da hipnose induzida por pentobarbital, diferindo quanto ao indutor de sono, neste caso o éter etílico. Além da sua rapidez no *screening* farmacológico, a grande vantagem deste teste em relação ao sono induzido por barbitúrico reside no fato de que o éter etílico não é metabolizado pelo sistema enzimático hepático citocromo P₄₅₀ (Medrado, 2002). Sabendo-se que a potencialização do sono por uma determinada substância no ensaio do sono-barbitúrico pode ser resultante de alterações de ordem farmacocinética, que por sua vez aumentariam os níveis plasmáticos do pentobarbital e, conseqüentemente, um aumento na duração do sono seria observado, isto seria evitado com o uso do éter etílico como agente indutor de sono, servindo para certificar as propriedades hipno-sedativas observadas pelo uso do EBH.

No teste do sono etéreo, a dose de 500 mg/kg (dose ansiolítica encontrada previamente no LCE) do EBH não foi capaz de modificar a latência para indução do sono, mas aumentou significativamente a hipnose induzida pelo éter etílico. Entre as frações e a 6-MC obtidas de *P. sabulosa*, nenhum dos tratamentos por via oral modificou a latência para indução ou a duração do sono, exceto a FAE (500-1.000 mg/kg) que aumentou significativamente este último parâmetro. Estes dados, como já comentado, sugerem primeiramente uma atividade hipno-sedativa do EBH, confirmando as observações do teste de sono induzido por barbitúrico, uma vez que a influência de interações farmacocinéticas é eliminada com o uso do éter etílico como indutor do sono. Em segundo lugar, este teste

também indica que a(s) substância(s) responsável(is) pelas ações centrais da planta *P. sabulosa* estão presentes na FAE, biodirecionando, assim aos testes posteriores.

Na etapa seguinte deste estudo as possíveis ações centrais da FAE de *P. sabulosa* foram investigadas nos vários modelos experimentais que avaliam atividades relacionadas a um perfil de ação BDZ, entre eles, o LCE, o sono barbitúrico e as convulsões induzidas por PTZ. No teste do LCE, a administração oral da FAE, nas doses de 250, 500 e 1.000 mg/kg, induziu um aumento significativo na porcentagem de tempo e na frequência de entradas nos braços abertos do LCE, bem como uma diminuição do número de estiramentos corporais desprotegidos. Além disso, a FAE foi capaz de promover um aumento significativo no número de imersões desprotegidas de cabeça e na atividade exploratória do final dos braços abertos, nas doses de 500 ou 1.000 mg/kg. Este conjunto de alterações comportamentais foi similar àquele promovido pelo DZP. No teste da hipnose induzida por pentobarbital, o pré-tratamento (1 h antes) com FAE na dose de 1.000 mg/kg, reduziu a latência para indução do sono, enquanto que as doses de 500 ou 1.000 mg/kg foram capazes de potencializar dramaticamente a duração total do sono. Nas convulsões induzidas por PTZ, o pré-tratamento com a FAE, nas doses de 500 ou 1.000 mg/kg, aumentou a latência para indução do primeiro episódio convulsivo. Ambas as doses também reduziram a duração da primeira convulsão, bem como a severidade das convulsões. Estes achados mostraram as propriedades do tipo-ansiolíticas, hipno-sedativas e anticonvulsivantes da FAE de *P. sabulosa*, bem como a maior potência nos efeitos aqui observados quando comparados àqueles induzidos pelo EBH, resultado do processo de fracionamento biomonitorado.

A descoberta dos constituintes responsáveis pelos efeitos farmacológico-comportamentais de uma determinada planta em estudo é de fundamental importância e pode fornecer bons candidatos terapêuticos para futuras investigações clínicas (Zhang, 2004). O estudo fitoquímico da espécie *P. sabulosa* através do isolamento de derivados de estiril-pironas colocou esta espécie de planta em uma posição quimiotaxonômica diferenciada no gênero Polygalaceae devido ao acúmulo destes compostos e a ausência de xantonas. Assim, a planta *P. sabulosa* é a única espécie do gênero estudada até o momento cuja rota bioquímica produz dihidroestiril-2-pironas e estiril-2-pironas com ausência de xantonas. No total, sete estiril-pironas já foram isoladas até o momento, sendo três dihidroestiril-2-pironas como dihidroestiril-2-pironas (1), (2) ou (3) e quatro estiril-2-pironas como estiril-2-pironas (4), (5), (6) ou (7) (Pizzolatti et al., 2000; Pizzolatti et al., 2004).

As estiril-pironas ou estiril-lactonas são consideradas um grupo de metabólitos relativamente incomum em produtos naturais. No entanto, as estiril-lactonas que ganharam bastante destaque no meio acadêmico e vêm sendo estudadas intensamente ao longo dos anos são aquelas isoladas da planta kava-kava, como já abordado anteriormente, onde são conhecidas como kavalactonas ou kavapironas. Mais de 20 kavalactonas já foram isoladas e identificadas, sendo a metisticina, dihidrometisticina, kavaína, dihidrokavaína e iangonina as mais abundantes, correspondendo a 96 % do extrato lipídico (Bilia et al., 2004). Na verdade, as propriedades ansiolíticas do Kava-kava ainda não foram totalmente elucidadas quanto ao seu mecanismo farmacológico de ação e a maioria dos estudos pré-clínicos e clínicos foram realizados com extratos padronizados e não com cada substância isoladamente (Jussofie et al., 1994; Wheatley, 2001; Rex et al., 2002; Garret et al., 2003; Capasso e Sorrentino, 2005).

Nesta etapa do trabalho, os compostos DST (1), (2) ou (3) e STY (4), (5), ou (7), majoritários na FAE de *P. sabulosa*, foram estudados através da administração central em camundongos avaliados no modelo do LCE, com o intuito de correlacionar as possíveis ações centrais destes compostos com aquelas observadas anteriormente para o EBH e a FAE de *P. sabulosa*. De maneira geral, os compostos DST (1) ou (3) e STY (4), ou (7), promoveram um aumento significativo nos parâmetros clássicos espaço-temporais, como porcentagem de tempo despendido e frequência de entradas nos braços abertos no LCE, caracterizando uma atividade do tipo ansiolítica similar àquela induzida por DZP. Em contraste, os compostos DST (2) e STY (5) não foram capazes de modificar nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados no LCE, nas doses aqui estudadas. O composto STY (6) não foi estudado face à exígua quantidade disponível após o isolamento.

O padrão de curva dose-resposta observado para alguns dos compostos isolados bem como para o EBH de *P. sabulosa* foi em “U invertido”, fenômeno denominado na literatura científica de hormese e que caracteriza muito bem os efeitos bifásicos observados para doses com diferentes ordens de magnitude (Calabrese et al., 1999; Calabrese e Baldwin, 2001). Assim, neste trabalho observamos uma resposta do tipo ansiolítica máxima em doses intermediárias, com perda desta resposta (comportamento similar ao controle) nas maiores doses utilizadas nestes experimentos. Este fenômeno tem sido muito observado em estudos experimentais, particularmente com plantas medicinais, já que extratos ou frações de plantas apresentam diversos constituintes químicos que poderiam estar agindo em diferentes vias (Carvalho-Freitas e Costa, 2002). Além disso, este tipo de curva bifásica é comum entre ligantes BDZ (Davies et al., 1984; Henberg e Williams,

1983; Soderpalm et al., 1991; Ruarte e Alvarez, 1999; Walters et al., 2000; Wang et al., 2003) e, na maioria dos casos, pode ser atribuído aos efeitos sedativos ocasionados em altas doses, que levam a redução na exploração do LCE e à aparente anulação do efeito observado.

Deve-se considerar que os efeitos induzidos pelo tratamento com extratos de plantas são, muitas vezes, resultantes de uma atividade sinérgica ou aditiva entre os diferentes constituintes químicos que compõem a preparação. Um exemplo claro disto é a ausência de efeito do tipo-antidepressivo das naftodiantronas (constituintes ativos) da planta *Hypericum perforatum*, quando administradas isoladamente, em contraposição às propriedades do tipo-antidepressivas dos extratos padronizados, muito bem caracterizadas (Butterweck et al., 1998). Outro exemplo são os efeitos do tipo ansiolíticos caracterizados para extratos padronizados de Kava-kava (Rex et al., 2002; Garret et al., 2003), em que grande parte dos constituintes, quando estudados isoladamente, falhou em mostrar as mesmas propriedades (Smith et al., 2001). Nos resultados aqui obtidos, dos seis compostos estudados isoladamente, quatro deles apresentaram propriedades do tipo ansiolíticas, também documentada anteriormente para o extrato e a FAE, sugerindo que os efeitos da *P. sabulosa* podem ser resultantes de sinergismo ou adição de efeitos de alguns de seus constituintes.

Dando seqüência a estes experimentos, investigamos o mecanismo pelo qual a FAE e as substâncias isoladas de *P. sabulosa* exercem suas ações centrais, particularmente enfocando a participação do sistema GABAérgico nestas ações. O GABA é o principal neurotransmissor do sistema nervoso central de mamíferos, possuindo importância fundamental no controle do balanço global entre a excitação e a inibição da atividade neuronal, regulando assim, numerosas funções neurofisiológicas, entre elas, convulsões, ansiedade e o sono (Nutt, 2001). Vários agentes farmacológicos agindo no complexo receptor GABA_A podem modular a ansiedade, bem como a epilepsia de ausência por aumentarem ou reduzirem a inibição sináptica rápida mediada por estes receptores (Brabcova, 1993; Lydiard, 2003; Brevard et al., 2006). Neste sentido, agonistas GABAérgicos agem como moduladores positivos, promovendo um aumento do influxo de íons cloreto com resultante propriedades hipno-sedativa, ansiolítica e anticonvulsivante. Por outro lado, agonistas inversos são moduladores negativos, ocasionando uma diminuição no influxo de íons cloreto em resposta ao GABA, induzindo respostas ansiogênicas e/ou pró-convulsivantes. Por sua vez, antagonistas GABAérgicos são capazes de antagonizar as ações de agonistas e agonistas inversos (para revisão, ver Korpi et al., 2002). Agonistas

parciais do complexo receptor GABA_A têm sido de grande interesse na pesquisa científica e por parte da indústria farmacêutica, devido às propriedades ansiolíticas desprovidas dos efeitos colaterais comuns aos agonistas totais, como o DZP.

No presente estudo, investigou-se o possível envolvimento do receptor GABA_A/BDZ nos efeitos *in vivo* da FAE e compostos isolados de *P. sabulosa*, com o intuito de correlacionar estas ações com o mecanismo de ação avaliado posteriormente *in vitro*. Para isso, ratos previamente implantados com eletrodos bipolares nas regiões A₃ do córtex e CA₃-hipocampal foram estudados no teste de convulsões induzidas por PTZ. O registro eletroencefalográfico dos animais controles (salina + veículo) foi caracterizado por atividade eletrográfica rápida de alta voltagem (descargas do tipo ponta-onda agudas que apareceram sobre a atividade de base do traçado), característico de descargas epileptiformes, tanto no córtex quanto no hipocampo, que coincidiram com as convulsões clônicas generalizadas, visualizadas através de uma *webcam*. O pré-tratamento com a FAE foi capaz de suprimir dramaticamente as descargas de alta voltagem bem como as convulsões comportamentais induzidas pelo PTZ, caracterizando um evidente efeito anticonvulsivante para esta preparação. Todavia, na análise comportamental, estes animais apresentaram espasmos mioclônicos da cabeça e patas anteriores, porém sem qualquer episódio de convulsão clônica generalizada. Como os espasmos mioclônicos/clônias e a convulsão clônica generalizada indicam o início e o espraio da crise convulsiva, respectivamente, nossos resultados sugerem que a FAE age particularmente bloqueando o espraio das convulsões, distinto do DZP, que bloqueou ambos os parâmetros convulsivos. Entretanto, para ambos os grupos tratados com FAE ou DZP, foram ainda observadas espículas-onda no registro do EEG indicativo de atividade convulsiva, sugerindo um efeito protetor parcial. O antagonista BDZ, FMZ, por sua vez, não foi capaz de exercer qualquer influência *per se* no traçado eletroográfico das convulsões induzidas por PTZ, uma vez que o perfil deste registro foi similar ao dos animais controle. A falta de efeito do FMZ nas convulsões induzidas por PTZ está de acordo com um estudo recente mostrando que esta droga não interfere nas convulsões induzidas agudamente por PTZ (Hansen et al., 2004). Em seguida, mostramos que o pré-tratamento com o FMZ foi capaz de prevenir o efeito protetor da FAE somente contra os espasmos mioclônicos/clônias, sem modificar a proteção contra as convulsões clônicas generalizadas bem como as mortes induzidas pelo PTZ. Estes resultados sugerem que o antagonista bloqueia apenas parcialmente o efeito anticonvulsivante da FAE em ratos, na dose utilizada. Este perfil foi diferente daquele visto para o grupo FMZ + DZP, já que o antagonista BDZ bloqueou

totalmente as ações protetoras do DZP em todos os parâmetros convulsivos registrados no EEG e na análise comportamental.

Considerando que FMZ não foi capaz de bloquear totalmente o efeito anticonvulsivante da FAE de *P. sabulosa*, estudos posteriores foram realizados utilizando o teste do eletrochoque transcorneal máximo (ECM) em camundongos, haja vista que drogas BDZ não são capazes de proteger de forma efetiva as convulsões neste teste. O padrão de convulsão comportamental observado no ECM é caracterizado pela flexão das patas anteriores seguido da extensão tônica das patas posteriores. Os parâmetros clássicos utilizados na investigação de drogas com potencial ação anticonvulsivante neste teste são: tempo da extensão tônica das patas posteriores e a porcentagem de animais que apresentaram o componente extensor. Nossos resultados mostraram que o tratamento com a FAE de *P. sabulosa* foi capaz de reduzir em 58 a 83 % o tempo da extensão tônica bem como a porcentagem de animais que apresentaram o componente extensor tônico, efeito similar àqueles produzidos pelas drogas anticonvulsivantes, como fenitoína, fenobarbital, carbamazepina e ácido valpróico. Estes resultados sugerem que a FAE pode estar agindo tanto aumentando o limiar de convulsão, como inibindo a propagação das mesmas, um perfil anticonvulsivante diferente daquele observado por drogas BDZ. De maneira geral, drogas capazes de proteger convulsões induzidas por PTZ interagem com a neurotransmissão GABAérgica, enquanto aquelas capazes de inibir as convulsões por ECM tanto podem afetar canais de Na^+ como bloquear receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (Rogawski e Porter, 1990). Assim, para o efeito anticonvulsivante da FAE observado no teste do ECM, supõe-se a participação de outras áreas cerebrais, canais iônicos, e/ou outros sistemas de neurotransmissores, que não o GABA_A/BDZ . Esta hipótese é sugerida por pelo menos três razões: primeiro, o prosencéfalo está envolvido na expressão de convulsões clônicas, enquanto que a ativação de estruturas do tronco cerebral está envolvida na gênese de convulsões tônicas (Eells et al., 2004). Sabe-se que convulsões límbicas induzidas por estimulação com 6 Hz é particularmente limitada a estruturas límbicas e são relativamente insensíveis a anticonvulsivantes bloqueadores de canais de Na^+ (Barton et al., 2001). Segundo, drogas BDZ são pouco efetivas nas convulsões induzidas por ECM, como pode ser observado pela falta de efeito do DZP nos parâmetros analisados no teste. Em terceiro lugar, diferentemente da fenitoína, fenobarbital, carbamazepina e ácido valpróico, o DZP promoveu apenas uma pequena redução (de 10 a 20 %) na porcentagem de animais que apresentaram o componente extensor tônico, e somente em doses hipnóticas (7.5 e 10 mg/kg). Este achado está de acordo com estudos

relatando a habilidade do DZP em prevenir convulsões clônicas induzidas por PTZ em baixas doses, porém, doses superiores à dose tóxica 50 % são necessárias para a proteção no ECM (Kupferberg, 1992; Mandhane et al., 2007).

Dando seguimento ao estudo, foi investigada a participação do sítio BDZ no efeito do tipo ansiolítico de cada estirilpirona isolada de *P. sabulosa*, no modelo do LCE. Assim, os animais foram pré-tratados com FMZ (1-10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração central de cada composto isolado. De maneira geral, o antagonista FMZ promoveu um bloqueio parcial dose-dependente das ações do tipo ansiolítica dos compostos isolados DST (3), STY (4) e STY (7). Os efeitos promovidos pela DST (1) não foram antagonizados pelo FMZ, sugerindo que, possivelmente, outro(s) sítio(s) de ligação do complexo receptor GABA_A pode(m) estar envolvido(s) e necessita-se de uma investigação farmacológica mais aprofundada a este respeito. Entretanto, dados preliminares recentes de nosso laboratório indicam que esta estirilpirona bloqueia a recaptação de serotonina em membranas sinaptossomais de córtex de ratos, mecanismo pelo qual pode contribuir, pelo menos em parte, para a ação do tipo ansiolítica deste composto *in vivo* (resultados não apresentados). É importante frisar que a falta de bloqueio das ações da STY (1) pelo FMZ não deve ser interpretada com base na dose do antagonista utilizada nestes experimentos, tendo em vista que doses similares foram efetivas em antagonizar os efeitos farmacológicos dos demais compostos estruturalmente similares. Por outro lado, nem todas as alterações comportamentais induzidas pelo DZP foram antagonizadas totalmente pelo FMZ. O antagonista BDZ exerceu um bloqueio total das ações do DZP nos parâmetros porcentagem de tempo nos braços abertos e imersões desprotegidas de cabeça, e um bloqueio parcial nos parâmetros frequência de entradas, exploração da região distal dos braços abertos e estiramentos corporais protegidos. Estes resultados em conjunto sugerem o envolvimento de populações de receptores GABA_A sensíveis e insensíveis ao FMZ, ou ainda, mecanismos não-GABAérgicos poderiam estar envolvidos nas ações do tipo-ansiolíticas observadas para os compostos isolados DST e STY de *P. sabulosa*, bem como para o DZP, no teste do LCE. Alguns estudos suportam nossos resultados, uma vez que é bem conhecido que drogas BDZ também são capazes de agir em outros sistemas não-GABAérgicos, tais como aminoácidos excitatórios, colecistocinina, adenosina e canais iônicos voltagem-dependentes (Polc, 1991; Ishizawa et al., 1997), alguns dos quais poderiam estar contribuindo para as ações do tipo ansiolíticas aqui observadas para os compostos isolados da *P. sabulosa* e DZP.

Atualmente, os medicamentos BDZ representam as drogas sintéticas mais freqüentemente prescritas e consideradas de primeira escolha no tratamento farmacológico da ansiedade generalizada (Atack, 2003; Basile et al., 2004, 2006), ocupando um lugar de destaque no *ranking* das drogas mais utilizadas pelo homem para minimizar os efeitos do estresse, da tensão e da ansiedade propriamente dita (Argyropoulos e Nutt, 1999; Uhlenhuth et al., 1999; Carlini, 2003). No entanto, por ser uma condição psiquiátrica crônica e, conseqüentemente, de tratamento contínuo, o uso repetido dos BDZ induz uma série de reações secundárias indesejáveis graves, das quais merece destaque a dependência. Embora outras opções farmacológicas para o tratamento desta psicopatologia sejam foco de estudos (antidepressivos, β -bloqueadores, azaspironas, anticonvulsivantes) (Argyropoulos et al., 2000), muitas delas também possuem efeitos secundários indesejáveis e o decurso temporal para o alívio da sintomatologia da ansiedade é bastante lento. Com isso, até hoje o complexo receptor GABA_A tem sido objeto de grande interesse científico no desenvolvimento de novos moduladores ansio-seletivos (Rupprecht et al., 2006).

Nos últimos anos, têm sido detectadas em várias plantas substâncias capazes de se ligarem no receptor GABA_A (para revisão ver Johnston e Beart, 2004), como a crisina da *Passiflora coerulea* (Medina et al., 1990), apigenina da *Matricaria chamomilla* (Avallone et al., 2000), 6-metilapigenina e hesperidina da *Valeriana officinalis* (Wasowski et al., 2002; Marder et al., 2003; Fernández et al., 2005) e hispidulina da *Salvia officinales* (Kavvadias et al., 2004). Entre os diferentes sítios alostéricos presentes neste receptor, um dos mais extensivamente estudados e que apresenta maior importância clínica é o sítio BDZ. Face ao conjunto de dados comportamentais indicativos de uma ação do tipo BDZ para a planta *P. sabulosa*, aqui estudada, e com o intuito de caracterizar o mecanismo de ação dos compostos isolados desta planta e substanciar a extrapolação realizada *in vivo*, experimentos de *binding* como a inibição da ligação do ³H-FNZ pelas diferentes estirilpironas foram conduzidos *in vitro*. Assim, as DST (1), (2) ou (3), bem como as STY(4), (5) e (7) foram estudadas em membranas sinaptossomais de córtex de ratos, a fim de testar suas ações como moduladores do sítio BZP do receptor GABA_A.

Curvas de deslocamento da ligação do ³H-FNZ em membranas sinaptossomais na presença de concentrações crescentes de cada DST ou STY foram realizadas. Nossos resultados mostraram que todos os compostos isolados de *P. sabulosa* foram capazes de inibir a ligação do ³H-FNZ ao sítio BDZ, com diferentes potências, confirmando a afinidade destes compostos pelo sítio de ligação BDZ. Entretanto, na maior concentração

testada, a DST (1) inibiu a ligação do ^3H -FNZ em apenas 49 % (K_i superior a 100 μM), sugerindo baixa afinidade pelo sítio BDZ. Por outro lado, a DST (2) ou (3) inibiram a ligação do ^3H -FNZ com valores de K_i ($\text{IC}_{95\%}$) de 41.7 (20 - 86) μM e 35.8 (28-45) μM , respectivamente, enquanto que a STY (4), (5) ou (7) inibiram a ligação do ^3H -FNZ com K_i ($\text{IC}_{95\%}$) de 90.3 (67 - 122) μM , 31.0 (22 - 41) μM e 70.0 (60-79) μM , respectivamente, confirmando a atividade do tipo BDZ destes compostos.

Para os ensaios de saturação, selecionamos dois compostos que maior apresentaram atividade farmacológica *in vivo*, a DST (3) e a STY (7). Neste estudo, a análise de *Scatchard* das curvas de saturação revelou que ambos os compostos inibem competitivamente a ligação do [^3H]-FNZ ao sítio BDZ, com uma diminuição na afinidade aparente (K_d) sem modificação do número máximo de sítios de ligação. Além disso, pôde-se verificar através desta análise, que os dados obtidos se ajustaram melhor a uma hipérbole de um único sítio de ligação.

Os resultados *in vitro* mostraram que os compostos isolados de *P. sabulosa* DST e STY inibiram a ligação do ^3H -FNZ em sinaptossomas com afinidade em ordem de magnitude de μM . Entretanto, dados da literatura mostram que o DZP inibe o *binding* de radioligantes com maior afinidade, na ordem de nM (Yasar et al., 2003). Por outro lado, os resultados obtidos através da injeção i.c.v. das DST e STY mostraram que estes compostos promovem efeitos do tipo ansiolítico, no LCE, na faixa de dose de fmol a pmol, sugerindo maior potência *in vivo* quando comparados ao DZP (nmol). Esta aparente discrepância pode ser devido ao fato de que as preparações sinaptossomais utilizadas neste trabalho foram obtidas de córtex de ratos, em que os receptores GABA_A são constituídos por aproximadamente 60 % de subunidades α_1 (responsáveis por mediar os efeitos sedativos) e somente por 15-20 % destas preparações consistem de subunidades α_2 (responsáveis por mediar as propriedades ansiolíticas) (Möhler et al., 2006). Então, é plausível pensar que estas preparações seriam mais apropriadas na identificação de compostos com ações sedativas do que ansiolíticas. Além disso, os resultados *in vitro* não eliminam a possibilidade do envolvimento de outros sistemas de neurotransmissores nos efeitos centrais da planta *P. sabulosa* e seus constituintes.

Por outro lado, existe uma tendência mundial entre as pessoas das diversas partes do mundo em acreditar que todo produto de origem natural é desprovido de efeitos maléficos ao organismo humano. Imbuídos pelo desejo de um resgate de hábitos de vida teoricamente mais saudáveis, muitos indivíduos são levados à auto-medicação com

produtos naturais em meio a um ambiente de mitos e realidades que circunda a questão cultural da fitoterapia. Lapa e colaboradores, em 2003, salientaram de forma bastante oportuna que: “plantas medicinais utilizadas como medicamentos são xenobióticos, isto é, são produtos estranhos ao organismo, nele introduzidos com finalidades terapêuticas. Assim, como todo corpo estranho, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos, com isso devem ser encarados como tal até que se prove o contrário”. Além do mais, não há porque, *a priori*, considerar inócua uma planta medicinal, se do reino vegetal já foram obtidas substâncias extremamente tóxicas como a estricnina, a digitoxina, os curares e os heterosídeos cianogênicos.

Do ponto de vista toxicológico, é importante considerar então que, as plantas medicinais ou fitoterápicos podem não possuir apenas efeitos benéficos na sintomatologia de uma determinada patologia, mas, principalmente efeitos que se instalam a longo-prazo e, muitas vezes, de forma assintomática, como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos. Assim, as plantas só podem ser consideradas medicamentos éticos a partir do momento em que se tem definida sua eficácia, sua toxicologia aguda e crônica bem como seu controle de qualidade (Lapa et al., 2003). Diante do exposto acima e considerando que até o momento não há dados na literatura científica relatando a toxicidade da planta *P. sabulosa* em animais de laboratório, estudos subseqüentes foram conduzidos com o intuito de investigar possíveis efeitos tóxicos do tratamento agudo e sub-crônico (32 dias) com a FAE de *P. sabulosa* nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, em camundongos.

O estudo da toxicidade aguda da FAE de *P. sabulosa* revelou sinais tóxicos somente em altas doses, a partir de 2.000 mg/kg para via i.p. e 3.500 mg/kg para via v.o. Assim, a triagem farmacológica inicial da FAE identificou os seguintes sinais indicativos de toxicidade aguda: cianose, sialorréia e uma aparente redução da frequência respiratória. No entanto, os demais sinais avaliados como lacrimejamento, hiperemia, piloereção, volume urinário, diarreia, movimento circular, comportamento agressivo, paralisia de cabeça e/ou membros, convulsões, contorção abdominal (*writhes*) e sinal de *Straub*, não foram observados em nenhuma das doses utilizadas, o que reforça a boa tolerabilidade da administração oral da FAE. É importante lembrar, contudo, que estas observações foram qualitativas, servindo apenas para mostrar um perfil preliminar da FAE e orientar a escolha de doses para o estudo toxicológico subseqüente.

Não foi possível calcular por regressão linear a DL₅₀ oral da FAE, uma vez que a administração desta fração em camundongos machos induziu 10 e 30 % de mortes nas doses de 3.500 e 5.000 mg/kg, respectivamente, enquanto que em fêmeas, o tratamento

oral com FAE promoveu 10, 30 e 40 % de mortes, nas doses de 2.500, 3.500 e 5.000 mg/kg, respectivamente. Esses resultados indicam que a DL_{50} oral da FAE, em camundongos, deve ser superior à maior dose empregada neste estudo (DL_{50} oral > 5.000 mg/kg). Segundo Hodgson (1997), uma substância é considerada de baixa toxicidade quando sua DL_{50} for superior a 5.000 mg/kg, não sendo necessário o uso de doses superiores. Com isso, é possível supor que as substâncias presentes na FAE de *P. sabulosa* realmente possuam baixa toxicidade, ou ainda, sejam mal absorvidas quando a via de administração oral é utilizada. Além disso, eventuais constituintes tóxicos poderiam estar sendo degradados ou inativados durante o processo digestivo.

Os demais sinais indicativos de toxicidade, observados também em altas doses em camundongos, tais como ptose palpebral, ataxia, perda do reflexo de endireitamento, bem como resposta diminuída à pressão da cauda, podem ser resultantes de uma atividade do tipo BDZ, que é comum a estas drogas. Entretanto, é importante frisar que a potência da FAE em promover sedação e prejuízo motor, avaliados nos testes do campo aberto e rota-rod, respectivamente, foi significativamente inferior àquelas do DZP. Uma das maiores limitações das medicações BDZ no tratamento clínico da ansiedade são os seus efeitos sedativos e mio-relaxantes. A razão de potência dos efeitos sedativos/ansiolíticos para a FAE de *P. sabulosa* foi de 7,15, enquanto que para o DZP foi de 1,85. A DE_{50} da FAE para a diminuição do tempo total de permanência na barra giratória do rota-rod não pode ser calculada uma vez que a FAE não foi capaz de reduzir em 50 % o tempo total de permanência na barra giratória, em contraste ao DZP. Com isso, a DE_{50} da FAE no teste do rota-rod pode ser considerada superior a 2.000 mg/kg (a maior dose utilizada neste estudo), de forma que a razão de potência da FAE para os efeitos mio-relaxantes/ansiolíticos é sugerida ser de, pelo menos, 8, enquanto que para o DZP foi de 4,85. Estes resultados indicam que os efeitos sedativos e mio-relaxantes da FAE de *P. sabulosa* ocorrem em doses muito superiores em relação às doses ansiolíticas quando comparadas aos intervalos de segurança calculados para o DZP, sugerindo uma maior ansio-seletividade da FAE quando comparada ao BDZ padrão.

No tratamento sub-crônico, as doses selecionadas nesta etapa foram determinadas conforme os resultados obtidos preliminarmente através da toxicidade aguda, como preconiza a resolução nº. 90 de 16 de março de 2004, na sua publicação: “Guia na realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”. Nesta etapa experimental, todos os animais tratados (machos e fêmeas) por 32 dias sobreviveram, assim como não apresentaram qualquer sinal indicativo de toxicidade, exceto uma maior resistência ao

procedimento de administração intra-gástrica para a administração da FAE, observada em camundongos machos que, evidentemente, pode ser atribuído ao próprio estresse gerado durante o procedimento. A evolução do peso corporal, tanto em camundongos machos quanto em fêmeas, não foi afetada significativamente pelo tratamento oral agudo ou subcrônico com a FAE. O peso absoluto e relativo dos órgãos vitais, nas menores doses (250 e 500 mg/kg) não foi modificado pelo tratamento com a FAE, entretanto, esta fração na dose de 1.000 mg/kg promoveu, em camundongos machos, um aumento do peso absoluto e relativo do fígado em 30 e 34 %, respectivamente, enquanto que em fêmeas aumentou em 14 e 18 %, respectivamente. Além disso, a maior dose utilizada (1.000 mg/kg) promoveu um aumento significativo nos níveis séricos de AST, em camundongos machos, sem modificação dos demais parâmetros bioquímicos e hematológicos. Em fêmeas foi observada uma diminuição de creatinina nas doses de 250 e 500 mg/kg e um aumento do volume corpuscular médio bem como neutrófilos segmentados na menor dose, sem quaisquer alterações nos demais parâmetros bioquímicos e hematológicos. No entanto, estas alterações não apresentaram um padrão dose ou sexo-dependente, uma vez que ocorreram em caráter esporádico, após uma ou outra dose da FAE, eventualmente em machos ou em fêmeas. É digno de nota lembrar que embora tenham ocorrido diferenças significativas em alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos entre animais controle e experimentais, estes valores não excederam os valores normais para camundongos conforme indica a literatura (Grover et al., 2001; Gupta et al., 2004; Bürger et al., 2005), sugerindo boa tolerabilidade e baixa toxicidade da FAE. Em linhas gerais, estes resultados sugerem que a exposição de camundongos à *P. sabulosa* em regime agudo e subcrônico (32 dias) não promove comprometimento hematológico e das funções hepática e renal dos animais, não caracterizando, portanto, toxicidade, mas estudos complementares devem ser feitos para garantir a segurança de seu uso em seres humanos.

Considerando que a ansiedade generalizada é uma psicopatologia crônica e que a terapia medicamentosa deve ser de uso contínuo, o próximo passo desta pesquisa foi investigar se o efeito do tipo-ansiolítico desenvolve o fenômeno de tolerância após a exposição de camundongos a um esquema de tratamento subcrônico.

Estudos prévios mostraram que existe tolerância às propriedades hipnosedativas e anticonvulsivantes de drogas BDZ (File, 1985; Rosenberg et al., 1985; Miller et al., 1988). Entretanto, o desenvolvimento de tolerância aos efeitos ansiolíticos é ainda questionável e matéria de controvérsias. A falta de desenvolvimento de tolerância aos efeitos do tipo-ansiolítico após a exposição crônica aos BDZ já foi mostrada (Margules e Stein, 1968;

Cook e Sepinwall, 1975; McMillan e Leander, 1978). Por outro lado, estudos realizados nos modelos do LCE, de esconder defensivo condicionado e de interação social mostraram que os efeitos do tipo-ansiolítico dos BDZ são reduzidos após a exposição crônica (Vellucci e File, 1979; Stephens e Schneider, 1985; Treit, 1985; File, 1989; Ishihara et al. 1993; Brett e Pratt, 1995). Estes resultados contraditórios sugerem que as diferenças de procedimento experimental e o tipo de teste comportamental utilizado para investigar a “ansiedade” podem afetar de forma diferenciada o desenvolvimento da tolerância após a exposição crônica aos BDZ. Mais recentemente, o fenômeno de tolerância aos efeitos do tipo-ansiolítico de BDZ foram observadas somente em animais tratados diariamente com baixas doses. Entretanto, o mesmo fenômeno não ocorreu com altas doses (Chopin et al., 1993; Stock et al., 2000), reforçando a idéia de que o período de tratamento, bem como a faixa de dose utilizada resultam em efeitos distintos sobre a fenomenologia da tolerância aos BDZ.

Nossos resultados mostraram que o tratamento sub-crônico oral (32 dias) de camundongos machos e fêmeas com a FAE (250, 500 ou 1000 mg/kg) aumentou significativamente os parâmetros de exploração dos braços abertos do LCE, indicando um efeito do tipo ansiolítico. Estes achados estão de acordo com um estudo recente realizado em ratos de ambos os sexos tratados com DZP e submetidos ao mesmo modelo (Stock et al., 2000). Conseqüentemente, nossos resultados sugerem ausência de tolerância a esse efeito, o que torna esta planta bastante promissora e de grande potencial para a terapêutica medicamentosa da ansiedade generalizada.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

1) O extrato bruto hidroetanólico (EBH) e a fração acetato de etila (FAE) de *P. sabulosa* promoveram um efeito do tipo ansiolítico, anticonvulsivante e hipno-sedativo, sendo estas ações mais evidentes para a FAE.

(2) O processo de purificação foi efetivo na concentração do(s) princípio(s) ativo(s) responsável(is) para estas ações centrais da *P. sabulosa*, já que a FAE foi pelo menos duas vezes mais potente em induzir estas ações que o EBH, e foi a única fração, das três aqui estudadas, que mostrou atividade no sistema nervoso central, reforçando a idéia de que o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(is) por estas ações são as dihidroestiril-2-pironas e estiril-2-pironas, únicos constituintes presentes nesta fração.

(3) As ações centrais desencadeadas pela FAE, bem como pelas substâncias isoladas (dihidroestiril-2-pironas e estiril-2-pironas), envolvem, pelo menos parcialmente, a participação do sítio GABA_A/BDZ, evidenciado através do bloqueio parcial pelo FMZ, um antagonista BDZ, observado nos modelos de ansiedade (LCE) e de convulsão induzida por PTZ (observada através do registro do eletroencefalograma). A atividade anticonvulsivante da FAE em camundongos avaliados no teste do eletrochoque transcorneal máximo, reforça a suposição do envolvimento de outro(s) sítio(s) de ligação do complexo receptor GABA_A ou de outros sistemas de neurotransmissores que poderiam estar contribuindo sinergicamente para as ações centrais aqui observadas.

4) Os experimentos *in vitro* mostraram que as substâncias ativas apresentam afinidade pelo sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, o que poderia explicar os efeitos centrais observados neste estudo.

5) Os estudos preliminares de toxicologia aguda e sub-crônica (32 dias) revelaram que a administração oral da FAE em camundongos machos e fêmeas mostrou boa tolerabilidade e baixa toxicidade, entretanto, novos estudos devem ser conduzidos em cães, por exemplo, para verificar se existe toxicidade aguda e crônica em espécie não-roedora.

6) O tratamento sub-crônico (30 dias) em camundongos, machos e fêmeas, não foi capaz de desenvolver o fenômeno de tolerância, e conseqüentemente diminuição das propriedades do tipo ansiolítica no teste do LCE, o que, em conjunto com os resultados

toxicológicos, favorece a condução de estudos posteriores com o intuito de aprofundar o conhecimento aqui obtido, pela primeira vez, no estudo das propriedades centrais da planta *P. sabulosa*.

Em resumo, a espécie vegetal *P. sabulosa* parece promissora como fitoterápico para o tratamento da ansiedade generalizada, face ao seu perfil farmacológico e toxicológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução-RE nº 16 de março de 2004. **Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos**. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/>> Acesso em: 10.Jan.2006.

AKERELE, O. Nature's medicinal bounty: don't throw it away. **World Health Forum**. 14(4): 390-5, 1993.

ALEXANDRE, R. F.; SIMÕES, C. M. O. **Fitoterapia baseada em evidências: exemplos dos medicamentos fitoterápicos mais vendidos em Santa Catarina**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Diagnostic criteria for generalized anxiety disorders, *In*: American Psychiatric Association (Ed.), Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - DSM-IV. 4th Edition, American Psychiatric Press, Washington, D.C., pp. 435-436, 1994.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - DSM-IV-R. 4th Edition, Text revised. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2002.

ANDRADE, L.; WALTERS, E. E.; GENTIL, V.; LAURENTI, R. Prevalence of ICD-10 mental disorders in a catchment area in the city of São Paulo, Brazil. **Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol.** 37: 316-325, 2002.

ANDREATINI, R. Uso de Fitoterápicos em psiquiatria. **Rev. Bras. Psiquiat.** 22(3): 104-105, 2000.

ANDREWS, J. S.; STEPHENS, D. N. Discriminative stimulus properties of the benzodiazepine receptor partial agonist beta-carbolines abecarnil and ZK 95962: a comparison with chlordiazepoxide. **Behav. Pharmacol.**, 2(3): 171-185, 1991.

ARGYROPOULOS SV, NUTT DJ. The use of benzodiazepines in anxiety and other disorders. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, 9 (6):S407-12, 1999.

ARGYROPOULOS, S. V.; SANDFORD, J. J.; NUTT, D. J. The psychobiology of anxiolytic drugs Part 2: pharmacological treatments of anxiety. **Pharmacol. Ther.**, 88: 213-227, 2000.

ASHTON, H. Guidelines for the rational use of benzodiazepines. **Drugs**. 48(1): 25-40, 1994.

ASTIN, J. A. Why patients use alternative medicine: results of a national study. **J. Am. Med. Assoc.**, 279: 1548-1553, 1998.

ATAK, J. R. Anxiolytic compounds acting at the GABAA receptor benzodiazepine binding site. **Curr. Drug Targets.** CNS Neurol. Disord. 2: 213-232, 2003.

ATAACK, J.R. The benzodiazepine binding site of GABA(A) receptors as a target for the development of novel anxiolytics. **Expert Opin. Investig. Drugs**, 14(5): 601-18, 2005.

AVALLONE R, ZANOLI P, PUIA G, KLEINSCHNITZ M, SCHREIER P, BARALDI M. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. **Biochem. Pharmacol.**, 59(11): 1387-94, 2000.

BALDWIN, D. S.; ANDERSON, I. M.; NUTT, D. J.; BANDELOW, B.; BOND, A.; DAVIDSON, J. R. T.; DEN BOER, J. A.; FINEBERG, N. A.; KNAPP, M.; SCOTT, J.; WITTCHEN, H. U. Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. **J. Psychopharmacol.**, 19(6): 567-596, 2005.

BARTON, M.E.; KLEIN, B.D.; WOLF, H.H.; WHITE, H.S. Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. **Epilepsy Res.**, 47(3):217-227, 2001.

BASILE, A.; LIPPA, A. S.; SKOLNICK, P. Anxiolytic effects of anxiolytics: can less be more? **Eur. J. Pharmacol.**, 500: 441-451, 2004.

BASILE, A.; LIPPA, A. S.; SKOLNICK, P. GABA_A receptor modulators as anxiolytic agents. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, 3(4): 475-481, 2006.

BAUR, R.; SIMMEN, U.; SENN, M.; SEQUIN, U.; SIGEL, E. Novel plant substances acting as beta subunit isoform-selective positive allosteric modulators of GABA_A receptors. **Mol. Pharmacol.**, 68(3):787-92, 2005.

BEAUBRUN, G.; GRAY G. E. A review of herbal medicines for psychiatric disorders. **Psychiatr. Serv.**, 51(9): 1130-4, 2000.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behav. Brain Res.**, 125(1-2): 141-9, 2001.

BENET, L.Z. General principles. In: Hardman, J.G., Limbard, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.H., Gilman, A.G. (eds.) Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, 9th edition, McGraw Hill, USA, pp. 12-13.

BILIA, A. R.; SCALISE, L.; BERGONZI, M. C.; VINCIERI, F. F. Analysis of kavalactones from *Piper methysticum* (kava-kava). **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, 818(1-2):203-14, 2004.

BLUMENTHAL, M., BUSSE, W.R., GOLDBERG, A., GRUENWALD, J., HALL, T., RIGGINS, C.W., RISTER, R.S. (eds.), The complete German Commission E Monographs: therapeutic guide in herbal medicines, American Botanical Council, Boston, Integrative Medicine Communications, 1998.

BLUMENTHAL, M. Interactions between herbs and conventional drugs: introductory considerations. **HerbalGram**, 49: 52-63, 2000.

BLUMENTHAL, M. Kava safety questioned due to case reports of liver toxicity. **HerbalGram**, 55:26-32, 2002.

BRABCOVA, R., KUBOVA, H.; VELISEK, L.; MARES, P. Effects of a benzodiazepine, bretazenil (Ro 16-6028), on rhythmic metrazol EEG activity: comparison with standard anticonvulsants. **Epilepsia**, 34(6): 1135-40, 1993.

BRANDÃO, M. L. **Psicofisiologia: as bases fisiológicas do comportamento**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 107-149, 2001.

BRAUER, R. B.; STANGL, M.; STEWART, J. R.; PFAB, R.; BECKER, K. Acute liver failure after administration of herbal tranquilizer kava-kava (*Piper methysticum*). **J. Clin. Psychiatry**, 64(2):216-8, 2003.

BRETT, R.R.; PRATT, J.A. Changes in benzodiazepine-GABA receptor coupling in an accumbens-habenula circuit after chronic diazepam treatment. **Br. J. Pharmacol.**, 116(5): 2375-84, 1995.

BREVARD, M. E., KULKARNI, P.; KING, J. A.; FERRIS, C. F. Imaging the neural substrates involved in the genesis of pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsia**, 47(4): 745-54, 2006.

BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiol.**, 124(2): 507-14, 2000.

BRITO, A.S. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo*** / Alba Souza Brito. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 1994.

BÜRGER, C., FISCHER, D. R., CORDENUNZZI, D. Â., BATSCHAUER, A. P. B., CECHINEL FILHO, V., SOARES, A. R. S. Acute and subacute toxicity of the hydroalcoholic extract from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae) in mice. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, 8(2): 370-373, 2005.

BUTTERWECK, V.; PETEREIT, F.; WINTERHOFF, H.; NAHRSTEDT, A. Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Med.**, 64(4): 291-4, 1998.

CALABRESE, E.J., BALDWIN, L.A.; HOLLAND, C.D. Hormesis: a highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment. **Risk Anal.**, 19(2): 261-81, 1999.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. U-shaped dose-responses in biology, toxicology, and public health. **Annu. Rev. Public. Health.**, 22: 15-33, 2001.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 33(2): 179-89, 2000.

CALIXTO, J. B. Biological activity of plants extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**, 2: 261-279, 2001.

CAPASSO, A.; SORRENTINO, L. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of Kava kava and Passiflora extracts combination. **Phytomedicine**, 12(1-2): 39-45, 2005.

CARLINI, E.A. Pharmacological screening of Brazilian plants. **Rev. Bras. Biol.**, 32(2): 265-74, 1972.

CARLINI, E.A.; CONTAR, J. DE D.P.; SILVA-FILHO, A.R.; DA SILVEIRA-FILHO, N.G.; FROCHTENGARTEN, M.L.; BUENO, O.F. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.**, 17(1): 37-64, 1986.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 75(3): 501-12, 2003.

CARLSON, N. R. **Fisiologia do comportamento**. 7ª edição. São Paulo: Editora Manole, p. 287, 2002.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 29(8): 1193-205, 2005.

CARPENDO, R.; CHIARUGI, A.; RUSSI, P.; LOMBARDI, G.; CARLA, V.; PELLICIARI, R.; MORORI, F. Inhibitors of kynurenine hydroxylase and kynureninase increase cerebral formation of kynurenate and have sedative and anti-convulsant activities. **Neurosci.**, 61: 237-243, 1994.

CARVALHO-FREITAS MIR, COSTA M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biol. Pharm. Bull.**, 25:1629-33, 2002.

CASS, H. Herbal for the nervous system: Ginkgo, Kava, Valerian, Passionflower. **Sem. Integr. Med.**, 2: 82-88, 2004.

CASSELLA, J.; HAY, J.; LAWSON, S.J. **The rat nervous system: An introduction to preparatory techniques**. British Library, p.17, 1997.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Hepatic toxicity possibly associated with kava-containing products-United States, Germany, and Switzerland, 199-2002. **JAMA**, 289:36-7, 2003.

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÃO DE MEDICAMENTOS PSICOTRÓPICOS (CEBRID) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP). Departamento de Psicofarmacologia. *Haja ansiedade. Haja insônia*. Bol. CEBRID n. 47, jan/fev/mar de 2003. Disponível em: <<http://www.saude.inf.br/cebrid/boletimcebrid47.htm>> Acesso em: 15 ago. 2003.

CHEN, Y. L., HSIEH, C. L.; WU, P. H.; LIN, J. G. Effect of Polygala tenuifolia root on behavioral disorders by lesioning nucleus basalis magnocellularis in rat. **J. Ethnopharmacol.**, 95(1): 47-55, 2004.

CHENG, M. C., LI, C. Y.; KO, H. C.; KO, F. N.; LIN, Y. L.; WU, T. S. Antidepressant principles of the roots of *Polygala tenuifolia*. **J. Nat. Prod.**, 69(9): 1305-9, 2006.

CHINDO, B. A.; AMOS, S.; ODUTOLA, A. A.; VONGTAU, H. O.; ABBAH, J.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. S. Central nervous system activity of the metanolic extract of *Ficus platyphylla* stem bark. **J. Ethnopharmacol.**, 85: 131-137, 2003.

CHOPIN, P.; ASSIE, M.B.; BRILEY, M. Neuropharmacology of a new potential anxiolytic compound, F 2692, 1-(3'-trifluoromethyl phenyl) 1, 4-dihydro 3-amino 4-oxo 6-methyl pyridazine. 2. Evaluation of its tolerance and dependence producing potential and of its effects on benzodiazepine withdrawal in the elevated plus-maze test in rats. **Psychopharmacology (Berl)**., 110(1-2): 19-26, 1993.

CHUNG, I. W., MOORE, N. A.; Oh, W. K.; O'Neill, M. F.; Ahn, J. S.; Park, J. B.; Kang, U. G.; Kim, Y. S. Behavioural pharmacology of polygalasaponins indicates potential antipsychotic efficacy. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 71(1-2): 191-5, 2002.

COLE, J.C.; RODGERS, R.J. An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze. **Behav. Pharmacol.**, 4(6): 573-580, 1993.

COOK, B.L.; SEPINWALL, J. **Behavioral analysis of the effects and mechanisms of action of benzodiazepines**. In: Costa E, Greengard, P. (eds). Mechanisms of action of benzodiazepines. Raven Press, New York, pp. 1-28.

COSTA, E.; GUIDOTTI, A. Benzodiazepines on trial: a research strategy for their rehabilitation. **Trends Pharmacol. Sci.**, 17(5): 192-200, 1996.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.**, 60: 52-60, 1997.

CRUZ, A.P.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 49(1): 171-6, 1994.

CUNNINGHAM, A.B. - Professional ethics and ethnobotanical research. In: ALEXIADES, M.N., ed. - Selected guidelines for ethnobotanical research: a field manual. New York, The New York Botanical Garden, 1996. p. 19-51.

CUPP, M.J. Herbal remedies: adverse effects and drug interactions. **Amer. Fam. Phys.**, 59 (5): 1239-1244, 1999.

CUTIN, S.; ROCHA, D.L.B.; PICON, P.; BLAYA, C. **Transtorno de ansiedade generalizada**. In: Alfredo Cataldo Neto, Gabriel José Chittó Gauer, Nina Rosa Furtado, Porto Alegre: Editora EDIPUCRS, p.414, 2003.

CZAJKOWSKI, C.M. **Receptor GABA_A and benzodiazepine binding sites**. 30 Jun. de 2006. Disponível em: <www.physiology.wisc.edu/faculty/czajkowski.html>. Acesso em 03 Abr.2007.

CZUCZWAR, S.J.; FREY, H.H. Effect of morphine and morphine-like analgesics on susceptibility to seizures in mice. **Neuropharmacology**, 25(5): 465-9, 1986.

DALL'ACQUA, S., INNOCENTI, G.; VIOLA, G.; PIOVAN, A.; CANIATO, R.; CAPPELLETTI, E. M. Cytotoxic compounds from *Polygala vulgaris*. **Chem. Pharm. Bull.** (Tokyo) 50(11): 1499-501, 2002.

DAVIES C, STEINBERG H. A biphasic effect of chlordiazepoxide on animal locomotor activity. **Neurosci. Lett.**, 46(3):347-51, 1984.

DESAI, A. K.; GROSSBERG, G. T. Herbals and botanicals in geriatric psychiatry. **Am. J. Geriatr. Psychiatry**, 11(5): 498-506, 2003.

DE SMET, P. A. Herbal remedies. **N. Engl. J. Med.**, 347(25): 2046-56, 2002.

DO-REGO, J. C.; VIANA, A. F.; LE MAITRE, E.; DENIEL, A.; RATES, S. M.; LEROUX-NICOLLET, I.; COSTENTIN, J. Comparisons between anxiety tests for selection of anxious and non anxious mice. **Behav. Brain Res.**, 169(2): 282-8, 2006.

DUARTE, F.S.; DUZZIONI, M.; MENDES, B.G.; PIZZOLATTI, M.G.; DE LIMA, T.C. Participation of dihydrostyryl-2-pyrones and styryl-2-pyrones in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical anesthetic. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 86(1): 150-61, 2007.

DUNHAN, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J. Amer. Pharm. Assoc.**, 46: 208-210, 1957.

EELLS, J.B.; CLOUGH, R.W.; BROWNING, R.A.; JOBE, P.C. Comparative fos immunoreactivity in the brain after forebrain, brainstem, or combined seizures induced by electroshock, pentylenetetrazol, focally induced and audiogenic seizures in rats. **Neuroscience** 123(1):279-292, 2004.

EGASHIRA, N., LI, J. C.; MIZUKI, A.; YAMAUCHI, K.; MATSUDA, T.; OSAJIMA, M.; MATSUSHITA, M.; MISHIMA, K.; IWASAKI, K.; HARA, S.; ONO, N.; NISHIMURA, R.; NOHARA, T.; FUJIWARA, M. Antagonistic effects of methanolic extract of *Polygala telephioides* on morphine responses in mice. **J. Ethnopharmacol.**, 104(1-2): 193-8, 2006.

EISEBERG, D. M.; DAVID, R. B.; ETTNER, S. L.; APPEL, S.; WILKEY, S.; VAN ROMPAY, M.; KESSLER, R.C. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. **JAMA**, 280(18): 1569-1575, 1998.

EL SAYAH, M., CECHINEL-FILHO, V.; PINHEIRO, T. R.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. In vitro effect of the extract and the 1,7-dihydroxy-2,3-dimethoxy xanthone from *Polygala cyparissias* on the contractions induced by inflammatory mediators and ovalbumin in normal and actively sensitized trachea from guinea pig. **Inflamm. Res.**, 48(4): 218-23, 1999.

ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **J. Ethnopharmacol.**, 51: 111-120, 1996.

ELISABETSKY, E. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas**. 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. Ed. UFSC e Ed. da UFRGS, 2003.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **J. Ethnopharmacol.**, 75(2-3): 141-64, 2001.

ERNST, E. Herbal remedies for anxiety – a systematic review of controlled clinical trials. **Phytomedicine**, 13: 205-208, 2006.

ESCHER, M.; DESMEULES, J.; GIOSTRA, E.; MENTHA, G. Hepatitis associated with Kava, a herbal remedy for anxiety. **BMJ**. 322(7279):139, 2001.

FARINA, M., J. L. FRANCO, Ribas, C. M.; Meotti, F. C.; Missau, F. C.; Pizzolatti, M. G.; Dafre, A. L.; Santos, A. R. Protective effects of Polygala paniculata extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, 57(11): 1503-8, 2005.

FERNANDEZ, S.P.; WASOWSKI, C.; PALADINI, A.C.; MARDER, M. Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. **Eur. J. Pharmacol.**, 512(2-3):189-98, 2005.

FILE, S.E. Tolerance to the behavioral actions of benzodiazepines. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 9(1): 113-21, 1985.

FILE, S.E. Chronic diazepam treatment: effect of dose on development of tolerance and incidence of withdrawal in an animal test of anxiety. **Hum. Psychopharmacol.**, 4: 59-63, 1989.

FRITSCHY, J. M.; MOHLER, H. GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. **J. Comp. Neurol.**, 359(1): 154-94, 1995.

FUGH-BERMAN, A.; COTT, J. M. Dietary supplements and natural products as psychotherapeutic agents. **Psychosom. Med.**, 61(5): 712-28, 1999.

GAMANIEL, K.; AMOS, S.; AKAH, P. A. SAMUEL, B. B.; KAPU, S.; OLUSOLA, A.; ABAYOMI, A. O.; OKOGUM, J. I.; WAMBEBE, C. Pharmacological profile of NIPRD 94/002/1-0. A novel herbal antisickling agent. **J. Pharm. Res. Dev.**, 3: 89-94, 1998.

GARRETT, K. M.; BASMADJIAN, G.; KHAN, I. A.; SCHANEBERG, B. T.; SEALE, T. W. Extracts of kava (*Piper methysticum*) induce acute anxiolytic-like behavioral changes in mice. **Psychopharmacology (Berl)**. 170(1):33-41, 2003.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on

the central nervous system-A study of historical sources from the 16th to 19th century. **J. Ethnopharmacol.**, 109(2): 338-47, 2007.

GOLOUBKOVA, T. D.; HECKLER, E.; Rates, S. M.; Henriques, J. A.; Henriques, A. T. Inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction from *Helietta apiculata* markedly potentiate the hypnotic action of pentobarbital. **J. Ethnopharmacol.**, 60(2): 141-8, 1998.

GOTTESMANN, C. GABA mechanisms and sleep. **Neurosci.**, 111(2), 231-239, 2002.

GRAEFF, F. G.; AUDI, E. A.; ALMEIDA, S. S.; GRAEFF, E. O.; HUNZIKER, M.H. Behavioral effects of 5-HT receptor ligands in the aversive brain stimulation, elevated plus-maze and learned helplessness tests. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 14(4): 501-6, 1990.

GRAEFF, F. G. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. In: Frederico Guilherme Graeff, Francisco Silveira Guimarães. São Paulo: Editora Atheneu, p. 124, 1999.

GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L.; GUIMARÃES, F. S.; VIANA, G. S.B.; VIANA, M. B. **Neurobiologia das doenças mentais**. 5ª edição, São Paulo: Editora Lemos, p. 135-178, 1999.

GRANT, B. F.; HASIN, D. S.; STINSON, F. S.; DAWSON, D. A.; RUAN, W. J.; GOLDSTEIN, R. B.; SMITH, S. M.; SAHA, T. D.; HUANG, B. Prevalence, correlates, co-morbidity, and comparative disability of DSM-IV generalized anxiety disorder in the USA: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. **Psychol. Med.**, 35: 1747-1759, 2005.

GROVER, J.K., ADIGA, G., VATS, V. and RATHI, S.S. Extracts of *Benincasa hispida* prevent development of experimental Ulcers. **J. Ethnopharmacol.**, 78(2001) 159–164.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz; L.A.; Petrovick, P.R. (eds). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3ª edição. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis, UFSC, p. 15, 2001.

GUPTA, M., MAZUMDER, U. K., KUMAR, R. S., SIVAKUMAR, T. and VAMSI, M. L. M. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **J. Pharmacol. Sci.**, 94: 177 – 184, 2004.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, 27: 1-93, 2006.

HA, W. Y., P. K. WU, KOK, T. W.; LEUNG, K. W.; MAK, N. K.; YUE, P. Y.; NGAI, S. M.; TSAI, S. N.; WONG, R. N. Involvement of protein kinase C and E2F-5 in euxanthone-induced neurite differentiation of neuroblastoma. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 38(8): 1393-401, 2006.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 327(1):1-5, 1984.

HANSEN, S. L.; SPERLING, B. B.; SÁNCHEZ, C. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABA_A receptor ligands in pentylenetetrazole-kindling mice. **Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psych.**, 28: 105-113, 2004.

HERDERICH, M; BECKERT, C.; VEIT, M. Establishing styrylpyrone synthase activity in cell free extracts obtained from gametophytes of *Equisetum arvense* L by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**. 8(4): 194-197, 1997.

IKEYA, Y., TAKEDA, S.; Tunakawa, M.; Karakida, H.; Toda, K.; Yamaguchi, T.; Aburada, M. Cognitive improving and cerebral protective effects of acylated oligosaccharides in *Polygala tenuifolia*. **Biol. Pharm. Bull.**, 27(7): 1081-5, 2004.

ISHIHARA, S.; HIRAMATSU, M.; KAMEYAMA, T.; NABESHIMA, T. Development of tolerance to anxiolytic effects of chlordiazepoxide in elevated plus-maze test and decrease of GABA_A receptors. **J. Neural Transm. Gen. Sect.**, 91(1):27-37, 1993.

ISHIKAWA, T., FUNAHASHI, T.; KUDO, J. Effectiveness of the Kampo kami-shoyosan (TJ-24) for tremor of antipsychotic-induced parkinsonism. **Psychiatry Clin. Neurosci.**, 54(5): 579-82, 2000.

IRWIN, S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. **Psychopharmacologia**, 13(3):222-57, 1968.

JIA, H., JIANG, Y.; RUAN, Y.; ZHANG, Y.; MA, X.; ZHANG, J.; BEYREUTHER, K.; TU, P.; ZHANG, D. Tenuigenin treatment decreases secretion of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein in cultured cells. **Neurosci. Lett.**, 367(1): 123-8, 2004.

JOFFE, S.; THOMAS, R. **Phytochemicals: a renewable global resource**. AgBiotech News Info, 1: 697-700, 1989.

JOHNSTON GA. GABA_A receptor pharmacology. **Pharmacol. Ther.**, 69(3): 173-98, 1996.

JOHNSTON, G.A.R.; BEART, P.M. Flavonoids: some of the wisdom of sage? **Br. J. Pharmacol.**, 142: 809-810, 2004.

JUSSOFIE, A.; SCHMIZ, A.; HIEMKE, C. Kavapyrone enriched extract from *Piper methysticum* as modulator of the GABA binding site in different regions of rat brain. **Psychopharmacology (Berl.)**, 116(4):469-74, 1994.

KAKO, M.; MIURA, T.; NISHIYAMA, Y.; ICHIMARU, M.; MORIYASU, M.; KATO, A. Hypoglycemic activity of some triterpenoid glycosides. **J. Nat. Prod.**, 60(6): 604-5, 1997.

KARAKIDA, F.; IKEYA, Y.; TSUNAKAWA, M.; YAMAGUCHI, T.; IKARASHI, Y.; TAKEDA, S.; ABURADA, M. Cerebral protective and cognition-improving effects of sinapic acid in rodents. **Biol. Pharm. Bull.**, 30(3):514-9, 2007.

KATE, K.T. & LAIRD, S.A. - Natural products and the pharmaceutical industry. In: KATE, K.T. & LAIRD, S.A., orgs. - **The commercial use of biodiversity: access to genetic resources and benefit-sharing**. Kew, Royal Botanic Gardens, 1999. p. 34-77.

KAVVADIAS, D.; SAND, P.; YOUDIM, K.A.; QAISER, M.Z.; RICE-EVANS, C.; BAUR, R.; SIGEL, E.; RAUSCH, W.D.; RIEDERER, P.; SCHREIER, P. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. **Br. J. Pharmacol.**, 142(5): 811-20, 2004.

KAWASHIMA, K., MIYAKO, D.; ISHINO, Y.; MAKINO, T.; SAITO, K.; KANO, Y. Anti-stress effects of 3,4,5-trimethoxycinnamic acid, an active constituent of roots of *Polygala tenuifolia* (Onji). **Biol. Pharm. Bull.**, 27(8): 1317-9, 2004.

KIM, H. M., E. H. LEE, Na, H. J.; Lee, S. B.; Shin, T. Y.; Lyu, Y. S.; Kim, N. S.; Nomura, S. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on the tumor necrosis factor-alpha secretion from mouse astrocytes. **J. Ethnopharmacol.**, 61(3): 201-8, 1998.

KINRYS, G.; WYGANT, L. E. Transtornos de ansiedade em mulheres: gênero influencia o tratamento ? **Rev. Bras. Psiquiatr.**, 27(II): S42-50, 2005.

KLEVEN, M.S.; KOEK, W. Effects of different classes of partial benzodiazepine agonists on punished and unpunished responding in pigeons. **Psychopharmacology (Berl)**, 144(4): 405-10, 1999.

KOCH-WESER J.; GREENBLATT, D. J. The archaic barbiturate hypnotics. **N. Engl. J. Med.**, 291(15):790-1, 1974.

KORPI, E. R.; GRUNDER, G.; LUDDENS, H. Drug interactions at GABA(A) receptors. **Prog. Neurobiol.**, 67(2): 113-59, 2002.

KUPFERBERG, H.J. Strategies for identifying and developing new anticonvulsant drugs. **Pharm. Weekbl. Sci.**, 14(3A):132-138, 1992.

LAFRANCE, W. C.; LAUTERBACH, E. C.; COFFEY, C. E.; SALLOWAY, S. P.; KAUFER, D. I.; REEVE, A.; ROYALL, D.R.; AYLWARD, E.; RUMMANS, T.A.; LOVELL, M. R. The use of herbal alternative medicines in neuropsychiatry. **J. Neuropsychiatry Clin Neurosci.**, 12: 177-192, 2000.

LAKE, J. Psychotropic medications from natural products: a review of promising research and recommendations. **Altern. Ther. Health Med.**, 6(3): 36-52, 2000.

LANCEL, M. Role of GABA_A receptors in the regulation of sleep: initial sleep responses to peripherally administered modulators and agonists. **Sleep**, 22(1): 33-42, 1999.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; NOGUEIRA, T.C.M. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (eds) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª edição revisada e ampliada, Editora da UFSC/Editora da UFRGS, Florianópolis/Porto Alegre, 247-262, 2003.

- LEDOUX, J. E. Emotion: clues from the brain. **Annu. Rev. Psychol.**, 46: 209-35, 1995.
- LI, T. Z., W. D. ZHANG, Yang, G. J.; Liu, W. Y.; Chen, H. S.; Shen, Y. H. Saponins from *Polygala japonica* and their effects on a forced swimming test in mice. **J. Nat. Prod.**, 69(4): 591-4, 2006.
- LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**., 92(2):180-5, 1987.
- LITCHFIELD, J.T.; WILCOXON, F. Simplified method evaluation dose-effect experiments. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 96: 99-113, 1949.
- LOSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Res.**, 2(3): 145-81, 1988.
- LU, M. -C. Studies on the sedative effects of *Cistanche deserticola*. **J. Ethnopharmacol.**, 59: 161-165, 1998.
- LUDDENS, H., KORPI, E. R.; SEEBURG, P. H. GABA_A/benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications. **Neuropharmacology**, 34(3): 245-54, 1995.
- LYDIARD, R. B. The role of GABA in anxiety disorders. **J. Clin. Psychiatry**, 64(3): 21-7, 2003.
- MACDONALD, R. L.; OLSEN, R. W. GABA_A receptor channels. **Annu. Rev. Neurosci.** 17: 569-602, 1994.
- McKERNAN, R. M.; WHITING, P. J. Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? **Trends Neurosci.**, 19(4): 139-43, 1996.
- MAK, N.K.; LI, W.K.; ZHANG, M.; WONG, R.N.; TAI, L.S.; YUNG, K.K.; LEUNG, H.W. Effects of euxanthone on neuronal differentiation. **Life Sci.**, 66(4):347-54, 2000.
- MAK, N. K., H. L. LUNG, Wong, R. N.; Leung, H. W.; Tsang, H. Y.; Leung, K. N. Expression of protein kinase C isoforms in euxanthone-induced differentiation of neuroblastoma cells. **Planta Med.**, 67(5): 400-5, 2001.
- MANDHANE, S.N.; AAVULA, K.; RAJAMANNAR, T. Timed pentylenetetrazol infusion test: A comparative analysis with s.c.PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice, **Seizure: Eur. J. Epil.**, (2007), doi:10.1016/j.seizure.2007.05.005, *in press*.
- MANTANI, N.; HISANAGA, A.; Kogure, T.; Kita, T.; Shimada, Y.; Terasawa, K. Four cases of panic disorder successfully treated with Kampo (Japanese herbal) medicines: Kami-shoyo-san and Hange-koboku-to. **Psychiatry Clin. Neurosci.**, 56(6): 617-20, 2002.

MARDER M, VIOLA H, WASOWSKI C, FERNANDEZ S, MEDINA JH, PALADINI AC. 6-methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 75(3):537-45, 2003.

MARGULES, D.L.; STEIN, L. Increase of "antianxiety" activity and tolerance of behavioral depression during chronic administration of oxazepam. **Psychopharmacologia**, 13(1): 74-80, 1968.

MARQUES, M. *Securidaca L.* (Polygalaceae) do Brasil. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro. 34(1): 7-44, 1996.

McMILLAN, D.E.; LEANDER, J.D. Chronic chlordiazepoxide and pentobarbital interactions on punished and unpunished behavior. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 207(2):515-20, 1978.

MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C.; WOLFMAN, C.; LEVI DE STEIN M.; CALVO, D.; DIAZ, L.E.; PENA, C. Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties. **Biochem. Pharmacol.** 40(10): 2227-31, 1990.

MEDRADO, V. C. **Farmacologia**. In: Silva, Penildon. 6^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 383, 2002.

MILLER, L.G.; GREENBLATT, D.J.; BARNHILL, J.G.; SHADER, R.I. Chronic benzodiazepine administration. I. Tolerance is associated with benzodiazepine receptor downregulation and decreased gamma-aminobutyric acidA receptor function. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 246(1): 170-6, 1988.

MOHLER, H.; CRESTANI, F.; RUDOLPH, U. GABA(A)-receptor subtypes: a new pharmacology. **Curr. Opin. Pharmacol.**, 1(1): 22-5, 2001.

MOHLER, H.; FRITSCHY, J.M.; RUDOLPH, U. A new benzodiazepine pharmacology. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 300(1): 2-8, 2002.

MOHLER, H. GABA(A) receptor diversity and pharmacology. **Cell Tissue Res.**, 326(2): 505-16, 2006.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, 48(4):254-60, 1955.

MORTON, S.; LADER, M. Studies with alpidem in normal volunteers and anxious patients. **Pharmacopsychiatry.**, 23(3):120-3, 1990.

NAITO, R.; TOHDA, C. Characterization of anti-neurodegenerative effects of *Polygala tenuifolia* in Abeta(25-35)-treated cortical neurons. **Biol. Pharm. Bull.**, 29(9): 1892-6, 2006.

NAPPO, S.; CARLINI, E. A. Preliminary findings: consumption of benzodiazepines in Brazil in during the year 1988 and 1989. **Drug Alcohol Depend.**, 33: 11-17, 1993.

NAZAR, M.; JESSA, M.; PLAZNIK, A. Benzodiazepine-GABAA receptor complex ligands in two models of anxiety. **J. Neural Transm.**, 104(6-7): 733-46, 1997.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, 70: 461-477, 2007.

N'GOUEMO, P.; NGUEMBY-BINA, C.; BALDT-MOULINIER, M. Some neuropharmacological effects of an ethanolic extract of *Maprounea africana* in rodents. **J. Ethnopharmacol.**, 62: 57-63, 1994.

NOTO, A. R.; CARLINI, E. A.; MASTROIANNI, P. C.; ALVES, V. C.; GALDURÓZ, J. C. F.; KUROIWA, W.; CSIZMAR, J.; COSTA, A.; FARIA, M. DE A.; HIDALGO, S. R.; ASSIS, D.; NAPPO, S. A. Analysis of prescription and dispensation of psychotropic medications in two cities in the State of São Paulo, Brazil. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, 24(2): 68-73, 2002.

NUTT, D. J. Neurobiological mechanisms in generalized anxiety disorder. **J. Clin. Psychiatry.**, 62(11): 22-7, 2001.

NUTT, D.; ARGYROPOULOS, S.; HOOD, S.; POTOKAR, J. Generalized anxiety disorder: A comorbid disease. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, 16: S109-S118, 2006.

PARK, C. H., CHOI, S. H.; Koo, J. W.; Seo, J. H.; Kim, H. S.; Jeong, S. J.; Suh, Y. H. Novel cognitive improving and neuroprotective activities of *Polygala tenuifolia* Willdenow extract, BT-11. **J. Neurosci. Res.**, 70(3): 484-92, 2002.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **J. Ethnopharmacology**, 100: 50-52, 2005.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego, Academic Press, 1986.

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. **J. Neurosci. Methods**, 14(3): 149-67, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 24(3): 525-9, 1986.

PERRY, N. S., BOLLEN, C.; PERRY, E. K.; BALLARD, C. Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 75(3): 651-9, 2003.

PITTLER M. H.; ERNST, E. Efficacy of kava extract for treating anxiety: systematic review and meta-analysis. **J. Clin. Psychopharmacol.**, 20: 84-89, 2000.

PITTLER M. H.; ERNST, E. Kava extract for treating anxiety. **Cochrane Database Syst Rev.**, (1):CD003383, 2003.

PIZZOLATTI, M. G.; LUCIANO, C.; MONACHE, F. D. Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrone derivatives from *Polygala sabulosa*. *Phytochemistry*. 55(7):819-22, 2000.

PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA, JR A.; PEREIRA, W. S.; MONACHE, F. D. A new styryl-2-pyrone derivative from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, 32(6):603-606, 2004.

RAMANJANEYULU, R.; TICKU, M. K. Interactions of pentylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. **Eur. J. Pharmacol.**, 98: 337-345, 1984.

REX, A.; MORGENSTERN, E.; FINK, H. Anxiolytic-like effects of kava-kava in the elevated plus maze test--a comparison with diazepam. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**. 26(5):855-60, 2002.

REYNOLDS, D. S.; McKERNAM; DAWSON, G. R. Anxiolytic-like action of diazepam: which GABAA receptor subtype is involved ? **Trends Pharmacol. Sci.** 22, 402-403, 2001.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. **The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology**. In: Cooper, S. J.; Hendrie, C. A. (Eds.), *Ethology and Psychopharmacology*. Wiley, Chichester, pp. 9-44, 1994.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E.A. Plants used by a Quilombola Group in Brazil with Potential Central Nervous System Effects. **Phytother. Res.**, 18: 748-753, 2004.

RODRIGUES, E; CARLINI, E. A. Ritual use of plants with possible action on the central nervous system by the Kraho Indians, Brazil. **Phytother. Res.**, 19(2): 129-35, 2005.

ROGAWSKI, M.A.; PORTER, R.J. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. **Pharmacol. Rev.**, 42(3): 223-86, 1990.

ROGERS, M. P.; WARSHAW, M. G.; GOISMAN, R. M., GOLDENBERG, I.; RODRIGUEZ-VILLA, F.; MALLYA, G.; FREEMAN, S. A.; KELLER, M. B. Comparing primary and secondary generalized anxiety disorder in long-term naturalistic study of anxiety disorders. **Depress Anxiety**. 10(1): 1-7, 1999.

ROY-BIRNE, P.P.; BYSTRITSKY, A.; RUSSO, J.; CRASKE, M. G.; SHERBOURNE, C. D.; STEIN, M. B. Use of herbal medicine in primary care patients with mood and anxiety disorders. **Psychosomatics**, 46: 117-122, 2005.

ROSENBERG, H.C.; TIETZ, E.I.; CHIU, T.H. Tolerance to the anticonvulsant action of benzodiazepines. Relationship to decreased receptor density. **Neuropharmacology**, 24(7):639-44, 1985.

RUARTE MB, ALVAREZ EO. Behavioral profiles displayed by rats in an elevated asymmetric plus-maze: effects of diazepam. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 32(1):99-106, 1999.

RUPPRECHT, R.; ESER, D.; ZWANZGER, P.; MOLLER, H.J. GABA_A receptors as targets for novel anxiolytic drugs. **World J. Biol. Psychiatry**, 7(4): 231-7, 2006.

RUSSMANN, S.; LAUTERBURG, B. H.; HELBLING, A. Kava hepatotoxicity. **Ann. Intern. Med.**, 135(1): 68-9, 2001.

SANGER, D.; WILLNER, P.; BERGMAN, J. Applications of behavioral pharmacology in drug discovery. **Behav. Pharmacol.**, 14: 363-367, 2003.

SETEM, J.; PINHEIRO, A.P.; MOTTA, V.A.; MORATO, S.; CRUZ, A.P. Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 62(3): 515-21, 1999.

SHAH, V. P.; YACOBI, A.; BARR, W. H.; BENET, L. Z.; BREIMER, D.; DOBRINSKA, M. R.; ENDRENYI, L.; FAIRWEATHER, W.; GILLESPIE, W.; GONZALES, M. A.; HOOPER, J.; JACKSON, A.; LESKO, L. J.; MIDHA, K. K.; NOONAN, P. K.; PATNAIK, R.; WILLIAMS, R. L. Evaluation of orally administrated highly variable drugs and drug formulation. **Pharm. Res.**, 13: 1590-1594, 1996.

SHIN, E. J., OH, K. W.; KIM, K. W.; KWON, Y. S.; JHOO, J. H.; JHOO, W. K.; CHA, J. Y.; LIM, Y. K.; KIM, I. S.; KIM, H. C. Attenuation of cocaine-induced conditioned place preference by *Polygala tenuifolia* root extract. **Life Sci.**, 75(23): 2751-64, 2004.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.**, 61: 1053-1071, 1998.

SIEGEL, P.S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **J. Psychol.**, 21: 227-236, 1946.

SINGH, Y. N. Potential for interaction of kava and St. John's wort with drugs. **J. Ethnopharmacol.**, 100(1-2):108-13, 2005.

SMITH, K. K.; DHARMARATNE, H. R.; FELTENSTEIN, M. W.; BROOM, S.L.; ROACH, J. T.; NANAYAKKARA, N. P.; KHAN, I. A.; SUFKA, K. J. Anxiolytic effects of kava extract and kavalactones in the chick social separation-stress paradigm. **Psychopharmacology (Berl)**, 155(1):86-90, 2001.

SODERPALM B, SVENSSON L, HULTHE P, JOHANNESSEN K, ENGEL JA. Evidence for a role for dopamine in the diazepam locomotor stimulating effect. **Psychopharmacology**. 104:97-102, 1991.

STAHL, S. M. Don't ask, don't tell, but benzodiazepines are still the leading treatments for anxiety disorder. **J. Clin. Psychiatry**. 63: 756-757, 2002.

STEPHENS, D.N.; SCHNEIDER, H.H. Tolerance to the benzodiazepine diazepam in an animal model of anxiolytic activity. **Psychopharmacology (Berl)**, 87(3):322-7, 1985.

STOCK, H.; FORADORI, C.; FORD, K.; WILSON, M.A. A lack of tolerance to the anxiolytic effects of diazepam on the plus-maze: comparison of male and female rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 147(4): 362-70, 2000.

STRAHL, S.; EHRET, V.; DAHM, H. H.; MAIER, K. P. Necrotizing hepatitis after taking herbal remedies. **Dtsch Med Wochenschr**. 123(47):1410-4, 1998.

SWINYARD, E.A.; BROWN, W.C.; GOODMAN, L.S. Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 106(3): 319-30, 1952.

TALLMAN, J. F.; GALLAGER, D. W.; MALLORGA, P.; THOMAS, J. W.; STRITTMATTER, W.; HIRATA, F.; AXELROD, J. Studies on benzodiazepine receptors. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.**, 198(21): 277-283, 1980.

TREIT, D. Evidence that tolerance develops to the anxiolytic effect of diazepam in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 22(3): 383-7, 1985.

UHLENHUTH, E. H.; BALTER, M. B.; BAN, T. A.; YANG, K. International study of expert judgment on therapeutic use benzodiazepines and other psychotherapeutic medications: IV. Therapeutic dose dependence and abuse liability of benzodiazepines in the long-term treatment of anxiety disorders. **J. Clin. Psychopharmacol.**, 19: 23S-29S, 1999.

VELLUCCI, S.V.; FILE, S.E. Chlordiazepoxide loses its anxiolytic action with long-term treatment. **Psychopharmacology**, 62: 61-65, 1979.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**. 3: 232-238, 1998.

VIEIRA RA. **Avaliação da possível atividade central da *Stachytarpheta cayenensis* (gervão-roxo)**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

WAGNER, H. Phytomedicine research in Germany. **Environ. Health Perspect.** 107(10):779-781, 1999.

WALTERS R. J; HANDLEY, S. H.; MORRIS, K. D.; AMIN, J. Benzodiazepines act on GABA_A receptors via two distinct and separable mechanisms. **Nat. Neurosci.**, 3(12):1274-81, 2000.

WANG DS, LU SY, HONG Z, ZHU HL. Biphasic action of midazolam on GABA_A receptor-mediated responses in rat sacral dorsal commissural neurons. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 309(4):893-9, 2003.

WASOWSKI, C.; MARDER, M.; VIOLA, H.; MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C. Isolation and identification of 6-methylapigenin, a competitive ligand for the brain GABA(A) receptors, from *Valeriana wallichii*. **Planta Med.**, 68(10): 934-6, 2002.

WHEATLEY, D. Stress-induced insomnia treated with kava and valerian: singly and in combination. **Hum. Psychopharmacol.**, 16(4): 353-356, 2001.

WHEATLEY, D. Medicinal plants for insomnia: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. **J. Psychopharmacol.**, 19(4): 414-421, 2005.

WHITING, P.J.; BONNERT, T.P.; MCKERNAN, R.M.; FARRAR, S.; LE BOURDELLES, B.; HEAVENS, R.P.; SMITH, D.W.; HEWSON, L.; RIGBY, M.R.; SIRINATHSINGHI, D.J.; THOMPSON, S.A.; WAFFORD, K.A. Molecular and

functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 868:645-53, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Monographs on selected medicinal plants**. Vol. 1, Geneva, The Organization, 1999.

WITTCHEN, H. U.; KESSLER, R. C.; BEESDO, K.; KRAUSE, P.; HOFER, M.; HOYER, J. Generalized anxiety and depression in primary care: prevalence, recognition, and management. **J. Clin. Psychiatry**, 63 (8): 24-34, 2002.

WITTCHEN, H. -U.; JACOBI, F. Size and burden of mental disorders in Europe – a critical review and appraisal of 27 studies. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, 15: 357-376, 2005.

WITTE, S.; LOEW, D.; GAUS, W. Meta-analysis of the efficacy of the acetonetic kava-kava extract WS1490 in patients with non-psychotic anxiety disorders. **Phytother. Res.**, 19(3):183-8, 2005.

WONG, A. H. C.; SMITH, M.; BOON, H. S. Herbal remedies in psychiatric practice. **Archives of General Psychiatry**. 55: 1033-1044, 1998.

WOODS, J. H.; KATZ, J. L.; WINGER, G. Benzodiazepines: use, abuse and consequences. **Pharmacol. Res.**, 44: 151-338, 1992.

WURDACK, J. J.; SMITH, L. B. **Flora Ilustrada Catarinense. Polygalaceae**. Itajaí: Tipografia e Livraria Blumenauense S.A., 3-52, 1971.

YABE, T., TUCHIDA, H.; KIYOHARA, H.; TAKEDA, T.; YAMADA, H. Induction of NGF synthesis in astrocytes by onjisaponins of *Polygala tenuifolia*, constituents of kampo (Japanese herbal) medicine, Ninjin-yoei-to. **Phytomedicine**. 10(2-3): 106-14, 2003.

YASAR, S.; BERGMAN, J.; MUNZAR, P.; REDHI, G.; TOBER, C.; KNEBEL, N.; ZSCHIESCHE, M.; PARONIS, C. Evaluation of the novel antiepileptic drug, AWD 131-138, for benzodiazepine-like discriminative stimulus and reinforcing effects in squirrel monkeys. **Eur. J. Pharmacol.**, 465(3): 257-65, 2003.

ZHANG, X. Y.; ZHOU, D. F.; ZHANG, P. Y.; WU, G. Y.; SU, J. M.; CAO, L. Y. A double-blind, placebo-controlled trial of extract of *Ginkgo biloba* added to haloperidol in treatment-resistant patients with schizophrenia. **J. Clin. Psychiatry**. 62(11): 878-83, 2001.

ZHANG, Z. J. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. **Life Sci**. 75(14): 1659-99, 2004.

ZORUMSKI, C. F.; ISENBERG, K. E. Insights into the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors: ion channels and psychiatry. **Am. J. Psychiatry**. 148(2): 162-73, 1991.