

Agradecimentos

Foi no já longínquo ano de 1992 que o Prof. Proença da Cunha me abriu as portas do laboratório de Farmacognosia permitindo iniciar-me no contacto com as tarefas da investigação nesta área. Foi também o Prof. Proença da Cunha que me orientou durante a tese de Mestrado e foi também com ele que iniciei os trabalhos conducentes a esta tese. Ele é, portanto, o primeiro responsável pela minha carreira académica e a ele quero deixar um sincero e reconhecido agradecimento.

No laboratório de Farmacognosia e na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, encontrei sempre o carinho e o apoio necessários para levar por diante os meus projectos. Para além daqueles com quem fui trabalhando directamente, agradeço a todos os que me concederam o benefício dos seus conselhos, ajuda e o privilégio da sua amizade, particularmente a D. Rosa Craveiro, o Sr. Arménio Direitinho a Dra. Ana Cristina, a Dra. Teresa Amaral, a Prof.^a Teresa Baptista, o Prof. António Paranhos, a Prof.^a Maria José Gonçalves, o Prof. Carlos Cavaleiro e a Prof.^a Lúcia Salgueiro.

À Prof.^a Tice de Macedo e à Prof. Thereza de Lima agradeço não só os seus conselhos mas também o facto de me terem aberto as portas dos seus laboratórios para as minhas incursões no domínio da farmacologia.

Às minhas orientadoras, a Prof.^a Maria da Graça Campos e a Prof.^a Maria Dulce Cotrim, tenho que agradecer toda a ajuda e, muito especialmente, a infinita paciência, compreensão e confiança que sempre depositaram em mim, mesmo quando a minha actividade política me impediu de concretizar os nossos objectivos mais imediatos.

O meu reconhecimento à Fundação para a Ciência e Tecnologia que financiou este projecto (BD/ 16264/98)

Publicações e comunicações no âmbito deste trabalho

"Assessment of luteolin (3', 4', 5, 7 - tetrahydroxyflavone) neuropharmacological activity"

Coleta M, Campos MG, Cotrim MD, de Lima TCM, Cunha AP

Behavioral Brain Research, *accepted for publication, in press*

"Affinity of different medicinal plants and isolated flavonoids for the benzodiazepine binding site in rat brain synaptosomes: a follow-up"

Coleta M, Campos MG, de Lima TCM, Cotrim MD

Phytotherapy Research, *in press*

"Distribution of main bioactive constituents in the aerial parts of *Hypericum perforatum* L."

Coleta M, Campos MG, Cotrim MD

Phytotherapy Research, *in press*

"Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents."

Coleta M, Batista MT, Campos MG, Carvalho R, Cotrim MD, Lima TC, Cunha AP.

Phytotherapy Research, 2006; 20(12):1067-73.

"Comparative evaluation of *Melissa officinalis* L., *Tilia europaea* L., *Passiflora edulis* Sims and *Hypericum perforatum* L. in the elevated plus maze anxiety test."

Coleta M, Campos MG, Cotrim MD, Proença da Cunha A.

Pharmacopsychiatry, 2001; 34, 20-1.

"Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* L.. Constituents involved and proposed mechanisms: a review update"

Coleta M

Comunicação à reunião anual da "The Phytochemical Society of Europe", Madeira, 2005.

"Aqueous sedative plant extracts activity in [3H]flunitrazepam binding"

Coleta M, Cotrim MD, Lima TCM, Campos MG, Cunha AP, Macedo TR

Comunicação ao "3rd Forum European Neuroscience", Paris, *FENS Abstr. vol 1, A175.5*, 2002.

"Anxiolytic-like activity of 7-O-rhamnoglucosyl-luteolin isolated from *Passiflora edulis* Sims"

Coleta M, Campos MG, Nogueira T, Cunha AP

Comunicação à "World Conference on Medicinal and Aromatic Plants", Budapeste, 2001

"Chemical composition and cytotoxic activity of *Hypericum perforatum* L. extracts."

Júnior F, Coleta M, Simões S, Paranhos A

Comunicação à "World Conference on Medicinal and Aromatic Plants", Budapeste, 2001

"Effect of *Passiflora edulis* Sims flavonoids on benzodiazepine modulatory sites of GABA_A receptor complex in rat brain"

Coleta M, Batista MT, Cunha AP, Caramona MM, Macedo TRA, Cotrim MD

Comunicação à 7ª Reunião da Sociedade Portuguesa de Neurociências, Luso, 2001.

Objectivos do Trabalho

O uso de plantas medicinais para o tratamento de distúrbios relacionados com a ansiedade tem vindo a aumentar ao longo dos últimos anos. Este uso crescente resulta da procura espontânea por parte dos doentes de opções aos medicamentos de síntese mais usados (tais como as benzodiazepinas e inibidores selectivos da recaptação de serotonina - SSRI's). Esta procura ocorre muitas vezes em situações de autodiagnóstico e de automedicação (Charlton, 2005), mas também de um maior interesse da classe médica na prescrição de tratamentos com base em plantas medicinais. Um dos exemplos mais ilustrativos será o caso dos extractos de *Hypericum perforatum* L., usados no tratamento de depressões ligeiras a moderadas, que na Alemanha, representaram já cerca de 25% de todas as prescrições de antidepressivos (Schradler, 2000) e cujo volume de vendas nos EUA aumentou de US\$20 milhões para US\$200 milhões entre 1995 e 1997 (Gaster e Holroyd, 2000).

Apesar do número significativo de ensaios clínicos e da enorme quantidade de estudos publicados sobre a actividade farmacológica de extractos das principais plantas medicinais referenciadas pelas suas propriedades ansiolíticas / sedativas, permanecem por esclarecer inúmeros aspectos fundamentais relacionados com a sua actividade.

Um desses aspectos é a identificação dos constituintes responsáveis pela actividade farmacológica evidenciada. A explicação para este fenómeno envolve, na nossa opinião, vários factores que abordaremos neste estudo, mas o facto inelutável é que os constituintes e respectivos mecanismos responsáveis pela actividade farmacológica de plantas tão extensivamente estudadas e usadas como a *Valeriana officinalis* L., são ainda objecto de interesse e de alguma controvérsia. Em face

disto, não será de estranhar que no caso de outras plantas menos estudadas química e farmacologicamente como a *Melissa officinalis* L., a *Tilia x europaea* L., ou a *Passiflora edulis* Sims, também não esteja ainda esclarecido qual ou quais os compostos envolvidos na sua actividade ansiolítica / sedativa.

Ainda assim, a quantidade de estudos publicados sobre a actividade ansiolítica / sedativa de extractos de plantas medicinais é enorme e cobre um número muito elevado de plantas e algumas das mais populares, como o *Hypericum perforatum* L., são objecto de novas publicações todas as semanas (pesquisa PubMed). Acontece também, que apesar de muitos estudos recorrerem ao fraccionamento bioguiado dos extractos, este é feito com base em estudos *in vitro* e, na maioria dos casos, não é feita a correlação com a actividade farmacológica testada *in vivo*.

Por outro lado, os estudos clínicos que comprovam a actividade das plantas usadas pela sua actividade ansiolítica / sedativa são relativos a apenas a um número muito limitado de espécies (Ex.: *Valeriana officinalis* L., *Hypericum perforatum* L., *Piper methisticum*, entre outras) e são quase exclusivamente estudos promovidos pela indústria farmacêutica ou por outras entidades privadas que, por questões de protecção da propriedade industrial, não fornecem praticamente nenhuma informação sobre a composição dos extractos testados.

Assim, em face do que acima se expôs determinámos vários objectivos para este trabalho:

- Identificar um conjunto de plantas com um uso tradicional que indiciasse uma potencial actividade ansiolítica / sedativa e de entre estas seleccionar aquelas que estivessem incluídas em preparações disponíveis no mercado nacional, revelassem insuficiente caracterização dos constituintes responsáveis pela actividade

farmacológica e fossem espontâneas da flora portuguesa ou cultivadas actualmente no nosso país.

- Validar o uso tradicional preparando extractos brutos de cada uma das plantas seleccionadas, de acordo com o uso tradicional, e submetê-los, em idênticas condições, a um "screening" neurofarmacológico recorrendo a modelos animais *in vivo*.

- Dosear e caracterizar cada um dos extractos testados, correlacionando a sua composição com a de outros extractos descritos na literatura.

- Seleccionar um dos extractos bioactivos e proceder ao seu fraccionamento bioguiado, recorrendo ao mesmo conjunto de modelos animais *in vivo* usados no screening neurofarmacológico inicial.

- Isolar e identificar os constituintes das fracções que evidenciem actividade.

- Interpretar a correlação entre a eventual actividade farmacológica dos extractos brutos, fracções e compostos isolados e a interacção *in vitro* com receptores implicados na fisiopatologia da ansiedade.

Dados de interesse para a realização deste estudo

Medicina tradicional

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a medicina popular ou tradicional refere-se às práticas de saúde, conceitos, crenças e conhecimentos que incorporam medicamentos à base de plantas, animais ou minerais, terapias espirituais, técnicas manuais e exercícios aplicados singularmente ou em combinação, com o fim de tratar, diagnosticar e prevenir doenças ou manter o bem-estar. No nosso trabalho a expressão "medicina tradicional" é usada num sentido mais restrito, referindo-se genericamente ao uso das plantas com fins terapêuticos.

A medicina tradicional manteve a sua importância em todas as regiões do mundo em desenvolvimento e tem vindo a ganhar popularidade em todo o mundo industrializado. Estima-se que na Europa 50% da população tenha usado a medicina tradicional pelo menos uma vez na vida e em países como a Alemanha 90% da população já recorreu à medicina tradicional pelo menos uma vez ao longo da vida. Na América do Norte estimativas oficiais calculam que em 2002, 20% da população tenha usado medicamentos à base de plantas (OMS, 2003). A OMS consciente da importância crescente dos medicamentos tradicionais nas diversas regiões do mundo publicou um guia geral para a pesquisa e avaliação de medicamentos tradicionais ("General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine" WHO, 2000).

Normalmente, o tipo de preparações referidas no uso tradicional são infusões, tinturas, macerados, decoctos, etc. Nos países industrializados, se excluirmos as infusões, as plantas medicinais são fundamentalmente usadas em formas

farmacêuticas convencionais que têm como matéria-prima extractos secos (maioritariamente hidro-alcoólicos) ou a própria planta pulverizada.

O desenvolvimento de novos fármacos a partir das plantas

As plantas continuam a ser usadas para o tratamento de doenças e novos fármacos continuam a ser desenvolvidos com base na pesquisa dos seus constituintes. Nos países desenvolvidos os testes de *screening* de elevado rendimento são usados para o fraccionamento bioguiado de extractos, conduzindo ao isolamento de compostos activos que podem vir a transformar-se em agentes terapêuticos, na forma de produtos naturais ou como análogos sintéticos com actividade biológica optimizada e / ou com redução dos efeitos adversos, e o uso das indicações da etnofarmacologia aumenta a eficácia destes *screenings* (Heinrich e Simmons, 2004; Phillipson, 2001). Em 1996 dos 20 fármacos mais prescritos 6 eram produtos naturais (Phillipson, 2001) e durante 2001 e 2002 aproximadamente um quarto dos fármacos mais vendidos em todo mundo foram produtos naturais ou derivados de produtos naturais (Butler, 2004).

Apesar do interesse recente da indústria farmacêutica na modelização molecular, na química combinatória e em outras técnicas de síntese química, os produtos naturais e as plantas medicinais em particular continuam a ser uma fonte importante de novos fármacos, de pistas para novos fármacos e de novas entidades químicas (Newman e Cragg, 2007; Newman *et al.*, 2003; Butler, 2004).

A diversidade e as particularidades estruturais das moléculas com origem na natureza como por exemplo os centros quirais, anéis aromáticos, sistemas complexos de anéis, o número e o *ratio* de heteroátomos são particularmente relevantes na pesquisa de novos fármacos (Clardy e Walsh, 2004; Nicolaou e Snyder, 2004; Peterson e Overman, 2004; Koehn e Carter, 2005). Entre 1981 e 2002 a pesquisa em produtos naturais correspondeu a aproximadamente a 48%

das novas entidades químicas (NEQs) reportadas durante este período (Newman *et al.*, 2003).

Mesmo quando não são descobertas novas entidades químicas nas pesquisas com plantas medicinais as actividades biológicas de compostos conhecidos podem fornecer pistas importantes para o desenvolvimento de novos fármacos. Desde a sequenciação do genoma humano foram já identificados milhares de alvos moleculares importantes em várias doenças (Kramer e Cohen, 2004). A actividade de vários compostos conhecidos isolados de plantas medicinais usadas tradicionalmente foi já demonstrada em alguns destes alvos moleculares recentemente validados, citando-se como exemplo a indirubina (Verweij *et al.*, 2000; Eisenbrand *et al.*, 2004) e a camebacaurina (Hwang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002).

Apesar do evidente sucesso na pesquisa de novos fármacos a partir de plantas medicinais este processo tem sido tradicionalmente mais moroso e complexo que outros métodos de pesquisa de novos fármacos pelo que a indústria farmacêutica tem vindo a eliminar ou a reduzir substancialmente os investimentos nesta área (Butler, 2004; Koehn e Carter, 2005). Por outro lado, as plantas medicinais não são patenteáveis e a patenteabilidade de determinada indicação da medicina tradicional para extractos com utilidade terapêutica, levanta questões complexas do ponto de vista ético e jurídico, nomeadamente no domínio dos direitos de propriedade intelectual de povos indígenas (Kartal, 2006; Timmermans, 2003). Não obstante, avanços recentes nas tecnologias de separação e identificação de moléculas provenientes de extractos naturais têm vindo a minimizar algumas das dificuldades técnicas do processo de descoberta de novos fármacos a partir de matérias primas de origem biológica o que, combinado com uma certa frustração das expectativas depositadas nas actuais estratégias de I&D, tem vindo a renovar o interesse nos

produtos naturais como fonte de diversidade química e geradora de pistas importantes para o desenvolvimento de novos fármacos (Koehn e Carter, 2005).

Apesar das flutuações no interesse por parte da indústria poder-se-á postular que as plantas medicinais continuarão a ser no futuro, sob diferentes formas, uma importante fonte de novos fármacos.

Regulamentação e interesse crescente

Nos países industrializados as autoridades de saúde pública têm correspondido ao crescente interesse e procura de plantas medicinais tentando estabelecer metodologias e critérios de modo a garantir a qualidade e segurança destes produtos. Na União Europeia a Agência Europeia do Medicamento (EMA) criou, em 1997, um grupo de trabalho sobre medicamentos à base de plantas, o *Working Group on Herbal Medicinal Products* (HMPWG) que entretanto deu lugar ao *Herbal Medicinal Products Committee* (HMPC), com vista à criação de normas para os medicamentos à base de plantas e nos EUA o *National Institutes of Health* criou em 1998 o *National Center for Complementary and Alternative Medicine*.

Ansiedade, benzodiazepinas e a pesquisa de alternativas na natureza

A ansiedade é um estado mental desencadeado em antecipação a uma ameaça directa ou potencial. A ansiedade acompanha a vida normal dos indivíduos sendo um estímulo importante e eficaz para a melhoria do desempenho, mas a partir de um determinado grau pode tornar-se patológica e originar incapacidade de funcionar. Ora, considerando a importância que o desempenho individual adquiriu nas sociedades ocidentais, facilmente se percebe que a ansiedade se tenha tornado uma característica mental bastante proeminente o que se reflecte no incremento da procura de ansiolíticos. A designação ansiedade inclui muitos fenótipos e descrições clínicas. Rotineiramente, as suas manifestações patológicas são divididas em perturbação de ansiedade generalizada, pânico, fobia e, em algumas classificações,

perturbação obsessiva-compulsiva (Morris-Rosendahl, 2002). Foi já estimado que a prevalência ao longo da vida para este grupo de perturbações pode atingir os 25% (Kessler *et al.*, 1994).

Nos EUA diversos estudos epidemiológicos revelam que nos últimos anos a procura de plantas medicinais continua a crescer e que, de entre estas, a procura de medicamentos e produtos de saúde à base de plantas com propriedades ansiolíticas aumentou mais do que qualquer outra categoria de plantas medicinais (Eisenberg *et al.*, 1993; Eisenberg *et al.*, 1998; Kessler *et al.*, 2001; Wheaton *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007). Em Portugal apesar de não dispormos de estudos epidemiológicos ou de dados fiáveis do mercado total esta tendência parece ser comprovada pelo aparecimento nas grandes superfícies comerciais de secções inteiramente dedicadas a produtos medicinais à base de plantas. Estas incluem sempre várias formulações com indicações terapêuticas como “regulador do sono”, “calmante” para situações de “stress”, “tensão psíquica” ou “desgaste”. As plantas incluídas nestas formulações são baseadas no conhecimento do seu uso tradicional, embora as diferentes combinações em que são encontradas em várias formulações resultem fundamentalmente de estratégias comerciais mais do que considerações de natureza científica.

Paralelamente, esta procura crescente de plantas medicinais ou medicamentos tradicionais para o tratamento de distúrbios relacionados com a ansiedade parece também acompanhar o aumento da procura de medicamentos ditos convencionais. De acordo com os relatórios anuais do International Narcotics Control Board (INCB) das Nações Unidas (www.incb.org) a procura e o consumo de medicamentos ansiolíticos e/ou sedativos no mundo ocidental tem vindo a crescer ao longo das últimas décadas. Portugal não é excepção e um estudo recente da autoridade nacional que regula o sector do medicamento (INFARMED) concluiu que o nosso

país apresenta dos maiores níveis de utilização de benzodiazepinas em termos europeus (Furtado e Teixeira, 2005). Em Portugal, segundo esse mesmo estudo, durante o ano de 2004, o consumo de benzodiazepinas expresso em Doses Diárias Definidas por 1000 habitantes/dia (DHD) atingiu as 115 DHD.

Um vasto espectro de tratamentos somáticos foi já usado ao longo do tempo, desde catárticos a eméticos, da atropina e digitalis ao brometo de potássio e hidrato de cloral, dos barbituratos às benzodiazepinas, até aos fármacos serotoninérgicos. Apesar do advento durante a década de 1980 de alguns fármacos serotoninérgicos que ganharam relevância no tratamento da ansiedade durante a década de 1990 assiste-se hoje ao regresso dos fármacos ditos gabaérgicos à primeira linha da maioria dos protocolos de tratamento (Schwartz *et al.*, 2005).

Desde que na década de 60 do século passado a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA aprovou os primeiros fármacos facilitadores do ácido gama-aminobutírico (GABA), as benzodiazepinas (que constituem a larga maioria dos fármacos que actuam por este mecanismo) tornaram-se os fármacos mais utilizados no tratamento da ansiedade e distúrbios com ela relacionados (Cassano *et al.*, 2002).

Apesar das benzodiazepinas serem fármacos relativamente seguros e apesar da sua enorme utilidade terapêutica, apresentam inconvenientes bastante significativos. O seu uso apresenta diversos problemas relacionados com sedação excessiva, interacção com outros fármacos, interferência com os mecanismos da memória, depressão, tolerância e dependência. Assim, justifica-se a busca de alternativas terapêuticas pelo menos tão eficazes quanto as benzodiazepinas mas sem os efeitos adversos que estas apresentam (Baldwin e Ajel, 2007; Sinclair e Nutt, 2007; Millan, 2003).

O advento da biologia molecular permitiu a descoberta e o isolamento do complexo-receptor GABA_A e do local de ligação das benzodiazepinas bem como a elucidação do mecanismo através do qual as benzodiazepinas exercem o seu efeito (Scott *et al.*, 1999). Assim, estas descobertas possibilitaram o desenvolvimento de outras moléculas com acções mais específicas sobre este complexo-receptor e consequentemente ao desenvolvimento de novos fármacos não benzodiazepínicos como o Zaleplon, que é um novo fármaco hipnótico que actua como agonista selectivo do receptor ómega 1 situado na sub-unidade alpha 1 do complexo receptor GABA_A (Atack, 2003).

À semelhança das benzodiazepinas (Unsold e Klotz, 1989) também as opções para novos fármacos com acção a nível do complexo-receptor GABA_A poderão, eventualmente, ser encontradas na natureza.

Aspectos fitoquímicos e farmacológicos das plantas com acção no SNC

Um aspecto comum a estas plantas é a incerteza sobre o seu mecanismo de acção. Assim, apesar de algumas das plantas mais usadas na prática clínica convencional como ansiolíticos ou sedativos - os casos mais notáveis serão o *Hypericum perforatum* L. ou a *Valeriana officinalis* L. - e terem sido já extensivamente estudadas do ponto de vista clínico, farmacológico e químico (Madabuchi *et al.*, 2006; Lacher *et al.*, 2007), subsistem ainda muitas dúvidas sobre a sua utilidade terapêutica (Whitten *et al.*, 2006; Taibi *et al.*, 2007) e sobre os compostos responsáveis pela actividade evidenciada pelos extractos e o(s) mecanismo(s) de acção envolvido(s).

De facto, apesar dos grandes avanços das últimas décadas no domínio do isolamento e identificação dos metabolitos secundários produzidos pelas plantas incluindo o advento da "metabolomics" (Sumner *et al.* 2003) e da caracterização

das actividades biológicas de muitos destes metabolitos isolados como, por exemplo, os flavonóides (Middleton *et al.*, 2000; Nijvelt *et al.*, 2001), a verdade é que estes avanços não se traduziram de forma directa na compreensão dos mecanismos de acção dos extractos complexos que são normalmente obtidos e usados com fins terapêuticos. Várias hipóteses têm sido avançadas para as diferenças verificadas entre a actividade biológica dos extractos e dos constituintes isolados (Zhang, 2004), tais como, a complexidade das interacções químicas que são estabelecidas entre os constituintes dos extractos, a acção sinérgica nos receptores ou as dificuldades de absorção dos constituintes isolados (Belofsky *et al.*, 2006; Wagner, 2004; Belofsky *et al.*, 2004; Gilbert e Alves, 2003; Stermitz *et al.*, 2000; Williamson, 2001). Se por um lado não foi objectivo deste trabalho explorar uma possível explicação para este fenómeno também não deixámos de levar estes dados em consideração no planeamento dos nossos estudos.

Por outro lado, a grande maioria das plantas referenciadas nos manuais de fitoterapia não foram ainda suficientemente estudadas, pelo menos em termos do relacionamento entre a actividade farmacológica dos seus extractos, a composição química dos mesmos e o eventual mecanismo de acção dos constituintes envolvidos.

Se, por um lado, esta constatação revela um enorme potencial na pesquisa de moléculas com actividade a nível do sistema nervoso central implica, por outro lado, a impossibilidade de assegurar convenientemente o controlo e garantia de qualidade destes produtos, dificultando o estabelecimento de uma base científica para a sua racional utilização terapêutica.

Algumas das plantas incluídas nas obras de referência sobre fitoterapia estão comumente presentes nas formulações que se encontram disponíveis nas prateleiras dos diversos estabelecimentos que comercializam estes produtos no

nosso país. De entre estas, algumas são espontâneas da flora portuguesa (ex.: *Hypericum perforatum* L., *Melissa officinalis* L.), ou encontram-se difundidas no nosso país (ex.: *Passiflora edulis* Sims) havendo, por isso, razões de saúde pública e de interesse comercial que justificam o estudo da actividade farmacológica dos seus constituintes.

Flavonóides, ansiedade, o receptor GABA e modelos experimentais

Partindo do conhecimento do uso tradicional das plantas, diversos autores demonstraram já a afinidade para os receptores benzodiazepínicos de diversos flavonóides com o núcleo da flavona (Medina *et al.*, 1997). Os efeitos comportamentais induzidos por alguns destes compostos em modelos animais da ansiedade, revelaram um perfil interessante, nomeadamente, a ausência de sedação e de relaxamento muscular (Wolfman *et al.*, 1994) apontados como alguns dos inconvenientes atribuídos às benzodiazepinas clássicas, sugerindo uma maior especificidade de acção relativamente a estas. Nós próprios pudemos verificar já o mesmo perfil farmacológico para alguns extractos de flavonóides constituídos fundamentalmente por flavonas derivadas da apigenina e da luteolina obtidos a partir da *Passiflora edulis* Sims (Coleta, 1998 – Tese Mestrado).

Estas descobertas foram complementadas ao longo dos últimos anos por um trabalho extensivo de caracterização dos ligandos do receptor GABA_A com estrutura flavonóidica (Marder e Paladini, 2002), incluindo vários estudos de relação estrutura-actividade (Dekkermendjian *et al.*, 1999; Hong e Hopfinger 2003) e suscitaram também a atenção da indústria farmacêutica que, através de modificações no núcleo central da estrutura flavónica, desenvolveu já compostos com uma afinidade para o receptor benzodiazepínico cerca de 60 vezes superior ao diazepam (Griebel *et al.*, 1999).

As plantas medicinais mais vulgarmente usadas pela sua actividade ansiolítica / sedativa possuem também compostos do tipo flavónico, pelo que este será um dos principais aspectos desenvolvidos neste estudo.

Capítulo I

Capítulo I

Estudos Fitoquímicos

1. Introdução

Plantas e animais evoluíram em conjunto desenvolvendo interações de cuja complexidade apenas começamos a tomar conhecimento e que estamos ainda longe de compreender (Harborne, 2001). O aparecimento de simples aminoácidos não proteicos altamente neurotóxicos (β -metilamina-1-alanina ou BMAA) em plantas mais primitivas (cicadófitas) (Schneider *et al.*, 2002; Brenner *et al.*, 2003), ou os metabolitos mais complexos (alcalóides ou flavonóides, por exemplo) encontrados em plantas mais evoluídas e com ações mais específicas sobre o sistema nervoso central dos mamíferos, são testemunhos dessa interação ao longo do processo evolutivo e indicadores da diversidade estrutural e funcional que esta assumiu (Simmonds, 2001; Simmonds, 2003; Wink, 2003). Através da etnofarmacologia apercebemo-nos da forma como, ao longo dos tempos, o homem foi aprendendo a tirar partido dessa diversidade para seu próprio benefício, pelo que as indicações da medicina tradicional têm sido e continuarão a ser um ponto de partida óbvio na busca de novas moléculas com actividade farmacológica sobre o sistema nervoso central (Rodrigues e Carlini, 2005; Heinrich e Gibbons, 2001; Schultes *et al.*, 1992).

1.1 Metabolitos secundários: diversidade e função

Por conveniência de estudo distinguimos no metabolismo das plantas o metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário refere-se ao processo de produção de compostos essenciais para a sobrevivência e bem-estar do

organismo, como são os ácidos carboxílicos do ciclo de Krebs, α -aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Todos os organismos possuem as mesmas vias biossintéticas ("pathways" metabólicos) através dos quais estes compostos são sintetizados. Os metabolitos secundários, por outro lado, não são essenciais à vida mas definem a capacidade de sobrevivência ("fitness") de cada espécie no ecossistema em que se encontra inserida. Os metabolitos secundários são produzidos através de vias biossintéticas diferentes das usadas na produção de metabolitos primários e estas vias são, muitas vezes, características de uma família ou género particular e estão relacionados com o mecanismo de evolução das espécies. Claro que esta separação entre metabolismo primário e secundário é apenas um artifício de estudo teórico e, na realidade, ambos se encontram interligados, uma vez que é o metabolismo primário que fornece as moléculas que servem de base ao metabolismo secundário (Bratt, 2000).

Os metabolitos secundários foram durante muito tempo considerados como subprodutos metabólicos ou desperdício, sem outra função aparente que não fosse o armazenamento de carbono em excesso fixado durante o processo da fotossíntese (Iason, 2005). No decurso das últimas 3 décadas esta visão foi definitivamente refutada e está hoje bem estabelecido que os metabolitos secundários desempenham um papel fundamental nos processos de desenvolvimento das plantas e da sua interacção com o meio ambiente (Kutchan, 2001).

Estes metabolitos secundários das plantas podem desempenhar funções de defesa (contra herbívoros, micróbios, vírus ou plantas competidoras) ou de sinalização (atraindo polinizadores ou dispersores de sementes) e também funções fisiológicas variadas (ex.: regulação do crescimento, protecção das radiações UV) (Foley e Moore, 2005; Theis e Lerchau, 2003). As plantas não podem fugir quando são atacadas por insectos ou herbívoros vertebrados, nem possuem sistema imunitário como nós para resistir a bactérias, fungos ou vírus. Como os vírus, bactérias ou fungos já estavam presentes quando as angiospérmicas iniciaram o seu processo evolutivo, à cerca de 140 milhões de anos, conclui-se que desde muito cedo na

escala evolutiva as plantas tiveram que desenvolver estratégias de sobrevivência (Wink, 2003). Compreende-se portanto que a diversidade estrutural e a distribuição dos metabolitos secundários seja uma ferramenta importante para compreender as relações filogenéticas entre as diferentes espécies de plantas (Waterman, 2007).

Por outro lado, as funções aleloquímicas dos metabolitos secundários só podem ser exercidas se estes forem capazes de influenciar os seus alvos moleculares, por exemplo, em herbívoros ou micróbios. Estes alvos moleculares podem ser proteínas, ácidos nucleicos, biomembranas ou outros metabolitos presentes nas espécies-alvo (Wink e Schimmer, 1999; Wink, 2000). Apesar da diversidade estrutural dos metabolitos secundários são discerníveis algumas relações estrutura-actividade e poderá fazer-se uma distinção entre interacções específicas e inespecíficas (Wink, 2003). Foram já demonstradas múltiplas interacções específicas entre metabolitos secundários e proteínas (enzimas, receptores, canais iónicos, proteínas estruturais) e outros componentes celulares (Harborne, 1993; Wink e Schimmer, 2000; Wink, 2003). Considerando as referidas funções de mediação dos metabolitos secundários na interacção com os restantes seres vivos do ecossistema, afigura-se-nos como óbvio que o sistema nervoso destes seja um alvo de eleição para a acção destes compostos produzidos pelas plantas, sendo provável que em virtualmente todos os taxões podemos encontrar compostos (metabolitos secundários) com algum tipo de acção no sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos.

1.2. Plantas com acção no SNC: evolução e diversidade

Têm sido propostos vários mecanismos de evolução molecular para explicar a extraordinária diversidade de metabolitos secundários encontrada na natureza (Shimizu e Purugganan, 2005; Pichersky e Gang, 2000). Independentemente dos mecanismos que conduziram a esta diversidade de estruturas moleculares, o modo como este processo evolutivo se desenrolou poderá explicar também a diversidade

de actividades biológicas exibidas pelas plantas e, particularmente, o elevado número de plantas com constituintes que exibem acções a nível do SNC.

De facto, de entre as plantas referenciadas na medicina tradicional, um grande número tem sido usado pela sua actividade no sistema nervoso central, incluindo no tratamento de distúrbios relacionados com a ansiedade (Carlini, 2003).

Uma pesquisa rápida de apenas algumas obras de referência na área da fitoterapia (Monografias da Comissão E, "Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia" de Proença da Cunha, "Green Pharmacy Herbal Handbook" de James Duke) revela que existem várias dezenas de plantas cujas indicações terapêuticas estão relacionadas com uma acção no SNC. Para algumas destas plantas, as alegadas indicações terapêuticas e propriedades farmacodinâmicas descritas indiciam uma potencial actividade ansiolítica e/ou sedativa. Começando por aquelas que têm o seu uso oficialmente reconhecido, referimos a título de exemplo:

Monografias da Comissão E (Alemanha) -

Com indicação terapêutica para a ansiedade

Humulus lupulus

Rauvolfia serpentina

Piper methysticum

Passiflora incarnata

Hypericum perforatum

Valeriana officinalis

Com indicação terapêutica para a depressão

Hypericum perforatum

Ginkgo biloba

Com indicação terapêutica para as perturbações de humor

Humulus lupulus

Lavandula angustifolia

Indicação terapêutica para distúrbios do sistema nervoso

Lycopus europaeus

Indicação terapêutica para a agitação

Humulus lupulus

Rauvolfia serpentina

Piper methysticum

Passiflora incarnata

Hypericum perforatum

Valeriana officinalis

Melissa officinalis

Indicação terapêutica para distúrbios do sono

Humulus lupulus

Rauvolfia serpentina

Piper methysticum

Passiflora incarnata
Hypericum perforatum
Valeriana officinalis

Melissa officinalis
Lavandula angustifolia

Por outro lado, Proença da Cunha, na sua obra "Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia", refere muitas outras para além de algumas já mencionadas, agrupando-as em função das seguintes actividades farmacológicas:

Ansiolíticos e tónicos do sistema nervoso

Crataegus oxycantha

Astragalus membranaceus
Avena officinalis
Turnera aphrodisiaca
Withania somniferum
Scutellaria lateriflora
Panax ginseng
Verbena officinalis

Espasmolíticos e relaxantes

Matricaria recutita
Nepeta cataria
Mentha piperita
Lobelia inflata
Origanum manjorana

Espasmolíticos e relaxantes (cont.)

Achillea millefolium
Viburnum opulus
Passiflora spp.
Petroselinum crispum
Tilia spp.
Thymus spp.

Sedativos e hipnóticos

Artemisia absinthium
Stachys officinalis
Cananga odorata
Citrus sinensis
Papaver rhoeas
Eschscholtzia californica

Para além destas, James Duke no seu "The Green Pharmacy Herbal Handbook" (2000) reconhece também, com indicação específica para a ansiedade:

Caulophyllum thalictroides

Apium graveolens

Turnera difusa

Oenothera biennis

Viscum album

Leonurus cardiaca

Prunus serotina

E a lista poderia continuar a ser aumentada se recorrêssemos a outras fontes, mas não é intenção deste trabalho fazer uma identificação exaustiva das plantas cuja indicação de uso tradicional possa estar relacionada com a ansiedade e, por outro lado, as fontes citadas referem no essencial as principais plantas em uso corrente.

Definimos no tema do nosso trabalho apenas a indicação "sedativa", porquanto esta, mais abrangente, estará mais próxima do conjunto das indicações tradicionais correlacionadas com esta actividade farmacológica e incluirá também as indicações que poderão ser encaixadas no conceito moderno de fármacos ansiolíticos. Numa primeira fase pretendemos apenas identificar um conjunto de plantas com um uso tradicional que indiciasse uma potencial actividade ansiolítica / sedativa para, de entre estas, seleccionar aquelas que estivessem incluídas em preparações disponíveis no mercado nacional, revelassem insuficiente caracterização dos constituintes responsáveis pela actividade farmacológica e fossem espontâneas da flora portuguesa ou cultivadas actualmente no nosso país.

Esta selecção, fazendo uso dos critérios referidos, era necessária na medida em que não seria exequível concretizar a caracterização fitoquímica e neurofarmacológica de cada uma das plantas usadas actualmente. Mesmo se considerarmos apenas os produtos disponíveis nas farmácias e nas lojas de produtos dietéticos presentes nas grandes superfícies, verificamos que em Portugal são comercializadas um número elevado de preparações contendo algumas das plantas já listadas isoladamente ou em associação. A este propósito permitimo-nos comentar que a insuficiente regulamentação em Portugal dos produtos medicinais à base de plantas, faz com que não seja possível saber exactamente quais (nem quantos) os produtos disponíveis nem em que condições, situação que nos parece obviamente indesejável do ponto de vista da saúde pública.

2. Plantas usadas pelas suas propriedades ansiolíticas / sedativas

2.1. Hypericum perforatum L.

2.1.1. Descrição botânica

O género *Hypericum* L. é o mais representativo das *Hypericaceae*, agora incluídas como uma subfamília (Hypericoideae) nas *Clusiaceae* (=Guttiferae), e compreende mais de 450 espécies em 36 secções (Pettrakis *et al.*, 2005; Robson, 2001). O *Hypericum perforatum* L. é uma planta herbácea perene que em Portugal é conhecido pelo nome vernáculo de Erva de S. João, Milfurada ou simplesmente Hipericão (Seabra e Vasconcelos, 1992) e se encontra por quase todo o país, nos campos, sebes, prados e margens dos caminhos (Flora de Portugal, 1974). É uma espécie que está difundida na Ásia, África do Norte e nos Estados Unidos da América (Pettrakis *et al.*, 2005) e na Europa só não está presente no extremo Norte do continente (Flora europaea, 2001). Caracteristicamente, a planta pode atingir até cerca de 1 m e apresenta-se glabra. O caule é arredondado, apresenta duas linhas longitudinais salientes, é erecto e ramificado no topo. As folhas são ovadas a lineares, com 7 a 40 mm de comprimento, subcordatas, planas ou moderadamente revolutas, com numerosas glândulas transparentes e algumas pontuações glandulares pretas ou castanhas. O seu período de floração situa-se entre Maio e Outubro, as flores são numerosas, dispostas em cimeiras numa espécie de inflorescência paniculada composta. As pétalas são oblongas a elípticas, com lados desiguais e numerosas pontuações negras (Bombardelli e Morazzoni, 1995).

2.1.2. Principais constituintes químicos

O fármaco é constituído pelas partes aéreas de *Hypericum perforatum* L. colhido imediatamente antes ou durante o período de floração e, conseqüentemente, os constituintes químicos predominantemente acumulados nas flores, folhas e caules estão combinados no fármaco em proporções que dependem da quantidade de cada parte na mistura. Os constituintes do fármaco também são influenciados pela variação química dentro da espécie, por factores ecológicos, época de colheita e pelo processamento do material vegetal colhido (Büter *et al.*, 1998; Southwell e Campbell, 1991; Brantner *et al.*, 1994; Čellarová *et al.*, 1994)

Aproximadamente sete grupos de compostos bioactivos foram identificados nesta espécie. Os fenilpropanos, os glicósidos de flavonóides, as biflavonas e as proantocianidinas oligoméricas estão bio-sinteticamente relacionados e, no seu conjunto, estes compostos são os principais constituintes do fármaco. As xantonas e as naftodiantronas ocorrem, geralmente, em menores quantidades (< 1%). Os floroglucinóis podem exceder os 5% no material vegetal fresco e a destilação por vapor do fármaco bruto origina uma fracção volátil de cerca de 2% (Nahrstedt e Butterweck, 1997).

Floroglucinóis

A hiperforina é um acilfloroglucinol poliprenilado que tem vindo a ser destacado como um dos constituintes fundamentais para a actividade antidepressiva do *Hypericum perforatum* L. (Zanoli, 2004). Este composto foi isolado e caracterizado pela primeira vez pelas suas propriedades antibióticas (Gurevich, 1971) e actualmente será sem dúvida um dos seus constituintes mais estudados (Beerhues, 2006). A sua estrutura foi determinada inicialmente por degradação química e derivatização (Bystrov *et al.* 1975 e 1978) e a sua configuração absoluta por cristalografia de raio-X (Brondz *et al.*, 1982, 1983). Só mais recentemente é que os sinais de ¹H-RMN e ¹³C-RMN foram inequivocamente

atribuídos, pois tratando-se de uma mistura de tautómeros interconvertíveis, os sinais detectados apresentavam uma fraca resolução (Adam *et al.*, 2002). Para além da hiperforina foram encontrados nesta espécie outros derivados floroglucínóis como é o caso da adhiperforina (Maisenbacher e Kovar, 1992), que contém um grupo metilo adicional, mas também alguns análogos oxidados da hiperforina como seja o caso da furohiperforina (Trifunovic *et al.*, 1998; Verotta *et al.*, 1999), oxepahyperforina, 33-desoxi-33-hidroperoxifurohiperforina, 8-hidroxihiperforina-8,1-hemiacetal (Verotta *et al.*, 2000) ou ainda a pirano[7,28-b]hiperforina, (2*R*, 3*R*, 4*S*, 6*R*)-6-metoxicarbonil-3-metil-4,6-di(3-metil-2-butenil)-2-(2-metil-1-oxopropil)-3-(4-metil-3-pentenil)ciclohexanona e a (2*R*, 3*R*, 4*S*, 6*R*)-3-metil-4,6-di(3-metil-2-butenil)-2-(2-metil-1-oxopropil)-3-(4-metil-3-pentenil)ciclohexanona (Shan *et al.*, 2001). Alguns destes compostos surgem como consequência da degradação da hiperforina (Vajs *et al.*, 2003) e, com a excepção da adhiperforina, desconhecem-se as suas actividades biológicas ou relevância para a actividade dos extractos, sendo que não foi descartada a possibilidade de alguns deles serem apenas artefactos (Beerhues, 2006).

O *Hypericum perforatum* L. é a única espécie conhecida na qual a hiperforina é quantitativamente o principal constituinte, atingindo aproximadamente 5% do peso seco das flores e folhas da planta (Umek *et al.*, 1999; Smelcerovic e Spiteller, 2006) embora, contrariamente ao que se supunha anteriormente (Berghoefer e Hoelzl, 1989), a hiperforina tenha sido também encontrada em diversas outras espécies de *Hypericum*, nomeadamente *H. barbatum*, *H. richeri*, *H. rumeliacum*, *H. maculatum*, *H. tetrapterum*, *H. hirsutum*, *H. linaroides*, *H. olympicum* (Smelcerovic e Spiteller, 2006). A hiperforina é facilmente oxidável, fotossensível e, tal como os restantes floroglucínóis presentes nesta espécie, é um composto lipofílico que pode ser extraído do material vegetal com *n*-heptano ou por pressão de CO₂ supercrítica, mas também com álcool e outros solvente orgânicos (Tolonen *et al.*, 2003).

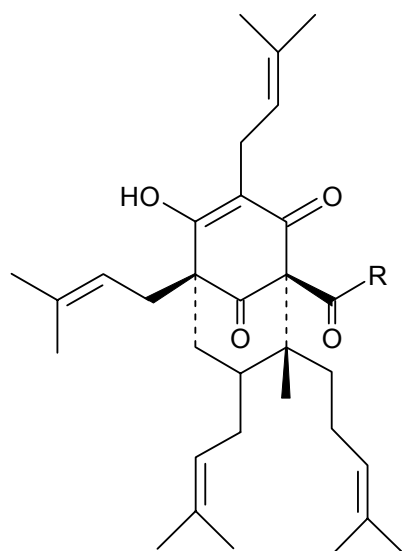


Fig. 2.1.2a: Hiperforina ($\text{R} = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$) – 2.0-4.5%

Adhiperforina ($\text{R} = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$) – 0.2-1.9%

As concentrações mais elevadas destes compostos ocorrem nas partes reprodutivas da planta, acumulando-se primariamente no pistilo (Repcák e Mártonfi, 1997). Mas, também contrariamente ao que se supunha (Maisenbacher e Kovar, 1992), a hiperforina pode ocorrer igualmente nas folhas onde o seu teor pode chegar a 1,5% (Sirvent *et al.*, 2003). O teor dos principais floroglucínóis pode variar entre 2% / 0,2% (hiperforina /adhiperforina) nas flores a 4,5% / 1,6% no fruto verde e 4,4% / 1,8% no fruto maduro (Maisenbacher e Kovar, 1992), embora estudos subsequentes mencionem valores mais elevados referindo, inclusive, que no decurso da ontogénese floral o conteúdo de hiperforina aumenta continuamente chegando a atingir 8,5% no fruto verde (Tekel'ová *et al.*, 2000).

Como se depreenderá do que foi dito o teor destes compostos no fármaco bruto está não só muito dependente da quantidade de flores e frutos, mas também do processamento a que o material vegetal é sujeito durante a colheita, secagem e extracção (Bergonzi *et al.*, 2001).

Naftodiantronas

Durante muitos anos a hipericina foi considerada o constituinte activo do *Hypericum perforatum* L. e, embora hoje em dia essa hipótese algo simplista esteja afastada, pensa-se que, de alguma forma, este constituinte seja importante na actividade farmacológica dos extractos desta planta (Butterweck, 2003).

As pequenas pontuações pretas em todas as partes aéreas da planta contêm fundamentalmente hipericina e compostos relacionados, típicos do género *Hypericum*. No *Hypericum perforatum* L. as hipericinas são acumuladas em estruturas morfológicas especializadas que ocorrem nas folhas desde as primeiras fases do crescimento da planta e durante a floração expandem-se a quase todas as partes da flor (Kosuth, 2003).

A hipericina foi originalmente isolada por extracção do material vegetal com metanol, tratamento subsequente com ácido clorídrico. Por re-dissolução do precipitado formado com piridina e acidificando a solução em seguida formam-se os cristais de hipericina (Vollmer e Rosenson, 2004). Entretanto, foram já estudados muitos outros métodos de extracção e optimizadas condições de extracção alternativas (Liu *et al.*, 2000; Benthin *et al.*, 1999; Li e Fitzloff, 2001). A hipericina tem um extenso sistema de anéis aromáticos e absorve luz na região do visível resultando uma cor vermelha intensa. O seu pico máximo de absorção ocorre a 590 nm com outras bandas a comprimentos de onda mais baixos (Fourneron *et al.*, 1999).

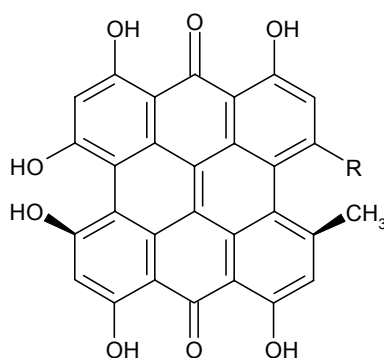


Fig. 2.1.2b: Hipericina (R = CH₃)

Pseudohipericina (R= CH₂OH)

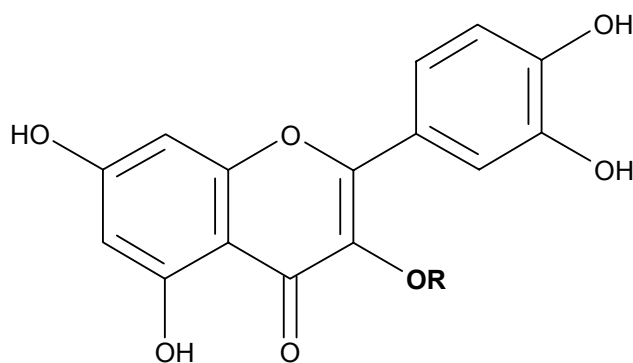
A sua estrutura foi proposta por Brockmann *et al.* (1951) e subsequentemente confirmada por numerosos estudos de RMN (Smirnov *et al.*, 1999; Freeman e Konstantinovskii, 2001).

As hipericinas são derivadas do metabolismo antraquinónico, sendo a emodina antrona o seu provável precursor. Os primeiros compostos isoláveis das plantas são os chamados proto-derivados, tais como proto-hipericina e protopseudo-hipericina, onde se destaca como única diferença a ausência de ligação 4,4'. Estes são facilmente convertíveis nos produtos estáveis hipericina e pseudo-hipericina por acção da luz. A pseudo-hipericina é a principal naftodiantrona encontrada nesta planta, geralmente presente em quantidades 2 a 4 vezes superiores à hipericina (Brantner *et al.*, 1994). Em alguns extractos esta proporção pode ser de 10:1. Foi, também, detectada a ciclopseudo-hipericina que se pensa seja um produto de oxidação da pseudo-hipericina. A concentração de hipericina e pseudo-hipericina varia entre 0,03 e 0,3% dependendo do estado de desenvolvimento da planta (Brantner *et al.*, 1994) e a sua fototoxicidade implica um uso cauteloso desta planta (Campos e Proença da Cunha, 2001). Foi observada uma variação significativa de ambos os compostos em plantas individuais (Cellaróva, 1994). A hipericina é fortemente acídica, com um $pK_a = 1.7-2.0$ (Vollmer e Rosenson, 2004) e, tal como as demais hipericinas, apresenta uma solubilidade limitada em quase todos os tipos de solvente. Os sais de potássio foram identificados como sendo os pigmentos solúveis nas espécies de *Hypericum* (Falk e Schmitzberger, 1992).

Flavonóides

Os flavonóides são outro grupo de constituintes presentes nesta espécie em quantidades significativas cujo potencial envolvimento na actividade antidepressiva dos extractos de *Hypericum perforatum* L. também tem vindo a ser estudado (Butterweck *et al.*, 2000; Nöldner e Schotz, 2002). A maioria dos flavonóides identificados nos extractos alcoólicos desta planta são derivados

glicosilados da quercetina (Dias *et al.*, 1992) e o seu teor poderá variar entre 2-4% (Wagner e Blatt, 1994). Quantitativamente, os principais flavonóides cuja presença nesta espécie tem sido reportada são o hiperósido e a rutina, seguidos da isoquercitrina e da quercitrina (Nahrstedt e Butterweck, 1997) e, para além destes, têm também sido identificados numerosos outros, tais como a quercetina-3-O-xilósido (Seabra *et al.*, 1992), a quercetina-3-O-(2''-O-acetil)-beta-D-galactosido, quercetina-3-O-beta-D-glucuronopiranosido (miquelianina), quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosido (guajaverina), isorientina e astilbina (5,7,3',4'-tetrahidroxi-2,3-dihidroflavonol-3- β -O-ramnosido) (Jürgenliemk e Nahrstedt, 2002), a apigenina-7-O-glucósido (Cirak *et al.*, 2007), caempferol-3-rutinósido e acetil-rutina (Silva *et al.*, 2005) e ainda o caempferol (Berghöfer e Hölzl, 1986), a miricetina e a luteolina (Schütt e Schulz, 1993). A quercetina também poderá aparecer em pequenas quantidades na sua forma livre, sugerindo-se que esta possa ser originada por hidrólise dos respectivos derivados glicosilados durante a colheita e secagem do material vegetal (Nahrstedt e Butterweck, 1997). Estes compostos acumulam-se diferencialmente nas diferentes partes da planta e o seu conteúdo total evolui ao longo do ciclo de vida da planta atingindo os valores mais elevados durante a floração (Tekel'ova *et al.*, 2000).



R	Flavonóide
H	Quercetina
α -L-ramnósido	Quercitrina
β -D-glucósido	Isoquercitrina
β -D-galactósido	Hiperósido
β -rutinósido	Rutina

Fig. 2.1.2c: Flavonóides mais abundantes em *Hypericum perforatum* L.

Outro tipo de flavonóides que se pensa serem relevantes para a actividade antidepressiva são os biflavonóides derivados da apigenina (Gutmann *et al.*, 2002; Baureithel *et al.*, 1997; Vohora *et al.*, 1980). Os biflavonóides presentes nesta espécie são a I3, II8 – biapigenina (0,1-0,5 %) (Berghöfer e Hölzl, 1987) e a amentoflavona (I3', II8 – biapigenina) (0,01-0,05 %) (Mártonfi e Repcak, 1994). Estes compostos ocorrem exclusivamente nos rebentos e flores (Berghoefer e Hoelzl, 1989).

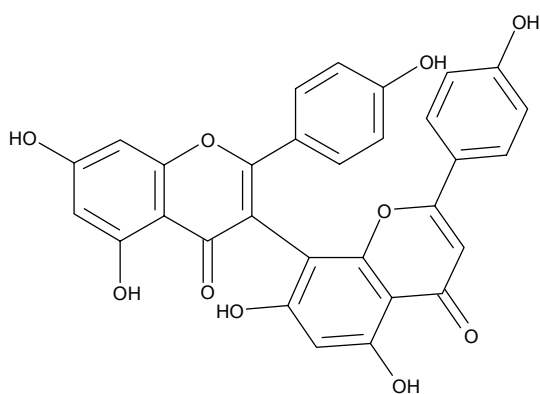


Fig. 2.1.2d: I3, II8-biapigenina

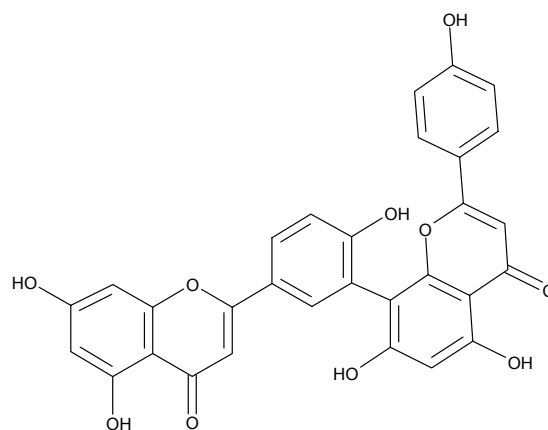


Fig. 2.1.2e: Amentoflavona (I3', II8-biapigenina)

Ácidos fenólicos

Apesar de estes compostos muito provavelmente não estarem directamente envolvidos na actividade farmacológica dos extractos desta planta, a sua presença poderá, de alguma forma, ser importante para a actividade farmacológica evidenciada pelos seus extractos. Nomeadamente, as suas propriedades antioxidantes poderão contribuir para a estabilidade de outras moléculas envolvidas na actividade antidepressiva, concretamente a hiperforina (Orth *et al.*, 1999), ou para a solubilização de outros compostos como, por exemplo a hipericina (Jurgenliemk e Nahrstedt, 2003). Os principais ácidos fenólicos presentes serão o ácido clorogénico (cuja concentração poderá ser inferior a 1% - Nahrstedt e Butterweck, 1997) e neoclorogénico (Seabra e Alves,

1989), mas também o ácido cafeico (Nahrstedt e Butterweck, 1997), para além do criptoclorogénico, protocatéquico, 3-O-[Z]-*p*-cumaroilquinico e 3-O-[E]-*p*-cumaroilquinico (Jürgenliemk e Nahrstedt, 2002;).

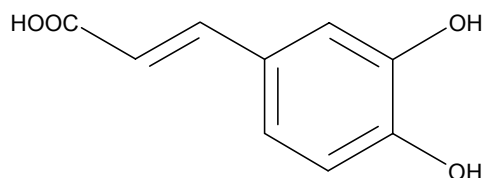


Fig. 2.1.2f: Ácido clorogénico

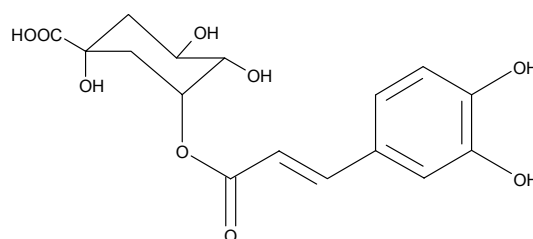


Fig. 2.1.2g: Ácido neoclorogénico

Taninos e proantocianidinas

A fracção de taninos varia entre os 6,2 e 12,1% (Brantner *et al.*, 1994) no fármaco bruto, sendo os valores mais elevados observados durante o período de floração. Os taninos encontrados nesta planta parecem ser procianidinas oligoméricas. Foi já isolada e caracterizada a procianidina B2 (dimérica), adicionalmente foram detectadas uma procianidina dimérica, dois trómeros e uma procianidina tetramérica (Melzer, 1990). Os putativos precursores biogénicos, catequina e epicatequina, foram também identificados. Não sendo provável que estes compostos estejam directamente envolvidos na actividade antidepressiva dos extractos foi já demonstrado, no entanto, que a presença nos extractos de procianidina B2 pode originar níveis plasmáticos de hipericina mais elevados (Butterweck *et al.*, 2003).

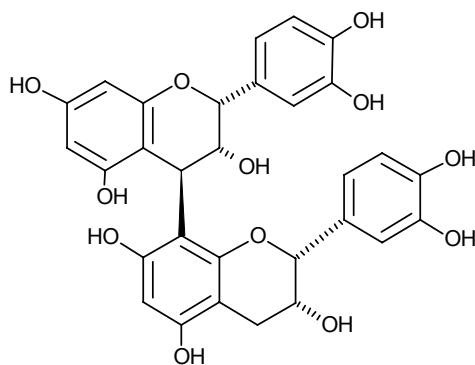


Fig. 2.1.2h: Procianidina B2

Xantonas

A família das *Clusiaceae* é uma fonte abundante de xantonas que foram já encontrados em todas as partes de várias espécies de *Hypericum* (Bennet e Lee, 1989) e também em *callus* e culturas de células desta espécie (Dias *et al.*, 2001). No *Hypericum perforatum* L. foram já identificadas a 1-hidroxi-3,5-dimetoxixantona; 1,3-dihidroxi-5-metoxi xantona, 1-hidroxi-3,5,6-trimetoxi xantona, 1-hidroxi-3,6,7-trimetoxi xantona, e a 2-C-glucosil-1,3,6,7-tetraoxi xantona (Ghosal, 2001) e a mangiferina (1,3,6,7-tetrahydroxixanthone-C2- β -d-glucoside) (Seabra e Alves, 1989), quielcorina C (Nielsen e Arends, 1978) e 1,3,6,7 - tetrahydroxixantona em quantidades vestigiais nas folhas e caule (Sparenberg *et al.*, 1993).

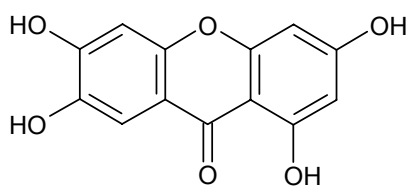


Fig. 2.1.2j: 1,3,6,7-tetrahydroxixantona

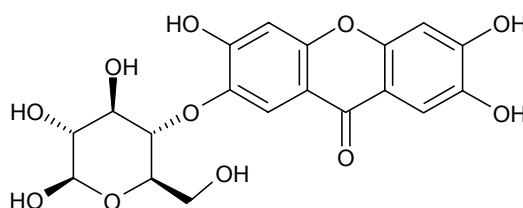


Fig. 2.1.2i: Mangiferina

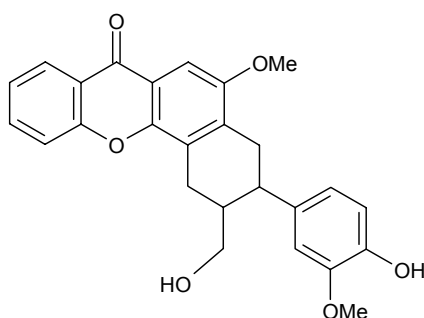


Fig. 2.1.2k: Quielcorina C

Óleo essencial

Existem relativamente poucos estudos sobre o óleo essencial do *Hypericum perforatum* L. (Radusiene *et al.*, 2005). Inicialmente, na composição do óleo essencial de plantas cultivadas em França, verificou-se que os principais constituintes eram o 2-metil octano (45%) e o α -pineno (24%) (Mathis e

Ourisson, 1964a; Mathis e Ourisson, 1964b). Em plantas provenientes da Turquia (Cakir *et al.*, 1997), Sérvia (Mimica-Dukic *et al.*, 1997) e Índia (Weyerstahl *et al.*, 1995) verificou-se que o principal componente era o α -pineno (5.1–67.3%). Na tabela 2.1.2a mostram-se os resultados de um estudo mais recente, levado a cabo em diferentes regiões de França, onde se verificou que o principal constituinte é o cariofileno (0,2–28,4%) (Schwob *et al.*, 2002).

Tabela 2.1.2a - Constituintes do óleo essencial de *Hypericum perforatum* L. (Adaptado de Schwob *et al.*, 2002)

Componentes	RI	Val-d'Arc (%)	Pertuis (%)	Saint-Cyr (%)	Mérindol (%)	Bandol (%)	Meailles (%)
α -pineno	936	0,3					
β -pineno	975	0,3					
limoneno	1028						0,3
(E)- β -ocimeno	1045	0,3		vestígios			
2-metildecano	1061	0,5	0,1	0,2			
cis-linalil óxido	1069						0,1
trans-linalil óxido	1085						0,1
n-undecano	1098	0,3	0,1	0,2	0,1		0,2
linalol	1099						0,5
camfolenal	1123					0,3	0,4
octanol	1134					0,2	0,5
pinocarveneol	1138					0,3	0,7
p-menta-1,5-dieno-8-ol	1167			vestígios		0,6	0,5
terpineno-4-ol	1173		0,1	vestígios	0,1		
p-cimeno-8-ol	1186					0,3	0,3
α -terpineol	1192	0,2				0,3	1,5
mirtenol	1198						0,4
safranal	1207					0,3	0,3
cis-carveol	1222					0,5	0,6
2-metildodecano	1266	0,6	0,4	0,6	0,3	4	1,7
n-tridecano	1303			vestígios			0,3
δ -butil benzoato	1329					0,5	
α -cubebeno	1351		0,1	0,7	0,1		
α -longipineno	1355	2,8					
α -copaeno	1379	0,4	0,1	0,2		0,9	0,8
β -bourboneno	1385			0,1			
isobutilo isobutirato	1392			vestígios	0,1		0,6
β -elemeno	1393			0,1			
β -funebreno	1414		0,5	0,1	0,6		
β -cariofileno	1425	14,8	28,4	26,1	24,1	0,2	13,3
β -copaeno	1431	0,4	0,2	0,4	0,1		
isoamil benzoato	1437					1,7	0,6
aromadendreno	1441	0,3		0,1		0,1	0,2
α -himacaleno	1449	0,6	vestígios	vestígios	0,1		2,6
α -humuleno	1454	0,4	0,5	0,4	0,3		
(E)- β -farneseno	1459	7,1	3	3,6	4,1	0,9	2,4
dodecanol	1478	3,8	3	7,5	3,6	0,4	0,8
γ -muuroleno	1480			4,3	1,7	7,7	6,9
ar-curcumeno	1484	13	2,5	0,6	2,9	1,3	0,9
germacreno D	1486	17,8	37,3	6,3	29,1		
β -selineno	1492		0,7	1,2	6		
(Z,E)- α -farneseno	1493	1,1		1,3			
α -selineno	1499	2,3	0,8	15,5	3,1	0,5	
biclogermacreno	1499	5,7	3,8		5,8	0,3	
α -muuroleno	1501	0,7	0,4	4,8	0,3		
β -himacaleno	1501	0,3					0,5
(E,E)- α -farneseno	1507	1	0,3	1,3	0,7		8,4
γ -cadineno	1513	2,2	3	1,3	0,8	2,8	1,6
cis-calameneno	1522	0,4	0,1	0,1	0,9	2,6	0,5
δ -cadineno	1522	4,9	2,7	2,9	0,9	3,2	2,1
α -cadineno	1534	0,2		0,1			
calacoreno	1538			vestígios		0,9	0,4
nerolidol	1559	0,7	0,6	0,5	0,1	6,5	1,2
hexenilo benzoato	1563		0,2	0,2		0,9	0,3
espatulenol	1574	0,5	2,5	0,5	2,6	21,1	21,5
óxido cariofileno	1577	0,5	2,3	1,1	2	4,4	18,4
óxido humuleno II	1601			0,2		0,6	0,5
tetradecanol ramificado	1629	1,3	0,8	0,4	0,8	9,1	2,3
T-cadinol	1631			0,4	0,1	0,5	
α -cadinol	1642	0,4	0,4	0,5	0,7	1,2	0,3
benzoato benzilo	1738					0,5	
hexaidrofarnesilacetona	1813					0,7	
Componentes identificados (%)		83	91	84	83	76	75

Por último será também de assinalar a presença nesta espécie de diversos aminoácidos (10mg/g) e também de ácido γ -aminobutírico (GABA) (0,7mg/g) (Lapke *et al.*, 1996) que poderão ser relevantes para a actividade farmacológica em estudo.

Conhecida que está, no essencial, a composição química desta planta, verifica-se que os estudos fitoquímicos sobre o *Hypericum perforatum* L. têm vindo a incidir sobre novos métodos de extracção (Wang *et al.*, 2004; Seger *et al.*, 2004), novos métodos analíticos (Roos *et al.*, 2004; Ruckert *et al.*, 2004 e Piovan *et al.*, 2004), nas vias biossintéticas dos constituintes conhecidos (Karppinen *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2005), no estudo químico das suspensões de culturas de células (Jun Xu *et al.*, 2005), ou ainda sobre os produtos de degradação dos constituintes bioactivos, principalmente hipericina (Liu *et al.*, 2005) e hiperforina (Vajs *et al.*, 2003), numa tentativa de compreender e ultrapassar os problemas de estabilidade da hiperforina (Gartner *et al.*, 2005; Zanolli *et al.*, 2002).

De entre os extractos padronizados de *Hypericum perforatum* L. cuja actividade farmacológica tem sido mais estudada destacamos alguns daqueles sobre os quais existe mais informação relativamente à sua utilização clínica, nomeadamente: o LI-160 (Schulz, 2006) produzido pela Lichtwer Pharma (Alemanha), é um extracto etanólico padronizado a 0,12-0,28% de hipericina, 3,1% de hiperforina e 6% de flavonoides (Hypericum Depression Trial Group, 2002); o WS 5572 (Kieser e Szegedy, 2005; Trautmann-Sponsel e Diemel, 2004) é um extracto etanólico padronizado, produzido pela Willmar Schwabe Arzneimittel (Alemanha) e cujos principais constituintes são a hipericina (0.3%), hiperforina (4.1%), rutina (3.3%), hiperósido (1.8%), isoquercitrina (1.0%), quercetin (0.3%) e biapigenina (0.3%) (Yoshitake *et al.*, 2004).; ou ainda o ZE 117 que é um extracto etanólico a 50% (m/m), com um *ratio* de extracção 4-7:1

e contendo 0,2% de hipericinas totais e <1 % de hiperforina (Kaufeler *et al.*, 2001), produzido pela Zeller AG na Suíça. De referir ainda, pelo seu conteúdo em flavonóides e informação farmacológica disponível, o extracto Ph-50 (0,3% Hipericina;4,5% Hiperforina;50% Flavonoides) (Mannucci *et al.*, 2007) produzido pela Pharmalife (Itália). Este extracto é preparado por extracção contínua do fármaco pulverizado com uma solução de etanol (60% m/m) a 40-60°C. A solução extractiva é concentrada a resíduo sob vácuo (T<60°C). Subsequentemente é adicionada maltodextrina com vista a secar, estabilizar e ajustar a reologia e higroscopia e auxiliar o processo de padronização). O teor de flavonóides é ajustado com rutina (grau de pureza, 95%) e quercetina (grau de pureza, 99%) (Mannucci *et al.*, 2007).

2.2. *Tilia x europaea* L.

2.2.1. Descrição botânica

Tilia x europaea L. (*T. cordata* × *T. platyphyllos*; syn. *T. x vulgaris* H.)

A Farmacopeia Portuguesa VIII (2005) inclui uma monografia com a descrição do fármaco *Tiliae flos*, constituído pelas inflorescências inteiras e secas de várias espécies (*spp*) officinais como a *Tilia cordata* Miller, a *T. platyphyllos* Scop., ou a *Tilia x vulgaris* Heyne, ou ainda uma mistura destas espécies. Estas três espécies de *Tilia* usadas tradicionalmente pelas suas propriedades medicinais são nativas da Europa, enquanto as restantes 40 espécies do género *Tilia* são nativas das regiões temperadas da Ásia e da América do Norte (Browicz, 1968). A *Tilia x europaea* L. ou *T. x vulgaris* H. é um híbrido da *T. cordata* × *T. platyphyllos* (Pigott e Sell, 1995), bastante comum em Portugal nas ruas de cidades e vilas, parques e jardins públicos e disseminado em toda a Europa (Flora de Portugal, 1974; Browicz, 1968). As *Tilia x europaea* L. são árvores altas que atingem mais de 20m (até 35m) e apresentam uma coroa em formato piramidal. As suas folhas com 4-10cm, de comprimento, apresentam formato arredondado em forma de

coração, desigual na base, o limbo é acentuadamente dentado e têm um longo pedúnculo. A face superior da folha é verde escura enquanto a face inferior é mais pálida e sem tricomas. Esta árvore floresce no final da Primavera (Junho) e as suas flores amarelo-pálido e bastante aromáticas dão origem a um pequeno fruto redondo com 6mm de diâmetro, pendurado num longo estame originado a partir de brácteas (Browicz, 1968).

A inflorescência é verde-amarelada. O eixo principal da inflorescência possui uma bráctea linguiforme, membranosa, verde-amarelada, praticamente glabra que está

aderente até cerca de metade da sua nervura mediana. A inflorescência é constituída, a maior parte das vezes, por 2 a 7 flores, raramente atingindo 16. As sépalas separam-se facilmente do perianto; podem, no máximo, ter 6 mm de comprimento com a face abaxial, normalmente glabra e a face adaxial e os bordos fortemente pubescentes. As 5 pétalas espatuladas, finas, de cor branco-amarelada, podem atingir 8 mm de comprimento; apresentam uma enervação fina e só os seus bordos são algumas vezes cobertos de pêlos isolados. Os numerosos estames estão livres e formam geralmente 5 grupos. O ovário é súpero e tem um estilete com um estigma dividido em 5 lobos pouco distintos (Farmacopeia Portuguesa VIII).

2.2.2. Principais constituintes químicos

Nestas espécies encontram-se diversos ácidos fenólicos como o cafeico, clorogénico e *p*-cumárico e vários flavonóides foram já isolados das flores e brácteas das diversas espécies officinais de *Tilia*, incluindo o caempferol, quercetina, miricetina, alguns glicósidos destas substâncias, principalmente astragalina e o seu éster 6''-*p*-cumarilo (tilirósido) (Toker *et al.*, 2001).

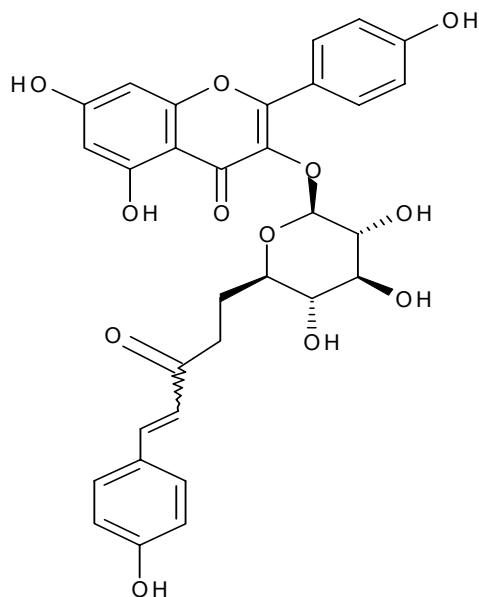


Fig. 2.2.2a: Tilirósido

Foi já referida a presença de GABA (Cavadas *et al.*, 1997) e de diversos aminoácidos como alanina, cisteína, cistina, isoleucina, leucina, fenilalanina e serina (Bradley, 1992). O teor de polissacáridos mucilaginosos (3%) está na origem da característica mucilagem formada em meio aquoso (Kram e Franz, 1985), mas também se encontram saponinas, taninos condensados e tocoferol (Wichtl e Bisset, 1994).

Na origem do característico odor está um óleo essencial com inúmeros constituintes dos quais se destacam diversos alcanos, álcoois fenólicos e ésteres, terpenos, incluindo citral, citronelal, citronelol, eugenol, limoneno, nerol, α -pineno, terpineol e farnesol (Barnes *et al.*, 2002).

2.3. *Melissa officinalis* L.

2.3.1. Descrição botânica

A *Melissa officinalis* L., vulgarmente conhecida em Portugal como Erva-Cidreira, pertence à família das Lamiaceae. É uma planta herbácea vivaz, que pode atingir 0.3-0.9m de altura, geralmente com vários caules, e as suas folhas libertam um

aroma característico a limão quando tocadas. Cresce em lugares húmidos e sombrios nas regiões meridionais da Europa, Ásia e Norte de África. Actualmente é cultivada um pouco por todo o mundo dadas as suas propriedades culinárias (Proença da Cunha *et al.*, 2003; Dastmalchi *et al.*, 2007). O seu caule é quadrangular, obtuso e raiado com tricomas. As folhas podem ter entre 2-9 cm de comprimento e 1-5 cm de largura, com forma oval ou oboval-oval, a sua base em forma de cunha é truncada ou cordata e apresenta-se densamente coberta de tricomas em ambas as superfícies; o pecíolo tem 0.2-3.5 cm de comprimento. A corola é branca ou rosada, com um tubo infundibuliforme de 8-12 mm de comprimento; os estames estão profundamente inseridos no tubo; com pequenas brácteas ovais-oblongas de 1,5 cm de comprimento, pubescentes; o cálice tem 5-9 mm de comprimento, é pubescente no exterior e no interior (aí com tricomas bastante pequenos) e apresenta densa pilosidade no meio (Hänsel *et al.*, 1994; Youngken, 1950).

2.3.2. Principais Constituintes Químicos

Os principais constituintes característicos são os ácidos hidroxicinâmicos, dos quais se salientam os ácidos rosmarínico, *p*-cumárico, cafeico e clorogénico, e o óleo essencial (0,02-0,37%), composto por mais de 40% de monoterpenos e mais de 35% de sesquiterpenos (WHO, 2002). Os constituintes polifenólicos foram estudados por diversos autores (Carnat *et al.*, 1998; Gracza e Ruff, 1984; Lamaison *et al.*, 1991; Agata *et al.*, 1993; Thieme e Kitze, 1973; Mulkens e Kapetanidis, 1987; Heitz *et al.*, 2000; Patora e Klimek, 2002; Modnicki *et al.*, 2004; Dastmalchi *et al.*, 2007). Num dos estudos mais recentes, Dastmalchi *et al.* (2007), analisaram a composição química e a actividade antioxidante de um extracto etanólico, obtido com espécimes de *Melissa officinalis* L. de origem iraniana, tendo identificado com base no seu comportamento cromatográfico e características espectrais (UV) ácidos hidroxicinâmicos tais como o cafeico, *m*-cumárico e rosmarínico e diversos flavonóides tais como eriodictiol-7-*O*-glucósido,

hesperidina, hesperitina, naringina e naringenina. Os dados qualitativos e quantitativos obtidos por estes autores foram resumidos na seguinte tabela:

Tabela 2.3.2a: Análise qualitativa/quantitativa do extracto de *Melissa officinalis* L. (adaptado de Dastmalchi *et al.*, 2007)

	Constituintes identificados							
	Ácido Cafeico	Eriodictiol-7-O-glucósido	Ácido <i>m</i> -cumárico	Naringina	Hesperidina	Ácido rosmarínico	Naringenina	Hesperitina
Teor (mg/g de extracto seco)	4,05	2,26	0,23	0,6	9,31	96,45	1,24	7,46

Os dados revelados por estes autores confirmam o ácido rosmarínico como o principal constituinte (~2,9% do peso seco da planta), bem como a presença de outros ácidos hidroxicinâmicos, tais como, o ácido cafeico, também já identificado nesta espécie (Zgórka e Glowniak, 2006; Carnat *et al.*, 1998; Ziaková e Brandšteterova, 2002 e 2003). Sobre os restantes compostos fenólicos, de cuja presença nesta espécie não havia ainda relatos, estes são referidos pelos autores como sendo comuns em outras espécies da família *Lamiaceae* (Dastmalchi *et al.*, 2007; Dorman *et al.*, 2003a; Dorman *et al.*, 2003b). Os derivados da luteolina como a luteolina-7-*O*-glucósido, ou a luteolina 3'-glucoronido, referidos por outros autores (Carnat *et al.*, 1998 e Heitz *et al.*, 2000, respectivamente) como sendo os principais flavonóides desta espécie, ou ainda outros derivados da luteolina, não foram detectados neste estudo, sendo avançada como possível explicação para esta diferença os factores ambientais e o diferente procedimento extractivo usado. Deverá, contudo, ser realçado que, tanto no trabalho de Carnat *et al.* (1998) como no de Dastmalchi *et al.* (2007) a metodologia usada para a identificação dos constituintes fenólicos (HPLC com diode-array e comparação com padrões) não permite uma identificação completa da estrutura dos constituintes referenciados, pelo que os dados destes estudos não deverão ser tomados como definitivos relativamente ao tipo de compostos fenólicos presentes nesta espécie. Por outro lado, Patora e Klimek (2002) isolaram seis derivados flavonóides das folhas de *Melissa officinalis* L., nomeadamente luteolina, luteolina 7-*O*-beta-D-glucuronopiranosido, apigenina 7-*O*-beta-D-glucopiranosido, luteolina

7-O-beta-D-glucopiranosido, luteolina 3'-O-beta-D-glucuronopiranosido e luteolina 7-O-beta-D-glucopiranosido-3'-O-beta-D-glucuronopiranosido.

Foi também referida a presença de outros flavonóides como a apigenina, caempferol, quercetina e quercitrina (ESCOP, 1996; Bruneton, 1995)

O óleo essencial desta planta foi já objecto de estudo por diversos autores (Bagdat e Cosge, 2006). Num estudo em diferentes populações de plantas cultivadas na Polónia, Patora e Klimek (2002) verificaram que o teor de óleo essencial, relativamente ao peso fresco da planta, poderá variar entre 0,08-0,25ml/100g ou 0,06-0,167ml/100g. Noutro estudo, Sari e Ceylan (2002) reportaram um teor de óleo essencial que variava entre 0.03 e 0.067%. Este óleo essencial apresenta um característico odor fresco a limão e uma coloração levemente amarelada. Os principais constituintes deste óleo são o citronelal, neral e geranial e a restante composição encontra-se resumida na tabela 2.3.2b.

Compostos	%
1-Octeno-3-ol	1,3
6-Metil-5-hepteno-2-ona	0,3
<i>Trans</i> - β -ocimeno	0,5
Linalol	0,9
<i>Para</i> -menta-3-en-8-ol	0,2
Citronelal	12,9
Citronelol	6,2
Neral	24,5
Geraniol	0,7
Geranial	35,3
α -Cubebeno	0,2
Eugenol	0,1
Acetato de geranilo	7,1
β -Cariofileno	4,9
Germacreno	0,2
Acetato de eugenol	0,1
Óxido de cariofileno	2,7

Tabela 2.3.2b: Composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. (adaptado de Sadraei *et al.*, 2003)

Os constituintes do óleo essencial poderão, ainda que parcialmente, ser também encontrados na infusão preparada a partir das folhas (Carnat *et al.*, 1998) (Tabela 2.3.2c).

Constituintes	Folha	Infusão	Folha após infusão
α -pineno	0,11		
cis- β -ocimeno	0,10		
trans- β -ocimeno	0,30		0,42
6-metilo-5-hepteno-2-ona	0,35	0,27	0,45
cis-linalol óxido	0,39	0,39	0,11
citronelal	39,47	16,81	42,67
linalol	0,56	0,43	0,29
β -cariofileno	2,37	1,38	6,34
neral	20,40	30,15	15,80
geranial	27,84	43,53	20,70
acetato de geranilo	0,58	0,18	1,07
citronelol	0,63	0,70	0,57
geraniol	0,18	0,32	0,15
Óxido de cariofileno	0,67	0,24	1,99
hidrocarbonetos	2,88	1,38	6,76
cetonas	0,35	0,27	0,45
óxidos	1,06	0,63	2,10
aldeídos	87,71	90,49	79,17
álcoois	1,37	1,45	1,01
ésteres	0,58	0,18	1,07

Tabela 2.3.2c: Composição do óleo essencial da folha, da infusão líquida e da folha após infusão da *Melissa officinalis* L. (valores em % do óleo essencial) (adaptado de Carnat *et al.*, 1998)

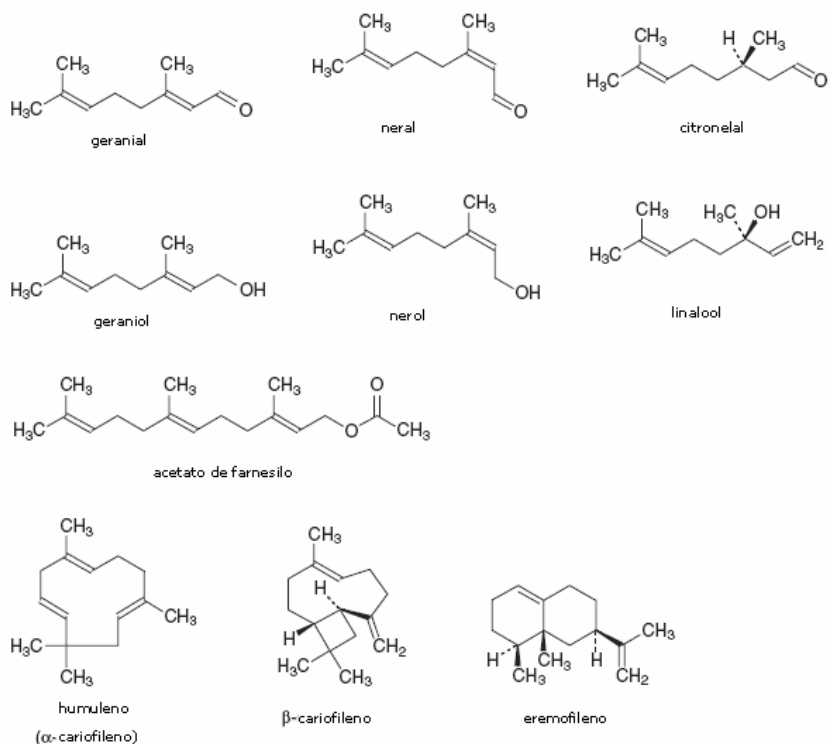


Fig. 2.3.2d - Estrutura dos principais constituintes terpênicos encontrados em *Melissa officinalis* L. (WHO, 2002)

2.4. *Passiflora edulis* Sims

2.4.1. Descrição botânica

A *Passiflora edulis* Sims., vulgo maracujá roxo, pertence à ordem das Violáceas que engloba 20 famílias, entre as quais a família das Passifloráceas, que está repartida em 12 géneros e 600 espécies, indígenas de climas quentes e temperados. O género principal é *Passiflora* L. representado por 500 espécies distribuídas nas regiões temperadas e tropicais do novo mundo, sendo mais raras na Ásia, Austrália e África tropical (Zibadi e Watson, 2004; Hickey e King, 1988). A *Passiflora edulis* Sims é uma das várias espécies deste género que são cultivadas pelo seu fruto comestível. O seu país de origem é, provavelmente, o Brasil (Brasseur e Angenot, 1984) e talvez essa seja também a origem das primeiras plantas desta espécie que chegaram a Portugal, onde é encontrada

frequentemente como planta ornamental. Na região autónoma dos Açores existe na ilha de S. Miguel uma produção significativa do fruto desta planta, cujo cultivo terá sido introduzido no séc. XVIII e cujas particulares características organolépticas levaram inclusive à atribuição por parte das autoridades de uma denominação de origem protegida (DOP).

A *Passiflora edulis* Sims é uma planta herbácea trepadeira, por meio de gavinhas axilares, chegando a alcançar até 9 metros de altura. As folhas são alternas, verdes, divididas em três lobos finamente dentados e com nervuras pubescentes. O lobo central é o mais importante e cada lobo tem, da base do limbo até à extremidade, entre 6 a 12 cm de comprimento e 2 a 6 cm de largura. A folha parece glabra e os dentes do bordo do limbo são mais longos e com tendência a encurvar na extremidade do limbo (Brasseur e Angenot, 1984). As suas flores possuem um receptáculo, na margem do qual se dispõem 5 sépalas e 5 pétalas; ao centro forma-se um androginófero suportando 5 estames e 3 a 5 carpelos e que aparece rodeado de estreitos apêndices petalóides, numerosos, dispostos em várias fiadas maiores que a corola, sob a forma de uma coroa. O nome *Passiflora*, que significa flor da paixão, foi-lhe atribuído por missionários Jesuítas (Svanidze *et al.*, 1974) como evocação da paixão de Cristo, precisamente pela construção peculiar das flores descrita, cujo conjunto recorda a coroa de espinhos (Costa, 1977).

2.4.2. Principais constituintes

Os flavonóides são compostos predominantes nas várias espécies de *Passiflora* e têm sido usados como marcadores para o controle de qualidade de diversas preparações, particularmente de *Passiflora incarnata* L. incluída em algumas farmacopeias (Farmacopeia Francesa X; Farmacopeia Helvetica VII; Ortega e Schmidt, 1995).

A *Passiflora edulis* Sims foi já descrita como sendo rica em glicósidos de flavonóides nomeadamente vitexina, saponarina, saponaretina, isorientina, rutina

e quercetina (Lutomski e Malek, 1975), sendo a vitexina e diversos outros flavonóides do tipo C-glicosilflavonas os seus principais constituintes (Lohdefink, 1976). Foram também isolados desta espécie dois C-glicósidos: 6-C-fucosil-luteolina e 6-C-chinovosil-luteolina (Mareck *et al.*, 1991). Mais recentemente foi confirmada a presença de isorientina, em concentrações superiores aquelas verificadas na *Passiflora alata* L. e *Passiflora incarnata* L., e verificada a presença de orientina, mas não de vitexina e rutina (Pereira *et al.*, 2004).

Tratando-se de uma espécie edível, facilmente se compreende que a maioria dos estudos de caracterização química tenha incidido no fruto e não nas suas folhas. Assim, para além dos glicósidos de flavonóides já referidos, diversos outros tipos de glicósidos foram já identificados nesta espécie, nomeadamente (revisão por Dhawan *et al.*, 2004): passiflorina (Bombardelli *et al.*, 1975) passicapsina e passibiflorina (Olafsdottir *et al.*, 1989); glicósidos cianogénicos como a passicoriacina, epipassicoriacina e epitetrafilina B (Seigler e Spencer, 1989), um rutinósido β -cianogénico (Chassagne e Crouzet, 1998), amigdalina, prunasina, sambunigrina (Chassagne *et al.*, 1996); e diversos glicósidos de linalol, álcool benzílico, 3 metil-2 buteno-1-ol, metil salicilato e eugenol (Chassagne *et al.*, 1996 e 1997). Por hidrólise enzimática verificou-se também a presença de inúmeros outros glicósidos de compostos voláteis (Chassagne *et al.*, 1999) tendo sido já identificados mais de 290 compostos voláteis em diversos extractos desta planta (Shibamoto e Tang, 1990; Whitfield e Last, 1986).

Foi também reportada a presença de alcalóides nas folhas, nomeadamente harmana, harmina, harmalina e harmalol (Lutomski e Malek, 1975), embora num estudo anteriormente realizado com plantas desta espécie cultivadas em Portugal, não tenhamos confirmado esta indicação (Coleta, 1998).

Por último são também encontradas referências sobre a presença de diversos outros tipos de constituintes (revisão por Dhawan *et al.*, 2004):

- *Antocianinas*: cianidina-3-O- β -glucopiranosido e cianidina-3-O- β -galactopiranosido (Chang e Su, 1998), cianidina-3-glucósido, cianidina-3-6''- malonil glucósido, pelargonidina-3-glucósido (Kidoey *et al.*, 1997)
- *Cicloartanos triterpénicos*: ácidos ciclopasiflóico A-D e seus saponósidos, ciclopasiflóidos I-VI (Yoshikawa *et al.*, 2000) isolados a partir das folhas.
- *Aminoácidos*: prolina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina e alanina (Fang e Ling, 1984)
- *Carotenoides*: fitoeno, fitoflueno, α -caroteno, neurosporeno, β -caroteno, licopeno, prolicopeno, monoepoxi- β -caroteno, β -criptoxantina, violaxantina, neoxantina (Mercadente *et al.*, 1998), γ -caroteno, α -criptoxantina, β -apocarotenol (Goday e Rodriguez, 1994)
- *Ácido L-ascórbico* (Wekesa *et al.*, 1996)
- *Hidratos de carbono*: fructose, glucose, sucrose, maltose, lactose (Fang e Chang, 1981) e pectina (Simpson *et al.*, 1984)
- *Minerais*: Na, K, Mg, Ca, Zn, Al, Mn, Fe (Nogueira *et al.*, 1998)
- *Enzimas*: piruvato quinase citoplásmica (Guo e Li, 1993)
- *γ -lactonas*: γ -hexa, γ -deca e γ -dodecalacetona; γ -hepta, γ -octa, γ -nona lactona (Nitz *et al.*, 1990) e 4 γ -lactonas alquiladas (Bernreuther *et al.*, 1989)
- *Componentes do aroma*: edulans I e II (Whitfield *et al.*, 1974), diversos ésteres (Yamaguchi *et al.*, 1983) e enantiómeros 3-metil-tiohexano-1-ol, 2-metil-4-propil-1, 3-oxationa (Mosandl e Heusinger, 1983)
- *Constituintes do seu óleo essencial*: hexil caproato e butirato e etil caproato e butirato (Dawes e Paul, 1961), limoneno (Kuhlmann, 1984), 2-tridecanona (62,9%), (9Z)-ácido octadecenóico (16,6%), 2-pentadecanona (6,2%), ácido haxadecanóico (3,2%), 2-tridecanol (2,1%), ácido octadecanóico (2%) e óxido de cariofileno (2%) (Arriaza *et al.*, 1997).

3. Material e Métodos

3.1. Equipamento

- Cromatógrafo Gilson[®], com um sistema de duas bombas modelo "305 piston pump" com cabeças "Sc-type", um misturador "811B dynamic mixer" e um módulo manométrico modelo "805". Este cromatógrafo estava acoplado a um detector de fotodíodos Gilson[®] modelo "170" e a aquisição e tratamento dos dados obtidos por este equipamento foi feito num computador pessoal ordinário recorrendo ao software Unipoint[®] fornecido pelo mesmo fabricante do detector. Para a análise cromatográfica este cromatógrafo foi equipado com uma coluna de fase reversa (250 x 4mm; Spherisorb[®] S5 ODS 2) e uma pré-coluna Nucleosil[®] C18 (tamanho de partícula 5µm; 30 x 4 mm).
- Para a cromatografia em camada fina preparativa, as placas foram preparadas no laboratório com equipamento próprio fornecido pela Camag[®].
- Para a cromatografia em papel foi construída uma câmara especial de vidro com 150 x 65 x 55cm.
- Liofilizador FTS Systems[®] (USA).
- Espectrómetro Varian[®] Unity-500.
- Espectrofotómetro de feixe duplo Hitachi[®], modelo U-2000.

3.2. Reagentes e Padrões

Nos processos de extracção e fraccionamento usaram-se solventes de grau "pró-análise" fornecidos pela Merck[®] e pela Fluka[®] (no caso do *n*-heptano). Para a cromatografia líquida de alta resolução usaram-se solventes "gradient-grade" fornecidos pela Merck[®] e pela Fluka[®] (no caso do *n*-heptano). Os diversos padrões usados foram adquiridos à Sigma-Aldrich[®] e à Extrasynthèse[®] (orientina e vitexina). O DMSO-d₆ usado em RMN foi igualmente adquirido à Sigma-Aldrich[®].

3.3. Material vegetal

As plantas seleccionadas foram colhidas na região de Coimbra durante o respectivo período de floração. De acordo com a indicação do uso tradicional, colhemos as folhas de vários espécimes de *Passiflora edulis* Sims e *Melissa officinalis* L., as inflorescências de *Tilia x europaea* L. e as partes aéreas *Hypericum perforatum* L. Cada uma das amostras colhidas foi classificada por um taxonomista especializado (Jorge Paiva, Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra) tendo ficado depositado um espécime de cada planta no herbário do Instituto Botânico da Universidade de Coimbra. As amostras foram secas no nosso laboratório ao abrigo da luz, sob um fluxo de ar quente a 25°C. Imediatamente após a secagem foram reduzidas a pó ($\emptyset < 20$ mesh) e armazenadas a $T < -14^\circ\text{C}$.

3.4. Preparação das infusões e seus liofilizados

Os extractos usados no *screening* farmacológico foram preparados de acordo com a indicação tradicional para a preparação de infusões, adicionando 100ml de água fervente (destilada) a 6g de pó da planta. Após o arrefecimento do infuso este foi filtrado sob vazio e imediatamente liofilizado em balão previamente tarado. Após a criogenação dos extractos (em recipiente com N_2 líquido) estes foram protegidos da luz, revestindo o frasco de liofilização com papel de alumínio. O pó resultante foi pesado, recolhido em frascos de cor âmbar, hermeticamente fechados e armazenados a $T < -14^\circ\text{C}$.

3.4.1. Determinação do perfil cromatográfico das infusões

De cada um dos infusos preparados foi retirada uma alíquota que, após ter sido microfiltrada, foi analisada por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) usando o seguinte gradiente (Campos *et al.*, 1996):

Solvente A - água (pH=2,2 com H_3PO_4); Solvente B - acetonitrilo

Fluxo=0,8ml.min⁻¹

0 - 12' _____ 100-91% A

12 - 20' _____ 91-87% A

20 - 40' _____ 87-67% A

40 -42' _____ 67% A

42-52' _____ 67-57% A

52-60' _____ 57% A

Os liofilizados das diferentes plantas foram reconstituídos com água destilada para uma concentração de 5mg/ml, microfiltrados e analisados por HPLC usando o mesmo gradiente acima descrito.

3.4.2. Determinação do resíduo seco das infusões

Do infuso foram retiradas três alíquotas (0,5ml), colocadas em balões previamente tarados, concentradas a resíduo e desidratadas durante 24^h em estufa de vácuo a 30°C na presença de gel de sílica exsicado.

3.4.3. Doseamento dos flavonóides no liofilizado dos infusos

Os liofilizados reconstituídos foram doseados para determinar o seu conteúdo de flavonóides, usando um método de dosagem directo pelo cloreto de alumínio (Lamaison e Carnat, 1990), tendo como padrão a rutina. Partindo de 2 ml de liofilizado reconstituído [na mesma concentração (m/v) do infuso], diluímos para um volume final de 50ml com metanol (solução amostra A). A 5ml de A adicionaram-se 5ml de solução de cloreto de alumínio 2%, com homogenização no vortex durante 1 minuto. Após 10 minutos foi lida a absorvância a 430nm, contra um branco composto por 5ml de A e 5ml de metanol. A recta de calibração da rutina foi determinada com igual procedimento preparando 3 soluções padrão, respectivamente de 0,4mg, 1mg e 2mg em 100ml de metanol.

3.5. Análise fitoquímica do *Hypericum perforatum* L.

3.5.1. Avaliação preliminar dos principais constituintes presentes no infuso liofilizado de *Hypericum perforatum* L. submetido a "screening" farmacológico

O liofilizado do infuso foi reconstituído com água destilada numa concentração de 10mg/ml. Alíquotas de 1, 2 e 4µl foram aplicadas em placas de sílica para cromatografia em camada fina e co-cromatografadas com os padrões apropriados para cada grupo usando os seguintes sistemas:

Grupo Químico	Suporte	Fase móvel	Revelador	Referência
Carotenóides	Sílica 60G	n-hexano/acetona (19:1)	Observação no Visível	Campos (1997a)
Flavonóides	Sílica 60F ₂₅₄	Acetato de etilo/metanol/água (8:1:1)	Rgte. New/Peg	Campos (1997)
Aminoácidos	Sílica 60F ₂₅₄	n-butanol/acetona/ácido acético/água (35:35:10:20)	Rgte. da Ninhidrina	Campos (1997)
Glúcidos	Sílica 60F ₂₅₄	Butanol/acetona/tampão fosfato pH=5 (4:5:1)	Rgte. de Tetrazolium	Campos (1997)
Taninos	Sílica 60G	Clorofórmio/acetato de etilo/ácido fórmico (5:4:1)	Sol. ácido fosfomolibdico 5% em metanol	Coleta (1998)
Alcalóides	Sílica 60G (alcalinizada)	Clorofórmio/metanol/amônia (97:3:0,25)	Rgte. de Draggendorf	Coleta (1998)
Ácidos Fenólicos	Sílica 60G	Acetato de etilo/ácido fórmico/água (9:1:1)	p-Nitroanilina	Coleta (1998)
Naftodiantronas	Sílica 60F ₂₅₄	n-Heptano/acetona/t-butimetileter /ácido fórmico(85%) (33:35:30:2)	Observação no UV a 366nm	Wichtl, 1994
Floroglucinóis	Sílica 60F ₂₅₄	n-Heptano/acetona/t-butimetileter /ácido fórmico(85%) (33:35:30:2)	Observação no UV a 254nm Fast-blue (solução aquosa 0,5%)	Wichtl, 1994

3.5.2. Isolamento da hiperforina

Para o isolamento deste constituinte foram testados diferentes procedimentos partindo de uma extracção inicial do material vegetal pulverizado com *n*-heptano. Começámos por extrair 5 g do material vegetal pulverizado com 100ml de *n*-heptano, submetendo a mistura a ultra-sons durante 30 minutos. O processo foi repetido 3x com o controlo da solução extractiva (no final dos 30'), após filtração sob vazio, a ser realizado por recurso a um varrimento no U.V. (modo "overlay") entre $\lambda_{220-650 \text{ nm}}$ (escala Abs. 0-3). Apesar de a intensidade de absorção da segunda extracção ser ligeiramente inferior a 30% da primeira extracção, alterámos o procedimento, passando a extrair com 200/100/100 ml de *n*-heptano. Os extractos foram concentrados a resíduo seco (T-30°C / Vazio-0.99) e armazenados a T < -14°C.

O resíduo seco foi retomado em 3ml de *n*-heptano e, após filtração, 1 μ l desta solução foi aplicado em mini-placas para TLC analítica (5x13cm), recortadas de placas pré-revestidas com suporte de sílica gel (Kieselgel 60 F₂₅₄, Machery Negel), e cromatografadas com os seguintes sistemas desenvolventes:

- *n*-hexano / *t*-butilmetileter - 80/20 (Maisenbacher e Kovar, 1992)
- *n*-heptano / acetona / *t*-butilmetileter / ácido fórmico 85% - 35/35/33/2 (Wichtl, 1994).
- tolueno / acetato de etilo / ácido fórmico (anidro) - 50/40/10 (DAC, 1986).

Para a revelação e identificação dos constituintes nas placas usámos as seguintes indicaoes:

A) Hipericina/Pseudohipericina: a 350nm observa-se fluorescência vermelha (Wichtl, 1994);

B) Hiperforina/Adhiperforina: a 350nm observa-se "quenching" de fluorescência; Após revelação com reagente "Fast Blue" aparece coloração amarela no visível (Wichtl, 1994)

C) Flavonóides: Reagente NEU/PEG (Wagner *et al.*, 1984)

Optimizada a extracção e escolhido o sistema desenvolvente procedemos ao isolamento da hiperforina por cromatografia em camada fina preparativa. As placas de sílica foram preparadas no laboratório, revestindo placas de vidro com Kieselgel HF₍₂₅₄₊₃₆₆₎/ H₂O - 30/60 (m/v com 2,5ml metanol) para uma espessura de 0,5 mm. Após um dia de secagem as placas foram activadas por aquecimento a 110°C durante 60min.

O resíduo da extracção de 5g de material vegetal foi retomado em 10ml de *n*-heptano, lavado com água destilada (10ml, 2x), concentrado novamente a resíduo seco, retomado em 1ml de *n*-heptano e aplicado em banda em 5 placas de TLC preparativa (200µl por placa).

Após um primeiro desenvolvimento com heptano/acetona/*t*-butilmetileter/ácido fórmico 85% (35/35/33/2), destacou-se a sílica da banda correspondente à hiperforina (Rf=0,45) e extraiu-se com acetona (10ml, 3x). Esta solução foi concentrada a resíduo que depois de retomado em *n*-heptano foi novamente cromatografado usando como desenvolvente *n*-hexano/*t*-butilmetileter (80/20). A banda correspondente à hiperforina (Rf =0,75) foi destacada, extraída com acetona, microfiltrada e purificada em coluna Isolute® C-18. Esta solução foi concentrada a resíduo em balão previamente tarado. Tanto quanto possível, o procedimento extractivo foi realizado ao abrigo da luz solar e em atmosfera de azoto.

3.5.3. Preparação de extractos etanólicos de Hypericum perforatum L.

Muitas das formulações comerciais que contém esta planta são preparadas a partir de extractos hidroalcoólicos ou metanólicos. Preparámos vários extractos

macerando o material vegetal metanol puro e com etanol em diferentes concentrações (25, 50, 95 e 100%). Cada 6g de pó da planta foi deixado a macerar com 100ml de solvente durante uma noite, após homogeneização no ultra-turrax durante 5min. Após maceração a solução foi centrifugada. Recolhido o sobrenadante o sedimento foi extraído mais 2x com 50ml do solvente, agitando durante 5min no ultra-turrax. As soluções extractivas foram concentradas a resíduo e retomadas em 10ml do mesmo solvente para análise por HPLC. Para o estudo da estabilidade dos constituintes deste extracto retiraram-se duas alíquotas destas soluções extractivas que foram concentradas a resíduo, sendo um destes resíduos armazenado à temperatura ambiente longe da luz solar e o outro a temperatura inferior a -14°C.

3.5.4. Evolução do teor dos constituintes ao longo do ciclo de vida da planta

Seguindo a indicação tradicional, o material vegetal usado nos ensaios farmacológicos foi colhido durante o período de floração por volta do dia de S. João (entre os dias 24 e 28 de Junho). Para verificar a evolução do teor dos constituintes desta planta ao longo do seu ciclo de vida procedemos ao seu cultivo *experimental*. Usámos sementes de duas proveniências, um lote fornecido pelo United States Department of Agriculture (USDA) e outro adquirido à empresa Semillas Zulueta (Espanha), cultivadas em estufa e ao ar livre. As sementes cultivadas em estufa foram semeadas manualmente (área±50m²) na Primavera sobre uma cama de turfa vulgar, cobertas com um pouco de turfa, subsequentemente remexida e ligeiramente humedecida; durante os meses de Inverno os períodos de rega foram quinzenais e o arejamento da estufa semanal; Durante os meses de Primavera e Verão a rega foi semanal e o arejamento diário. No mesmo período e no mesmo terreno (previamente remexido) onde se localizava a estufa espalhámos manualmente sementes dos dois lotes que foram deixadas crescer livremente (área±150m²). Após a germinação fizemos

periodicamente (cada 5 semanas) a recolha de amostras das partes aéreas das plantas para análise dos seus constituintes. As amostras foram secas no laboratório ao abrigo da luz, sob um fluxo de ar quente a 25°C. Imediatamente após a secagem foram reduzidas a pó ($\emptyset < 20$ mesh) e extraídas com etanol de acordo com a técnica acima descrita.

3.5.5. Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

Esta técnica foi usada para verificar a composição dos extractos obtidos, a capacidade de resolução dos sistemas de TLC testados, o grau de pureza dos compostos isolados e dosear os constituintes dos extractos obtidos com esta planta. Foram usados os seguintes gradientes:

Gradiente I (Hölzl e Ostrowski, 1987)

Solvente A - Acetonitrilo /H₂O /H₃PO₄ (19/80/1); Solvente B - Acetonitrilo /Metanol /H₃PO₄ (59/40/1)

Fluxo=0,8ml.min⁻¹

0 - 8' _____ 100% A

8 - 30' _____ 100 - 50% A

30 - 45' _____ 50 - 0% A

45 - 75' _____ 0% A

Gradiente II (Örth *et al.*, 1999)

Isocrática de acetonitrilo/H₂O (89,5/10,5); duração 30min

Fluxo de 1,2ml.min⁻¹

Gradiente III (Campos *et al.*, 1996)

Solvente A - água (pH=2,2 com H₃PO₄); Solvente B - acetonitrilo

Fluxo=0,8ml.min⁻¹

0 - 12' _____ 100-91% A
12 - 20' _____ 91-87% A
20 - 40' _____ 87-67% A
40 -42' _____ 67% A
42-52' _____ 67-57% A
52-60' _____ 57% A
60-80' _____ 0% A

3.5.6. Doseamento dos principais constituintes de Hypericum perforatum

L.

3.5.6.1. Doseamento por HPLC

Uma vez que não existia disponível no mercado nenhum padrão puro de hiperforina, usámos para este doseamento a hiperforina isolada de acordo com a técnica anteriormente descrita. O doseamento foi feito nos gradientes II e III acima descritos, pelo método do padrão externo, com 5 concentrações (0,18; 0,29; 0,66; 1,8; 3,6mg/ml) em triplicado.

Para o doseamento da hipericina, hiperósido, ácido cafeico, amentoflavona e quercitrina nos extractos etanólicos usámos novamente o método do padrão externo com gradiente III, injectando padrões comerciais em triplicado e em 4 concentrações distintas.

3.5.6.2. Doseamento colorimétrico das hipericinas totais

As hipericinas totais foram também doseadas seguindo um método colorimétrico, tal como descrito na monografia "Hipericão" da Farmacopeia Portuguesa VII e na monografia "St. John's Wort" da American Herbal Pharmacopoeia (AHP, 1997). Foram preparadas cinco soluções padrão de hipericina em metanol (0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,005mg/10ml) e lida a respectiva absorvância a 590nm contra um branco de metanol. O resíduo liofilizado da infusão foi retomado em metanol para uma concentração final de 1mg/20ml e submetido a ultra-sons durante 15 minutos. Após filtração foi lida a absorvância da solução a 590nm e, por

interpolação na recta de calibração obtida com as diferentes concentrações de hipericina, foi determinada a concentração de hipericinas totais.

3.5.7. Distribuição dos principais constituintes nas diferentes partes aéreas do Hypericum perforatum L.

Após a colheita e secagem do material vegetal, retirámos uma amostra de algumas plantas, pesámos e subsequentemente separámos as folhas, das flores e dos caules. Cada uma das amostras foi pulverizada e sujeita a extracção com álcool seguindo o processo descrito na secção 3.5.3..

3.6. Análise fitoquímica da Passiflora edulis Sims

3.6.1. Extracção e fraccionamento dos flavonóides presentes nas infusões de Passiflora edulis Sims

3.6.1.1. Preparação das infusões

As infusões a 6% (m/v) foram preparadas num recipiente de porcelana adicionando água fervente às amostras de material vegetal previamente pulverizado. Depois de arrefecidas à temperatura ambiente durante 40 minutos, as suspensões foram filtradas sob vazio através de papel de filtro (Whatman® nº2). Para cada um dos infusos preparados, calcularam-se os volumes finais e retiraram-se três alíquotas para o cálculo do resíduo seco. O resíduo seco foi determinado por extrapolação do valor médio obtido para as três alíquotas concentradas a resíduo seco sob vazio, em balões previamente tarados e colocados em estufa de vazio a 35°C durante a noite, na presença de gel de sílica exsicado.

3.6.1.2. Extração dos derivados flavonóides

Após arrefecimento e filtração as infusões foram agitadas com um adsorvente polimérico (Amberlite XAD-2) recorrendo a um agitador mecânico, durante 60 minutos (1g de fármaco / 5g de resina). Após a agitação, o adsorvente foi colocado numa coluna para descartar o remanescente da infusão e lavado extensivamente com água destilada. O adsorvente foi reutilizado várias vezes e entre utilizações a sua regeneração foi feita por agitação com HCl 0,5M durante 60min, seguido de lavagem com água.

Para 6g de fármaco, a eluição dos compostos fenólicos fixados na resina adsorvente foi feita com 300 ml de metanol e 200ml de metanol 50%. Reuniram-se os eluatos metanólicos e concentraram-se a resíduo seco sob vazio, a uma temperatura inferior a 40°C.

O resíduo dos eluatos metanólicos foi retomado em 2ml de metanol 75%. A suspensão resultante foi homogeneizada num banho de ultra-sons, centrifugada durante 5 minutos a 5000rpm e o sobrenadante foi cromatografado numa coluna de Sephadex LH-20. Foi usada uma coluna de vidro com 25 cm de altura e 1,3 cm de diâmetro. A coluna de Sephadex LH-20 foi preparada em metanol e estabilizada em metanol a 75%. Após a aplicação da solução eluíram-se os seus constituintes a um fluxo constante, com o auxílio de uma bomba peristáltica. A primeira fase de eluição foi feita com metanol a 75% seguindo-se a eluição com metanol. Com um colector de fracções automático recolheram-se fracções com cerca de 1ml. Após cada separação cromatográfica o Sephadex LH-20 foi regenerado pelo hidróxido de potássio 0,1N (50ml) e ácido clorídrico 0,1N (50ml), lavado com metanol e armazenado neste solvente.

Para o acompanhamento do processo de separação na coluna de Sephadex LH-20, uma vez que não era exequível o controlo de todas as fracções de eluato recolhidas, seleccionaram-se amostras representativas da evolução do processo separativo, num mínimo de dez por separação. As fracções cujos constituintes apresentavam o comportamento característico de derivados flavonóides, no

controle feito por cromatografia em camada fina, foram reunidas e a solução resultante concentrada a resíduo. Este resíduo foi designado de fracção flavonóide total.

3.6.1.3. Subfraccionamento da fracção flavonóide total

Apesar da cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 permitir separar os derivados flavonóides dos restantes constituintes fenólicos igualmente adsorvidos pela resina de Amberlite XAD-2, o controle por cromatografia em camada fina da separação obtida nesta coluna evidenciou a impossibilidade de conseguir resolver os diferentes derivados flavonóides presentes e, mesmo aumentando a capacidade da coluna ($h = 43\text{cm}$; $\varnothing = 1,5\text{cm}$), com redução do fluxo do eluente, verificou-se um "arrastamento" destes constituintes.

A cromatografia em papel é uma das técnicas mais úteis para o estudo químico dos flavonóides (Markham, 1982). Assim, considerando o baixo custo e simplicidade desta técnica optámos por ensaiar a separação dos diversos derivados flavonóides presentes na *Passiflora edulis* Sims fazendo uso desta técnica. Assim, o resíduo designado como fracção flavonóide total foi aplicado em folhas de papel Whatman® nº3 (em bandas de 35 cm) e cromatografado (38cm) com uma mistura de acetato de etilo / ácido fórmico / água (44:16:20). Após a cromatografia procedeu-se à secagem das folhas à temperatura ambiente, protegidas da luz solar e sob ventilação. A observação das folhas no ultravioleta (350nm) permitia distinguir 3 zonas distintas de forte absorção UV, com comportamento típico dos derivados flavonóides do tipo flavona, após exposição ao vapor de amónia. As bandas receberam a designação de Subfracção I, II e III (abreviadamente SF I, SF II e SF III) respectivamente, por ordem crescente de R_f (0,58; 0,79; 0,90). Cada banda foi delineada e destacada da folha de cromatografia e esgotada sucessivamente (3x / 15min) com metanol 75%. As soluções extractivas de cada uma das bandas foram reunidas, filtradas e concentradas a resíduo seco. Este foi retomado em metanol 75% e a solução

resultante microfiltrada. A composição de cada uma destas bandas foi determinada por HPLC.

3.6.2. Isolamento dos constituintes das subfracções

Subfracção I - Em primeiro lugar testámos a mobilidade dos constituintes da subfracção I (SF I), aplicando uma gota da sua solução metanólica em tiras de papel Whatman® nº3 e desenvolvendo com diferentes gradações de ácido acético (7,5%; 15%; 50%). A observação destas tiras no UV permitiu distinguir duas zonas distintas de forte absorção desta radiação, verificando-se uma separação óptima destas manchas com ácido acético 15%. Uma vez que a análise por HPLC usando diferentes sistemas cromatográficos indicava que cada uma destas manchas correspondia a apenas um composto, elegemos este sistema para o isolamento subsequente dos dois constituintes da SF I (SF Ia e SF Ib). Para aumentar a rapidez e rendimento do processo extractivo, de modo a isolar as quantidades necessárias para os ensaios farmacológicos, foi necessário construir uma câmara de saturação com capacidade suficiente para cromatografar um número significativo de folhas ao mesmo tempo. Esta câmara, com 150x65x55cm, foi construída em estrutura de alumínio com interior em vidro, incluindo os suportes para as folhas, e permitiu cromatografar (por cromatografia ascendente) 15 folhas em simultâneo. Depois da secagem das folhas ao abrigo da luz, as bandas foram destacadas da folha de cromatografia, agrupadas em função do seu R_f, e esgotadas sucessivamente (3x / 15min) com metanol 75%. As soluções extractivas de cada uma das bandas foram reunidas, filtradas e concentradas a resíduo seco. Este foi retomado em metanol 75%, a solução resultante microfiltrada e, após a eliminação do metanol, a solução foi purificada em colunas pré-revestidas Isolute® C18. O eluato metanólico destas colunas foi concentrado a resíduo em balões previamente tarados e colocados em estufa de vazio a 35°C durante a noite, na presença de gel de sílica exsiccado.

Subfracções II e III - Considerando os resultados bastante positivos obtidos no isolamento dos constituintes da SF I usando a cromatografia em papel, ensaiámos o isolamento dos constituintes das restantes fracções usando o mesmo suporte cromatográfico e diferentes sistemas de solventes, nomeadamente ácido acético (7,5%; 15%; 50%), *n*-butanol/ácido acético/água (4/1/5) (BAW) e *t*-butanol/ácido acético/água (3/1/1) (TBA). No caso da SF II nenhum dos solventes usados isoladamente mostrou capacidade para resolver satisfatoriamente os constituintes desta subfracção. Assim, usamos os dois solventes com melhor capacidade de resolução (BAW e ácido acético 15%) para uma cromatografia bidimensional. O procedimento seguido para remover as manchas identificadas em cada folha cromatográfica foi idêntico ao acima descrito para os constituintes da SF I.

Apesar deste sistema bidimensional ter permitido o isolamento de 3 dos constituintes da SF II nas quantidades necessárias para o estudo da sua estrutura, o rendimento limitado que a aplicação em gota do sistema bidimensional obriga, tornou o sistema impraticável para o isolamento destes compostos com vista ao seu estudo farmacológico *in vivo*.

No caso da SF III obtivemos uma separação satisfatória dos seus constituintes num sistema unidimensional usando como solvente o ácido acético 70%.

3.6.2.1. Procedimentos de extracção alternativos com vista ao isolamento dos compostos SF Ia e SF Ib

O isolamento por cromatografia em papel dos compostos SF Ia e SF Ib a partir da fracção flavonóide total, tendo em vista o seu estudo farmacológico bem como a caracterização da sua estrutura, requeria o uso de quantidades relativamente elevadas de material vegetal, pelo que não se tornava prática a repetição do procedimento descrito no ponto anterior partindo apenas de 6g de material vegetal. Assim, o procedimento foi adaptado para usar como ponto de partida

80g de material vegetal, iniciando-se o procedimento com uma infusão ligeiramente mais diluída (5,3% m/v). Após adição de água fervente e durante o arrefecimento do infuso, procedeu-se a uma agitação do sistema com um magneto durante 180min. O tempo para a adsorção dos compostos fenólicos na resina Amberlite XAD-2 foi também significativamente aumentado, ficando o filtrado do infuso em contacto com a resina durante uma noite, sob agitação mecânica. O processo de fixação dos flavonóides na resina de Amberlite XAD-2 foi monitorizado extraindo o infuso, depois da sua agitação com a resina, três vezes (v/v) com *n*-butanol (saturado com água destilada). Os primeiros 200 ml da água de lavagem da coluna foram igualmente extraídos para verificar se havia perdas de derivados flavonóides durante a lavagem da resina. Em ambos os casos, a fracção *n*-butanólica foi concentrada a resíduo seco, retomada em metanol e analisada por cromatografia em camada fina. Os volumes dos solventes (metanol e metanol 50%) necessários para a eluição dos derivados flavonóides desta resina foram estabelecidos, testando vários volumes e controlando a fase final da eluição, de forma a verificar se todos os flavonóides tinham ou não sido eluídos. A coluna de Sephadex LH-20 usada nestas extracções possuía 70cm de altura e 2,5 cm de diâmetro. Foram recolhidas fracções com cerca de 2,5ml e, tal como anteriormente, todas aquelas cujos constituintes apresentavam o comportamento característico de derivados flavonóides, no controle feito por cromatografia em camada fina (CCF), foram reunidas e a solução resultante concentrada a resíduo.

3.6.3. Extracção da *Passiflora edulis* Sims com diferentes solventes

O objectivo deste processo extractivo era aferir, por intermédio de uma extracção simples, a eficiência do procedimento extractivo geral acima descrito para a obtenção da fracção flavonóide total, nomeadamente, para verificar se os principais derivados flavonóides presentes nas folhas secas da planta eram efectivamente extraídos seguindo aquela técnica. Assim, foram testados 4 solventes diferentes (etanol 95%, etanol 50%, acetato de etilo e *n*-butanol),

partindo de pequenas quantidades de material vegetal (1g). Cada amostra foi extraída com 3x25ml do solvente respectivo, à temperatura ambiente e por agitação no Ultra-Turrax (20500rpm) durante 5min.. As soluções extractivas foram reunidas e a solução resultante concentrada a resíduo. Este resíduo foi retomado em metanol (5ml), subseqüentemente microfiltrado e novamente concentrado a resíduo em balão previamente tarado. O perfil cromatográfico deste extracto foi determinado para a solução metanólica (5mg/100 μ l) deste resíduo bruto e os picos doseados em equivalentes de homoorientina.

3.6.4. Procedimentos analíticos usados no estudo dos derivados flavonóides da Passiflora edulis Sims

3.6.4.1. Controlo dos processos extractivos

Os trabalhos realizados anteriormente nesta espécie (Coleta, 1998) já nos haviam permitido otimizar o processo para o controlo da separação dos diversos constituintes fenólicos na cromatografia em coluna de Sephadex LH-20. Assim, as amostras das fracções recolhidas foram aplicadas em placas de sílica gel 60G (0,25mm) e cromatografadas com acetato de etilo/ácido fórmico/água (9/1/1). A detecção foi feita no UV a 350nm, antes e depois da acção do vapor de amónia e após revelação com o reagente NEU/PEG (Markham, 1989).

3.6.4.2. Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

Esta técnica foi usada para diversas finalidades, designadamente:

- Para estabelecer o perfil cromatográfico das diferentes soluções obtidas no processo extractivo;
- Para identificar os constituintes das diversas fracções e subfracções de derivados flavonóides;
- Para verificar o grau de pureza das subfracções e dos constituintes isolados;

- Para o doseamento dos derivados flavonóides;

Foram usados dois gradientes, adaptados de técnicas anteriormente descritas:

A - Gradiente linear de metanol em água/ácido fórmico (95/5), desde 35% de metanol até 80% em 60 minutos com um fluxo de $1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (Batista, 1994);

B - Gradiente água (pH=2,2 com H_3PO_4) (A) / acetonitrilo (B) (0-12 min: 100-91% de A; 12-20 min: 91-87% de A; 20-40 min: 87-67% de A; 40-42 min: 67% de A; 42-52 min: 67-57% de A; 52-60 min: 57% de A) com um fluxo de $0,8\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (Campos, 1997b).

3.6.4.3. Identificação dos constituintes por HPLC

A identificação preliminar dos picos registados no cromatograma da infusão de *Passiflora edulis* Sims, da fracção flavonóide total e restantes subfracções e constituintes isolados, foi feita por comparação dos respectivos tempos de retenção e espectros de absorção no UV com os dados registados para os padrões nos dois sistemas cromatográficos descritos. Com os padrões de flavonóides disponíveis no laboratório, e outros entretanto adquiridos em função das referências bibliográficas que sugeriam a sua presença nesta espécie, foi construída uma base de dados de modo a permitir a automatização das comparações com o software do cromatógrafo.

3.6.4.4. Doseamentos por HPLC

Os constituintes da infusão, fracção flavonóide total, subfracções e constituintes isolados foram doseados em equivalentes de orientina pelo método do padrão externo, usando o gradiente B. Para definir a recta de calibração foram usadas 5 concentrações de padrão (orientina) preparadas por diluições sucessivas de uma solução metanólica com $1,07\text{mg/ml}$ (concentração das soluções injectadas: $2,38\text{mM}$; $1,19\text{mM}$; $0,6\text{mM}$; $0,3\text{mM}$; $0,15\text{mM}$). Cada concentração foi injectada 3

vezes e a recta de calibração para este padrão foi calculada com os valores da área do pico registados para cada injeção.

3.6.5. Análise da estrutura dos constituintes isolados

Uma vez verificada a actividade farmacológica da SF I estabelecemos como objectivo isolar e determinar a estrutura dos compostos que a constituíam. Pelo comportamento cromatográfico (em HPLC, TLC e Cromatografia em Papel), pela coloração exibida após a acção dos reveladores, bem como pelos espectros UV registados com o detector de fotodíodos do HPLC, sabíamos que ambos os constituintes desta fracção seriam derivados (muito provavelmente glicosilados) da luteolina. Apesar da grande semelhança entre os espectros e tempos de retenção dos compostos SF Ia e SF Ib e os da orientina e isorientina, respectivamente, estes não eram exactamente coincidentes e quando co-cromatografados, quer em HPLC quer em TLC com suporte de celulose (solvente ácido acético a 15%) verificámos que apresentavam tempos e factores de retenção diferentes. Assim, realizámos vários ensaios para identificar e determinar a posição do substituinte no anel central, bem como a natureza da sua ligação.

3.6.5.1. Hidrólise ácida pelo método clássico

Esta técnica foi usada para análise dos açúcares dos derivados glicosilados. Num balão de fundo redondo adicionou-se a uma alíquota de 100 µl da amostra a hidrolisar (1% m/v em metanol) 400µl de HCl 2N e aqueceu-se a mistura a 100°C, com refluxo, durante 60min. Depois de arrefecidos, os hidrolisados foram concentrados a resíduo e retomados em ± 2ml de água; esta solução foi extraída 3 vezes com 5ml de acetato de etilo (adaptado de Campos, 1997a).

3.6.5.2. Micro-hidrólise ácida em placa

Sobre uma placa de gele de sílica 60F_{254nm} aplicaram-se 25µl de uma solução a 0,1% em flavonósidos. Após secagem em corrente de ar frio, são depositados 5µl de HCl metanólico 3N; a zona de aplicação foi coberta com uma lâmina de vidro e o conjunto aquecido a 100°C durante 15min (Campos, 1997a). A migração dos depósitos faz-se depois de aplicar na mesma placa uma alíquota da amostra não hidrolisada ou dos padrões, usando como sistemas eluentes o ácido acético 15% (para a pesquisa dos flavonósidos) e *n*-butanol/acetona/tampão fosfato pH 5 (4:5:1) para a pesquisa das oses.

3.6.5.3. Espectros de Ultravioleta

O espectro de absorção no UV/visível dos derivados flavonóides permite-nos identificar o tipo de flavonóide e o seu padrão de oxigenação. Adicionalmente, para um dado flavonóide, a presença na genina de hidroxilos fenólicos não substituídos pode ser determinada pela adição de reagentes (ditos de "shift") e observando as alterações resultantes nos picos de absorção (Markham, 1982).

Os padrões foram dissolvidos em metanol e o seu espectro registado contra um branco do mesmo solvente. No caso dos compostos isolados por cromatografia em camada fina ou cromatografia em papel Whatman nº3, o espectro foi registado contra brancos preparados nas mesmas condições dos ensaios. Para o registo dos espectros na presença dos reagentes de "shift" seguimos a técnica descrita por Mabry *et al.* (1970). O espectro em metóxido de sódio foi registado imediatamente após a adição de III gotas da solução stock deste reagente à mesma solução usada para registar o espectro em metanol. Após 5min registámos o espectro novamente para verificar se havia decomposição do flavonóide. O espectro em cloreto de alumínio foi registado imediatamente após a adição de VI gotas da solução stock deste reagente a 2-3ml da solução stock do flavonóide em análise. À solução resultante do passo anterior foram adicionadas III gotas de solução stock de ácido clorídrico e imediatamente registado o

espectro AlCl_3/HCl . O espectro em acetato de sódio (NaOAc) foi registado até dois minutos após adicionar à cuvette contendo 2-3ml da solução stock do flavonóide, NaOAc anidro em pó em excesso de modo a ficar uma película com cerca de 2mm no fundo da cuvette. Um segundo espectro foi registado 5-10 min depois para verificar se havia decomposição do flavonóide em estudo.

3.6.5.4. Espectros de ressonância magnética nuclear

Os espectros dos compostos isolados durante este trabalho bem como dos respectivos hidrolisados (dissolvidos em 600 μL DMSO-d_6), foram registados num espectrómetro Varian Unity-500 usando uma detecção reversa a 5mm (^1H -RMN, HMBC e COSY) e uma sonda de banda larga de 5mm (^{13}C -RMN), usando TMS como padrão interno a 30°C.

Capítulo I

Estudos fitoquímicos

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização das infusões e dos respectivos liofilizados

A caracterização química dos extractos submetidos a ensaios farmacológicos é um dos aspectos fundamentais na avaliação da actividade farmacológica das plantas medicinais. Por um lado temos a variabilidade natural do teor de metabolitos secundários nas plantas de uma mesma espécie, que está fortemente dependente de factores genéticos e ambientais. Por outro lado, temos as condições específicas em que é feita a colheita e o processamento do material vegetal que podem afectar de um modo decisivo o teor de constituintes relevantes para uma dada actividade farmacológica.

Assim, mesmo com uma correcta caracterização botânica da espécie em estudo e uma descrição detalhada das condições em que são obtidos os extractos submetidos a ensaios farmacológicos, a comparabilidade dos resultados estará comprometida se não for feita uma caracterização qualitativa e quantitativa dos extractos em estudo.

A possibilidade de comparar os resultados obtidos no decurso deste trabalho com os resultados de outros autores é um aspecto importante a considerar no *design* experimental do trabalho mas, igualmente importante, é poder garantir a comparabilidade das diferentes séries de resultados obtidos, com um determinado extracto, num ensaio realizado em tempos diferentes. Refira-se apenas, a título de exemplo, que a degradação de alguns constituintes, que em alguns casos se verifica com relativa facilidade mesmo nas condições ideais de armazenamento, pode originar diferenças significativas na composição de extractos preparados em momentos diferentes, ainda que estes sejam obtidos

exactamente do mesmo modo, com reflexos óbvios nos resultados dos ensaios farmacológicos. Assim, no contexto do *screening* neurofarmacológico preliminar que se realizou, pretendeu-se estabelecer o perfil cromatográfico das infusões preparadas com as diferentes plantas, de modo a poder verificar a equivalência dos extractos preparados ao longo do tempo necessário para a realização do ensaio de *screening*. Mesmo sem uma identificação completa dos constituintes presentes, a determinação dos perfis cromatográficos e o espectro de absorção UV dos principais constituintes (Fig. 4.1a, b, c, d) permitia identificar os principais tipos de estruturas presentes e, não só verificar a conservação dos extractos ao longo do tempo do ensaio, mas também aferir em que medida a liofilização das infusões alterava o teor dos principais constituintes.

Da análise dos espectros UV dos principais constituintes detectados no cromatograma de cada uma das espécies consideradas, feita segundo Campos e Markham (2007), pudemos retirar algumas conclusões relativamente ao tipo de estruturas encontradas.

A *Melissa officinalis* L. para além do óleo essencial que não faz parte do nosso estudo, contém como principais constituintes descritos os ácidos hidroxicinâmicos (ácidos rosmarínico, *p*-cumárico, *m*-cumárico, cafeico e clorogénico) e diversos flavonóides, tais como, eriodictiol-7-*O*-glucósido, hesperidina, hesperitina, naringina, naringenina, apigenina-7-*O*-beta-D-glucopiranosido, luteolina, luteolina 7-*O*-beta-D-glucuronopiranosido, luteolina-7-*O*-beta-D-glucopiranosido, luteolina-3'-*O*-beta-D-glucuronopiranosido, luteolina-7-*O*-beta-D-glucopiranosido-3'-*O*-beta-D-glucuronopiranoside (Carnat *et al.*, 1998; Gracza e Ruff, 1984; Lamaison *et al.*, 1991; Agata *et al.*, 1993; Thieme e Kitze, 1973; Mulkens e Kapetanidis, 1987; Heitz *et al.*, 2000; Patora e Klimek, 2002; Dastmalchi *et al.*, 2007), caempferol, quercetina e quercitrina (Monografia ESCOP, Bruneton 1995).

Na Fig. 4.1a), respeitante aos constituintes fenólicos detectados no infuso, podemos ver que os espectros 1, 2, 5, 7, 8 e 10, correspondem a derivados do ácido cinâmico, o que se enquadra com a informação bibliográfica sobre os constituintes desta planta (WHO, 2002), embora nenhum dos espectros confira com os ácidos *p*-cumárico e/ou *m*-cumárico que absorvem a $\lambda_{\text{máx.}}=293\text{sh},308\text{nm}$ e a $233\text{sh},274,320\text{sh}$ respectivamente. O constituinte maioritário, 5, tem um espectro UV e um tempo de retenção similar ao do ácido rosmarinico. Sendo que o 8 poderá ser um seu derivado.

No entanto, os constituintes 1 e 2 apresentam um perfil UV similar aos ácidos clorogénico ($\lambda_{\text{máx}} = 245\text{sh}, 296\text{sh}, 323 \text{ nm}$) e cafeico ($\lambda_{\text{máx}} = 239\text{sh}, 296\text{sh}, 323 \text{ nm}$), respectivamente, embora os seus tempos de retenção não coincidam em absoluto com estes padrões. No caso do composto 1 o espectro e o t_R são muito próximos do ácido clorogénico; por sua vez, o ácido ferulico, derivado 3-*O*-metil do ácido cafeico corresponde ao espectro e tempo de retenção do constituinte em 2.

Os espectros 3, 4, 6 e 9 têm um comportamento no ultravioleta que os enquadra mais em estruturas de compostos polifenólicos do tipo di-hidroflavonoide ou flavona, uma vez que se desdobram em dois picos de absorção, sendo que a banda I não vai além de 335nm em nenhum deles, descartando desta forma a possibilidade de encontrarmos flavonas como a luteolina livre e o seu 7-*O*-beta-D-glucopiranosido que absorvem a $\lambda_{\text{máx.}}= 253, 267\text{sh}, 292\text{sh}, 350$ e $\lambda_{\text{máx.}}= 254, 267\text{sh}, 348\text{nm}$, respectivamente.

O constituinte 3 tem um perfil UV ($\lambda_{\text{máx.}}= 275, 324 \text{ nm}$) que embora próximo dos di-hidroflavonoides não corresponde aos espectros do eriodictiol ($\lambda_{\text{máx}} 287, 333\text{sh nm}$), hesperidina ($\lambda_{\text{máx}} 284, 327\text{sh nm}$) ou naringenina ($\lambda_{\text{máx}} 289, 326\text{sh nm}$), cuja presença foi já reportada nesta espécie (Dastmalchi *et al.*, 2007). Os máximos de absorção dos ácidos *m*- e *o*-cumárico são idênticos, embora no último caso o sh a 320 nm seja melhor definido que no *m*-cumárico, o que se

aproxima mais do espectro obtido neste caso do pico 3 mas, considerando o t_R , seria provavelmente um derivado deste ácido.

Os compostos 4 e 9 apresentam um espectro UV que tem uma banda II com um $\lambda_{\text{máx}}$ 285 próximo das flavonas 6-OH.

As bandas II e I do constituinte 6 enquadram-se no perfil UV da apigenina ($\lambda_{\text{máx}}$ 269 e 334nm). A análise de diferentes espectros retirados deste pico sugerem que este se pode encontrar contaminado, provavelmente com o constituinte maioritário 5, o que poderá explicar a absorção a 286nm. As glucuronações em C8 também introduzem um "shoulder" correspondente a um banda IIa mas mais próximas de $\lambda_{\text{máx}}$ 295nm.

Nenhum dos espectros é característico de uma absorção UV das estruturas flavonoidicas correspondentes aos flavonóis do tipo caempferol, quercetina e quercitrina descritos na bibliografia.

Na *Tilia x europaea* L. encontram-se descritos ácidos fenólicos como o cafeico, clorogénico e *p*-cumárico e vários flavonóides livres e glicosilados como o caempferol, quercetina miricetina, a astragalina e o seu éster 6''-*p*-cumarilo (tilirósido) (Toker *et al.*, 2001).

Na Fig. 4.1b), do infuso da *Tilia x europaea* L., verificamos que os espectros UV dos constituintes 2, 8 e 10 são claramente de ácidos fenólicos e que todos os outros são característicos de um perfil de flavonóis glicosilados em C3, do tipo caempferol, quercetina (banda I a $\lambda_{\text{máx}}$ próximos de 350nm) sendo que 1, 3, 4 e 6 serão também substituídos em C7 (ausência de absorção entre $\lambda_{\text{máx}}$ 290-310nm). Nenhum dos espectros UV se encaixa na absorção da miricetina e/ou seus derivados.

O espectro UV do ácido *p*-cumárico ($\lambda_{\text{máx}}$ 292sh, 310 nm) e o tempo de retenção conferem com o constituinte 2 e o do ácido cafeico com o constituinte 8. Neste ultimo caso, do seu tempo de retenção pode-se inferir que estamos em presença de um derivado deste ácido que não será certamente o ácido clorogénico livre,

uma vez, que sairia a t_R 28.9 e não 42 como é o caso. Tem, no entanto, um espectro UV e um tempo de retenção que confere com o do ácido rosmarinico também encontrado no infuso de *Melissa officinalis* L. O ácido fenólico 10 pode também ser um derivado do ácido cafeico, embora os hidroxilos possam estar substituídos por metilos uma vez que existem dois picos de absorção equivalentes e não um pico predominante e um "shoulder".

O composto 1 apresenta a banda II desdobrada, o que é típico de duas substituições no anel B, e um perfil geral próximo da quercetina, sendo que a maior concavidade observada entre as bandas IIb e IIa, relativamente ao caso da quercetina, sugere que um dos hidroxilos em C4' ou em C3 poderá estar substituído por um grupo metilo. A ausência de banda entre $\lambda_{m\acute{a}x}$ 290-310nm indica uma possível substituição em C7 e a banda I a $\lambda_{m\acute{a}x}$ 352nm é concordante com uma substituição em no hidroxilo em C3. Com esta informação podemos prever que este composto 1 seja uma isoramnetina-3,7-O- substituída ou quercetina-3-O-metil,7-O-derivada.

No caso do composto 3, a presença de apenas um pico de absorção na banda II a $\lambda_{m\acute{a}x}$ 265nm revela um hidroxilo no anel B em C4' típico do caempferol. A ausência de absorção entre 290-310nm indica uma substituição em C7 e a banda I a $\lambda_{m\acute{a}x}$ 345nm é característica do C3 substituído que, dado o t_R , talvez seja apenas uma ose. Assim, o composto 3 parece ser um caempferol 3,7-O- substituído.

O composto 4 apresenta as bandas II e I características da quercetina, com ausência de absorção a $\lambda_{m\acute{a}x}$ 290-310nm. Poderá tratar-se de uma quercetina-3-O-ramnose-7-O- derivada, uma vez que a ramnose torce ligeiramente a molécula induzindo uma alteração no $\lambda_{m\acute{a}x}$ de absorção da banda I e daí a absorção a $\lambda_{m\acute{a}x}$ 348nm.

O composto 5 parece ser similar ao composto 4 apresentando, contudo, outro tipo de ose em C3 e o hidroxilo na posição 7 estará livre.

No caso do composto 6 a absorção a $\lambda_{m\acute{a}x}$ 264, 318 e 343nm é típica de um caempferol 3-O- substituído, e a ausência de absorção a $\lambda_{m\acute{a}x}$ 290-310nm

pressupõe uma substituição na posição 7, talvez esteja próximo da estrutura da astragalina mas 7- substituída. No entanto, a substituição em 6" por um grupo cumaroil, como acontece com o tilirósido não possa ser descartada, uma vez que o perfil de absorção é ligeiramente diferente do que se observa para o caempferol 3-O-glucósido.

O composto 7 poderá ser um derivado de quercetina-3-O- substituída com o 7-OH livre e possíveis substituições nos hidroxilos do anel B e/ou em C6 e/ou em C8 o que resulta na inversão da intensidade de absorção das bandas IIa e IIb face à quercetina.

O espectro do constituinte 9 é típico de estruturas como o caemferol-3-O-glicosilado, pelo tempo de retenção provavelmente monoglicosilada, sendo que, também neste caso, se verifica um desvio na absorção da banda I para menor comprimento de onda, o que pode indicar a presença de ramnose em C3 e pelo efeito hipocrómico da banda I parece ser o caemferol-3-O-ramnósido.

A maioria dos flavonóides identificados nos extractos alcoólicos do *Hypericum perforatum* L. são derivados glicosilados da quercetina (Dias *et al.*, 1992) nomeadamente hiperósido, rutina, isoquercitrina, quercitrina (Nahrstedt e Butterweck, 1997), quercetina-3-O-xilósido (Seabra *et al.*, 1992), acetil-rutina (Silva *et al.*, 2005), quercetina-3-O-(2"-O-acetil)-beta-D-galactosido, quercetina-3-O-beta-D-glucuronopiranosido (miquelianina), quercetina-3-O- α -L-arabino piranosido (guaijaverina), para além de outros flavonoides como a isoorientina e astilbina (5,7,3',4'-tetrahidroxi-2,3-dihidroflavonol-3- β -O-ramnosido) (Jürgenliemk e Nahrstedt, 2002), a apigenina-7-O-glucósido (Cirak *et al.*, 2007), caempferol-3-rutinósido e ainda o caempferol livre (Berghöfer e Hölzl, 1986), miricetina e luteolina (Schütt e Schulz, 1993).

Na Fig. 4.1c), correspondente aos compostos fenólicos obtidos no infuso de *Hypericum perforatum* L. os espectros dos constituintes 1, 2, 3, 7 e 8 são identificados com ácidos fenólicos e 4, 5 e 6 com derivados da quercetina.

Deixando assim de parte muitos dos constituintes que vêm descritos na bibliografia para os extractos alcoólicos, o faz algum sentido, nomeadamente para o possível aparecimento de geninas do tipo caempferol, miricetina e luteolina. Os derivados da apigenina e da orientina têm também espectros UV muito característicos que em nada se aproximam dos que se encontram no infuso.

Para os constituintes 1, 7 e 8 os espectros aproximam-se aos derivados do ácido cafeico sendo que este último confere com o constituinte 3. O espectro 7 e o tempo de retenção identificam com os do ácido rosmarínico, ou com uma estrutura similar, tal como foi encontrado na *Melissa officinalis* L. e na *Tilia x europaea* L. O composto 2 corresponderá provavelmente ao ácido *p*-cumárico.

Para o composto 4, o tempo de retenção confere com o do hiperósido (quercetina-3-*O*-galactósido). No entanto, absorção a $\lambda_{\text{máx}}$ 290, 310 nm é mais intensa do que o habitual em estruturas deste tipo o que leva a pensar que deve haver mais alguma interferência na absorção. A provável identificação deste constituinte com a quercetina-3-*O*-(2"-*O*-acetil)-beta-D-galactosido não deve ser descartada, embora a inclusão de um grupo acetil no glicósido deve induzir uma alteração no tempo de eluição na coluna.

Para a estrutura a que corresponderá o pico 5, temos claramente uma quercitina-3-*O*-derivada que pelo tempo de retenção não confere com a rutina, nem com a isoquercitrina mas que pode estar próxima de derivados do tipo quercetina-3-*O*-xilósido (Seabra *et al.*, 1992), quercetina-3-*O*-beta-D-glucuronopiranosido (miquelianina), quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosido (guaijaverina) ou mais provavelmente acetil-rutina (Silva *et al.*, 2005), se acaso o local de acetilação interferir no espectro UV a nível da absorção a $\lambda_{\text{máx}}$ 290, 310 nm que aqui nos parece um pouco dubio.

Dos derivados glicosilados da quercetina, não parecem existir mais nenhum em quantidade relevante a não ser o composto 6 que se pode indetificar com a quercitrina. A substituição em C3 com uma molécula de ramnose apresenta,

normalmente um perfil de absorção UV ligeiramente diferente do que ocorre com outras eses o que parece enquadrar-se neste caso.

Genericamente, mesmo apesar de alguma incerteza motivada pela imperfeita separação dos constituintes, podemos afirmar que o tipo de estruturas de flavonóides e ácidos fenólicos detectados corresponde aos dados da bibliografia sobre esta planta. No entanto, não foram detectadas nesta análise espectros UV compatíveis com a estrutura de alguns constituintes relevantes para a actividade farmacológica, como são o caso das biflavonas, hipericinas e hiperforinas. No caso das hipericinas, tal pode dever-se apenas ao facto de este composto ficar retido na coluna dadas as suas características de solubilidade, o que pôde ser obviado através de uma alteração do procedimento cromatográfico, nomeadamente estendendo o período de integração e baixando a polaridade do gradiente na fase final da corrida, o que permitiu detectar a presença de hipericina e pseudohipericina na infusão. No caso das hiperforinas e das biflavonas, mesmo com as alterações referidas estes compostos não foram de todo detectados na infusão.

Na *Passiflora edulis* Sims está descrita a presença de isoorientina e de orientina não se tendo detectado vitexina nem rutina (Pereira *et al.*, 2004), no entanto, outros autores referem a presença de diversos glicósidos de flavonóides, nomeadamente vitexina, saponarina, saponaretina, rutina e quercetina (Lutomski e Malek, 1975), sendo a vitexina e diversos outros flavonóides do tipo C-glicosilflavonas os seus principais constituintes (Lohdefink, 1976). Foram também isolados desta espécie dois C-glicósidos: 6-C-fucosil-luteolina e 6-C-chinovosil-luteolina (Mareck *et al.*, 1991).

Numa análise mais detalhada os espectros apresentados na Fig. 4.1d) verificamos uma ausência de formas similares aos ácidos fenólicos e uma totalidade de espectros correspondentes a prováveis flavonas e/ou flavonóis. Não se tendo detectado vitexina ou quercetina sob a forma livre nem rutina, tal como referido

por outros autores. Quanto à saponarina deveria apresentar um tempo de retenção (t_R) muito próximo da 2''-O-ramnosilvitexina mas como tem um espectro UV distinto, também não confere com nenhum dos constituintes detectados neste infuso. A saponarina (isovitexina) a existir no infuso deveria aparecer depois do composto 8 o que não se verificou.

Para os espectros dos constituintes 2, 4 e 7 temos um perfil similar à apigenina. No entanto, o composto 2 com o tempo de retenção (t_R) 35,76 apresenta uma intensidade de absorção da banda II e I muito equivalente estando mais próximo do espectro tipo vitexina e confere com o do padrão de 2''-O-ramnosilvitexina. Para o 4 o espectro e o tempo de retenção apontam para uma estrutura similar ao 7-O-glucosido da apigenina uma vez que as bandas I e II mantêm o mesmo perfil de absorção mas perdeu-se o ombro entre $\lambda_{m\acute{a}x}$ 290-310 o que sugere uma substituição em C7 como também acontece com o composto 7. De qualquer modo a absorção de 4 e 7 apresenta algumas diferenças. No composto 4 a banda II que apesar de só ter um pico a $\lambda_{m\acute{a}x}$ 267nm parece ter um ligeiro ombro a $\lambda_{m\acute{a}x}$ 252nm o que pode indicar alguma substituição no OH em 4', ao contrário do composto 7 em que o vale $\lambda_{m\acute{a}x}$ 240-260nm se distingue dos anteriores espectros, havendo também ausência do ombro a $\lambda_{m\acute{a}x}$ 290-310nm. Assim, o composto 7, aproxima-se de um 7-O-derivado da apigenina talvez substituído em C8, uma vez que a banda I mostra um efeito hipocrômico relativamente aos mesmos derivados simples da apigenina, para além da aproximação das bandas para $\lambda_{m\acute{a}x}$ 270, 330 como se verifica no caso da 8-hidroxi-apigenina-8-O-glucuronido.

Os compostos 1, 3, 5 e 6 têm espectros que se identificam com derivados da luteolina, sendo que para o 1, o t_R confere com o 8-C-glucósido ou seja com a orientina. AS 6-C ou 8-C-substituições na luteolina como são o caso da isorientina e da orientina induzem uma alteração na intensidade de absorção da banda IIa sendo que no primeiro caso esse efeito se apresenta mais notório. Sendo assim, os constituintes 5 e 6, poderiam ser vistos desta forma e poderemos até especular que se aproximariam de estruturas propostas por

alguns autores como o caso da 6-C-fucosil-luteolina ou 6-C-chinovosil-luteolina (Mareck *et al.*, 1991).

Para o composto 3 existe uma ausência da banda a $\lambda_{\text{máx}}$ 290-310nm o que indica a substituição também em C7.

Por último, o composto 8 confere com o perfil UV do espectro da 7-metilherbacetina-3-O-glicosido (Campos e Markham, 2007; p.100) e dado o t_R poderá ser a 7-O-metilherbacetina-3-O-ramnósido.

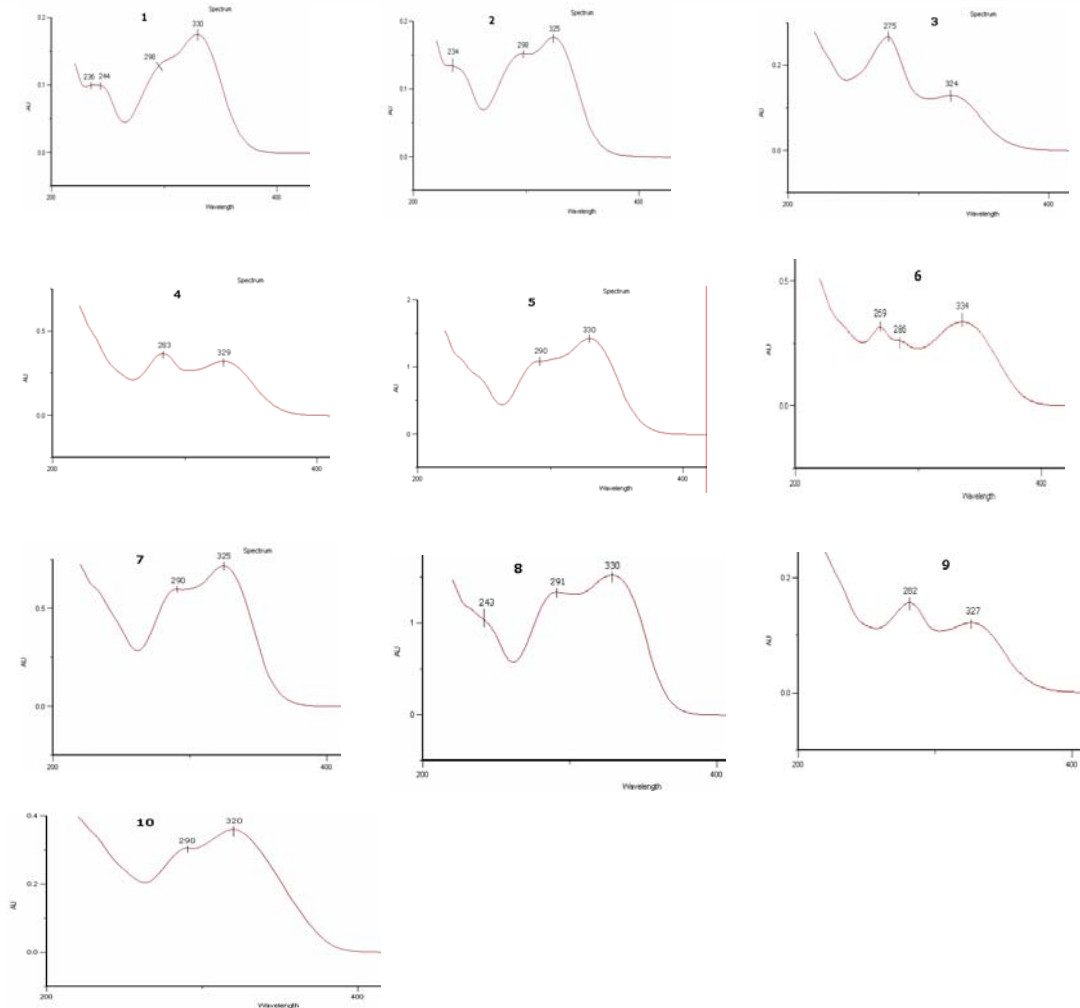
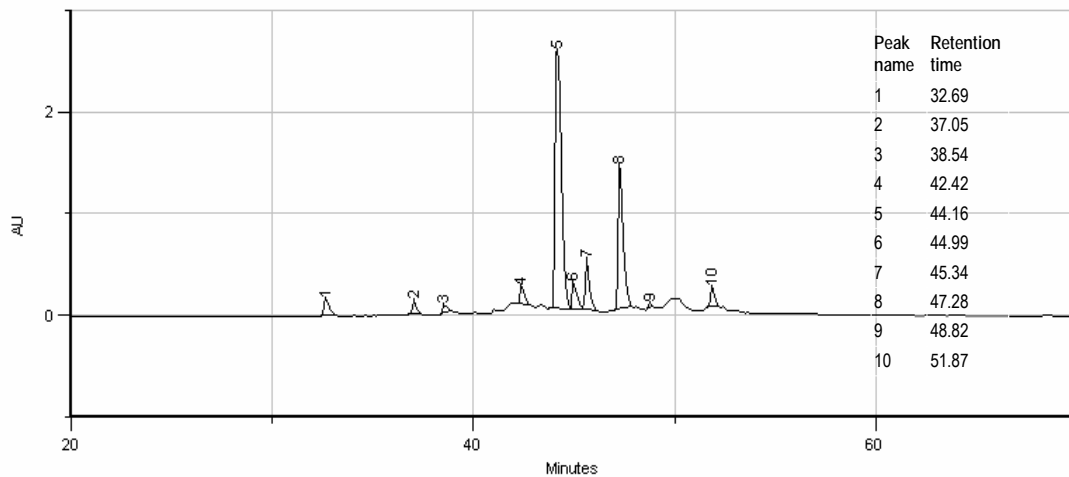


Fig. 4.1a – Perfil cromatográfico das infusões preparadas com *Melissa officinalis* L. e espectros UV dos principais constituintes. Gradiente: água ácida/acetonitrilo; fluxo 0,8ml.min⁻¹; detecção a 340nm; coluna Spherisorb® S5 ODS 2 (250 x 4mm).

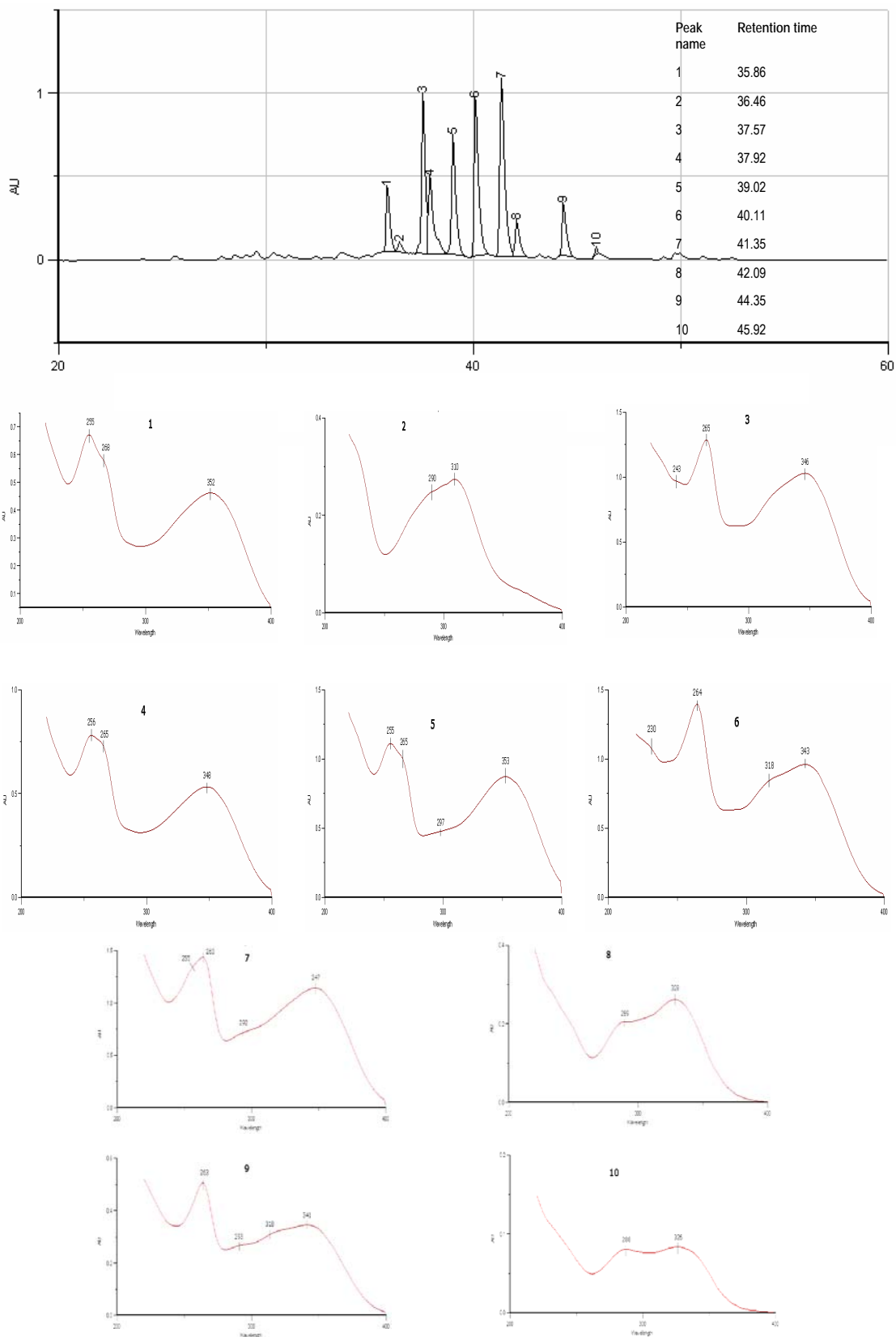


Fig. 4.1b – Perfil cromatográfico das infusões preparadas com *Tilia x europaea* L. e espectros UV dos principais constituintes. Gradiente: água ácida/acetonitrilo; fluxo 0,8ml.min⁻¹; detecção a 340nm; coluna Spherisorb® S5 ODS 2 (250 x 4mm).

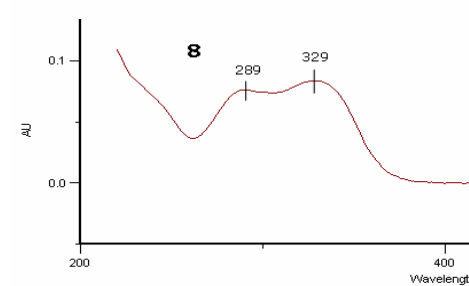
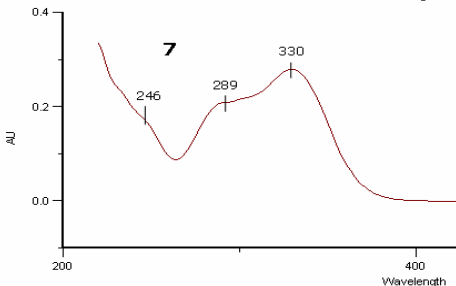
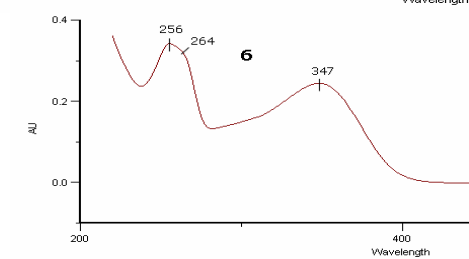
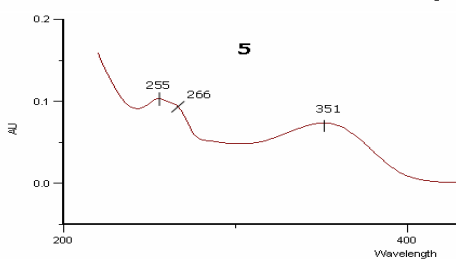
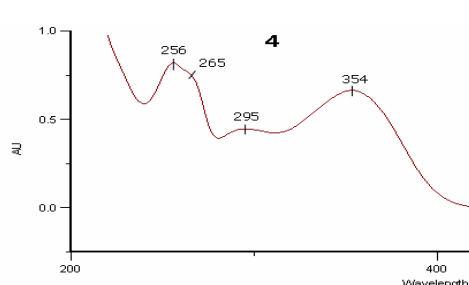
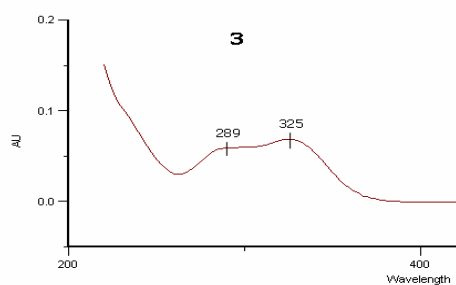
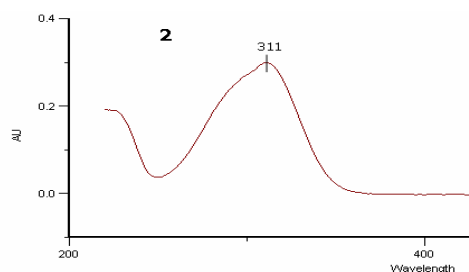
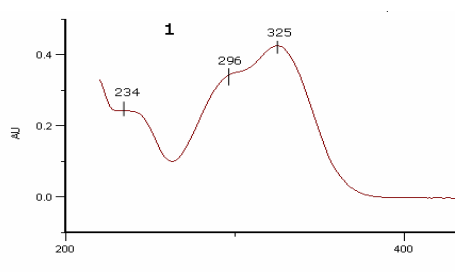
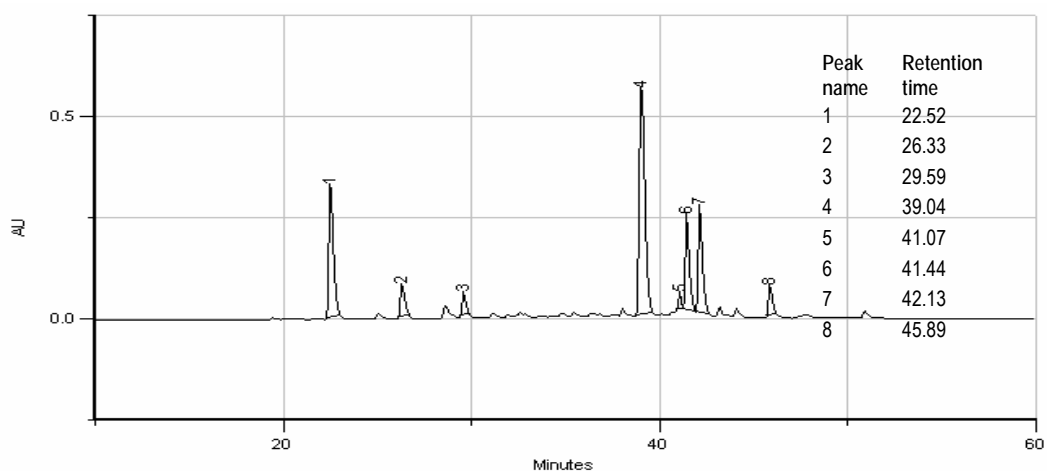


Fig. 4.1c – Perfil cromatográfico das infusões preparadas com *Hypericum perforatum* L. e espectros UV dos principais constituintes. Gradiente: água ácida/acetonitrilo; fluxo 0,8ml.min⁻¹; detecção a 340nm; coluna Spherisorb® S5 ODS 2 (250 x 4mm).

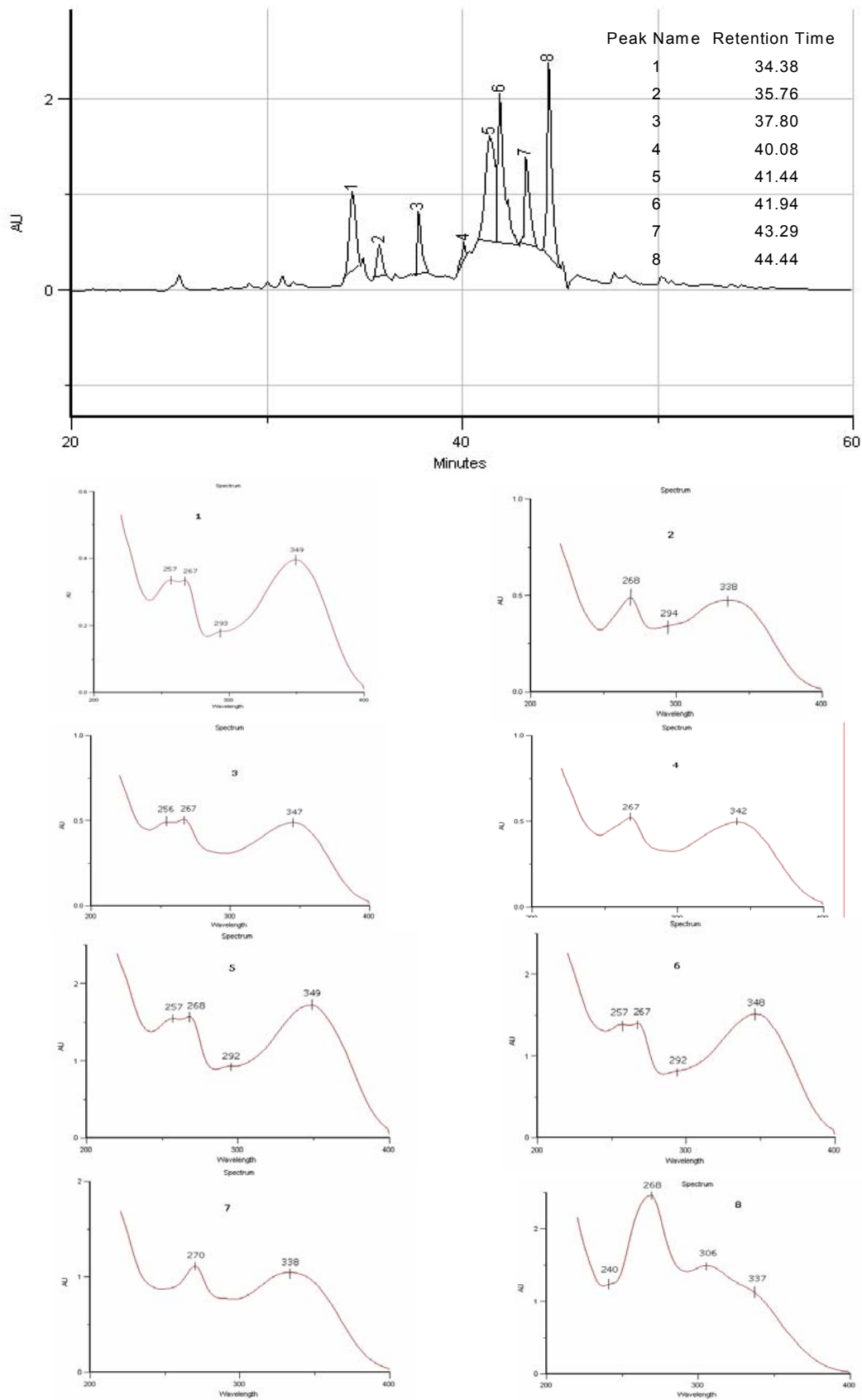


Fig. 4.1d – Perfil cromatográfico das infusões preparadas com *Passiflora edulis* Sims e espectros UV dos principais constituintes. Gradiente: água ácida/acetonitrilo; fluxo 0,8ml.min⁻¹; detecção a 340nm; coluna Spherisorb® S5 ODS 2 (250 x 4mm).

O gradiente utilizado permitiu uma resolução satisfatória dos principais constituintes das infusões de *Melissa officinalis* L., *Tilia x europaea* L. e *Hypericum perforatum* L. Apenas no caso da *Passiflora edulis* Sims não foi possível, com este gradiente, obter uma boa resolução dos principais constituintes. Ainda assim, uma vez que esta resolução se comparava favoravelmente com aquela obtida com outros gradientes utilizados em trabalhos anteriores (Coleta, 1998), e havia alguma vantagem prática em usar o mesmo gradiente para todos os extractos (por exemplo, para a comparação dos tempos de retenção dos vários padrões disponíveis, evitava a injeção de um grande número de padrões em 4 gradientes diferentes), adoptámos o gradiente referido que, no caso do *Hypericum perforatum* L. teve que ser aumentado no tempo de modo a permitir a eluição de constituintes mais apolares que encontramos nesta espécie (hipericinas e hiperforinas, por exemplo), como já referido.

Pudemos verificar que durante o período que durou a realização do screening neurofarmacológico (cerca de 3 meses) não foram detectadas alterações na composição qualitativa e quantitativa dos constituintes de cada um dos liofilizados. Por outro lado, também não foram detectadas diferenças na composição das infusões e dos respectivos liofilizados.

O doseamento colorimétrico dos flavonóides presentes no liofilizado de cada uma das infusões revelou que os extractos que evidenciaram uma maior actividade farmacológica nos ensaios realizados, nomeadamente o *Hypericum perforatum* L. e a *Tilia x europaea* L., foram também aqueles que apresentaram um maior teor de flavonóides, respectivamente $6,1 \pm 0,3\%$ e $5,3 \pm 0,2\%$ (m/m) em equivalentes de rutina. Para a *Passiflora edulis* Sims e *Melissa officinalis* L. os valores obtidos foram de $3,5 \pm 0,1\%$ e $2,9 \pm 0,1\%$ (m/m). No caso do *Hypericum perforatum* L. será importante salientar que na análise do perfil cromatográfico não foi possível detectar a presença de hiperforina, quer na infusão quer no seu liofilizado. Considerando a natureza lipofílica e a instabilidade relativa deste constituinte e o facto de a infusão ser um extracto aquoso, este dado não é muito surpreendente.

Contudo, não deixa de ser relevante a ausência deste constituinte pois a hiperforina é um dos metabolitos secundários presentes na planta em maior quantidade e o principal constituinte lipófilo (2-4,5% do peso seco da planta, Maisenbacher e Kovar, 1992) e vários autores têm defendido o seu envolvimento na acção antidepressiva clinicamente demonstrada para alguns dos seus extractos hidroalcoólicos (Laakman *et al.*, 1998; Zanolli, 2004). Assim, a actividade do tipo ansiolítico/ sedativa evidenciada pela infusão liofilizada de *Hypericum perforatum* L. aponta para o possível envolvimento de outros constituintes na actividade farmacológica desta planta. Por outro lado, e dado que historicamente era à a hipericina que se atribuía a actividade farmacológica dos extractos desta planta, verificámos também que os liofilizados das infusões desta planta possuíam $0,16 \pm 0,01\%$ (m/m) de hipericinas totais.

4.2. Análise fitoquímica de Hypericum perforatum L.

4.2.1 Avaliação preliminar dos principais constituintes presentes na infusão liofilizada de Hypericum perforatum L.

O *Hypericum perforatum* L. será provavelmente uma das plantas medicinais cuja composição química está mais bem estudada. Sendo o seu uso tradicional bastante comum na Europa, o grande interesse na sua potencial utilização clínica durante as décadas de 80 e 90 do século passado despoletou a publicação de inúmeros estudos sobre a sua composição química. Numa revisão da literatura publicada até 1997, haviam sido identificados nesta espécie aproximadamente sete grupos de compostos com actividade biológica (Nahrstedt e Butterweck, 1997). De entre estes, os fenilpropanos, os derivados glicosilados de flavonóides, as biflavonas e as proantocianidinas oligoméricas estão biossinteticamente relacionados e, conjuntamente, são os principais constituintes dos extractos da planta. As xantonas e as naftodiantronas ocorrem, geralmente, em menores quantidades (< 1%) e os floroglucinóis podem exceder os 5% no material vegetal fresco.

Assim, considerando os resultados francamente positivos verificados no *screening* neurofarmacológico da infusão liofilizada de *Hypericum perforatum* L., procedemos a uma avaliação preliminar dos seus constituintes, cujos resultados se encontram resumidos na Tabela 4.2.1a.

Grupo químico pesquisado	UV /visível + revelação	Padrões co-cromatografados	Resultado
Carótenoides	-	β-caroteno	-
Flavonóides	+++	Apigenina Hiperósido (Rf~0,47)	- +
Glúcidos	+	D(+)Galactose D(+)Xilose Maltose D(-)Arabinose D(+)Glucose	? ? ? ? ?
Taninos	+	Ácido gálgico	-
Aminoácidos	+	Prolina Cisteína (Rf ~0,4)	- +
Alcalóides	-	Reserpina e teobromina	-
Ácidos Fenólicos	++	Ácido cafeico (Rf~0,8) Ácido clorogénico (Rf~0,6) Ácido galhico Ácido vanílico	+ + - -
Naftodiantronas	++	Hipericina (Rf~0,25)	+
Floroglucinóis	-	(sem padrão)	(sem padrão)

Tabela 4.2.1a - Avaliação preliminar dos principais constituintes presentes na infusão liofilizada de *Hypericum perforatum* L. por TLC, por observação no UVI visível e revelação.

Confirmou-se a presença neste extracto de diversos constituintes com o comportamento cromatográfico característico de diferentes grupos químicos, nomeadamente, ácidos fenólicos, aminoácidos, taninos, glúcidos, naftodiantronas e diversos tipos de flavonóides. Através dos padrões co-cromatografados foi ainda possível identificar alguns dos constituintes do extracto nomeadamente hipericina, hiperósido, ácido clorogénico, ácido cafeico e cisteína. No entanto, não foi detectada a presença de hiperforina ou de outros floroglucinóis.

4.2.2. Doseamento colorimétrico das hipericinas totais

Segundo a monografia da Farmacopeia Portuguesa VIII (FP VIII) e da American Herbal Pharmacopoeia (AHP) as hipericinas totais são doseadas por um método colorimétrico. Uma vez que partimos de um resíduo liofilizado da infusão, que não deverá conter clorofila (que poderia interferir na determinação), optámos por uma simplificação do doseamento descrito na FP VII. Foram preparadas cinco soluções padrão de hipericina em metanol (0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,005mg/10ml) e registámos a absorvância a λ_{\max} 590nm contra um branco de metanol. Os resíduos dos infusos liofilizados foram retomados em metanol para uma concentração final de 1mg/20ml e submetidos a ultra-sons durante 15 minutos. Após filtração foi lida a absorvância da solução a λ_{\max} 590nm e por interpolação na recta traçada para as diferentes concentrações de hipericina foi determinada a concentração de hipericinas totais. De acordo com os resultados obtidos, a equação da recta de calibração para o doseamento das hipericinas por este método foi:

$$[\text{mM Hipericinas}] = 96.316 (Ab_{S_{590nm}}) + 0.0656$$
$$(R^2 = 0.992)$$

As hipericinas totais doseadas no resíduo do infuso liofilizado usado nos ensaios farmacológicos registaram um valor de $0,16 \pm 0,01\%$ (m/m). Este valor aproxima-se bastante do valor determinado pelo método cromatográfico (ver secção 4.2.4.), somando as áreas correspondentes aos picos da hipericina e pseudohipericina, para a mesma amostra [$0,14 \pm 0,03\%$ (m/m)].

No entanto, aplicando o método colorimétrico acima referido ao resíduo dos extractos etanólicos de diversas amostras (no caso de diversas plantas colhidas durante o ciclo de crescimento da planta)

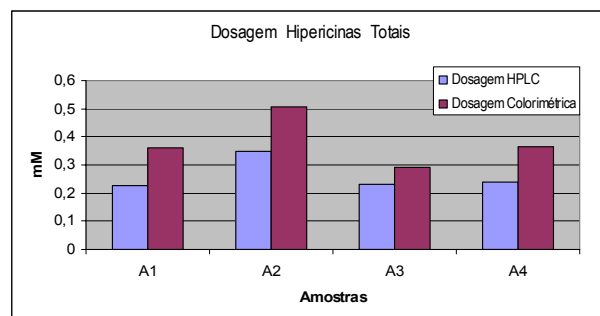


Fig. 4.2.2a: Comparação do doseamento de hipericinas totais pelo método cromatográfico e pelo método colorimétrico

verifica-se que, em média, o valor das hiperquinas totais é cerca de $29,9 \pm 6,8\%$ superior à dosagem feita por HPLC (Fig. 4.2.2a). Esta discrepância poderá ser justificada pela presença no extracto etanólico de clorofilas cuja absorção a λ_{\max} 590nm interfere com esta determinação.

4.2.3. Dosagem, isolamento e estabilidade da hiperforina

A hiperforina é um dos constituintes característicos do *Hypericum perforatum* L. (Monografia AHP). A sua ausência nas nossas preparações poderia ser devida à sua não extracção pelo método seguido ou, considerando que se trata de um composto instável, facilmente oxidável por exposição à luz solar (Örth *et al.*, 1999), poderia verificar-se a sua degradação durante o processamento (secagem, pulverização, armazenamento) do material vegetal. Uma vez que não existia disponível no mercado o padrão puro deste constituinte verificámos, em primeiro lugar, a presença deste composto no nosso material vegetal, partindo de uma extracção com *n*-heptano e tomando como referência os dados da bibliografia sobre o seu espectro UV, tempos de retenção em diferentes sistemas de HPLC e factor de retenção em 2 sistemas de TLC. Seguidamente, procedemos ao isolamento da hiperforina com vista à sua dosagem.

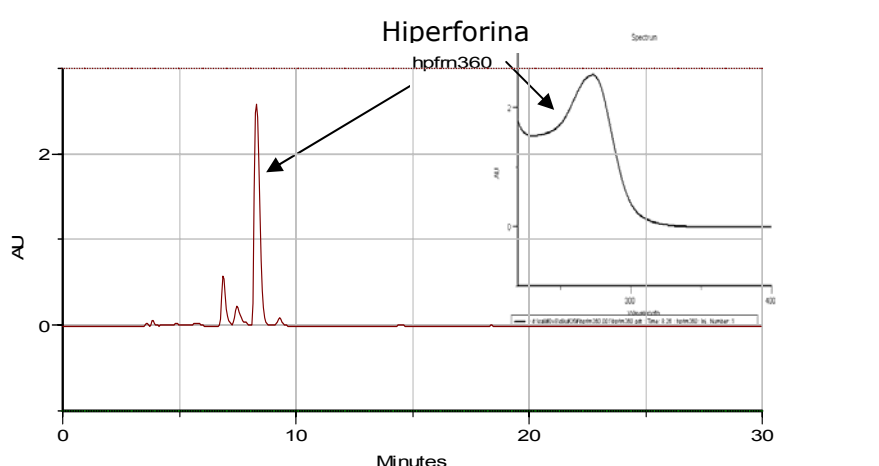


Fig. 4.2.3a: Cromatograma do extracto de *n*-heptano do *Hypericum perforatum* L.. Gradiente II

Da extracção inicial com *n*-heptano resultou, após filtração, uma solução límpida de coloração amarela intensa. Pelo perfil cromatográfico verificámos que o

principal constituinte deste extracto seria a hiperforina (Fig. 4.2.3a), concluindo-se, portanto, que a ausência da hiperforina dos nossos extractos (infusões) liofilizados não estava relacionada com a qualidade do material vegetal.

Após a primeira TLC preparativa com o sistema desenvolvente constituído por *n*-heptano/acetona/*t*-butilmetileter/ácido fórmico 85% (35/35/33/2) foi possível

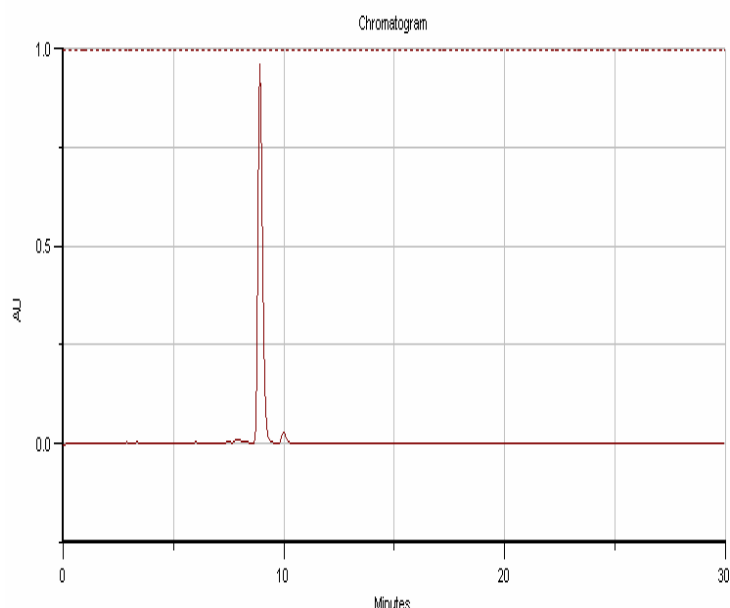


Fig. 4.2.3b - Cromatograma após isolamento da hiperforina. Gradiente II

identificar a banda cujo comportamento cromatográfico correspondia á descrição da literatura e verificar, na análise por HPLC, que a banda destacada continha para além da hiperforina outros constituintes não identificados. Assim, após nova TLC preparativa foi possível isolar novamente a banda com o comportamento característico da hiperforina e verificar que, desta feita, não se detectavam outros constituintes contaminantes (Fig. 4.2.3b).

Procedeu-se ao doseamento da hiperforina recorrendo ao método do padrão interno. Assim, após o isolamento, purificação, desidratação e pesagem da hiperforina obtida a partir dos extractos etanólicos, preparámos uma solução com a concentração de 3,6mg/ml da qual foram preparadas 5 diluições sucessivas dentro da gama de concentrações das soluções extractivas. Cada diluição foi

analisada por HPLC em triplicado e a área do pico obtido em cada análise foi usada para calcular a recta de calibração para este constituinte por regressão linear. De acordo com os resultados obtidos a equação da recta da hiperforina foi:

$$[\text{Hiperforina (mg/ml)}] = 5 \times 10^{-9} (\text{área HPLC}) - 0.014$$
$$(R^2 = 0.988)$$

A hiperforina está presente em quantidades significativas nas flores e folhas de *Hypericum perforatum* L. mas a sua instabilidade, particularmente no caso do material vegetal mal seco, pode fazer com que este teor diminua drasticamente (Zanoli, 2004). A susceptibilidade à luz e à temperatura da hiperforina pura, bem como dos produtos comerciais contendo extractos de *Hypericum perforatum* L., tem sido bastante estudada (Bilia *et al.*, 2002 e Bilia *et al.*, 2001; Orth *et al.*, 1999). A hiperforina pura é susceptível de sofrer transformações oxidativas, sendo bastante sensível à luz e ao calor, quer em pó quer em solução (Örth *et al.*, 1999) e foram já identificados diversos produtos da sua oxidação, nomeadamente furohiperforina (também chamada de orthoformina) (Verotta *et al.*, 1999; Örth *et al.*, 1999), piranohiperforina e desoxihiperforina (Shan *et al.*, 2001; Vajs *et al.*, 2003) entre outros (Trifunovic *et al.* 1998; Verotta *et al.*, 2000).

Quando exposta à luz e ao ar, em solução metanólica, cerca de 90% da hiperforina poderá decompor-se (Gray *et al.*, 2000). No entanto, se protegida da luz, ar e mantida a -20°C, esta poderá manter-se estável durante 8 meses (Örth *et al.*, 1999). De acordo com a literatura, a hiperforina poderá ser estabilizada pela adição de uma pequena quantidade de ácido ascórbico e ácido cítrico à solução, ou por formação de um complexo de inclusão com metil-β-ciclodextrina (Örth e Schmidt, 2000). A adhiperforina, que é um composto homólogo da hiperforina, tem demonstrado uma estabilidade semelhante (Örth e Schmidt, 2000). A instabilidade da hiperforina é devida ao sistema β-dicarbonilo enolizado, uma vez que os derivados naturais sem esta estrutura são estáveis (Verotta *et al.*, 1999 e 2000).

Durante o desenvolvimento da metodologia para o isolamento da hiperforina, fomos também confrontados com este problema e verificámos que o teor de hiperforina nos diversos extractos obtidos se alterava ao longo do tempo. Verificámos ainda que esta degradação era aparentemente mais intensa e acelerada no extracto obtido com *n*-heptano, onde se verificou uma perda do teor de hiperforina superior a 50% em três meses (Fig. 4.2.3c), do que no extracto alcoólico, o que está de acordo com os dados obtidos por outros autores (Orth e Schmidt, 2000).

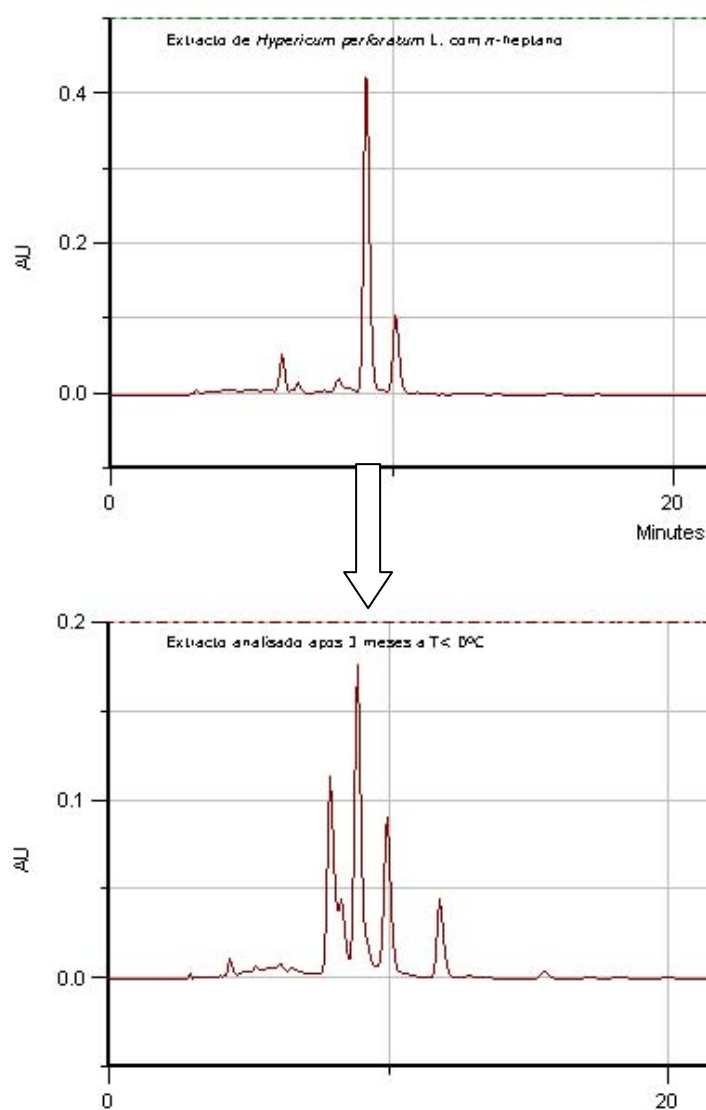


Fig. 4.2.3c: Degradação do extracto de *n*-heptano do *Hypericum perforatum* L. mantido durante 3 meses a $T < 0^{\circ}\text{C}$. Gradiente II.

Por outro lado verificámos também que a degradação era particularmente rápida nas soluções obtidas após extracção das bandas de TLC preparativa. Contudo, trabalhando ao abrigo da luz, sempre que possível em atmosfera de N₂ e armazenando as amostras a -20°C, era possível preservar o teor deste constituinte (i.e, com uma variação de teor dentro da margem de erro do próprio método) durante, pelo menos, 2 dias.

Por último, analisando o teor de hiperforina em extractos etanólicos frescos analisados logo após a colheita e extracção do material vegetal com o respectivo teor, na mesma solução extractiva, após alguns meses de armazenamento em atmosfera de N₂ a -20°C e, ainda, com o teor de hiperforina em extractos etanólicos preparados alguns meses após a colheita do mesmo material vegetal (ver dados na secção 4.2.6.), pudemos verificar que a hiperforina se degrada muito mais rapidamente na solução extractiva do que no material vegetal, o que também corrobora os dados obtidos por Orth e Schmidt (2000).

4.2.4. Doseamento de outros constituintes dos extractos etanólicos de *Hypericum perforatum* L.

No caso do doseamento da hipericina, hiperósido, ácido cafeico, amentoflavona e quercitrina nos extractos etanólicos o facto de existirem padrões comerciais disponíveis (e estáveis), dispensou-nos de proceder ao isolamento de cada um destes constituintes para o seu doseamento por HPLC. Assim, usando novamente o método do padrão externo, neste caso preparando 5 diluições dentro da gama de concentrações de trabalho, injectámos cada solução em triplicado no HPLC e a área do pico obtido em cada análise foi usada para calcular, por regressão linear, a recta de calibração de cada constituinte.

De acordo com os resultados obtidos, a equação da recta de calibração para os diferentes constituintes foi:

$$[\text{Hipericina (mM)}] = 3 \times 10^{-9} (\text{área HPLC}) + 0.0198$$
$$(R^2 = 0,989)$$

$$[\text{Hiperósido (mM)}] = 3 \times 10^{-9} (\text{área HPLC}) - 0.0978$$
$$(R^2 = 0,997)$$

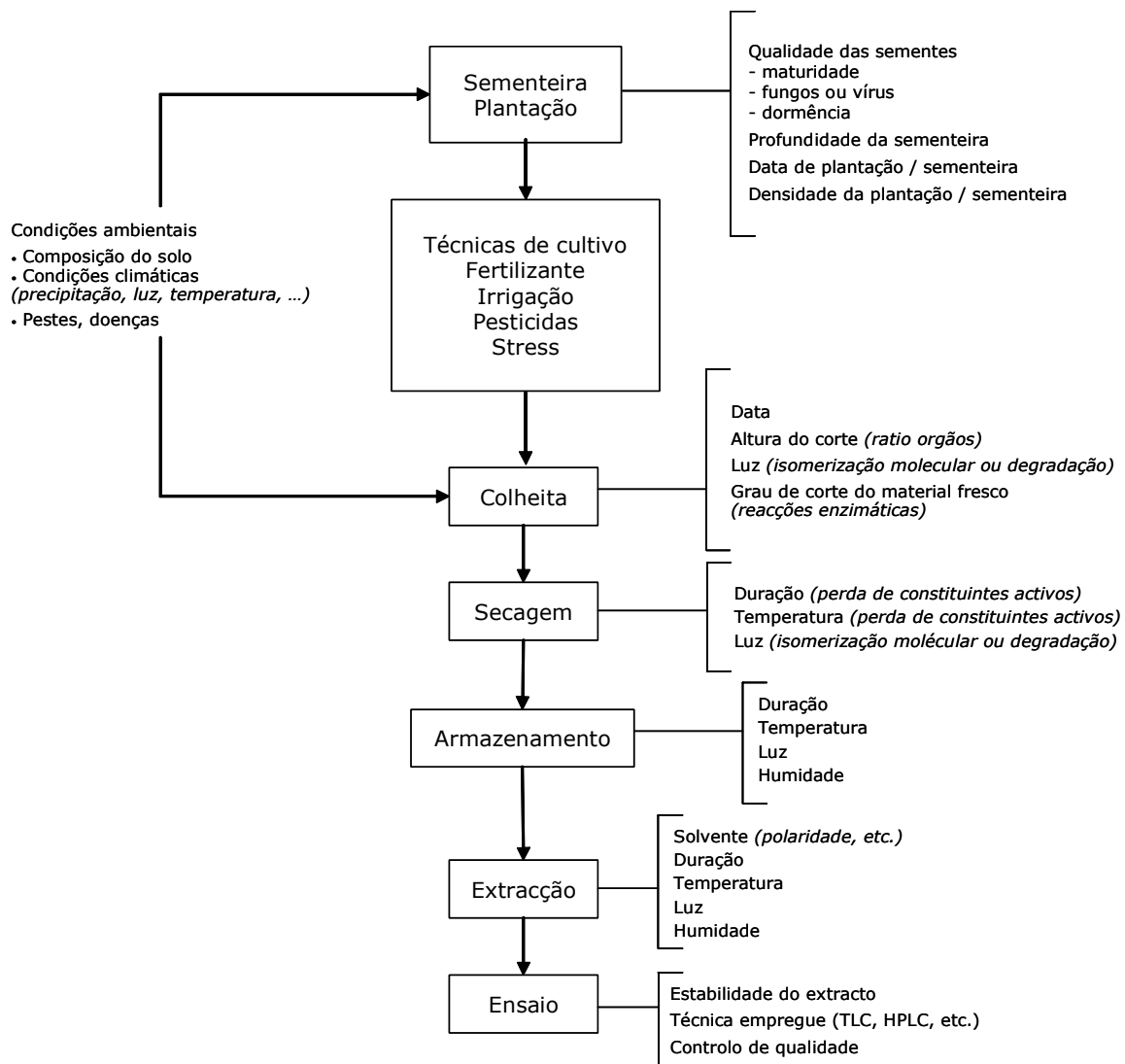
$$[\text{Quercitrina (mM)}] = 5 \times 10^{-9} (\text{área HPLC}) + 0.0091$$
$$(R^2 = 0,997)$$

$$[\text{Amentoflavona (mM)}] = 1 \times 10^{-9} (\text{área HPLC}) - 0.0125$$
$$(R^2 = 0,999)$$

4.2.5. Distribuição dos principais constituintes bioactivos nas partes aéreas do *Hypericum perforatum* L. e ao longo do ciclo vegetativo da planta

O *Hypericum perforatum* L. é uma espécie que apresenta grande variabilidade em vários dos seus caracteres morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. A variação no conteúdo dos seus metabolitos secundários é influenciada por factores ecológicos, fisiológicos e genéticos (Poutaraud e Girardin, 2005; Kosuth *et al.*, 2003).

De acordo com a indicação tradicional, devem colher-se as sumidades floridas durante o período da floração e, tipicamente, estas deverão conter uma mistura de flores e de rebentos. Os teores dos principais constituintes bioactivos dependerão, portanto, do *ratio* dos principais órgãos da planta presentes nas amostras utilizadas na preparação do extracto mas, também, de outros factores como a colheita, métodos de processamento do material vegetal, humidade, etc. Os factores que podem interferir com o conteúdo dos constituintes bioactivos foram resumidos na Fig. 4.2.5a.



(Fig. 4.2.5a: Factores que podem afectar o rendimento e o teor de constituintes activos em *Hypericum perforatum* L. Adaptado de Poutaraud e Girardin, 2005)

Assim, pretendemos com este estudo, avaliar a evolução dos teores dos principais constituintes ao longo do desenvolvimento da planta, bem como a sua distribuição nas diferentes estruturas no momento da floração, de modo a poder aferir, para cada um desses constituintes, qual a influência que o momento da colheita e o *ratio* das diferentes partes da planta usadas poderia ter no teor dos extractos em estudo.

Com a metodologia extractiva seguida pretendeu-se apenas replicar o tipo de extracção que origina os extractos mais vulgarmente usados. Contudo, será importante referir que esta metodologia não permite garantir uma extracção

quantitativa de todos os principais constituintes presentes, pelo que a assumpção teórica de um coeficiente de extracção de 100%, usada nos cálculos para determinação da percentagem desses constituintes no peso seco da planta, poderá, em alguns casos, originar um valor significativamente inferior ao real e diferente daqueles referidos por outros autores.

Constituinte	Planta 1 % (m/m)	Planta 2 % (m/m)	Planta 3 % (m/m)	Planta 4 % (m/m)	Planta 5 % (m/m)
Hipericina	0,07±0.003	0,05±0.001	0,09±0.007	0,15±0.007	0,19±0.008
Pseudohipericina	0,08±0.004	0,51±0.006	0,28±0.001	0,19±0.002	0,32±0.003
Hipericinas totais	0,15±0.003	0,56±0.006	0,37±0.007	0,34±0.01	0,51±0.01
Hiperforina	0,75±0.01	2,30±0.07	2,90±0.04	3,30±0.06	4,40±0.2
Adhiperforina	0,20±0.002	0,60±0.004	0,70±0.04	0,70±0.03	0,50±0.07
Hiperforinas totais	0,96±0.01	2,90±0.08	3,60±0.08	4,00±0.09	4,90±0.3
Rutina	2,06±0.02	1,58±0.01	2,11±0.1	3,24±0.08	2,41±0.06
Hiperósido	Nd	Nd	Nd	Nd	1,63±0.01
Quercitrina	0,20±0.01	0,30±0.006	0,75±0.01	1,13±0.02	Nd
Isoquercitrina	Nd	Nd	0,21±0.003	1,11±0.08	0,97±0.002
Total de flavonóides (rutina)	2,60±0.02	1,88±0.01	3,07±0.1	5,48±0.2	5,30±0.08
13,118-biapigenina	Nd	Nd	Nd	Nd	0,16±0.003
Total biflavonóides	Nd	Nd	Nd	Nd	0,16±0.003
Ácidos fenólicos totais (ácido clorogénico)	1,40±0.08	0,60±0.009	2,70±0.1	2,30±0.03	2,40±0.01

Tabela 4.2.5a: Evolução do teor dos principais constituintes nas partes aéreas de *Hypericum perforatum* L. (folha + flor + caule), ao longo do crescimento da planta. Amostras colhidas após a germinação (Planta 1) com um intervalo de aproximadamente 5 semanas (Planta 5 = floração).

Constituinte	Folha % (m/m)		Flor % (m/m)		Caule % (m/m)
Hipericina	0,11±0.004		0,35±0.02		0,005±0.0001
Pseudohipericina	0,16±0.01		0,38±0.01		0,005±0.0006
Hipericinas totais	0,27±0.01		0,71±0.03		0,007±0.0006
Hiperforina	2,46±0.06		4,32±0.2		0,09±0.001
Adhiperforina	0,13±0.005		1,18±0.1		0,01±0.004
Hiperforinas totais	2,63±0.07		5,54±0.3		0,10±0.005
Rutina	2,78±0.1		2,70±0.02		0,08±0.003
Hiperósido	Nd		1,91±0.01		Nd
Quercitrina	0,38±0.009		0,12±0.01		0,03±0.005
Isoquercitrina	0,25±0.002		0,08±0.007		0,03±0.001
Quercetina	0,32±0.004		0,71±0.001		0,10±0.007
Total de flavonóides (rutina)	3,73±0.1		5,52±0.04		0,24±0.01
13,118-biapigenina	Nd		0,18±0.004		Nd
Amentoflavona	Nd		0,04±0.002		Nd
Total biflavonóides	Nd		0,22±0.006		Nd
Ácidos fenólicos totais (ácido clorogénico)	2,76±0.07		0,70±0.003		0,07±0.004

Tabela 4.2.5b: Percentagem média dos principais constituintes de *Hypericum perforatum* L. nas folhas flores e caule, doseadas no período de floração.

Flavonóides

No caso das plantas cultivadas no decurso do nosso trabalho, verificou-se que o teor dos flavonóides atingiu os valores mais elevados ainda antes do período da floração (5,48%), não diferindo este valor significativamente do teor medido

durante a floração (5,3%). A concentração de flavonóides nas diferentes partes das plantas colhidas durante a floração, considerando em agregado os principais flavonóides doseados, foi significativamente superior nas flores (5,52% vs. 3,73% nas folhas).

Qualitativamente verificaram-se também diversas diferenças significativas, quer ao longo do crescimento das plantas, quer entre as diferentes partes aéreas da planta florida. A rutina foi identificada como o flavonóide maioritário durante o crescimento da planta (1,6-3,2%), atingindo o teor máximo ainda antes da floração, período em que a sua distribuição nas folhas e flores não foi significativamente diferente. O hiperósido foi detectado apenas durante o período de floração, acumulando-se somente nas flores (1,91%), enquanto outros autores (Maksyutina e Koget, 1971) referem a sua presença também nas folhas e até no caule. A quercitrina foi detectada ao longo do ciclo de vida da planta, atingindo valores máximos antes da floração (1,13%) e acumulando predominantemente nas folhas (0,38%) durante o período de floração. A isoquercitrina, embora não tenha sido detectada nas plantas colhidas durante as primeiras fases do desenvolvimento, também atingiu valores máximos antes da floração (1,11%), acumulando-se fundamentalmente nas folhas (0,25%) durante a floração. A quercetina foi detectada apenas na planta florida e, embora outros autores (Smith *et al.*, 1996) tenham referido que a sua acumulação (0,1-0,5%) ocorre nas folhas, no nosso caso ocorreu principalmente na flor (0,71%), tal como indicado por Benigni *et al.* (1971). Segundo alguns autores (Nahrstedt e Butterweck, 1997), a presença de quercetina livre poderá ser originada pela hidrólise dos seus glucósidos durante a secagem e processamento.

A concentração de flavonóides atinge valores mais elevados durante a floração (Cirak *et al.*, 2007; Tsitsina, 1969), embora existam indicações divergentes sobre se os valores mais elevados são atingidos nas flores (Tsitsina, 1969) ou nas folhas (Cirak *et al.*, 2007). Não obstante, no estudo que realizámos, os valores mais elevados foram atingidos ainda antes da floração e, quantitativamente, não

se alteraram significativamente quando esta ocorreu, isto apesar de se verificarem alterações qualitativas significativas e de, globalmente, o teor de flavonóides ser mais elevado nas flores do que nas folhas. Apesar de não existir muita informação detalhada sobre o teor dos diversos flavonóides durante o processo de desenvolvimento da planta (daí uma das razões porque considerámos pertinente realizar este trabalho), existe abundante informação sobre o teor destes compostos na planta florida, com indicações que a concentração destes compostos pode variar de 2-4% (Nahrstedt e Butterweck, 1997) até mais de 10% (Tsitsina, 1969). As diferenças verificadas no teor individual de alguns flavonóides (hiperósido por exemplo; Hänsel *et al.*, 1993), face ao trabalho de outros autores, reflectem não apenas aspectos metodológicos, mas também a influência específica de factores genéticos, ecológicos e ambientais (Pietta *et al.*, 2001; Martonfi *et al.*, 2001). Independentemente destas diferenças, parece-nos claro que o teor de flavonóides atinge o seu valor máximo ainda antes do período de floração, contudo, no processo de floração ocorre uma significativa alteração na composição qualitativa [que no decorrer da floração se transforma também numa alteração quantitativa (Tekel'ova *et al.*, 2000)], com uma alteração no teor relativo dos diferentes flavonóides e da sua distribuição nas diferentes partes aéreas, cuja relevância para a actividade farmacológica da planta é desconhecida.

Biflavonas

Estes compostos foram detectados apenas na planta florida e exclusivamente nas flores. A I3,I18-biapigenina foi detectada na amostra preparada com sumidades floridas (0,16%) e também na flor (0,18%), enquanto que a amentoflavona (0.04%) foi detectada apenas na amostra preparada com flores. Estes compostos não foram identificados na folha nem no caule. Os dados obtidos sugerem que estes compostos ocorrem apenas nas estruturas da flor e estão em concordância com os resultados de outros autores (Berghöfer e Hölzl, 1987).

Considerando que estes compostos poderão ser importantes para a actividade farmacológica da planta (Baureithel *et al.*, 1997), os nossos resultados realçam a importância da colheita da planta ser feita apenas a partir do momento da floração, de modo a assegurar a sua presença no fármaco.

Naftodiantronas

As chamadas hipericinas (hipericina e pseudohipericina) acumulam-se em estruturas morfológicas especializadas (glandulas) que ocorrem nas folhas desde as primeiras fases do desenvolvimento e durante a floração expandem-se a todas as estruturas da flor (Kosuth *et al.*, 2003). Dependendo do estado de desenvolvimento das plantas o teor destes compostos pode oscilar entre 0,03-0,3% (Brantner *et al.*, 1994). As variedades com folha estreita, com um número elevado de glândulas oleosas translúcidas (6.2 por mm), apresentam concentrações mais elevadas de hipericina do que as variedades de folha larga (2.2 glândulas por mm) (Southwell e Campbell, 1991). A hipericina e pseudohipericina diminuem rapidamente após a floração e depois da polinização ocorrer (Brantner *et al.*, 1994). Pensa-se que estes compostos estejam envolvidos nos mecanismos de defesas da planta, pois o seu teor pode ser aumentado em resposta à indução química ou biótica (Sirvent e Gibson, 2002).

Nas plantas cultivadas durante o nosso estudo a hipericina esteve presente desde as primeiras fases de desenvolvimento das partes aéreas da planta (0,05-0,15%) e atingiu os valores máximos durante a floração (0,19% nas sumidades floridas e 0,35% na flor). A pseudohipericina também esteve sempre presente, numa proporção superior à hipericina embora, curiosamente, o seu teor máximo (0,51%) tenha sido registado logo na segunda amostra colhida, portanto, ainda nas fases iniciais do desenvolvimento. A sua distribuição nas diferentes partes aéreas durante a floração parece ser idêntica à da hipericina. Os teores registados para ambos os compostos estão de acordo com os registados por outros autores (Poutaraud e Girardin, 2004) e confirmam a indicação tradicional

para que a colheita se processe no momento da floração. A sua presença desde as primeiras fases de desenvolvimento tem sido explorada por diversos autores na tentativa de desenvolver processos alternativos para a maximização da produção destes metabolitos (Zobayed e Saxena, 2004).

Ácidos Fenólicos

A concentração de ácidos fenólicos, que aumenta gradualmente ao longo do ciclo vegetativo da planta, é mais elevada durante o período da floração e é equivalente nas folhas e flores (Brantner *et al.*, 1994). No entanto, no caso das plantas cultivadas durante este estudo, o teor máximo de ácidos fenólicos medidos em equivalentes de ácido clorogénico (2,7%) foi atingido ainda antes do período de floração. Durante a floração, apesar de o teor de ácidos fenólicos ter sido ligeiramente mais elevado nas folhas do que nas flores, esta diferença não foi significativa. Como seria expectável o teor de ácidos fenólicos detectado no caule foi significativamente inferior às folhas e flores.

Floroglucinóis

Os principais floroglucinóis detectados nas plantas cultivadas foram a hiperforina (0,75-4,4%) e a adhiperforina (0,2-0,7%). Apesar de referências bibliográficas mais antigas referirem que estes ocorrem exclusivamente nas flores e fruto (Maisenbacher e Kovar, 1992), estudos mais recentes demonstraram que estes compostos estão presentes também nas folhas, embora em concentrações mais baixas (1,5%) (Sirvent *et al.*, 2003) e que estão presentes desde as primeiras fases do desenvolvimento da planta (Kosuth *et al.*, 2003), tendo sido inclusivamente detectados em tecidos indiferenciados em culturas *in vitro* (Karppinen *et al.*, 2005). Estes últimos dados conferem com os resultados obtidos que indicam a presença da hiperforina e adhiperforina desde as primeiras fases de desenvolvimento da planta, e atingindo valores máximos apenas durante a floração. A literatura refere que durante a ontogénese da flor o teor de

hiperforina se acumula principalmente no pistilo (Repčák e Mártonfi, 1997), aumenta continuamente de 2,5% nos rebentos mais jovens chegando até 8,5% no fruto imaturo (Tekel'ová *et al.*, 2000), o que confere com os resultados deste estudo.

Para os diferentes grupos de constituintes o teor registado no caule foi sempre significativamente inferior, ou mesmo inexistente (biflavonóides). Assim, um dos aspectos que pode decisivamente influenciar o teor de constituintes activos será a percentagem de caule presente nas misturas que pode diluir os constituintes activos. Alguns autores consideram que, devido a este factor, as sumidades floridas deverão corresponder apenas a 25cm (Tekel'ova, *et al.*, 2000) ou 30cm (Poutaraud e Girardin, 2005) do topo da planta.

Verificou-se igualmente que o momento da colheita pode também alterar significativamente o teor global dos compostos activos, bem como a sua proporção relativa. Os dados obtidos parecem justificar que a colheita da planta se faça apenas durante a floração, pese embora a generalidade dos constituintes eventualmente envolvidos na actividade farmacológica estejam presentes bastante antes do momento da floração, alguns só foram detectados no momento da floração (biflavonóides) e, quase todos, atingiram os níveis mais elevados durante este período. Uma vez que a floração dura cerca de 3-4 semanas e a maturação aproximadamente 3 semanas (Franke *et al.*, 1993), com a hipericina a atingir valores máximos no início da floração seguido de um imediato declínio (Brantner *et al.*, 1994) e a hiperforina a atingir o valor máximo apenas no período de maturação do fruto, parece-nos que para a definição do momento ideal para a colheita terá que ser encontrado um compromisso que reflecta a importância relativa destes compostos na actividade farmacológica.

4.2.6. Preparação de extractos etanólicos de Hypericum perforatum L.

Os principais grupos de constituintes considerados relevantes para a actividade farmacológica são quimicamente bastante diversos, pelo que o solvente ideal a usar na metodologia extractiva deve dar conta dessa diversidade. Numa análise de diferentes sistemas de solventes Avato e Guglielmi (2004) concluíram que para obter uma amostra homogénea representativa de todos os constituintes, com menos produtos de degradação, o solvente ideal seria um solvente polar do tipo do metanol ou etanol. Para além dos extractos etanólicos convencionais já referidos na secção 2.1.2., alguns dos extractos de *Hypericum perforatum* L. referenciados na literatura são extractos metanólicos secos (LI 160S – Dimpfel *et al.*, 1998; WS 5570 – Kasper *et al.*, 2006). Assim, resolvemos estudar comparativamente a eficácia extractiva do metanol, do etanol e de diferentes gradações deste (95, 50, 25%), para os principais grupos de constituintes bioactivos.

Ácidos fenólicos como o clorogénico foram mais eficazmente extraídos com uma solução hidroalcoólica a 50%, enquanto a sua extracção com metanol e etanol puros evidenciou resultados semelhantes. Na extracção da rutina a solução hidroalcoólica a 95% foi mais eficiente seguindo-se metanol puro e só depois o etanol puro. A extracção da quercitrina e da isoquercitrina foi equivalente com metanol e etanol puros que também não diferiram significativamente da extracção com etanol a 95%. Para a quercetina o metanol puro e com etanol a 50% foram os melhores. A amentoflavona apresentou maior rentabilidade extractiva com metanol. A pseudohipericina foi extraída de modo equivalente com etanol 50-100% e metanol puro, enquanto para a hipericina a melhor extracção foi obtida com os álcoois puros, o mesmo acontecendo com a hiperforina.

Com a excepção do ácido clorogénico e da quercetina as soluções hidroalcoólicas a 25 e 50% evidenciaram uma eficiência extractiva inferior às restantes soluções testadas, não parecendo assim justificar-se o seu uso. A solução hidroalcoólica a

95% comparava favoravelmente com o etanol e metanol puro no caso da rutina e equivalia a estas na extracção da quercitrina e hipericinas. No entanto, considerando a eficácia na extracção da amentoflavona e hiperforina, parece haver vantagem em proceder à extracção com metanol ou etanol puros. A eficiência extractiva do metanol não foi significativamente inferior ao etanol para nenhum dos principais constituintes, havendo mesmo vantagem em usá-lo, nomeadamente, na extracção da rutina e da amentoflavona.

O etanol e o metanol apresentaram rentabilidades extractivas semelhantes, pese embora o facto de nos casos da rutina e amentoflavona o 1º ter sido mais eficiente.

Será importante referir que as diferenças registadas carecem de validação e de estudos mais aprofundados, porquanto este estudo pretendeu apenas verificar, por questões de segurança e de disponibilidade dos solventes, se seria possível substituir o metanol pelo etanol na extracção e isolamento de dois dos principais constituintes (hipericina e hiperforina). Em face dos resultados descritos não nos parecem existir, para o efeito pretendido, desvantagens significativas em usar o etanol.

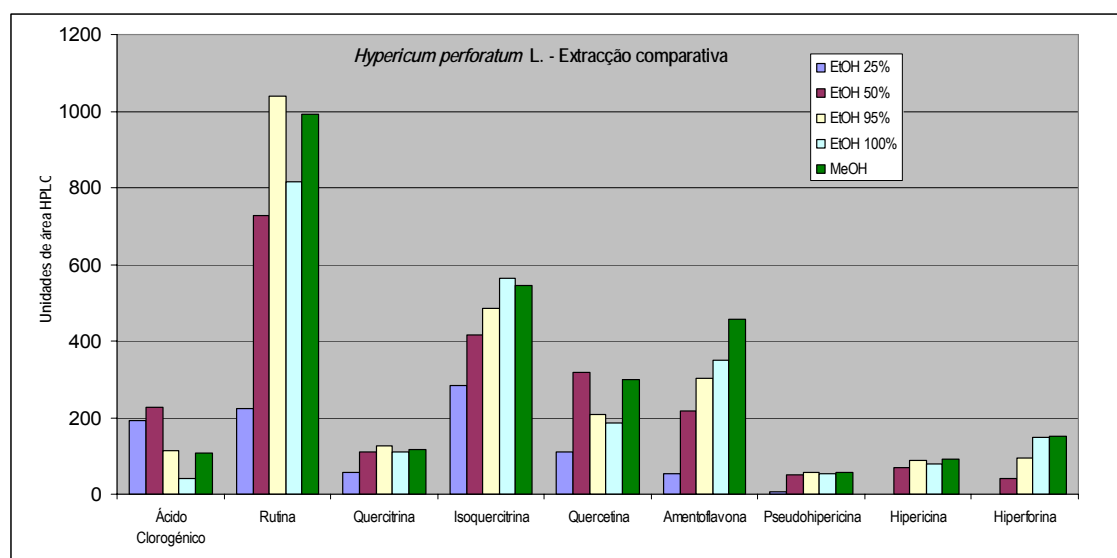


Fig. 4.2.6a: Teores dos principais constituintes obtidos na extracção comparativa de uma amostra de *Hypericum perforatum* L. com diferentes solventes.

4.2.7. Estabilidade da amostra da planta nas condições do laboratório

A estabilidade de diversos extractos etanólicos de *Hypericum perforatum* L. (Bilia *et al.*, 2001; Kopleman *et al.*, 2001), bem como das formulações com eles obtidas (Bilia *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2005), ou de alguns dos seus constituintes isolados (Örth *et al.*, 1999; Wirz *et al.*, 2001), tem sido objecto de múltiplos estudos. Atendendo ao uso generalizado destes extractos em inúmeros países e ao historial do seu uso até na prática clínica convencional (particularmente na Alemanha – Kasper, 1997), não será de estranhar que tenham já sido publicados estudos de estabilidade de acordo com a metodologia preconizada pela “International Conference of Harmonization” (ICH) (Bilia *et al.*, 2001). Segundo estes autores, o armazenamento a 25°C, em contentores de alumínio resistentes à luz, resultou em diferentes prazos de validade (t_{90}) para os diferentes constituintes, nomeadamente, cerca de duas semanas para a hipericina, cerca de três meses para a hiperforina e vários meses, no caso dos flavonóis. Pondo assim em evidência não só a instabilidade relativa dos principais constituintes, mas também da dificuldade de aplicação da metodologia ICH a este tipo de produtos.

A relativa instabilidade de pelo menos dois dos principais constituintes (hiperforina e hipericina) destes extractos foi já abordada noutra secção deste trabalho e, dada a sua relevância para a actividade farmacológica dos extractos, percebe-se que a estabilização destes constituintes se tenha tornado um desafio interessante para a tecnologia farmacêutica e já, entretanto, objecto de alguns registos de patente (US Patent 6280736; European Patent 1345614).

Os dados obtidos por outros autores (Kopleman *et al.*, 2001) sugerem que os extractos hidro-alcoólicos se podem manter ($T < 5^{\circ}\text{C}$; 0% Humidade relativa), ao abrigo da luz e oxigénio, durante um período de cerca de 8 semanas, sem alteração significativa dos constituintes. No caso do liofilizado preparado com as infusões verificámos que, pelo menos, durante um período de cerca de um mês ($T < 0^{\circ}\text{C}$; ao abrigo da luz) não ocorriam alterações significativas. Assim,

conscientes da instabilidade relativa dos principais constituintes nos extractos da planta, e da eventual interferência deste factor nos resultados, procurámos realizar os ensaios farmacológicos com extractos preparados nas duas semanas que antecederam cada ensaio. Contudo, um outro aspecto importante a considerar é a estabilidade dos constituintes no material vegetal pulverizado, que não foi ainda objecto da mesma caracterização acima referida para os extractos e formulações com ele obtidas, mas que naturalmente afectará o teor de constituintes bioactivos dos extractos preparados com o mesmo material vegetal, mas em diferentes intervalos de tempo. Para aferir em que medida é que a instabilidade já referida para os extractos, poderia ocorrer no material vegetal pulverizado, afectando assim os resultados dos ensaios farmacológicos, determinámos o seu teor nos principais constituintes em três momentos diferentes ao longo de um ano, para a mesma amostra de material vegetal armazenada no laboratório a $T < 0^{\circ}\text{C}$ e ao abrigo da luz (Fig. 4.2.7a).

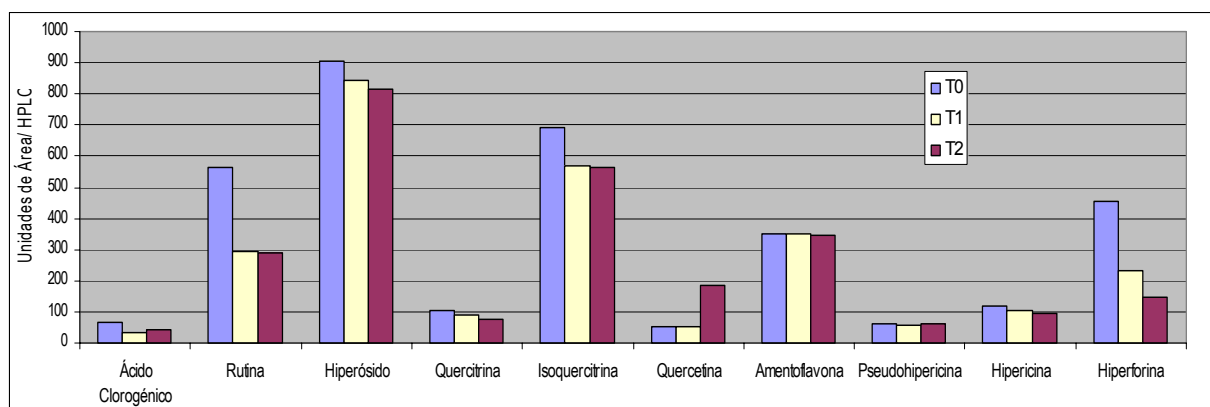


Fig. 4.2.7a: Estabilidade dos principais constituintes na amostra de material vegetal ao longo do período de armazenamento de 1 ano a $T < 0^{\circ}\text{C}$. (T0 = após colheita, T1 = 6 meses, T2 = 1 ano)

Os resultados obtidos revelaram que no final dos primeiros 6 meses (T1) a amostra de material vegetal revelava já diferenças significativas no teor de alguns dos principais constituintes, e particularmente acentuada no caso da hiperforina, rutina e ácido clorogénico. No caso da hiperforina uma diminuição acentuada do seu teor era previsível em face dos dados que dispomos sobre a estabilidade deste constituinte nos extractos e, pese embora a dificuldade de

comparar resultados obtidos em diferentes condições, não nos parecem existir diferenças entre a intensidade da sua degradação no material vegetal, daquela registada por outros autores para o extracto (Bilia *et al.*, 2001).

	Quebra em %	
	T1	T2
Ácido Clorogénico	48,5	36,7
Rutina	47,9	49,0
Hiperósido	6,8	9,7
Quercitrina	12,5	27,7
Isoquercitrina	18,1	18,6
Quercetina	-1,2	-251,7
Amentoflavona	0,3	1,2
Pseudohipericina	1,6	-0,1
Hipericina	8,6	18,2
Hiperforina	48,6	67,6

Tabela 4.2.7a: % de perda dos constituintes ao longo do período de armazenamento (T < 0°C). T1 = 6 meses; T2 = 1 ano

Tendo em conta que a rutina é também apontada como um constituinte importante na actividade farmacológica dos extractos (Nöldner e Schötz, 2002), a sua degradação no curto espaço de tempo foi um dado um pouco surpreendente, uma vez que não existem indicações que esta, em condições idênticas, se possa degradar mais acentuadamente que os restantes flavonóis como o hiperósido que, mesmo após um ano de armazenamento, se mantinha com um teor superior a 90% do valor inicial (Tabela 4.2.7a). A quercitrina e isoquercitrina também se mostraram pouco estáveis e aos 6 meses o seu teor já era inferior a 90% do

valor inicial. Curiosamente os níveis de quercetina aumentaram ao longo do tempo do ensaio, sugerindo que a hidrólise terá sido um dos processos pelo qual diminuíram os teores dos restantes flavonóis, que são na sua maioria derivados da quercetina. Este dado também reforça a sugestão de outros autores (Nahrstedt e Butterweck, 1997) de que a presença de quercetina nos extractos poderá ser devida à hidrólise dos seus heterósidos durante o processamento do material vegetal. O ácido clorogénico também se degradou muito significativamente logo durante os primeiros 6 meses do ensaio. Podendo eventualmente ser um componente importante para a estabilização dos extractos, pela sua capacidade antioxidante (Orth *et al.*, 1999) não existem, no entanto, indicações da literatura que sugiram que a presença deste composto seja relevante para a actividade farmacológica.

A hipericina e a pseudohipericina evidenciaram neste estudo uma estabilidade relativa invulgar. Decorridos os primeiros 6 meses a hipericina mantinha-se com cerca de 92% do teor inicial, registando no final do ano cerca de 82%. Enquanto que a pseudohipericina aparentemente não sofreu degradação significativa até ao final do ensaio. Segundo a literatura publicada a estabilidade destes constituintes em extractos hidro-alcoólicos, pode depender bastante das condições experimentais (temperatura, humidade, luminosidade), variando desde 140 dias ($T < -20^{\circ}\text{C}$; na ausência de luz) (Wirz *et al.*, 2001), 12 semanas ($T = 5^{\circ}\text{C}$ / 0% Humidade relativa), 2 semanas (25°C – guidelines ICH) (Bilia *et al.*, 2001). Apesar da dificuldade de comparar resultados obtidos em condições experimentais diferentes, considerando que o factor crítico parece ser a luz, e comparando apenas com o ensaio a $T < -20^{\circ}\text{C}$ e ausência de luz, verificamos que a estabilidade da hipericina e pseudohipericina aparentemente se deteriora após a sua extracção do material vegetal. Este dado sugere que na matriz vegetal em que se encontram naturalmente, estes compostos estão, de alguma forma, estabilizados (refira-se que estes compostos se acumulam na planta em

estruturas morfológicas especiais) e que ao serem retirados dessa matriz se tornam mais instáveis.

4.3. Análise fitoquímica da *Passiflora edulis* Sims

4.3.1. Extracção e fraccionamento dos flavonóides presentes nas infusões de *Passiflora edulis* Sims

O procedimento descrito para a obtenção da chamada Fracção Flavonóide Total (TFF) da *Passiflora edulis* Sims havia já sido utilizado por nós em outros trabalhos (Coleta, 1998) e, uma vez que esta fracção havia exibido uma actividade do tipo ansiolítico em diversos ensaios farmacológicos, recorreremos ao mesmo procedimento extractivo com vista ao isolamento dos respectivos constituintes.

4.3.1.1. Preparação das infusões

As infusões preparadas apresentavam um resíduo seco variável entre cada preparação, que verificámos situar-se entre 19 e 23mg/ml (n=5). Uma vez que os restantes parâmetros que poderiam afectar o rendimento extractivo (temperatura, tempo, agitação, etc.) foram mantidos constantes, admitimos que esta variação possa ser devida à tenuidade do material vegetal pulverizado. De facto, apesar da calibração do pó ser feita com o tamiz de 20 mesh, abaixo dessa granulometria existirá sempre uma gama de diferentes tamanhos de partículas que, mesmo com homogeneização, poderá variar entre cada toma da amostra e afectar ligeiramente o rendimento da infusão. Não aprofundámos este tópico pois pareceu-nos que o mais relevante seria poder verificar, para o produto de cada infusão, ou processo extractivo, se existiam diferenças significativas na composição qualitativa e quantitativa do resíduo obtido no caso o liofilizado da infusão.

4.3.1.2. Extracção dos derivados flavonóides

Para a monitorização do processo foram sendo realizados vários ensaios ao longo da extracção. Desde logo a comparação entre o perfil cromatográfico da infusão e

do respectivo liofilizado, já referidos noutra secção. Para o liofilizado, o teor de flavonóides determinado pelo método colorimétrico foi de $3,5 \pm 0,1\%$ (m/m) em equivalentes de rutina, tal como já referido na secção 4.1. Após a fixação dos compostos fenólicos com Amberlite XAD-2, determinámos novamente o teor de flavonóides no novo resíduo obtido, bem como o perfil cromatográfico do resíduo obtido para verificar eventuais alterações ocorridas durante o processo. Na comparação dos perfis cromatográficos (Fig. 4.3.1.2a) podemos verificar que existe uma sobreposição completa, pelo que podemos concluir que os principais constituintes são extraídos e que se mantém a sua proporção com um aumento significativo do seu teor no resíduo em análise.

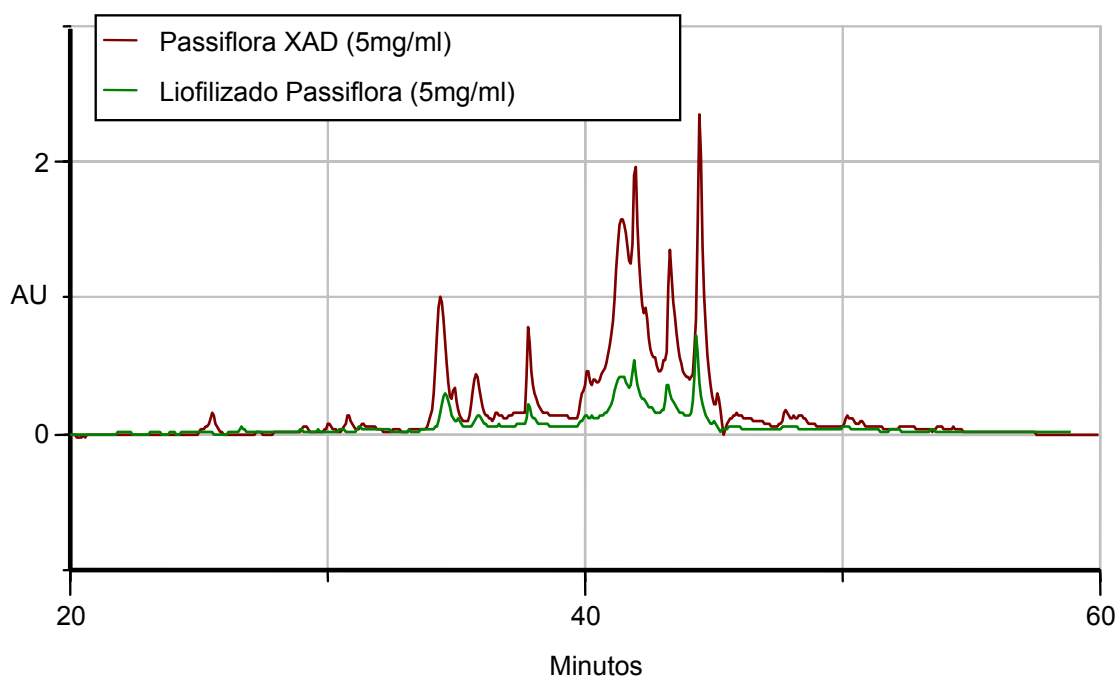


Fig. 4.3.1.2a: Comparação dos cromatogramas do resíduo do infuso liofilizado de *Passiflora edulis* Sims e do resíduo obtido após fixação dos compostos fenólicos dessa infusão com Amberlite XAD-2. Gradiente B

A dosagem colorimétrica confirmou esta última indicação [baseada na intensidade relativa dos picos obtidos com soluções de liofilizado e resíduo extractivo do XAD-2 com a mesma concentração (m/v)], pois verificámos que o teor de flavonóides no resíduo obtido nesta fase se situava nos $15,7 \pm 0,2\%$ (m/m) em equivalentes

de rotina. Fazendo os cálculos com relação ao peso seco do material vegetal verificámos que neste passo não houve perda dos flavonóides presentes.

Nesta fase, para além dos derivados flavonóides, o resíduo obtido após a eluição da resina de Amberlite XAD-2 conterá outros compostos fenólicos como ácidos fenólicos e taninos. Uma vez que em anteriores trabalhos (Coleta, 1998) havíamos já confirmado a presença destes compostos por TLC e não estava nos nossos objectivos o seu estudo, dispensámos a confirmação da presença destes compostos e submetemos o resíduo a uma cromatografia com gel de Sephadex LH-20, previamente controlando apenas o seu perfil cromatográfico por HPLC.

O gel Sephadex LH-20 está indicado para a aferição do tamanho de moléculas de produtos naturais como esteróides, terpenóides, lípidos e, dependendo do solvente usado, permite também separar os componentes de uma amostra por partição entre a fase móvel e a fase estacionária. Este gel é bastante utilizado tanto na escala analítica como industrial para a preparação de espécies moleculares próximas. No nosso caso, o objectivo com a utilização deste suporte era separar os flavonóides dos restantes compostos fenólicos presentes. Este objectivo tinha em vista a obtenção de uma fracção purificada dos flavonóides presentes na planta, para o seu estudo farmacológico "*in vivo*" e ulterior isolamento dos diversos constituintes para caracterização estrutural e estudo de seu perfil farmacológico. Referimos este aspecto, para que se perceba que a opção por esta técnica também foi grandemente condicionada pelas quantidades significativas de flavonóides que necessitávamos de obter, nas diferentes fases do processo (Fracção flavonóide total, subfracções e compostos isolados), para concretizar os objectivos deste estudo.

A separação na coluna de Sephadex LH-20 dos diferentes compostos fenólicos depende de factores como o fluxo do eluente, modo de preparação e estabilização da coluna, volume de amostra aplicado, regeneração do enchimento, etc., o que faz com que, nas condições do laboratório, os tempos de retenção (t_R) dos

diferentes compostos diferissem de ensaio para ensaio. Assim, procedemos ao controlo da separação ocorrida na coluna por TLC em suporte de Sílica 60G, com o sistema acetato de etilo/ácido fórmico/água (9:1:1). Nas primeiras fracções do eluato recolhido da coluna cromatográfica (Fig. 4.3.1.2b; coluna I) verificámos a presença de compostos (não identificados) com elevada polaridade, mas que não apresentavam o comportamento característico de flavonóides. Ainda nas primeiras fracções (Fig. 4.3.1.2b; coluna II e III), detectámos a presença de compostos que pensamos serem ácidos fenólicos, ou seus derivados. A partir de determinada altura (Fig. 4.3.1.2b; coluna IV), os eluatos recolhidos revelavam na sua constituição apenas a presença de constituintes que, na placa cromatográfica, apresentavam uma forte absorção no UV, exibindo fluorescência amarelo-esverdeada muito intensa após exposição aos vapores amoniacais. Por acção do reagente de NEU/PEG as manchas dos constituintes detectados exibiam colorações fluorescentes na gama amarelo/ laranja e amarelo/ verde (Wichtl, 1994). O comportamento descrito é característico dos compostos com estrutura flavonóide, mais precisamente do tipo dos derivados da flavona (Markham, 1982).

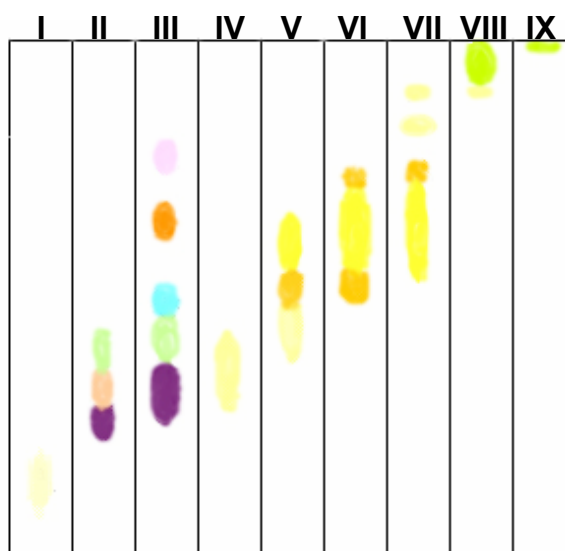


Fig. 4.3.1.2b: Esquema da separação em TLC das diversas fracções recolhidas após a cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, tal como observado após revelação com o reagente NEU/PEG

Em suma, cremos poder afirmar que esta técnica foi eficaz para separar os diferentes derivados flavonóides dos restantes compostos fenólicos adsorvidos pela resina de Amberlite XAD-2, nomeadamente taninos e ácidos fenólicos. A análise comparativa dos cromatogramas correspondentes ao resíduo da extracção com a resina de Amberlite XAD-2 (5mg/100µl) e ao conjunto dos eluatos recolhidos após a cromatografia na coluna de Sephadex LH-20 (0,5mg/100µl) (Fig. 4.3.1.2c), permite-nos verificar que o teor de flavonóides neste último resíduo está francamente aumentado, o que naturalmente resulta da eliminação por este processo dos demais constituintes de estrutura não flavonóide. Por outro lado manteve-se a proporção relativa dos diferentes constituintes, com a notável excepção do constituinte assinalado no cromatograma (Fig. 4.3.1.2c), cujo teor verificámos ser particularmente afectado pelo momento em que se inicia a recolha das fracções correspondentes aos derivados flavonóides. Segundo o esquema da placa de TLC (Fig. 4.3.1.2b) esta recolha deverá iniciar-se algures entre as fracções correspondentes às colunas III e IV do esquema. Sendo este o momento crítico do processo em que se poderá dizer que ocorre a separação dos derivados flavonoídicos dos restantes constituintes, passámos a fazer incidir nesta fase o controlo por TLC das fracções recolhidas. Quando as fracções cujos constituintes evidenciavam o comportamento característico dos derivados de flavonóides foram reunidas, dando origem à designada fracção flavonóide, aconteceu que inevitavelmente, devido ao arrastamento, houve sempre a necessidade de desprezar um número limitado de fracções (1-3 tubos \approx 1-3ml) que apresentavam já vestígios de derivados de flavonóides mas que eram maioritariamente constituídas por outros compostos fenólicos. Nas situações em que o "arrastamento" ultrapassava este número de fracções, isto é, quando havia maior sobreposição de constituintes flavonóides/ não flavonóides, verificámos que a rejeição dessas fracções conduzia a uma alteração na proporção relativa dos derivados flavonóides, como foi o caso assinalado no cromatograma da Fig 4.3.1.2c.

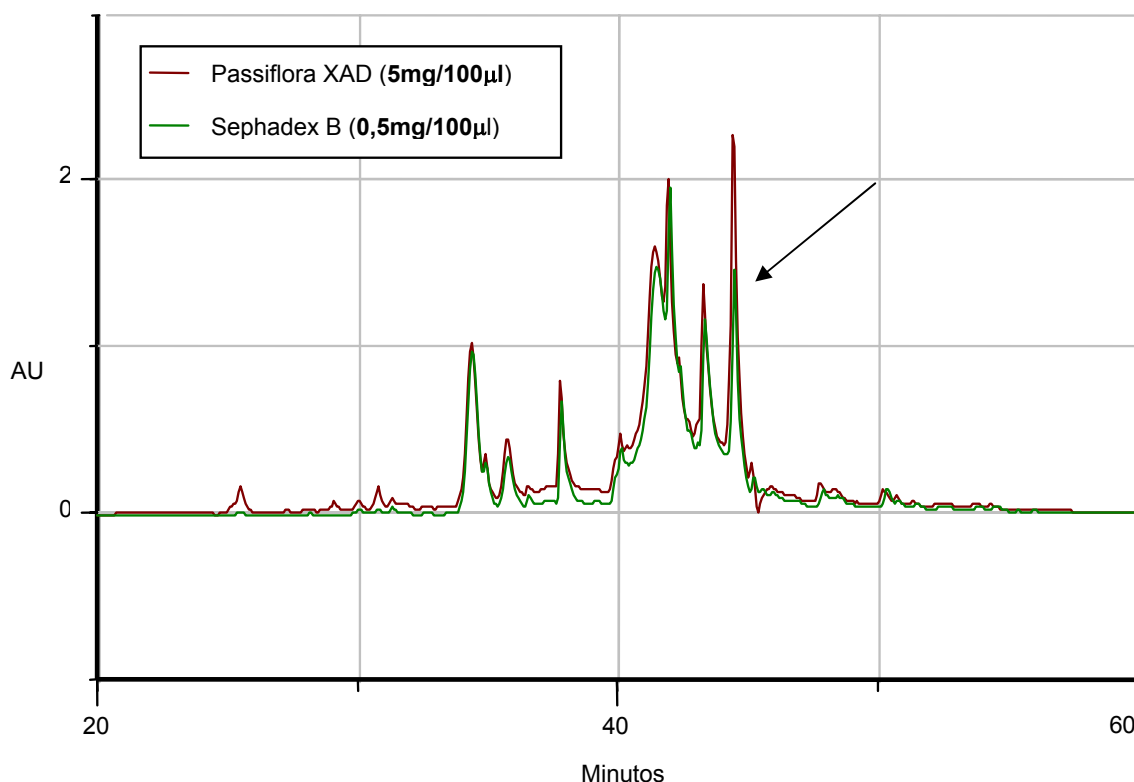


Fig. 4.3.1.2c: Comparação dos cromatogramas do resíduo do conjunto das fracções recolhidas na coluna de Sephadex LH-20 com comportamento flavonoídico característico (Sephadex B) e o resíduo dos compostos fenólicos fixados na coluna de Amberlite XAD-2 (Passiflora XAD). Gradiente B.

4.3.1.3. Subfraccionamento da fracção flavonóide total

Tal como acima referido para o processo de obtenção da fracção flavonóide total, também o processo de fraccionamento foi baseado nos nossos trabalhos anteriores (Coleta, 1998). Contudo, tendo em conta que o objectivo era conseguir chegar ao isolamento, caracterização estrutural e ensaio farmacológico de constituintes isolados das subfracções, tivemos que adaptar o método já desenvolvido para o isolamento de quantidades significativas de material vegetal. O controlo por TLC da separação obtida na coluna de Sephadex LH-20 evidenciou a impossibilidade de conseguir resolver os diferentes derivados dos flavonóides presentes, mesmo aumentando a capacidade da coluna ($h = 43\text{cm}$; $\varnothing = 1,5\text{cm}$) e reduzindo o fluxo do eluente. Este era um resultado esperado dado que os

derivados dos flavonóides presentes na *Passiflora edulis* Sims são, provavelmente, estruturas molecularmente muito próximas não sendo o Sephadex LH-20 o suporte apropriado para a sua resolução. A similitude em termos estruturais dos constituintes presentes na fracção flavonóide total era um dado que se podia inferir pelo comportamento destes compostos após revelação das placas de TLC, pelo tipo de espectros UV dos principais constituintes (Fig. 4.1c) e até pela fraca resolução dos picos nos cromatogramas já apresentados.

Anteriormente, havíamos já conseguido a separação de 3 subfracções diferentes recorrendo à cromatografia em papel. Atendendo aos resultados já obtidos (Coleta, 1998) e às limitações técnicas do laboratório, o "scaling-up" da técnica usada anteriormente pareceu-nos ser o processo mais simples para conseguir isolar não só as subfracções como os seus constituintes nas quantidades necessárias. Para conseguir atingir este objectivo construímos uma câmara de saturação com capacidade para a eluição simultânea de 15 folhas de papel Whatman 3MM (46x57cm) em cromatografia ascendente.

Após a cromatografia, a observação das folhas no ultravioleta (350nm) permitiu distinguir 3 zonas distintas de forte absorção UV, com comportamento típico dos derivados flavonóides do tipo flavona, após exposição ao vapor de amónia. As bandas receberam a designação de Subfracção I, II e III (abreviadamente SF I, SF II e SF III) respectivamente, por ordem crescente de Rf (0,58; 0,79; 0,90). A análise da composição de cada uma destas bandas por HPLC (Fig. 4.3.1.3b) permite verificar que houve uma efectiva separação dos constituintes da fracção flavonóide total.

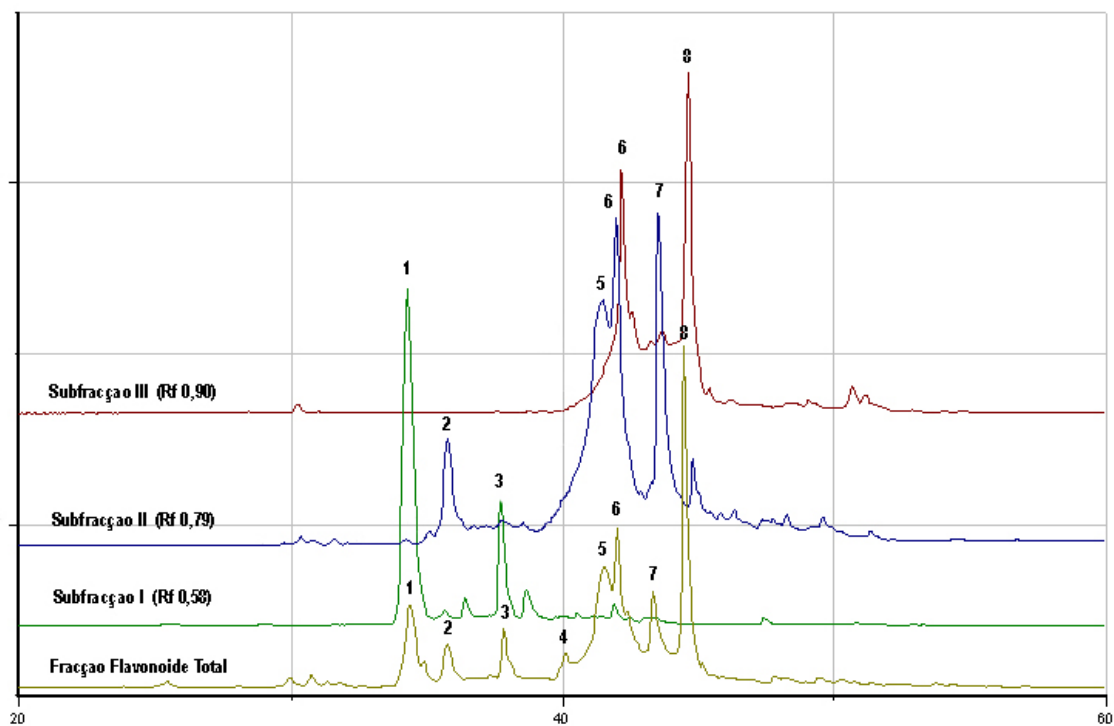


Fig. 4.3.1.3b: Perfil cromatográfico (HPLC) comparativo das diferentes subfracções obtidas a partir da Fração Flavonoide Total. Gradiente B.

4.3.2. Isolamento dos constituintes das subfracções

Subfracção I - Em primeiro lugar testámos a mobilidade dos constituintes da subfracção I (SF I), aplicando uma gota da sua solução metanólica em tiras de papel Whatman® 3MM e desenvolvendo com diferentes gradações de ácido acético (7,5%; 15%; 50%). A observação destas tiras no UV permitiu distinguir duas zonas distintas de forte absorção desta radiação, verificando-se uma separação óptima destas manchas com ácido acético 15%. Uma vez que a análise por HPLC (Fig. 4.3.2a) usando diferentes sistemas cromatográficos indicava que cada uma destas manchas correspondia a apenas um composto, elegemos este sistema para o isolamento subsequente dos dois constituintes da SF I (SF IA e SF IB).

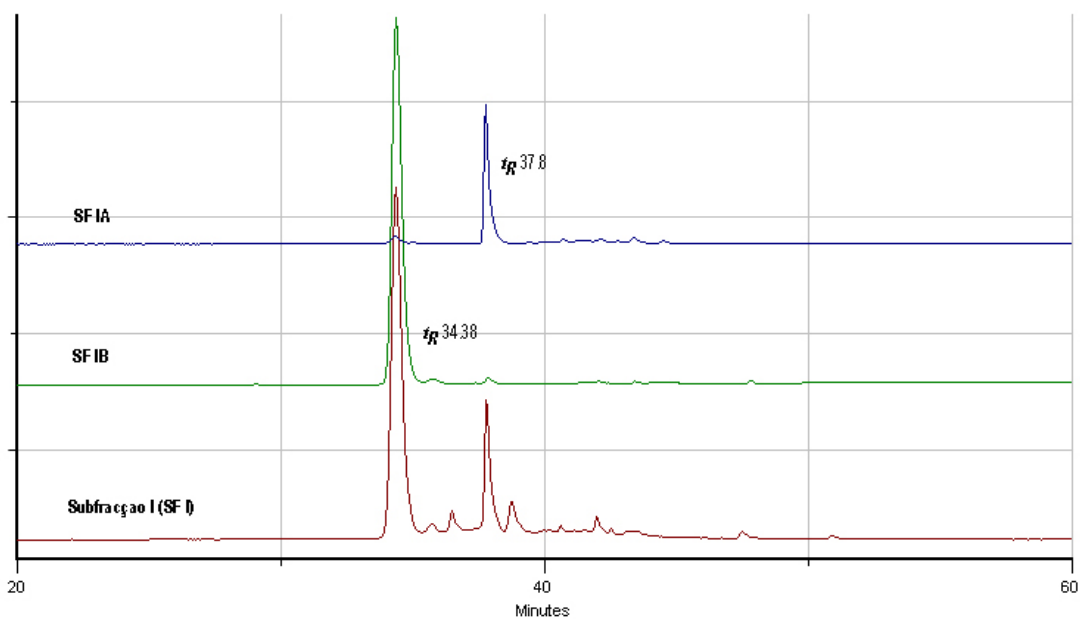


Fig. 4.3.2a: Perfil cromatográfico (HPLC) da Subfracção I (SF I) e comparação com o comportamento cromatográfico das duas manchas isoladas após cromatografia de SF I em papel com HOAC 15%, designadas de SF IA e SF IB. Gradiente B.

Depois de extraídos das folhas de papel cada um dos compostos SF IA e B foram purificados por recurso a colunas pré-revestidas Isolute® C18 (Fig. 4.3.2b e 4.3.2c).

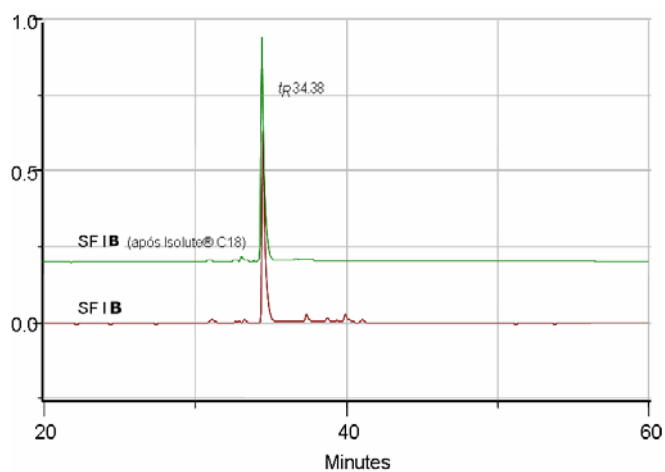


Fig. 4.3.2b: Perfil cromatográfico da SF IB e da mesma amostra após purificação com Isolute® C18. Gradiente B

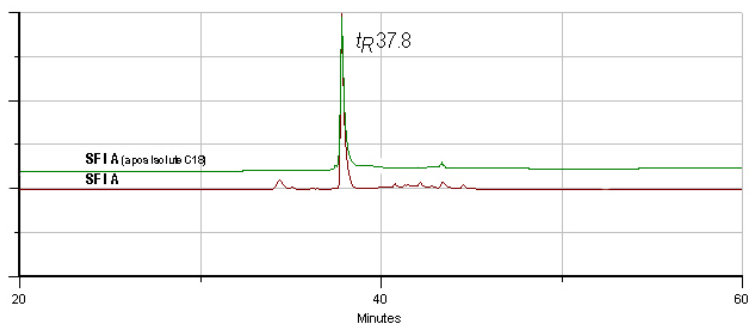


Fig. 4.3.2c: Perfil cromatográfico da SF I A e da mesma amostra após purificação com Isolute® C18. Gradiente B

Subfracção II – Tratava-se neste caso da subfracção com a constituição mais complexa (Fig. 4.3.2d) e o isolamento dos constituintes não foi possível com uma cromatografia monodimensional como no caso da subfracção I. Com os recursos disponíveis, a única possibilidade de separar os constituintes desta subfracção foi novamente por cromatografia em papel, desta feita recorrendo a um sistema bidimensional com BAW e ácido acético 15%. Apesar de este método ter permitido isolar 3 dos constituintes da subfracção (SF II A; SF II B; SF II C) (Fig. 4.3.2d) foram obtidas quantidades limitadas de cada composto.

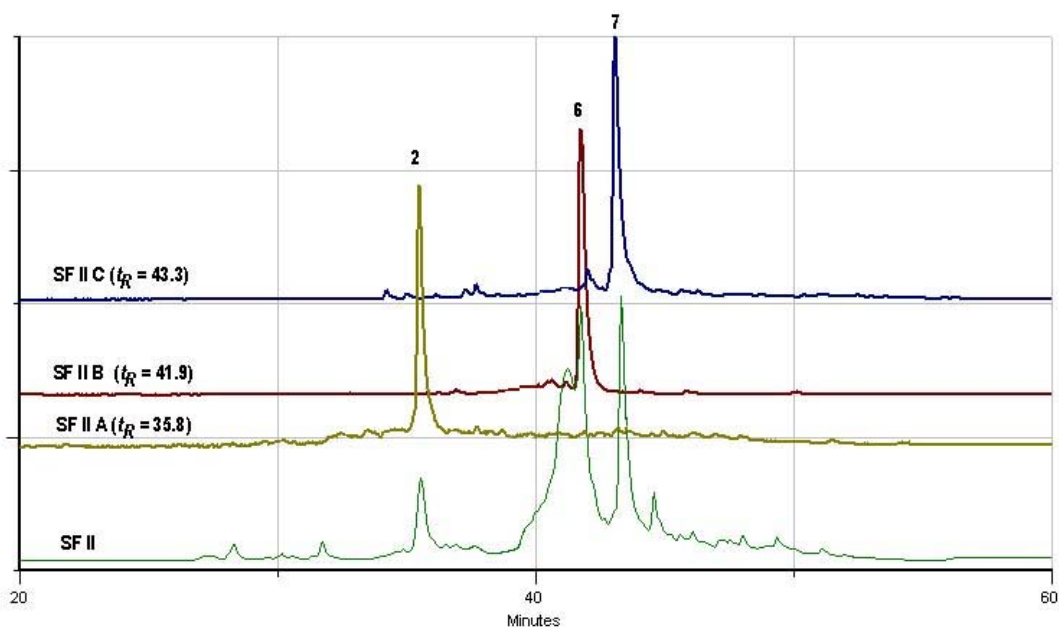


Fig. 4.3.2d: Perfis cromatográficos da subfracção II (SF II) e das subfracções IIA, IIB e IIC isoladas a partir desta. Gradiente B

No caso da SF III obtivemos uma separação satisfatória dos seus constituintes num sistema unidimensional usando como solvente o ácido acético 70% (Fig. 4.3.2e).

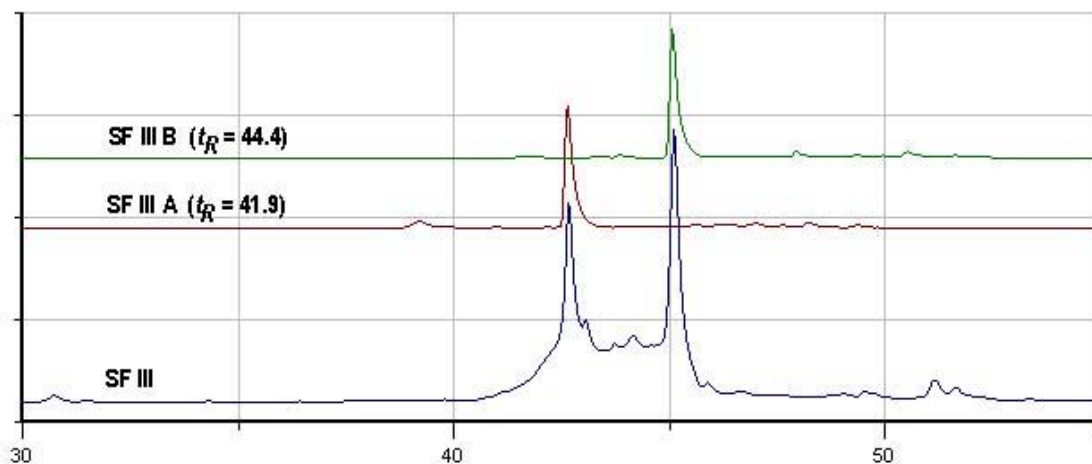


Fig. 4.3.2e: Perfis cromatográficos da subfracção III (SF III) e das subfracções IIIA e IIIB isoladas a partir desta. Gradiente B

4.3.2.1. Procedimentos de extracção alternativos com vista ao isolamento dos compostos SF IA e SF IB

A já referida necessidade de obtenção de quantidades significativas dos constituintes isolados esteve na origem de uma ligeira adaptação do método referido na secção 4.3.1.2. e 4.3.2. para a extracção dos derivados dos flavonóides. Essa adaptação consistiu apenas basicamente no “scaling up” do processo já desenvolvido com aumento da quantidade de material vegetal de partida e conseqüente adaptação e validação das quantidades de resina de Amberlite XAD-2 e da capacidade da coluna de Sephadex LH-20. A comparação dos cromatogramas da fracção flavonóide total obtida com os dois métodos (Fig. 4.3.2.1a) revela um perfil semelhante, com a excepção do(s) constituinte(s) do pico assinalado no esquema, cujo teor parece ser proporcionalmente menor com o novo método. Assim, pudemos concluir que este procedimento poderia ser usado na extracção de SF IA e SF IB nas quantidades necessárias para a realização dos ensaios farmacológicos.

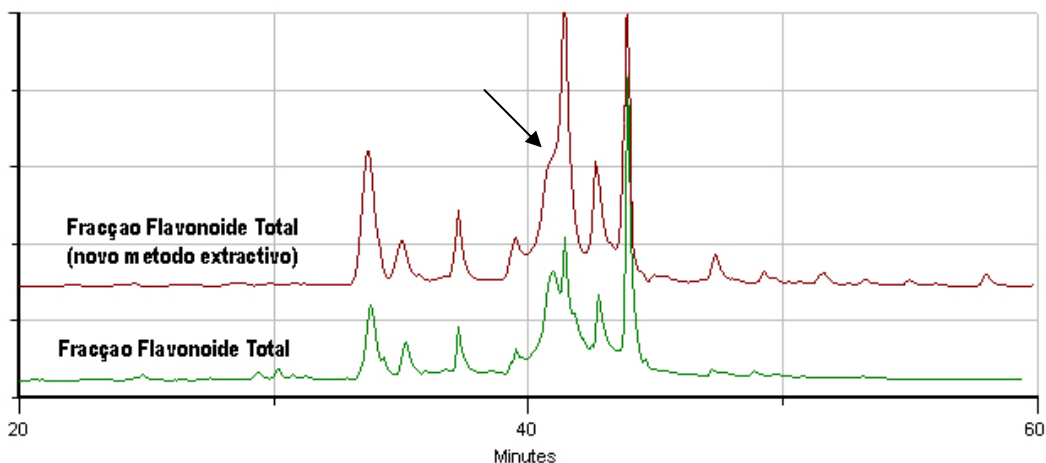


Fig. 4.3.2.1a: Comparação dos perfis cromatográficos (HPLC) da fracção flavonoide total obtida com uma variação do método inicial. Gradiente B

4.3.3. *Extracção da Passiflora edulis Sims com diferentes solventes*

O objectivo deste processo extractivo era aferir, por intermédio de extracções simples, se os principais derivados de flavonóides presentes nas folhas secas da planta eram efectivamente extraídos durante o processo da infusão que está na base do procedimento extractivo acima descrito. Uma análise do perfil cromatográfico obtido para o resíduo das diferentes extracções (Fig. 4.3.3a) permite concluir que os principais derivados flavonóides presentes na planta são extraídos na infusão, i.e, não se verificou a presença de compostos adicionais (pelo menos quantitativamente relevantes), nem houve alteração significativa da proporção relativa dos principais constituintes e, portanto, do perfil cromatográfico.

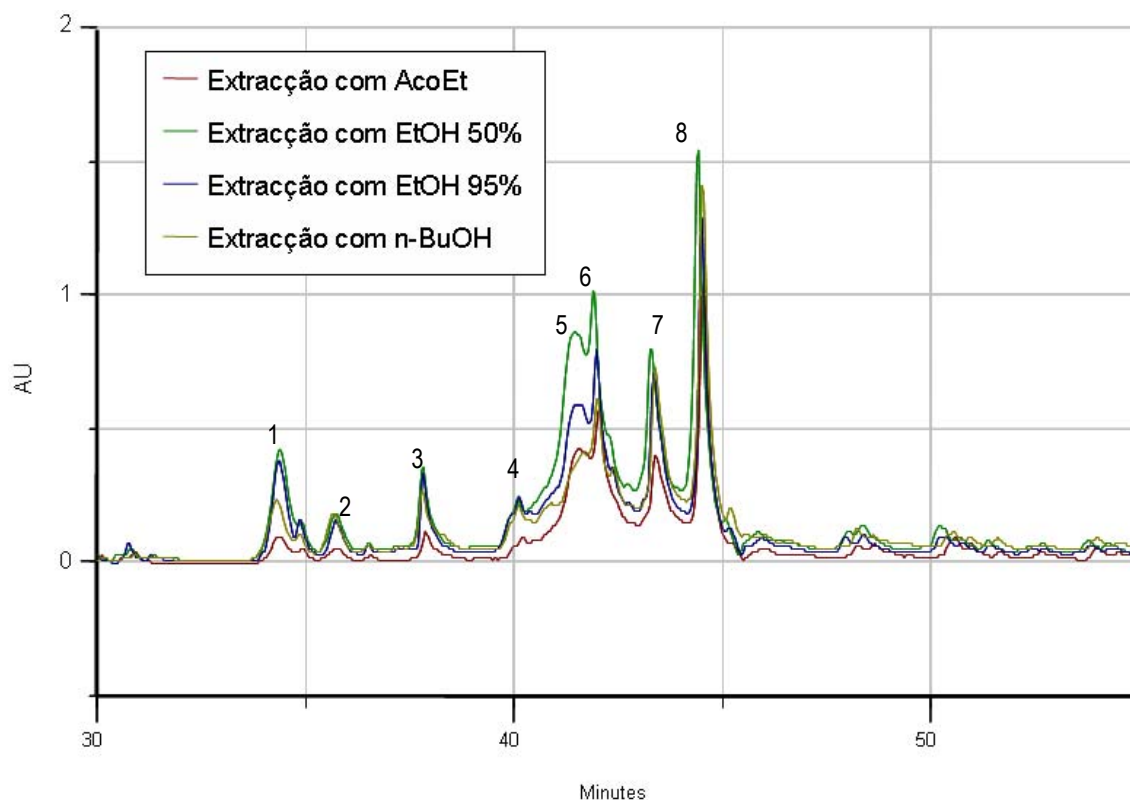


Fig. 4.3.3a: Comparação dos perfis cromatográficos (HPLC) dos resíduos obtidas na extração das folhas de *Passiflora edulis* Sims com diferentes solventes. Gradiente B

4.3.3.1. Doseamentos por HPLC dos principais constituintes presentes no resíduo da extração com diferentes solventes

Os constituintes da infusão, fracção flavonóide total, subfracções e constituintes isolados foram doseados em equivalentes de orientina pelo método do padrão externo, usando o gradiente B. Para definir a recta de calibração foram usadas 5 concentrações de padrão (orientina) preparadas por diluições sucessivas de uma solução metanólica com 1,07mg/ml (concentração das soluções injectadas: 2,38mM; 1,19mM; 0,6mM; 0,3mM; 0,15mM). Cada concentração foi injectada 3 vezes e a recta de calibração para este padrão foi calculada com os valores da área do pico registados para cada injeção. Este método foi aplicado no doseamento comparativo dos principais constituintes dos resíduos das extracções com diferentes solventes e verificámos que a extração com uma solução de etanol a 50% foi aquela que originou teores de flavonóides mais elevados no extracto e, analisando cada um dos picos registados no cromatograma (Fig.

4.3.3a), verificamos que essa maior eficiência extractiva se verificou para a maioria dos derivados de flavonóides presentes (Fig. 4.3.3.1a).

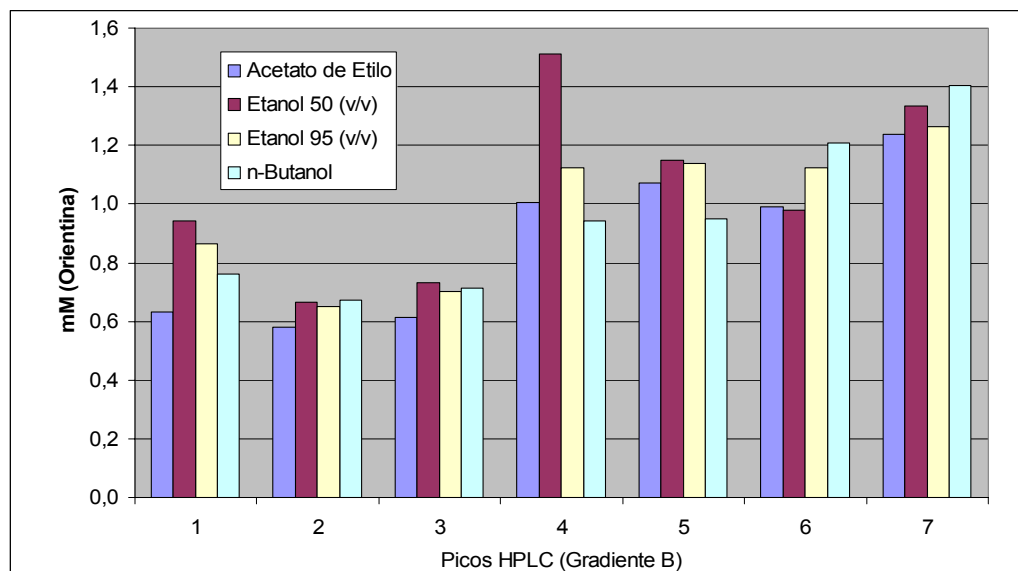


Fig. 4.3.3.1a: Comparação do rendimento extractivo dos principais constituintes presentes nos resíduos obtidos pela extracção das folhas de *Passiflora edulis* Sims com diferentes solventes. Gradiente B

4.3.4. Identificação e análise da estrutura dos constituintes isolados

Com vista á identificação preliminar dos derivados flavonóides presentes na *Passiflora edulis* Sims, começámos por construir uma base de dados, injectando no HPLC os padrões disponíveis no laboratório e construindo uma "livraria de espectros", usando a função específica do software (Unipoint 5.11) do equipamento. Pretendíamos em primeiro lugar verificar se havia sobreposição dos picos detectados e dos respectivos espectros UV com os flavonóides padrão injectados.

Uma vez que os constituintes da subfracção I (SF IA e SF IB) foram os primeiros a serem isolados, começámos por ensaiar a sua identificação. Tendo em conta que os flavonóides encontrados no género *Passiflora* são principalmente derivados glicosilados da luteolina e da apigenina (Abourashed *et al.*, 2002), tendo em

conta o comportamento em TLC por acção dos reveladores, e considerando os máximos de absorção dos respectivos espectros no UV (Fig. 4.3.4a), podemos concluir tratarem-se de derivados da luteolina (máximos de absorção no UV = 254, 266sh, 347), muito provavelmente glicosilados, pois a respectiva genina apresenta um tempo de retenção significativamente superior.

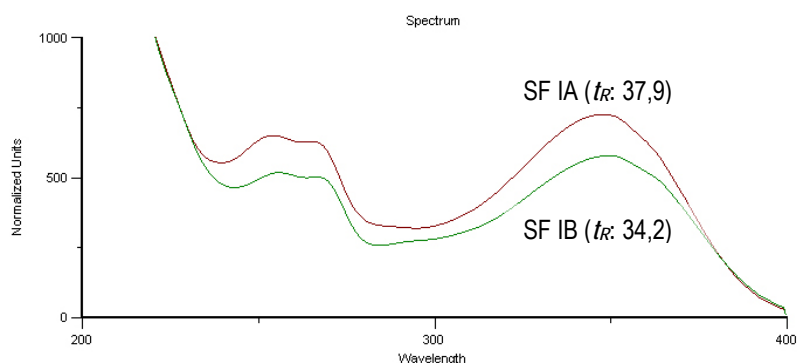


Fig. 4.3.4a: Espectros de absorção no UV dos dois constituintes da Subfracção I: SF IA e SF IB. Estes espectros foram registados online com o sistema de diode-array acoplado ao equipamento de HPLC, usando o gradiente B.

Comparando os espectros e tempo de retenção, verificámos que o composto SF IB apresenta um tempo de retenção (t_R 34,2), compatível com aquele evidenciado pelas orientina e isorientina, mas o seu espectro é sobreponível apenas ao da orientina (t_R 34,9) (Fig. 4.3.4b).

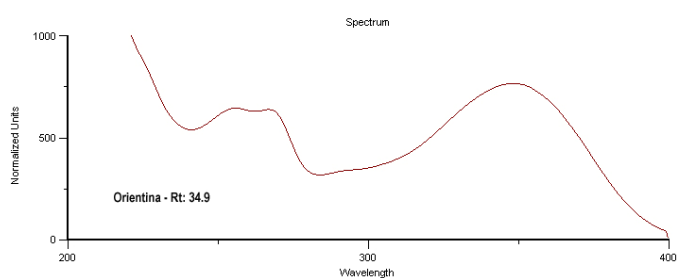


Fig. 4.3.4b: Espectro UV da Orientina registado online com o sistema de diode-array acoplado ao equipamento de HPLC, usando o gradiente B.

Analisando uma amostra de SF I adicionada de orientina, em ambos os gradientes de HPLC já descritos (A e B), verificamos um enriquecimento do pico correspondente ao composto SF IB (t_R 8.4/ 34.3, respectivamente nos gradientes

A e B). Com a adição de homoorientina (isorientina) a esta solução aparecem, nos cromatogramas de ambos os gradientes um terceiro pico (t_R 11.0/ 35.0) (Fig. 4.3.4c) com o espectro UV característico deste composto. Pelos espectros e tempos de retenção pudemos concluir que nenhum dos constituintes da SF I seria a homoorientina e era possível que o SF IB fosse a orientina.

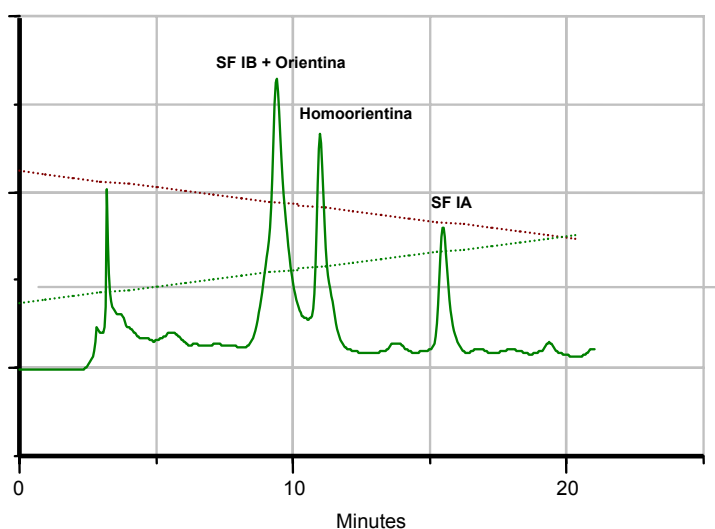


Fig. 4.3.4c: Cromatograma de SF I adicionada de Orientina e Homoorientina, usando o gradiente A.

Aplicando o composto isolado SF IB numa placa de celulose pré-revestida e co-cromatografando com orientina, usando ácido acético a 15% como desenvolvedor, verificamos que o padrão apresentava um factor de retenção (R_f : 0,1) diferente do composto isolado (R_f : 0,23), o mesmo acontecendo cromatografando uma amostra de SF IA isolado adicionada de orientina padrão, levando-nos a concluir que o SF IB não seria a orientina.

4.3.4.1. Hidrólise ácida dos compostos SF IA e SF IB

Para obter informação adicional sobre estes compostos, nomeadamente da natureza da ligação entre a genina e os eventuais substituintes glicosídicos, procedemos à sua hidrólise. Analisando o produto da hidrólise ácida de SF IA, verificamos uma alteração do seu comportamento cromatográfico, passando a apresentar o mesmo t_R em HPLC (Gradiente A = 28.1 / Gradiente B = 49,5), o

mesmo Rf em suporte de papel (Ácido acético 70% = 0.56) e o mesmo espectro UV (máximos de absorção 245sh, 254, 267, 291sh, 349 nm) que a luteolina pura. Estes dados confirmam que SF IA é um derivado da luteolina, mais precisamente um derivado *O*-glicosilado da luteolina, uma vez que era facilmente hidrolisável. Após a extracção da solução aquosa do hidrolisado com acetato de etilo, co-cromatografámos a solução aquosa com diversos glicósidos (galactose, glucose, arabinose, ramnose e xilose), não tendo sido possível identificar o glicósido resultante da hidrólise deste composto.

Relativamente ao composto SF IB também se verificou uma alteração no seu comportamento cromatográfico após a hidrólise. O composto resultante apresentava os mesmos t_R em HPLC (Gradiente A = 9.4 / Gradiente B = 34.9) e o mesmo Rf em suporte de papel (Ácido acético 15% = 0.15) que a orientina padrão e os seus espectros UV eram também sobreponíveis (255, 266, 292 sh, 348 nm). Estes dados sugerem que o composto SF IB era um derivado *O*-glicosilado da orientina. Co-cromatografando a solução aquosa do hidrolisado com os glicósidos acima referidos, detectámos a presença de ramnose (Rf = 0.8). Este dado sugere que o composto SF IB é um *O*-ramnósido da orientina.

4.3.4.2. Espectros de Ultravioleta

O espectro UV das flavonas em solução metanólica exhibe tipicamente dois máximos de absorção na região 240-400 nm. Distinguimos normalmente a banda I (300-380nm), cuja absorção está associada ao anel B, e a banda II (240-280 nm) com a absorção relacionada com o anel A. Aumentando a oxigenação do anel B ocorre um desvio batocrómico na banda I. Paralelamente a banda II pode aparecer como um ou dois picos dependendo do padrão de oxigenação do anel B. Flavonas com oxigenação em 3' e 4', exibem dois máximos de absorção ($\lambda_{m\acute{a}x}$) na banda II como vimos ser o caso de SF IA e SF IB (Campos e Markham, 2007). A hidroxilação do anel A produz um desvio batocrómico na banda II. A presença ou

a ausência de um hidroxilo (-OH) na posição 5 tem um efeito marcado nas bandas I e II. Quando este está ausente ambas as bandas aparecem a comprimentos de onda inferiores aos equivalentes 5-OH. Se em 3, 5 ou 4' houver metilação ou glicosilação são observados desvios hipsocrómicos, particularmente na banda I. A acetilação de um grupo fenólico anula o efeito do -OH no espectro (Mabry, 1970). Estas são algumas das características principais dos espectros UV das flavonas e as alterações verificadas nos picos de absorção pela adição dos chamados reagentes de "shift", funcionam como um diagnóstico do padrão de oxidação do núcleo flavonóide e do posicionamento dos substituintes presentes. A tabela 4.3.4.2a mostra os máximos de absorção registados para o composto isolado SF IA e o respectivo hidrolisado, verificando-se que ambos os compostos mostram máximos de absorção bastante próximos da luteolina.

Tabela 4.3.4.2a: Máximos de absorção do composto isolado SF IA e respectivo hidrolisado

		UV - λ_{max} . (nm)				
SF IA	MeOH	245sh	254	267	291sh	349
SF IA Hidrolisado	MeOH	247sh	255	266	291sh	348
Luteolina	MeOH	245sh	254	267	291sh	349
Luteolina (Bibliografia)	MeOH	242sh	253	267	291sh	349

Daqui se retira que o substituinte removido pela hidrólise do composto 1A não interfere significativamente com o espectro UV.

O espectro das flavonas na presença de metóxido de sódio (NaOMe)

O NaOMe é uma base forte que ioniza todos os grupos -OH no núcleo flavonóide. A adição de NaOMe a flavonas em metanol resulta normalmente em grandes desvios batocrómicos em todas as bandas de absorção. No entanto, um desvio da ordem dos 40-65 nm na banda I sem diminuição da intensidade de absorção é indicativo da presença de um -OH livre na posição 4'. No caso do composto 1A e do respectivo hidrolisado verificou-se, para ambos os compostos, um grande desvio batocrómico (>50nm) na banda I sem diminuição da respectiva intensidade. Em ambos os casos este desvio correlacionava bem com o padrão de

luteolina apesar da banda II do hidrolisado de 1A mostrar um ligeiro (~8nm) desvio batocrómico relativamente à luteolina padrão (Tabela 4.3.4.2b).

Tabela 4.3.4.2b: Máximos de absorção do composto isolado SF IA, respectivo hidrolisado e luteolina em presença de NaOMe

	Solução	UV - λ_{max} . (nm)				
		245sh	254	267	291sh	349
SF IA	MeOH	245sh	254	267	291sh	349
SF IA	NaOMe			266,5		401
SF IA Hidrolisado	NaOMe			274,5		406
Luteolina	NaOMe			266	328sh	401
Luteolina (Bibliografia)	NaOMe			266	329sh	401

O espectro das flavonas na presença de acetato de sódio (NaOAc)

O acetato de sódio é uma base mais fraca que ioniza apenas os grupos -OH mais acídicos, i.e., na posição 3, 7 e 4'. É usado como reagente de diagnóstico para detectar o grupo 7-OH que, quando presente, origina um desvio batocrómico de 5-20nm na banda II. Contudo, quando existe uma oxigenação na posição 6 e 8 este desvio é imperceptível. As flavonas com um 4'-OH e sem 3 ou 7-OH livre apresentam usualmente um ombro pronunciado no maior comprimento de onda da banda I. Não se tendo observado um desvio significativo na banda II e considerando o desvio observado na banda I, bem como a ausência de qualquer ombro no maior comprimento de onda da banda I, não foi possível, neste caso, concluir sobre a possível substituição do 7-OH (Tabela 4.3.4.2c).

	Solução	UV - λ_{max} . (nm)				
		245sh	254	267	314sh	381
SF IA	MeOH	245sh	254	267	291sh	349
SF IA	NaOAc			267,5	314sh	381
SF IA Hidrolisado	NaOAc			267,5		373,5
Luteolina	NaOAc			269,5		403,5
Luteolina (Bibliografia)	NaOAc			269	326sh	384

Tabela 4.3.4.2c: Máximos de absorção do composto isolado SF IA, respectivo hidrolisado e luteolina em presença de NaOAc

A presença de grupos orto-di-OH pode ser detectada pela adição de ácido bórico (H_3BO_3) em presença de NaOAc. As flavonas contendo um grupo orto-di-OH no anel B mostram neste caso um desvio batocrómico de 12-30nm na banda I, enquanto que a presença de grupos orto-di-OH nas posições 6,7 ou 7,8 é detectável por um desvio batocrómico de 5-10nm na banda I. O desvio verificado

de ~20nm na banda I é, portanto, indicador da presença de um grupo orto-di-OH no anel B (Tabela 4.3.4.2d).

	Solução	UV - $\lambda_{max.}$ (nm)				
		245sh	254	267	291sh	349
SF IA	MeOH					
SF IA	NaOAc/H ₃ BO ₃		260			371,5
SF IA Hidrolisado	NaOAc/H ₃ BO ₃		261,5			373,5
Luteolina	NaOAc/H ₃ BO ₃		263			373,5
Luteolina (Bibliografia)	NaOAc/H ₃ BO ₃		259			370

Tabela 4.3.4.2d: Máximos de absorção do composto isolado SF IA, respectivo hidrolisado e luteolina em presença de NaOAc/ H₃BO₃

O espectro das flavonas na presença de AlCl₃ e AlCl₃/HCl

Flavonas com um grupo hidroxilo em C5 formam complexos com o AlCl₃ estáveis na presença de ácido. Inversamente, os complexos formados pelo AlCl₃ com grupos orto-di-OH são decompostos na presença de ácido. Um desvio hipsocrômico de 30-40nm na banda I do espectro com AlCl₃ após a adição de HCl é indicativo da presença de um grupo orto-di-OH no anel B. Por outro lado, a presença de 3 hidroxilos em posições adjacentes origina um desvio de apenas 20nm. Após a adição de ácido à solução contendo AlCl₃, qualquer desvio que permaneça na banda I ou II relativamente ao espectro metanólico será devida à presença de um 5-OH livre. No caso do composto SF IA os resultados indicam a presença de um grupo orto-di-OH no anel B bem como de um hidroxilo livre em C5 (Tabela 4.3.4.2e).

	Solução	UV - $\lambda_{max.}$ (nm)				
		245sh	254	267	291sh	349
SF IA	MeOH					
SF IA	AlCl ₃		273	303sh		425
SF IA	AlCl ₃ /HCl	262,5	274	298sh	356	383
SF IA Hidrolisado	AlCl ₃		273	301sh	332	426,5
SF IA Hidrolisado	AlCl ₃ /HCl	264,5	275	297	356	380
Luteolina (Bibliografia)	AlCl ₃		274	300sh	328	426
Luteolina (Bibliografia)	AlCl ₃ /HCl	266	275	294sh	355	385

Tabela 4.3.4.2e: Máximos de absorção do composto isolado SF IA, respectivo hidrolisado e luteolina em presença de AlCl₃ e AlCl₃/HCl

Reunindo os dados cromatográficos, hidrólise e espectro UV com reagentes de shift, obtidos para o composto SF IA podemos concluir que a sua estrutura provável será do tipo descrito na Fig. 4.3.4.2a.

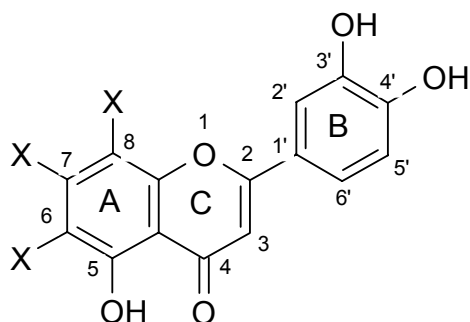


Fig. 4.3.4.2a: Estrutura provável de SF IA com os dados cromatográficos, espectros UV e hidrólise.
X = *O*-glucósido / -H.

Os resultados relativos ao composto SF IB estão resumidos na tabela 4.3.4.2f. O aparecimento de dois máximos de absorção na banda II sugere uma dupla oxigenação do anel B nas posições C3' e C4'. O desvio batocrômico de 65nm na banda I após adição de NaOMe indica a presença de um -OH livre em C4'. A ausência de desvio (<5nm) na banda II após adição de NaOAc indica a ausência de -OH em C7 ou então a presença de substituintes em C6 e C8, como parece sugerir a ausência de ombro no maior comprimento de onda da banda I. O desvio de ~30nm após adição do H₃BO₃ indica a presença de grupos orto-di-OH no anel B. Este dado é confirmado pela adição de AlCl₃ e AlCl₃/HCl que sugere ainda a presença de um -OH livre na posição 5.

	Solução	UV (nm)			
		257	269,5	347,5	
SF IB	MeOH	257	269,5	347,5	
	NaOMe		275	412,5	
	NaOAc		272	388,5	
	NaOAc/H ₃ BO ₃		263	374	~435-440sh
	AlCl ₃		276	304sh	333,5 427,5
	AlCl ₃ /HCl		277	297	357,5 385

Tabela 4.3.4.2f: Resumo das características dos espectros UV de SF IB com os diferentes reagentes de shift

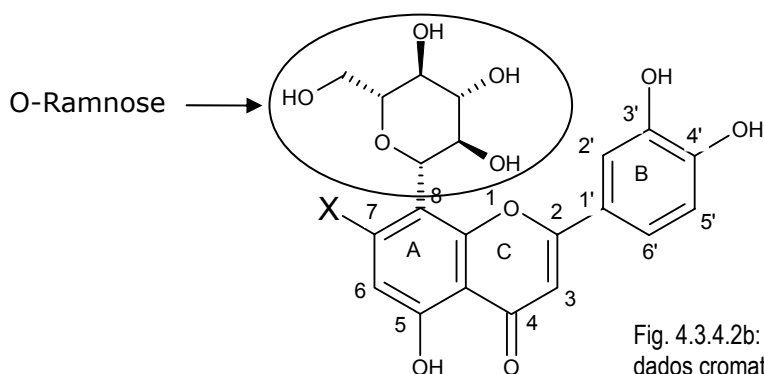


Fig. 4.3.4.2b: Estrutura provável de SF IB com os dados cromatográficos, espectros UV e hidrólise.

Reunindo os dados cromatográficos, hidrólise e espectro UV com reagentes de shift, obtidos para o composto SF IB podemos concluir que a sua estrutura provável será do tipo descrito na Fig. 4.3.4.2b.

Utilizámos também os reagentes de shift para analisar os espectros dos dois constituintes maioritários das SF II e SF III, respectivamente RT 43 (SF IIC) e RT 45 (SF IIIB).

Os resultados relativos ao composto RT 43 estão apresentados na tabela 4.3.4.2g e sugerem tratar-se de um composto do tipo 7-O-R-vitexina. Ao contrário de SF IA e IB o espectro metanólico não parece indicar uma dupla oxigenação no anel B. O grande desvio batocrómico ($\sim 53\text{nm}$) verificado na banda I após adição de NaOMe sugere a presença de um $-\text{OH}$ livre em C4'. A ausência de desvio na banda II após a adição de NaOAc, bem como o ombro no maior λ da banda I sugere a ausência de hidroxilação em C7 e confirma a presença de um $-\text{OH}$ em C4'. O desvio batocrómico na banda I após a adição de H_3BO_3 ($\sim 4\text{nm}$) não sugere a presença de grupos orto-di-OH no anel A ou no anel B. Este dado é confirmado após a adição de AlCl_3 e AlCl_3/HCl uma vez que não são formados complexos lábeis com o AlCl_3 , verificando-se antes a formação de um complexo estável com AlCl_3 que sugere a presença de um $-\text{OH}$ em C5.

Solução		UV - λ_{max} (nm)			
RT 43 (SF IIC)	MeOH	252sh	271	291,5sh	337,5
	NaOMe	241,5sh	270	278,5sh	333,5sh
	NaOAc		271,5		340,5
	NaOAc/H ₃ BO ₃		270		342
	AlCl ₃		278,5	298	349,5
	AlCl ₃ /HCl		279,5	296	347

Tabela 4.3.4.2g: Resumo das características dos espectros UV do composto isolado RT 43 com os diferentes reagentes de shift

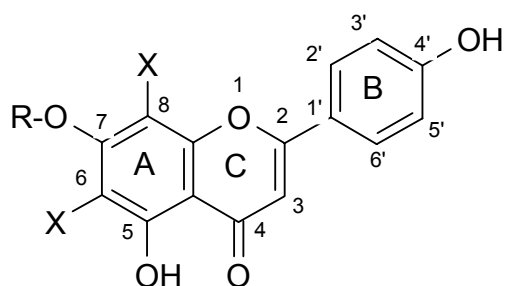


Fig. 4.3.4.2c: Estrutura provável de RT 43 (7-O-R-vitexina) com os dados cromatográficos e espectros UV.
X= -glucósido/ -H; R= glucósido

Os resultados relativos ao composto RT 45 estão apresentados na tabela 4.3.4.2h e sugerem tratar-se de um derivado da herbacetina. A fraca intensidade relativa da banda I sugere a ausência de oxigenação no anel B. Após adição de NaOMe também não se verificou um desvio significativo da banda I o que também indica a ausência de um -OH livre em C4'. Também o comportamento após adição de NaOAc não parece indicar a presença de um -OH livre em C7 e a adição de H₃BO₃ não evidenciou a presença de grupos orto-di-OH. O comportamento do espectro após adição de AlCl₃ e AlCl₃/HCl sugere a presença de um -OH em C5.

Solução		UV (nm)	
RT 45 (SF IIIB)	MeOH	269,5	311,5sh
	NaOMe	269	311,5sh*
	NaOAc	269,5	308,5sh
	NaOAc/H ₃ BO ₃	269,5	308,5
	AlCl ₃	279,5	318,5
	AlCl ₃ /HCl	280	314

*diminuição intensidade após 5'

Tabela 4.3.4.2h: Resumo das características dos espectros UV do composto isolado RT 45 com os diferentes reagentes de shift

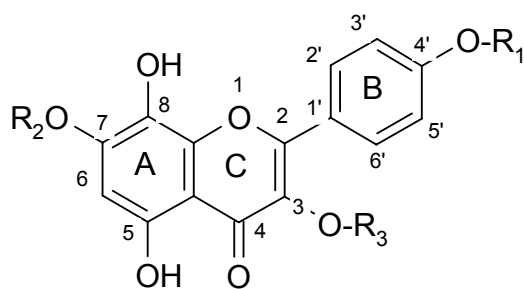


Fig. 4.3.4.2d: Estrutura provável de RT 45 com os dados cromatográficos e espectros UV.
R1 e R3 = -glicósido; R2 = metil (?)

4.3.4.3. Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN)

Para o cabal esclarecimento das estruturas dos dois constituintes isolados da SF I recorreremos a ^1H -RMN e ^{13}C -RMN usando também duas técnicas bidimensionais (COSY (^1H - ^1H) e HMBC) para a identificação completa dos picos dos respectivos espectros.

SF IA - Tendo presente a informação estrutural já obtida anteriormente, verificamos que o espectro de ^1H -RMN (500MHz, DMSO- d_6) deste composto confirma os dados obtidos, nomeadamente a existência de um grupo orto-di-OH no anel B, uma vez que os desvios obtidos para os restantes prótons deste anel, nomeadamente δ (ppm) = 7.45 (d, J = 2.2 Hz, H-6'), 7.40ppm (s, H-2') e 6.90ppm (d, J = 8.4 Hz, H-5'), são consistentes com a presença destes dois -OH na posição 3'-4'. A presença dos sinais dos prótons da posição 6 e 8 (δ = 6.74; H-3, H-8 e δ = 6.37; d, H-6) clarifica o posicionamento do substituinte indicando que este se localizará na posição 7. De assinalar que o sinal do próton 8 aparece escondido pelo do próton 3 o que pode ser confirmado pelo integral deste pico. Por outro lado, no HMBC verificou-se uma forte correlação deste sinal a 6.7ppm com o C-6 (ca. 104 ppm), o que não aconteceria se este sinal representasse apenas o próton da posição 3. Como seria de esperar o próton hidroxilo da posição 5 (δ = 13.01ppm) aparece apenas nos espectros traçados sem saturação de água (Fig. 4.3.4.3a).

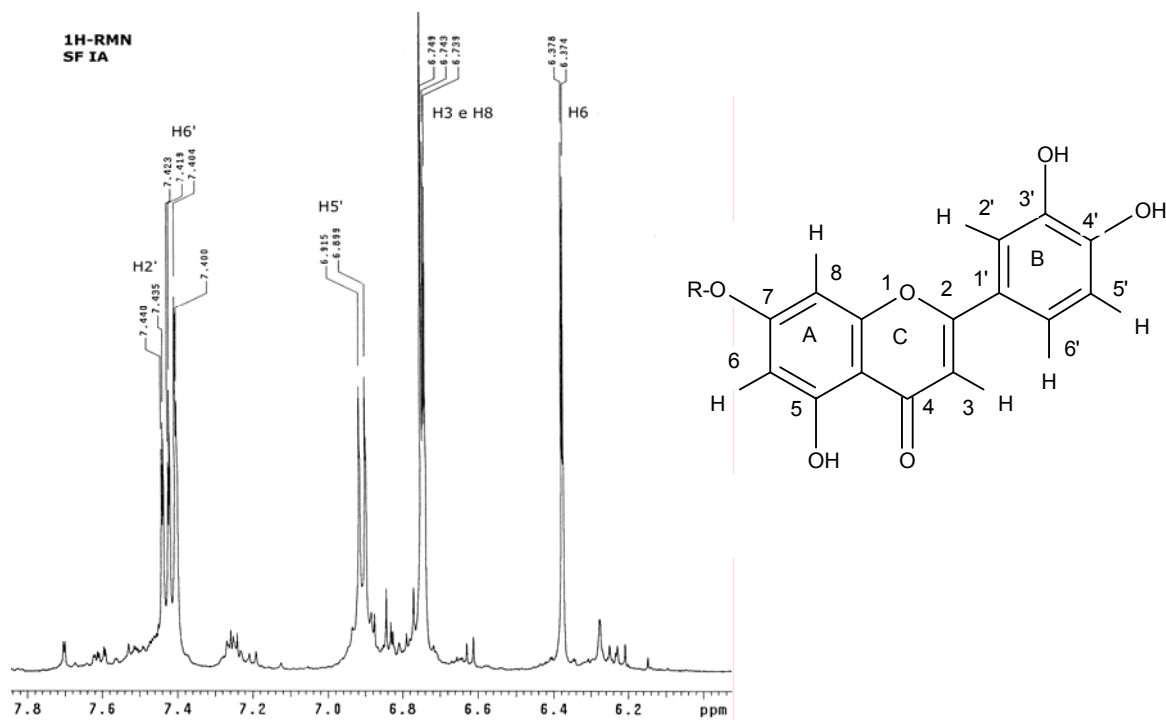


Fig. 4.3.4.3a: Espectro ¹H-RMN do composto SF IA (500MHz, DMSO-d₆)

Ainda no espectro ¹H-RMN os sinais detectados a 5.24ppm (1H, d, $J = 7.3$ Hz) e 5.13ppm (1H, s) (Fig. 4.3.4.3b), que desaparecem após a hidrólise, correspondem aos prótons anoméricos da glucose e ramnose respectivamente.

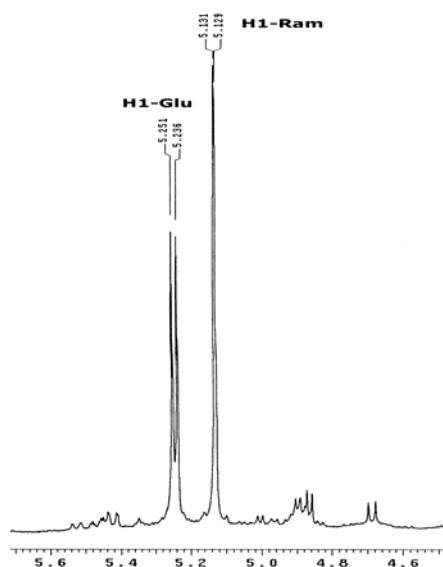


Fig. 4.3.4.3b: Prótons anoméricos do composto SF IA no espectro ¹H-RMN

Pelo espectro de ¹³C-RMN (500MHz, DMSO-d₆) (Fig. 4.3.4.3c) podemos confirmar tratar-se de um di-glicósido e, embora o espectro tenha sido referenciado com

um desvio campo abaixo de 4ppm, os sinais detectados são compatíveis com a glucose e ramnose (valores corrigidos em 4ppm): 94.4ppm [Glucose (G)1], 73.3 (G2), 72.3 (G3), 77.3 (G4), 72.4 (G5), 60.3 (G6); 99.3ppm [Ramnose (R)1], 77.2 (R2), 77.0 (R3), 76.4 (R4), 71.9 (R5), 18.1 (R6).

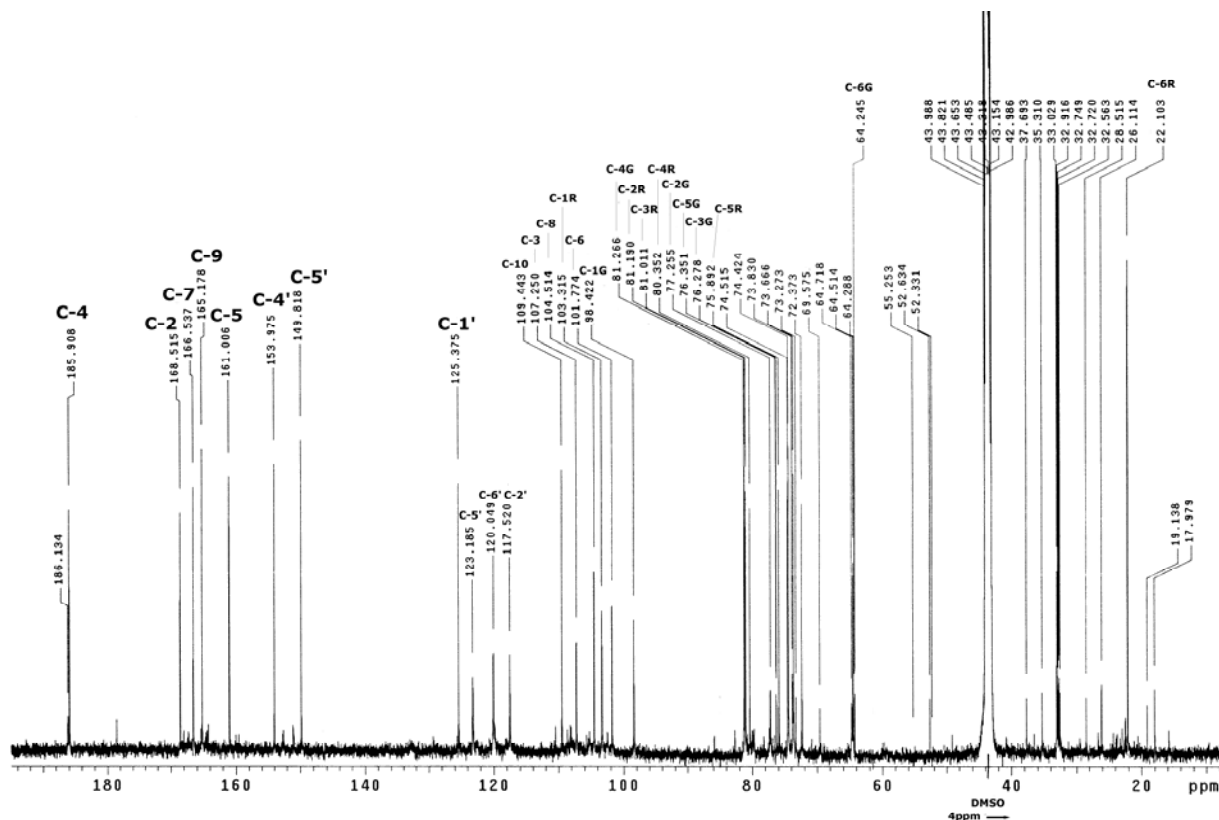


Fig. 4.3.4.3c: Espectro ^{13}C -RMN (500MHz, DMSO-d_6) do composto SF IA

Após a hidrólise do composto SF IA o seu espectro ^1H -RMN (Fig. 4.3.4.3d) é compatível com a estrutura da luteolina, apresentando os desvios seguintes: 7.42ppm (1H, s, H-2'), 7,39ppm (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6'), 6.88ppm (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.67ppm (1H, s, H-3), 6.45ppm (1H, s, H-6) e 6.19ppm (1H, s, H-8).

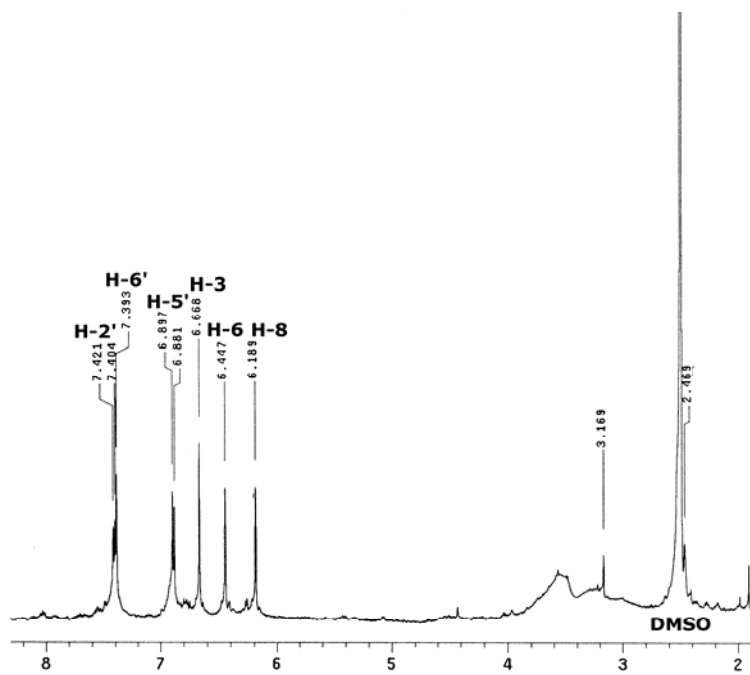


Fig. 4.3.4.3d: Espectro ^1H -RMN do hidrolisado do composto SF IA

Por último, através dos sinais registados no HMBC e das diferentes correlações encontradas, propusemos a estrutura para o composto SF IA (Fig. 4.3.4.3e).

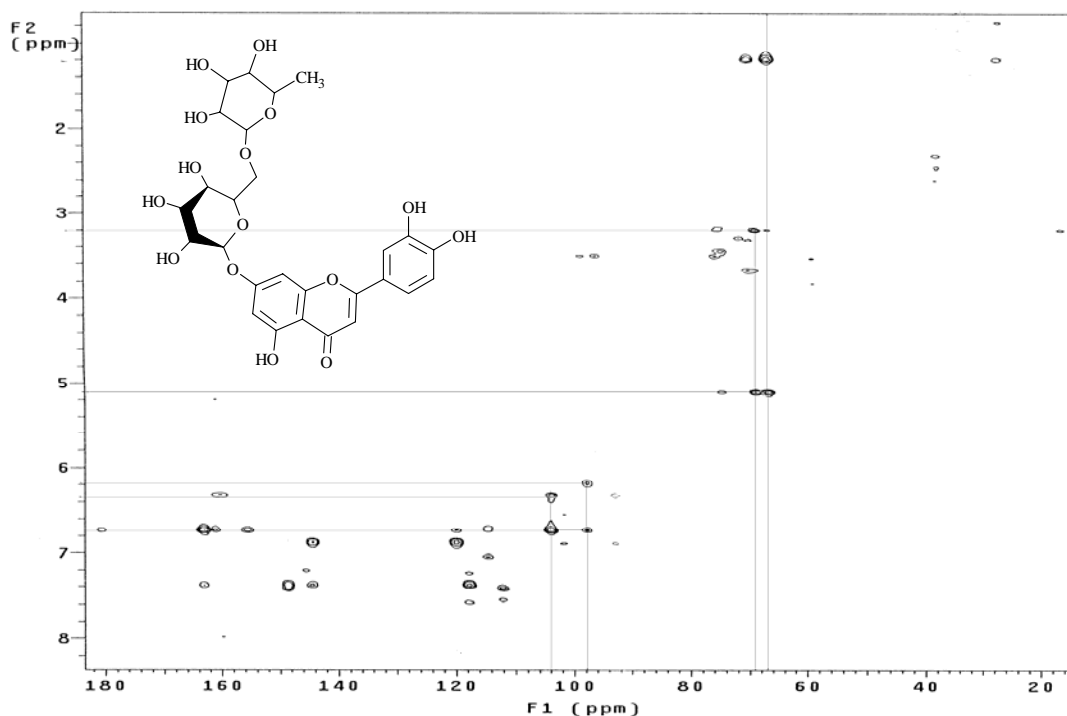


Fig. 4.3.4.3e: Espectro HMBC de SF IA e estrutura proposta para este composto

SF IB – Os principais sinais detectados no espectro ^1H -RMN (500MHz, DMSO-d_6) deste composto (Fig. 4.3.4.3f) foram registados a 13.14ppm (s, 5-OH), 7.55ppm ($J = 8.5$ Hz, H-6'), 7.49ppm (s, H-2'), 6.87ppm (d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.66ppm (s, H-3), 6.26ppm (s, H-6) e confirmam a informação dos ensaios anteriores, nomeadamente a existência de dois -OH no anel B nas posições 3' e 4'. A ausência do sinal do protão da posição 8 (neste caso, o integral do sinal do protão da posição 3 indica que este sinal corresponde a apenas um protão) sugere que os dois substituintes glicosídicos, cuja presença pode ser confirmada nos espectros de ^{13}C -RMN, poderão estar localizados na posição 8. Os protões anoméricos destes glicósidos também são identificáveis no espectro ^1H -RMN a 4.98ppm (s, H-1 Ramnose) e 4.75ppm (d, $J = 9.9$ Hz, H-1 Glucose).

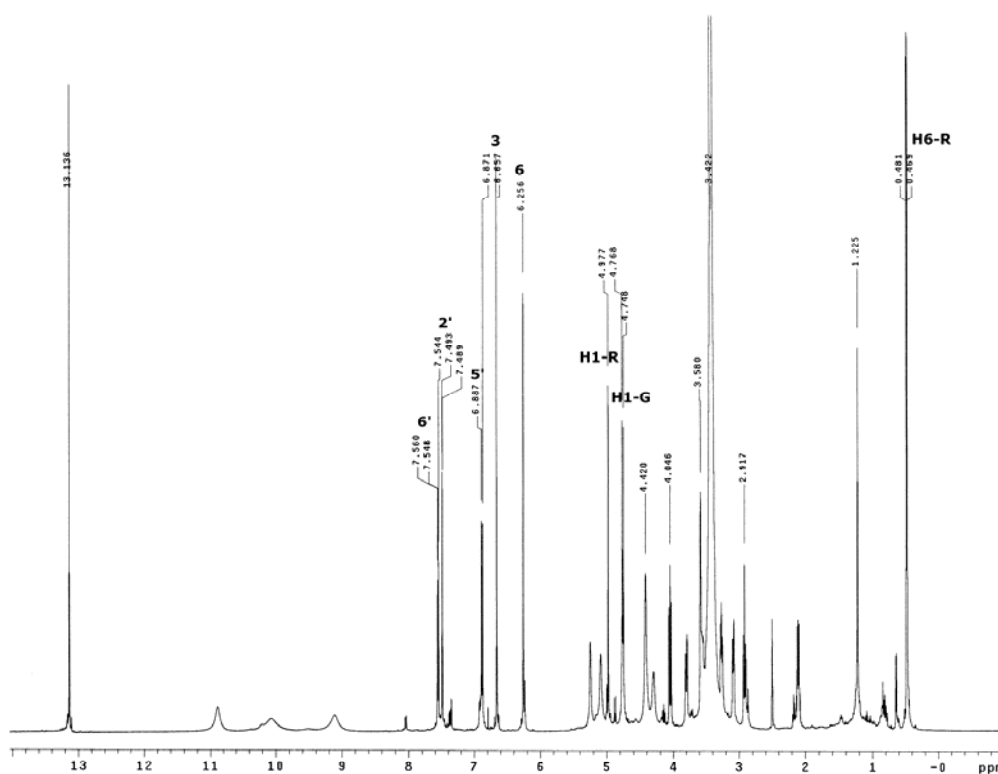


Fig. 4.3.4.3f: Espectro ^1H -RMN do composto SF IB (500MHz, DMSO-d_6)

O sinal registado a 0.47ppm sugere que um dos glicósidos poderá ser a ramnose. Os dados do espectro ^1H - ^1H COSY (Fig. 4.3.4.3g) permite correlacionar este sinal com o dos restantes protões do glicósido.

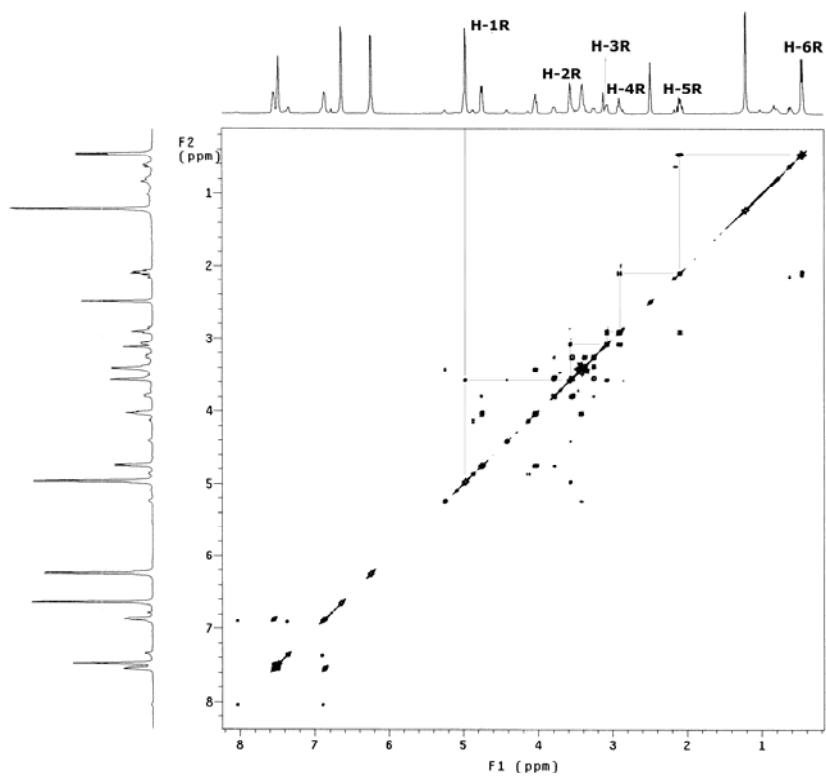


Fig. 4.3.4.3g: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto SF IB

Após a hidrólise permanecem os sinais dos prótons glucosídicos e desaparecem os prótons anteriormente atribuídos à ramnose, sendo o espectro resultante equivalente ao da orientina (Fig. 4.3.4.3h).

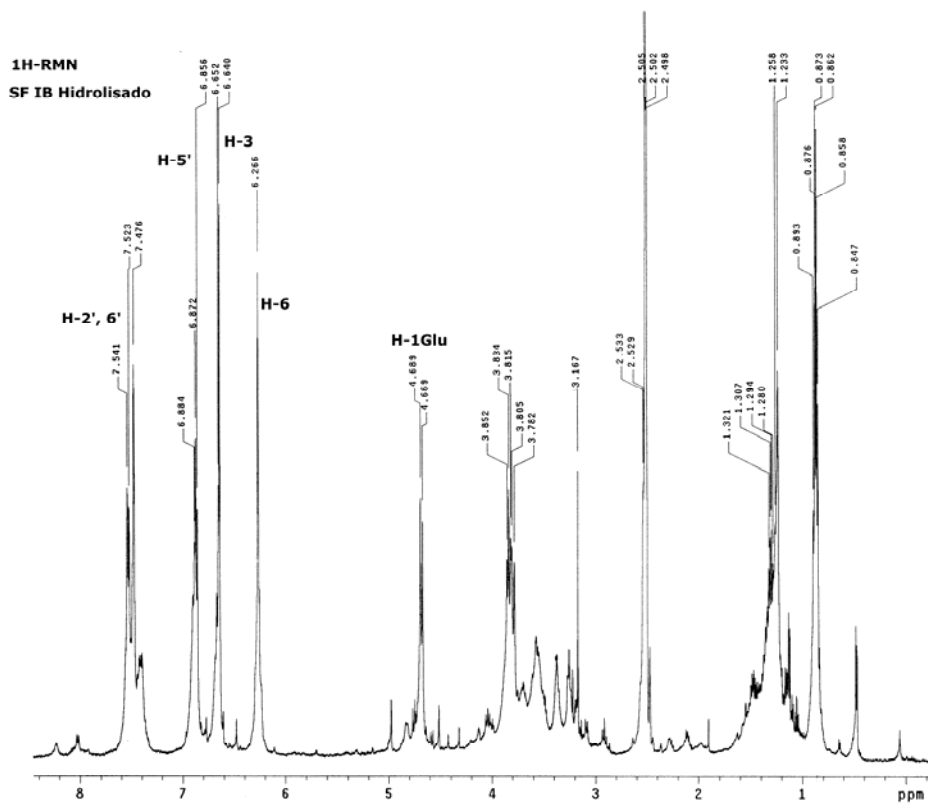


Fig. 4.3.4.3h: Espectro ^1H -RMN do hidrolisado composto SF IB (500MHz, DMSO-d_6)

δ

Pelo número de sinais na região onde aparecem os desvios dos glicósidos no espectro ^{13}C -NMR (500MHz, DMSO-d_6) de SF IB (Fig. 4.3.4.3i) podemos também concluir da presença de duas oses. Para a identificação dos sinais dos diferentes carbonos corrigimos os valores da ressonância em 4ppm pois também neste caso o espectro não estava correctamente referenciado.

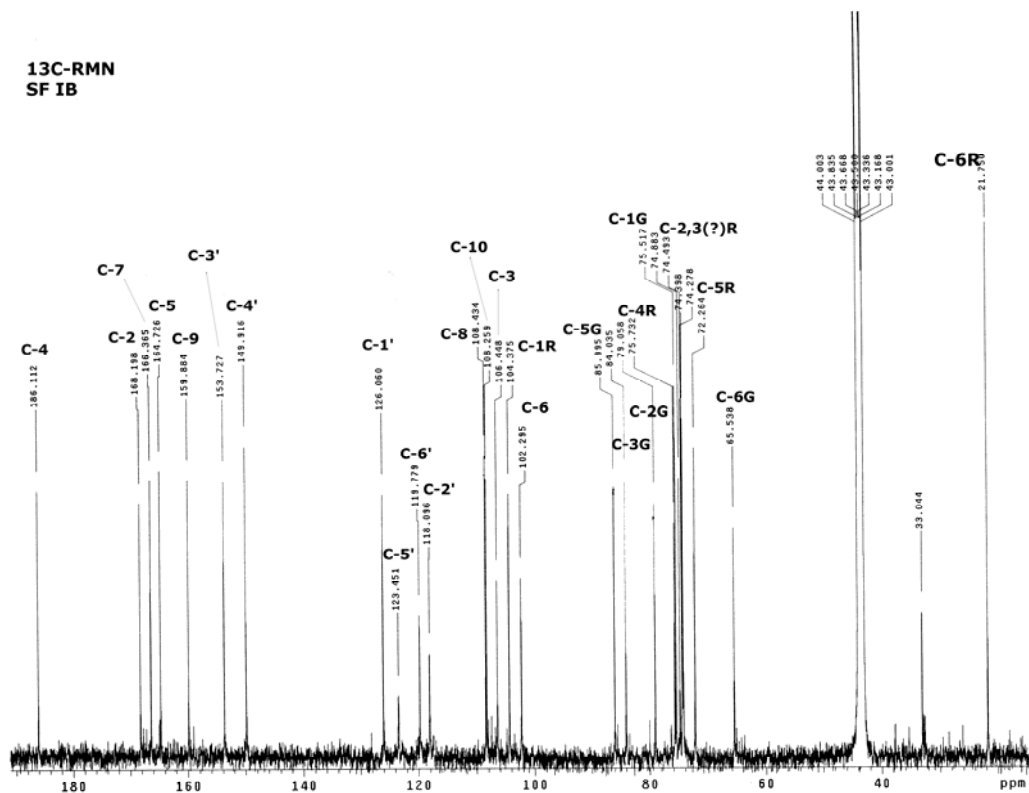


Fig. 4.3.4.3i: Espectro ¹³C-RMN (500MHz, DMSO-d₆) do composto SF IB

O sinal a 61.5ppm indica que o 6-OH da C-glucose ligada na posição 8, não está substituído. Para verificar em que -OH da glucose se liga a ramnose, atribuímos os sinais aos restantes carbonos glicosídicos para analisar a correlação no espectro de HMBC (Fig. 4.3.4.3j).

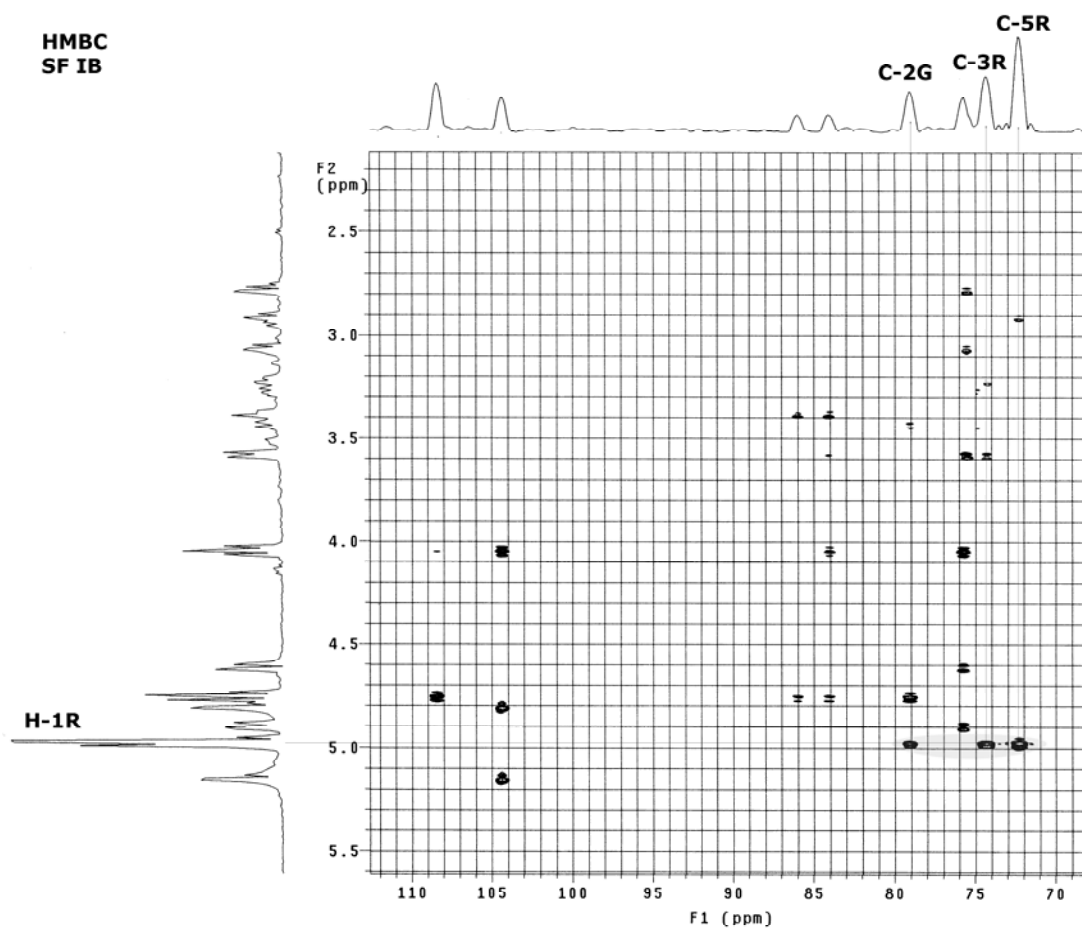


Fig. 4.3.4.3j: Espectro HMBC do composto SF IB

Na porção do espectro apresentada assinalámos a correlação verificada entre o sinal do protão a 4.977ppm com o sinais dos carbonos 2 da glucose e 3 e 5 da ramnose, tal como seria de esperar se a ramnose estivesse ligada à glucose através do -OH da posição 2.

Assim, em face dos resultados obtidos nos diferentes ensaios podemos concluir que o composto isolado, designado de SF IB é, de facto, a 2''-O-ramnosilorientina cuja estrutura representamos abaixo (Fig. 4.3.4.3k).

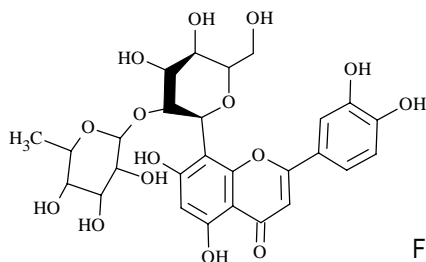


Fig. 4.3.4.3k: SF IB - 2''-O-ramnosilorientina

No contexto deste trabalho, pareceu-nos desnecessário o esclarecimento das estruturas dos compostos das SF II e SF III dado estas não terem exibido uma bioactividade relevante.

Capítulo 2

Capítulo 2

Bioactividade

1. Introdução

No início de um estudo sobre plantas com indicação de uso tradicional no tratamento da ansiedade é fundamental considerar que a definição e o termo ansiedade são conceitos modernos, que foram assumindo múltiplas formas ao longo da história. Subsistem, ainda hoje, na civilização ocidental, crenças populares que relacionam as doenças do foro psiquiátrico com fenómenos sobrenaturais e foi apenas em meados do séc. XIX que Griesinger concebeu as bases da moderna psiquiatria, conceptualizando os distúrbios mentais como alterações quantitativas de estados fisiológicos que podem resultar de factores externos ou internos. No entanto, Hipócrates já concebia a doença mental como uma patologia do cérebro (um desequilíbrio dos 4 humores corporais) tratável com dieta apropriada, bebida e abstinência sexual. Cícero dá-nos uma ideia do que seria o conceito Romano de ansiedade afirmando que uma “perturbação excessiva pode originar doenças da alma causadas por erros no julgamento”. Um bom exemplo prático da problemática relacionada com a transposição de uma indicação tradicional para um uso terapêutico definido nos dias de hoje é a Erva de S. João (*Hypericum perforatum* L.). Esta planta, que hoje em dia tem a sua eficácia no tratamento de depressões ligeiras a moderadas comprovada por ensaios clínicos, era colhida tradicionalmente na época da sua floração, por altura do solstício de Verão, quando as “forças” do dia e da noite se equilibram, acreditando-se, por isso, que tinha o poder de combater “possessões demoníacas”, que era uma das formas, digamos pré-científicas, como era percebida aquilo a que hoje chamamos de depressão. Sendo a ansiedade um dos

componentes normais dos estados depressivos, não podemos por de parte que esta indicação de uso tradicional para o combate às “possessões demoníacas” envolva uma planta com alguma acção ao nível da ansiedade.

A ponderação da indicação tradicional e a sua eventual relação com uma actividade do tipo ansiolítico ou sedativo foi, portanto, um dos aspectos considerados no processo de selecção das plantas a incluir neste estudo, cujos princípios foram já abordados na secção 1 do capítulo I. Uma vez que as plantas envolvidas neste estudo foram já avaliadas por outros autores, apresentamos de seguida uma análise mais detalhada das actividades farmacológicas descritas e dos mecanismos de acção propostos para cada uma delas.

2. Actividades farmacológicas descritas e mecanismos de acção propostos

2.1. *Hypericum perforatum* L.

Apesar dos muitos estudos realizados sobre os constituintes activos e os mecanismos de acção do extracto hidroalcoólico de *Hypericum perforatum* L., estes são ainda objecto de muita controvérsia. Neste contexto, fizemos uma actualização do estado do conhecimento, analisando a evolução dos vários mecanismos propostos e dos compostos envolvidos na actividade farmacológica descrita.

O uso medicinal desta planta é conhecido desde a antiguidade sendo-lhe atribuídas diversas propriedades medicinais nomeadamente como agente cicatrizante, diurético, antibiótico, antiviral e efeitos antidepressivos (Upton *et al.*, 1997). Durante a década de 90 do século passado surgiu um interesse crescente no seu uso como antidepressivo e vários extractos hidro-alcoólicos têm sido extensivamente usados na prática clínica convencional pelas suas propriedades antidepressivas (Kasper 1997; Linde *et al.*, 1996; Gastpar *et al.*, 2006; Whitten *et al.*, 2006). Estudos clínicos demonstraram a sua acção relativamente ao

placebo no tratamento da depressão, com uma eficácia comparável a moléculas de síntese usadas actualmente e com uma menor incidência de efeitos adversos (Linde *et al.*, 1996; Linde *et al.*, 2005). Estas investigações contribuíram para o uso generalizado desta planta em alguns países como a Alemanha (Orth *et al.*, 1999) e os E.U.A. (Bennett *et al.*, 1998).

2.1.1. Mecanismos de acção propostos

Hipócrates é considerado como tendo sido o primeiro a descrever a depressão como uma condição somática. Estudos iniciados nos anos 50 deste século levaram à formulação da hipótese da depressão ser causada pela diminuição da concentração de neurotransmissores monoaminérgicos. Esta hipótese tem sido desenvolvida e, hoje em dia, pensa-se que uma desregulação da função monoaminérgica pode conduzir à depressão (Bennett *et al.*, 1998). O “design” experimental dos estudos que visam a identificação de potenciais novos antidepressivos e a caracterização dos seus mecanismos de actuação tem sido baseado nesta hipótese.

Uma das questões abordadas em qualquer dos mecanismos considerados de seguida tem que ver com a definição da concentração terapêutica do *H. perforatum* L. e, conseqüentemente, com as concentrações atingidas *in vivo*. Esta é uma matéria particularmente sensível e complexa pois os diferentes constituintes individuais apresentam perfis farmacocinéticos distintos e factores como a fraca penetração na barreira hemato-encefálica ou lenta eliminação dos tecidos cerebrais podem estar relacionados com o lento e crescente aparecimento da acção antidepressiva. A título de exemplo, considerando apenas as duas principais hipericinas, verifica-se que a absorção da hipericina é mais lenta que a pseudo-hipericina (2-2,5h vs. 0,5-1h) e durante a administração crónica (3 x 300 mg/dia) as concentrações plasmáticas no “steady-state” só são atingidas ao fim de 4 dias. A hipericina e a pseudohipericina atingem concentrações plasmáticas

de 8,5 e 5,8 ng/ml, respectivamente. A mediana da semi-vida de eliminação é de cerca de 25h para a hipericina e de 16-36h para a pseudohipericina, tendo sido sugerido que a concentração no cérebro seja apenas 1/20 da concentração plasmática mas com uma semi-vida de, possivelmente, algumas semanas (Brockmöller *et al.*, 1997; Upton *et al.*, 1997).

2.1.1.1. Inibição da actividade enzimática da Monoaminoxidase (MAO) e Catecol-O-metil-transferase (COMT)

No caso do *Hypericum perforatum* L. o primeiro mecanismo de acção proposto foi a inibição da monoaminooxidase (MAO) A e B, enzimas envolvidas na degradação de neurotransmissores como a serotonina, noradrenalina ou a dopamina, tendo mesmo a hipericina sido considerada como a substância responsável por essa inibição (Suzuki *et al.*, 1984), não obstante o extracto testado conter um teor significativo de derivados de flavonóides. Este antagonismo da MAO foi confirmado posteriormente como sendo o mecanismo de acção provável, mas como resultado da actividade de substâncias pertencentes ao grupo dos flavonóides e xantonas (Demisch, *et al.*, 1989 e Sparenberg *et al.*, 1993). Com vista ao esclarecimento dos constituintes envolvidos na interacção com a MAO, outros autores procederam ao estudo da actividade sobre esta enzima de 6 fracções do extracto de *H. perforatum* L., bem como das hipericinas isoladas a partir deste, usando hipericina sintética como padrão de referência (Bladt e Wagner, 1994). Neste ensaio, o conjunto das hipericinas, a pseudohipericina e hipericina isoladas, e a hipericina de síntese, não mostraram qualquer inibição significativa da MAO com concentrações até 0,1 mM. Contudo, a fracção de compostos polares (contendo glicósidos de flavonóides, taninos e procianidinas) mostrou ser mais activa, com um grau de inibição de 39% para uma concentração de 10^{-4} M, assim confirmando os resultados de Demisch, *et al.* (1989) e Sparenberg *et al.* (1993). No entanto, os autores concluíram que a actividade antidepressiva não podia ser explicada em termos de inibição da MAO,

pois as doses necessárias *in vitro* para verificar este efeito eram bastante elevadas. Num outro trabalho sobre a actividade da hipericina, do extracto total e de seis fracções, desta feita sobre a MAO e a catecol-*O*-metil-transferase (COMT), verificou-se que na concentração de 0,01 mM apenas duas fracções mostraram actividade (Thiede e Walper, 1994) e que na concentração de 0,001 mM nenhuma das soluções testadas mostrou qualquer actividade inibitória sobre a actividade da MAO. Assim, estes autores concluíram também que as concentrações necessárias eram demasiado elevadas para que a inibição da MAO pudesse, por si só, justificar a actividade antidepressiva concluindo, por outro lado, que a hipericina não possui qualquer actividade assinalável sobre esta enzima. Igualmente, o extracto de *H. perforatum* mostrou uma fraca actividade inibitória da COMT (35%), obtida apenas com concentrações elevadas (0,1 mM), o mesmo se tendo verificado com as outras fracções e com a hipericina. Estes autores também concluíram que seriam os derivados de flavonóides e/ou as xantonas e não a hipericina, os compostos responsáveis pela fraca actividade inibitória dos extractos sobre a MAO e COMT.

Isoladamente, diversos derivados de flavonóides presentes nos extractos de *H. perforatum* L., tais como a quercetina, caempferol, luteolina e quercetina-3-*O*-ramnósido, inibem significativamente a MAO (Sparenberg *et al.*, 1993). A 1,3,6,7-tetra-hidroxi-xantona, que existe em quantidades vestigiais nas folhas e caule, também inibe a MAO A (99%) em concentrações relativamente baixas (95µM). Contudo, a concentração em que estes compostos existem nos extractos não permite considerá-los como sendo responsáveis pela actividade antidepressiva, no entanto, a ligeira inibição da MAO e da COMT pelos extractos poderá ser devida à sua presença.

Por último, em estudos mais recentes, verificou-se igualmente que o extracto metanólico total apresentava uma actividade inibitória da MAO A e MAO B com IC₅₀ superior a 100 µg/ml sugerindo, mais uma vez, que este mecanismo terá pouca relevância para explicar a actividade antidepressiva *in vivo* (Müller *et al.*,

1997). Para além da fraca actividade inibitória do extracto de *H. perforatum* L. sobre a MAO *in vitro*, foi também já demonstrado que as actividades da MAO no cérebro de rato permanecem inalteradas após tratamento crónico e agudo (Yu, 2000).

Assim, independentemente de os extractos de *H. perforatum* L. possuírem constituintes com actividade inibidora sobre a MAO e de não estar estabelecida a relevância deste facto para a actividade farmacológica dos extractos, pode-se concluir, dos estudos citados, que a inibição da MAO não será certamente o principal mecanismo envolvido na actividade antidepressiva dos extractos de *H. perforatum* L.

2.1.1.2. Interação com diferentes tipos de neurotransmissores e receptores

As primeiras indicações sobre a possível interferência com o sistema serotoninérgico foram referidas por Müller e Rossol (1994), na sequência do seu estudo sobre a influência do extracto metanólico LI-160 (0,3% hipericina e 6% de flavonóides – Lichtwer Pharma) sobre a expressão dos receptores serotoninérgicos. Estes autores usaram uma linha celular de neuroblastomas para estabelecer um modelo para a regulação de neurotransmissores, por intermédio de compostos imunologicamente activos tais como as citocinas, tendo verificado uma diminuição da expressão de receptores bastante significativa para uma concentração de 0,05 mM (0,5µg/ml = 6 ng/ml em hipericina). Para além disso, este efeito foi detectável com concentrações mais baixas, dentro da gama de concentrações passível de ser atingida durante o tratamento com este extracto (Brockmöller *et al.*, 1997). As alterações na neurotransmissão central verificadas algum tempo após o início do tratamento crónico com antidepressivos tem sido considerada como um factor chave na acção dos fármacos antidepressivos, sugerindo que a modulação dos próprios receptores possa estar envolvida no mecanismo final desta acção (Müller *et al.*, 1997).

Ao estudarem o efeito do extracto metanólico LI-160 sobre a recaptação de serotonina (5-HT) em sinaptosomas de rato, Perovic e Müller (1995) demonstraram que este extracto causa 50% de inibição da recaptação de 5-HT com uma concentração de 6,2 µg/ml. Apesar de esta concentração ser elevada, os autores sugeriram que, com a acumulação originada pelo esquema posológico seguido normalmente, poderiam ser atingidos valores desta ordem de grandeza, tendo concluído que esta inibição poderia ser um dos mecanismos possivelmente responsáveis pela actividade do extracto. Estes resultados foram confirmados posteriormente (Rolli *et al.*, 1995), tendo-se verificado adicionalmente que a recaptação sinaptosómica da noradrenalina (NA) também era inibida, sugerindo que o mecanismo de acção dos extractos de *H. perforatum* L. poderia ser semelhante a outros fármacos antidepressivos, como os tricíclicos antidepressivos (TCA's) ou os inibidores específicos da recaptação da 5-HT (SSRI's).

Na sequência destes trabalhos, o extracto LI-160 e as fracções contendo hipericina e campferol foram testados sobre nove tipos de receptores diferentes, em sinaptosomas preparados a partir de murganhos, e foi estudada a sua interferência com a recaptação de serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA) (Müller e Schäfer, 1996). O extracto inibiu a ligação específica ao receptor 5-HT_{1A}, com um IC₅₀ de 15 µg/ml (concentração um pouco superior aos estudos de Perovic e Müller (1995), no entanto o método usado foi ligeiramente diferente) e, por outro lado, inibiu a recaptação da 5-HT e NA com um IC₅₀ < 15 µg/ml. Ainda, o extracto inibiu a ligação específica ao nível do receptor muscarínico colinérgico (mAChR) mas apenas com concentrações elevadas (150 µg/ml). Não foi observada qualquer actividade significativa ao nível dos receptores adrenérgicos α₁, α₂ e β, nos receptores 5-hidroxitriptamina (5-HT₂), nem no local de ligação da imipramina. As fracções contendo hipericina e campferol mostraram actividade apenas nos receptores mAChR e nos locais de recaptação da 5-HT e da NA, mas apenas com concentrações elevadas (IC₅₀ > 0,1 mmol/L). Os autores concluíram que as soluções testadas exerciam uma actividade significativa sobre os

receptores estudados apenas com concentrações elevadas e que a eficácia bioquímica *in vivo* do efeito inibitório na recaptção de 5-HT e NA deveria ser questionada. No entanto, tal como sugerido por Perovic e Muller (1995), estes autores também concluíram que, no caso da interacção do extracto com a ligação ao receptor 5-HT_{1A} e da inibição da recaptção da 5-HT e NA, as concentrações estudadas *in vitro* seriam compatíveis com a dose média diária do extracto de *H. perforatum* L. quando usado como antidepressivo.

A inibição da recaptção sinaptosómica de 5-HT pelo extracto LI-160 foi confirmada por Müller *et al.* (1997), que verificaram um IC₅₀ de 2 µg/ml. Igualmente, o extracto também inibiu a recaptção da NA e da dopamina (DA) com uma potência semelhante. Enquanto alguns fármacos antidepressivos inibem a recaptção sinaptosómica da 5-HT e NA com igual potência, não são conhecidos outros fármacos que exibam potência similar nos três sistemas considerados. A elevada potência do extracto LI-160 na inibição da recaptção sinaptosómica 5-HT, NA e DA está de acordo com a actividade antidepressiva mas também com algumas propriedades miméticas da DA em experiências com animais (Winterhoff *et al.*, 1995; Butterweck *et al.*, 1997).

De acordo com a literatura, o tratamento subcrónico de ratos com imipramina conduz a uma significativa diminuição da densidade de receptores adrenérgicos β e 5-HT₂ no cortex frontal (Leonhard, 1993; Duncan *et al.*, 1994). Curiosamente, um tratamento semelhante com o extracto LI-160 originou uma diminuição (16%) da densidade de receptores adrenérgicos β no cortex frontal (sem alterar a afinidade do radioligando para os receptores) e um aumento (15%) na densidade dos receptores 5-HT₂ (Müller *et al.*, 1997). Ainda, para este mesmo extracto, foi demonstrado um aumento (50%) na densidade de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}, no cérebro de rato, sem alteração da afinidade, após um tratamento prolongado (Teufel-Mayer e Gleitz, 1997), confirmando assim a indicação de que o extracto LI-160 poderá interferir com a expressão dos receptores serotoninérgicos. Estes

dados são consistentes com as alterações na expressão de receptores serotoninérgicos verificadas após tratamento com antidepressivos sintéticos.

Em termos dos constituintes envolvidos na interacção com os receptores serotoninérgicos ou na recaptção da 5-HT, NA ou DA, verificou-se que a hipericina não estaria envolvida nestas actividades (Raffa, 1998). A hipótese do possível envolvimento da hiperforina na actividade antidepressiva dos extractos de *H. perforatum* L. foi inicialmente explorada por Chatterjee *et al.* (1998) e Müller *et al.* (1998) após terem verificado que algumas actividades do extracto alcoólico de *H. perforatum* L. não eram observadas na ausência deste composto (Chatterjee *et al.* 1996). Assim, estes autores demonstraram que a hiperforina é um potente inibidor da recaptção de 5-HT, DA, NA, GABA e L-glutamato com valores de IC₅₀ entre 0,09 e 0,18 µM (0,05 – 0,1 µg/ml) (5-HT, DA, NA, GABA) e 0,5 µg/ml para o L-glutamato, e que a actividade de dois extractos com diferentes teores de hiperforina em dois paradigmas farmacológicos convencionais (teste da natação forçada, teste do desespero comportamental) se correlacionava bem com o teor de hiperforina. Foi também verificado que as concentrações de extracto necessárias para a inibição da recaptção dos diferentes neurotransmissores eram cerca de 100 vezes inferior ao valor necessário para a inibição da MAO_A e da MAO_B. Por outro lado, a hipericina e o caempferol não evidenciaram actividade na recaptção de nenhum dos diferentes neurotransmissores em estudo.

A hipótese da inibição da recaptção da serotina pela hiperforina continuou a ser explorada, tendo-se confirmado que extractos contendo hiperforina e a própria hiperforina isolada inibiam de modo inespecífico a recaptção de 5-HT em células peritoneais de rato (Chatterjee *et al.*, 1998). Estes autores demonstraram ainda que a hiperforina bloqueava o chamado efeito Bezold-Jarisch (mediado por receptores 5-HT₃) em ratos anestesiados, de um modo independente da dose, sugerindo que o efeito observado não é devido a um efeito antagonista no receptor propriamente dito, tendo concluído que, apesar de a hiperforina modular

processos mediados pela 5-HT (inibição da contracção do íleon de cobaia induzida por 5-HT), esta não seria um agente anti-serotoninérgico (inibe também outros agentes espasmogénicos) e que os seus efeitos não seriam mediados directamente por interferência com o receptor.

Reforçando a tese de um mecanismo envolvendo a recaptação de neurotransmissores, verificou-se que recaptação de 5-HT e NA em astrócitos (células que rodeiam os terminais sinápticos e regulam a neurotransmissão através dos seus sistemas de recaptação), também foi inibida de modo dependente da dose pelo extracto LI-160 (Neary e Bu 1999). Os dois sistemas transportadores foram afectados de forma diferente: para a 5-HT o principal efeito foi uma diminuição de 50% da taxa de transporte máximo, enquanto que para a NA, foi uma redução de 4,5 vezes na afinidade aparente da NA para os seus locais de recaptação. Após remoção do extracto a recaptação retomou os valores normais indicando que a inibição verificada não era devida a um efeito tóxico (Neary e Bu 1999). Com um outro extracto hidroalcoólico de *H. perforatum* L. foi também verificada uma inibição da acumulação de [³H]5-HT em sinaptosomas do córtex de rato, com um IC₅₀ de 7,9 µg/ml (Gobbi *et al.*, 1999). Neste caso, o IC₅₀ determinado para a hiperforina pura foi de 1,8 µg/ml, pelo que se pode concluir que a actividade do extracto não podia estar relacionada apenas com o conteúdo de hiperforina (< 5%). Contudo, usando o citalopram (um inibidor selectivo da recaptação da 5-HT) como ligando competitivo, concluiu-se que o efeito inibitório não podia ser devido a uma interacção directa e bloqueio dos transportadores de 5-HT pois o extracto, tal como a hiperforina, não inibiu a ligação do citalopram. Ainda, foi também demonstrado que 3-10 µg/ml do extracto e 0,3-1 µg/ml de hiperforina, induziam uma libertação de trítio significativa em sinaptosomas previamente "carregados" com [³H]5-HT. Este efeito assemelhava-se ao de um composto do tipo reserpínico (Ro-04-1284), isto é, era ligeiramente atrasado e independente do transportador de 5-HT e do cálcio. Os autores sugeriram que o extracto origina uma depleção dos grânulos de

armazenamento, aumentando a concentração citoplásmica de 5-HT e este aumento é, presumivelmente, responsável pela aparente inibição da captação de [³H]5-HT. No entanto, as concentrações necessárias para originar este efeito do tipo reserpínico (> 3 µg/ml de extracto), não parecem ser atingidas no cérebro após doses farmacologicamente activas do extracto, tal como indicado pelo facto de não terem sido encontradas alterações significativas nos níveis cerebrais de 5-HT e ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA), após um esquema de tratamento (3 x 300 mg/kg/dia) activo num modelo preditivo da actividade antidepressiva (Gobbi *et al.*, 1999).

A possibilidade dos extractos de *H. perforatum* L. interferirem com o armazenamento da 5-HT nas vesículas pré-sinápticas, inibindo a recaptação de serotonina, foi também confirmada subsequentemente por Roz *et al.* (2003). Por último, foi também sugerido que o mecanismo de inibição da recaptação de neurotransmissores estará associado a uma elevação da concentração intracelular de sódio, provavelmente como consequência da activação do trocador Na⁺/H⁺ devido a uma diminuição do pH intracelular (Wonnemann *et al.*, 2000).

Independentemente de não ser ainda consensual a relevância da inibição inespecífica da recaptação de 5-HT, DA, NA, GABA e L-glutamato, para a actividade antidepressiva dos extractos, acredita-se que esta actividade está dependente da presença de hiperforina e envolve mudanças da concentração intracelular de sódio e/ou do armazenamento de 5-HT nas vesículas pré-sinápticas.

Assim, considerando, a aparente importância da hiperforina na recaptação de 5-HT, DA, NA, GABA e L-glutamato (Müller *et al.*, 1998), foi também estudado o efeito desta substância sobre vários mecanismos de condutância iónica em neurónios isolados do hipocampo de rato, com vista a determinar o tipo de interacção com os transportadores membranares (Chatterjee *et al.*, 1999). Na concentração de 1µM a hiperforina inibiu virtualmente todas condutâncias testadas e os efeitos não eram revertidos após a sua remoção. Apesar da

corrente induzida pelo propionato de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) ser inibida pela hiperforina de uma forma competitiva, estas respostas não eram completamente bloqueadas por concentrações elevadas desta substância. Pelo contrário, a conductância iónica activada pelo receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) era completamente inibida pela hiperforina de um modo não competitivo. A hiperforina aparece assim como um potente modulador dos mecanismos envolvidos na condutância iónica neuronal. No entanto, vários dos efeitos observados para a hiperforina não parecem ser mediados por um mecanismo molecular único (Chatterjee *et al.*, 1999).

Foi também sugerido que os efeitos inespecíficos observados *in vitro* poderiam ser devidos à lipossolubilidade da hiperforina ou à elevada reactividade química desta substância. Assim, foram estudados os efeitos da hiperforina na fluidez de membranas cerebrais tendo-se verificado existirem interacções físico-químicas com estruturas membranares específicas, com alteração das propriedades das membranas, para a mesma gama de concentrações em que a hiperforina inibe a recaptção de vários neurotransmissores, podendo este efeito ser relevante para a actividade farmacológica evidenciada (Eckert e Müller, 2001; Eckert *et al.*, 2004).

Estando demonstrada a interferência com a recaptção de diferentes neurotransmissores, foram também estudados os efeitos da administração aguda de dois extractos de *Hypericum perforatum* L., com diferentes teores de flavonóides, nos níveis de 5-HT, NA e DA no cortex, diencéfalo e tronco cerebral no cérebro de rato (Calapai *et al.*, 1999). O extracto LI-160 e o extracto Ph-50 (0,3% de hipericina, 4,5% de hiperforina e 50% de flavonóides), bem como a fluoxetina, induziram um significativo aumento no conteúdo de 5-HT no cortex. No diencéfalo, apenas o extracto Ph-50 induziu um aumento do teor de 5-HT e ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA). Ambos os extractos aumentaram os níveis de DA e NA no diencéfalo. No tronco cerebral o LI-160 não alterou os níveis de neurotransmissores enquanto que o Ph-50 e a fluoxetina originaram um aumento

dos níveis de 5-HT. O extracto Ph-50 também aumentou os níveis de NA no tronco cerebral. Estes dados confirmaram que a administração aguda de um extracto de *H. perforatum* L. pode modificar os níveis cerebrais de neurotransmissores envolvidos na patofisiologia da depressão e são consistentes com os estudos *in vitro* que demonstram a interferência do extracto LI-160 na recaptação de 5-HT, NA e DA em sinaptosomas de rato (Müller *et al.* 1998). Curiosamente, quando os extractos apresentam uma maior concentração de flavonóides os efeitos são mais disseminados e envolvem regiões do cérebro tais como o diencéfalo e o tronco cerebral que estão envolvidos na depressão.

Num outro estudo, verificou-se também um aumento dos níveis de 5-HIAA no córtex cerebral, hipotálamo, hipocampo e núcleo caudato de murganho e de 5-HT no hipotálamo e hipocampo, após tratamento agudo com uma dose baixa (10 mg/kg) de LI-160 (Yu, 2000). Após tratamento crónico, os níveis de 5-HIAA não se alteraram para além dos níveis induzidos pelo tratamento agudo. Ainda, o extracto produziu uma diminuição significativa dos níveis plasmáticos de triptofano, o precursor da 5-HT. Segundo o autor, os efeitos do extracto nos níveis de 5-HIAA e 5-HT são, aparentemente, diferentes daqueles verificados com os bloqueadores da recaptação de 5-HT clássicos (Yu, 2000). Não obstante os resultados destes estudos que verificaram alterações dos níveis cerebrais de 5-HT e do seu metabolito 5-HIAA, após tratamento agudo com extractos de *H. perforatum* L., outros autores não encontraram alterações significativas nos níveis destes compostos (Gobbi *et al.*, 1999; Serdarevic *et al.*, 2001), pelo que não sabemos ainda como é que as alterações na transmissão serotoninérgica estão relacionadas com a actividade antidepressiva (Mennini e Gobbi, 2004)

Paralelamente, dada a aparente relevância da hiperforina para a actividade dos extractos, foi já demonstrado que esta, apesar de ser relativamente instável, é rapidamente biodisponível e atravessa a barreira hemato-encefálica (Ostrowski, 1988). Por outro lado, foi também testada a actividade da hiperforina no modelo de desespero comportamental da depressão e num modelo etológico da

ansiedade, verificando-se que no labirinto elevado em cruz, esta substância mostrou actividade apenas com doses baixas 1h após a administração, enquanto que, pelo contrário, a actividade no teste do desespero comportamental era observada após administração repetida de doses elevadas (Bhattacharya *et al.* 1998; Chatterjee *et al.* 1998). Estes autores sugeriram que o efeito central imediato desta substância seria similar ao dos ansiolíticos e que a actividade antidepressiva surjiria apenas após o desaparecimento dos efeitos agudos. Ainda, também concluíram que, apesar da actividade dos extractos poder ser correlacionada com o teor de hiperforina em muitos estudos farmacológicos, não seria possível prever a eficácia dos extractos baseado apenas no teor deste composto, sugerindo assim a existência de outros compostos que podem contribuir para a sua eficácia clínica (Chatterjee *et al.* 1998). Esta observação é consistente, por exemplo, com os resultados de Butterweck *et al.* (1997) que demonstraram a actividade das hiperquinas e alguns flavonóides, isolados do extracto de *H. perforatum* L., em modelos comportamentais de depressão. Especificamente, três derivados da quercetina 3-O-glicósido, nomeadamente o galactósido (hiperósido), o glucósido (isoquercitrina) e o glucorónido (miquelianina) evidenciaram actividade no teste da natação forçada, enquanto que o ramnósido (quercitrina) e a genina (quercitina) não exibiram qualquer actividade (Butterweck *et al.*, 2000).

Os dados de Simmen *et al.* (1998) também suportam a hipótese dos vários constituintes do *H. perforatum* L. actuarem por diferentes mecanismos, de um modo sinérgico, contribuindo para o seu efeito antidepressivo no SNC. Estes autores estudaram a ligação de extractos, fracções e constituintes de *H. perforatum* L. com vários ligandos de receptores recombinantes do SNC e verificaram que o extracto lipofílico revelou uma actividade relativamente potente na inibição da ligação aos receptores opióides (μ , δ , κ), que estão implicados na modulação de comportamentos afectivos (Raynor *et al.*, 1993), bem como nos

receptores serotoninérgicos 5-HT₆ e 5-HT₇, e uma inibição menos potente da ligação do receptor NK-1. A hipericina, pseudohipericina e hiperforina inibiram a ligação nos receptores opióides e serotoninérgicos com concentrações < 1µM. A ligação de estrogénios foi inibida pela I3, II8 – biapigenina com concentrações na ordem de grandeza µM.

Diversos outros mecanismos têm sido propostos, entre os quais a elevada afinidade específica dos extractos para os receptores GABA_A e GABA_B (K_i (µg/ml) = 0,06 e 0,009 respectivamente) (Cott, 1997). A hipótese do possível envolvimento dos receptores benzodiazepínicos na actividade antidepressiva dos extractos foi também sugerida por Baureithel *et al.* (1997). Estes autores demonstraram, *in vitro*, a capacidade dos extractos de *H. perforatum* L. em inibir a ligação de [³H]-flumazenil ao receptor benzodiazepínico (BZD-R) com um IC₅₀ de 6,83 µg/ml. Esta actividade dos extractos foi correlacionada com os teores de amentoflavona presente no extracto, tendo esta substância isolada mostrado uma inibição significativa da ligação de [³H]-flumazenil com um IC₅₀ de 14,9 nM. Estes autores não encontraram qualquer actividade (IC₅₀ > 1µM) para a hipericina nem para os restantes flavonóides testados (luteolina, quercetina, quercitrina, rutina, I3,II8-biapigenina), mas foi também sugerida a possibilidade de existirem no extracto outros compostos que exercem uma acção sinérgica com a amentoflavona, apesar de dados anteriores sugerirem que este composto não inibe a ligação de flunitrazepam *in vivo* (Nielsen *et al.*, 1988). No entanto, a possível importância da ligação ao receptor GABA dos extractos de *H. perforatum* L. não foi confirmada, entretanto, por outros autores que verificaram um IC₅₀ > 3 µg/ml nos estudos de ligação com o receptor GABA_A (Gobbi *et al.*, 1999; Simmen *et al.*, 1998). Vandenberghe *et al.* (2000) estudaram os efeitos do extracto total e de alguns compostos isolados de *H. perforatum* L. (protohipericina, pseudohipericina, hipericina), sobre o comportamento exploratório de ratos e a sua actividade na caixa claro/escuro. Estes autores demonstraram, para o

extracto total, um aumento da actividade locomotora em campo aberto e uma actividade do tipo ansiolítico na caixa claro/escuro, enquanto que os constituintes isolados não evidenciaram qualquer actividade. Curiosamente, este efeito foi bloqueado com um pré-tratamento com flumazenil sugerindo, portanto, a implicação na actividade ansiolítica de uma activação do receptor benzodiazepínico, consistente com a hipótese do envolvimento destes receptores na actividade antidepressiva dos extractos.

Relativamente à hipótese de um possível envolvimento dopaminérgico no mecanismo de acção dos extractos de *Hypericum perforatum* L. também surgiram alguns dados que parecem confirmar as suposições iniciais de Winterhof *et al.* (1995). Assim, Kleber *et al.* (1999) demonstraram a inibição da hidroxilase em β da dopamina por um extracto de *Hypericum perforatum* L. com um IC_{50} de $0,1\mu M$ (doseado em hipericina). Esta actividade não parece ser devida à hipericina, que apresentou um IC_{50} de $21\mu M$, e a actividade de enzimas envolvidas na síntese de DA, nomeadamente a tirosinase e a tirosina descarboxilase, também não foram influenciadas pela hipericina. Por outro lado, Butterweck *et al.* (1998) demonstraram a actividade de uma fracção contendo hipericina e pseudohipericina (solubilizadas através da procianidina B2) no teste da natação forçada. Esta actividade parece estar relacionada com uma interferência com os receptores dopaminérgicos (D2 e D3) pois é antagonizada pelo sulpiride. Franklin *et al.* (1999) obtiveram alguns dados neuroendócrinos que também sugerem actividade dopaminérgica. Estes autores estudaram os efeitos de uma dose única elevada de LI-160 sobre as concentrações plasmáticas de hormona de crescimento (GH), prolactina (PRL) e cortisol (CORT) em 12 voluntários saudáveis e verificaram um aumento nos níveis plasmáticos de GH, uma diminuição significativa de PRL e a manutenção dos níveis de CORT, o que, segundo os autores, sugeriria um aumento de alguns aspectos da função dopaminérgica no

cérebro. A relação entre estes efeitos e a actividade antidepressiva dos extractos não é ainda conhecida.

A hipericina também demonstrou capacidade de inibir a ligação com receptores muscarínicos da acetilcolina (mAChR) e receptores sigma (σ) (Raffa, 1998). A actividade nos receptores muscarínicos colinérgicos está de acordo com os resultados de Müller e Schäfer (1996), que obtiveram 89% de inibição com 0,01 mmol/L. A actividade da hipericina nos receptores σ é um outro dado interessante, uma vez que os ligandos para estes receptores têm vindo a ser estudados pelo seu potencial como antidepressivos com início de acção rápido dado que produzem uma rápida modulação do sistema serotoninérgico no núcleo dorsal de Raphe e da transmissão glutamatérgica no hipocampo (Bermack e Debonnel, 2005). Panocka *et al.* (2000) estudaram os possíveis mecanismos neuroquímicos envolvidos na actividade dos extractos de *Hypericum perforatum* L. no teste de desespero comportamental, sugerindo que esta actividade pode ser mediada por interacção com os receptores σ e, de algum modo, pelo aumento da actividade serotoninérgica.

Fiebich *et al.* (2001) verificaram que os extractos de *H. perforatum* L. inibem a síntese de Substância P (SP) induzida pela IL-6 e que a hiperforina era o composto do extracto mais eficaz nesta inibição. *In vivo* a SP induz a expressão de citocinas pro-inflamatórias como a IL-6 e os seus antagonistas têm sido descritos como tendo eficácia antidepressiva e ansiolítica. Também, Gobbi *et al.* (2000), demonstraram a interacção da hiperforina com os receptores NK-1, indiciado pelo aumento significativo do binding de SP induzido por baixas concentrações deste composto (10-100 ng/ml).

Não obstante a diversidade de constituintes eventualmente implicados na actividade farmacológica dos extractos de *H. perforatum* L. e a diversidade,

porventura ainda maior, dos mecanismos envolvidos nessa actividade, a maioria dos estudos mais recentes sobre os mecanismos moleculares da actividade antidepressiva desta planta têm incidido sobre a hiperforina que, actualmente, se julga poder afectar vários sistemas de neurotransmissores no cérebro, putativamente por modulação do estado físico das membranas neuronais, relacionada com a sua capacidade para dissipar o gradiente de pH através da membrana das vesículas sinápticas (Eckert *et al.*, 2004; Roz e Rehavi, 2003). Yoshitake *et al.* (2004) sugeriram um mecanismo mais complexo para a inibição da recaptação de monoaminas, demonstrando para os extractos de *H. perforatum* L. um aumento preferencial da dopamina extracelular no córtex pré-frontal do rato. Bucholzer *et al.* (2002) mostraram uma modulação dual da libertação de acetilcolina no estriado pela hiperforina, com concentrações mais baixas a aumentar a libertação de acetilcolina que é inibida por doses mais elevadas, e Kiewert *et al.* (2004) demonstraram que esta libertação de acetilcolina era dependente de cálcio. Por outro lado, Gobbi *et al.* (2004) confirmaram o envolvimento da hiperforina na inibição da libertação de substância P induzida pela IL-6 tal como já havia sido demonstrado por Fiebich *et al.* (2000). Por outro lado, continuaram a surgir referências sobre o possível envolvimento de outros compostos na actividade antidepressiva, nomeadamente dos flavonóides, tendo sido demonstrado que estes compostos podem inibir a função hipotalâmica-pituitária-adrenérgica (HPA), normalmente activada em doentes deprimidos, reduzindo a hipersecreção de cortisol e hormona adrenocorticotropica (ACTH) (Butterweck *et al.*, 2004). Apesar da maioria dos estudos relativos à farmacologia da hipericina incidirem actualmente sobre as eventuais propriedades anti-tumorais ou anti-virais desta interessante molécula, Kubin *et al.* (2005) reportaram que esta substância também pode afectar a regulação dos genes envolvidos no controlo da função HPA. Simbrey *et al.* (2004) também demonstraram a capacidade da hipericina para regular inversamente

(downregulate) a ligação beta-adrenergica no córtex frontal do rato, propriedade já demonstrada para o extracto total.

De grande relevância biológica e clínica foram as descobertas recentes sobre a activação do receptor pregnano X (PXR) pelos extractos de *H. perforatum* L., que se traduz na indução da isoenzima 3A4 do citocromo P450 (CYP450). Este efeito traduz-se na aceleração do metabolismo hepático de diversos fármacos que, quando administrados concomitantemente, poderão não atingir as concentrações plasmáticas necessárias para a sua actividade terapêutica. Foram já reportados vários casos de interacções que resultaram em diminuição da concentração plasmática de vários fármacos, nomeadamente com a ciclosporina, indinavir, amitriptilina, digoxina, verapamil, omeprazole, contraceptivos orais e simvastatina (Haller, 2004).

Como conclusão poder-se-á dizer que apesar dos estudos clínicos terem já correlacionado a eficácia terapêutica dos extractos de *Hypericum perforatum* L. com o seu conteúdo em hiperforina (Zanoli, 2004) e da inibição inespecífica da recaptação da 5-HT, NA, DA e GABA desencadeada por esta substância ser um dos mecanismos, eventualmente o principal, envolvido na actividade antidepressiva desses mesmos extractos, a relevância dos restantes mecanismos acima referidos não está ainda completamente esclarecida. Não obstante, a hiperforina é agora aceite como um dos constituintes mais importantes envolvidos na actividade dos extractos, sugerindo-se também que os flavonóides e a hipericina desempenhem um papel importante.

2.2. *Melissa officinalis* L.

O uso medicinal da *Melissa officinalis* L., vulgarmente conhecida em Portugal pelo nome vernáculo de Erva-Cidreira, encontra-se referenciado pelo menos desde o século I da nossa era, tendo sido descrita por Dioscórides na sua obra "De Matéria Medica". O seu uso tornou-se popular na Europa durante a Idade-Média (Koch-Heitzmann e Schultze, 1988), sendo referenciado para as suas infusões um efeito benéfico para o cérebro (Coghan, 1584; Evelyn, 1699) e, portanto, o seu uso indicado em todas as afecções supostamente originadas por um "desarranjo do sistema nervoso" (Grieve, 1931).

Em Portugal, é ainda actualmente uma planta muito utilizada para a preparação de infusões às quais são vulgarmente atribuídas propriedades calmantes e gastro-protectoras. O seu uso nos sistemas de medicina tradicional também é comum no nosso país onde pesquisas recentes fazem referência à sua utilização. (Salgueiro, 2004; Novais, 2004).

A Farmacopeia Portuguesa VII inclui uma monografia da Melissa, Folha (*Melissae folium*) e diversas outras publicações de referência incluem também monografias desta planta:

- British Herbal Pharmacopoeia (1996)
- British Pharmacopoeia (2002)
- The Complete German Commission E Monographs (1998)
- The European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCO) Monographs (1996)
- Martindale, 33rd Ed. (2002)
- European Pharmacopoeia, 4th Ed. (2004)
- World Health Organization – Monographs on selected medicinal plants (2002)

O uso desta planta está indicado, segundo a monografia da Comissão E (1998), nos distúrbios de sono com origem nervosa e espasmos gastrointestinais dada a sua actividade sedativa e carminativa, respectivamente. Não são conhecidas

contra-indicações para esta planta nem estão descritos efeitos secundários adversos (Wong *et al.*, 1998) embora a ingestão exagerada do óleo essencial possa provocar sonolência, bradicardia, bradipneia e hipotensão (Proença da Cunha *et al.*, 2003).

Para além do simples uso das folhas de *Melissa officinalis* L. na preparação de infusões, encontram-se também no mercado diversas formulações de produtos de saúde contendo extractos desta planta. Nessas formulações a *Melissa officinalis* L. aparece normalmente associada a outras plantas com putativa acção ansiolítica ou sedativa. Na Alemanha, o catálogo de produtos da indústria farmacêutica (Rote List, 2001) incluía 49 produtos contendo *Melissa officinalis* L., nos quais a associação mais comum é feita com a *Valeriana officinalis* L., tendo já sido publicados estudos em humanos que sugerem que esta associação poderá melhorar significativamente a qualidade do sono em pessoas com distúrbios de sono (Dressing *et al.*, 1992; Cerny e Schmid, 1999). Em Portugal não existe semelhante registo pelo que não é possível saber quantas nem quais as preparações existentes.

Para além deste uso oficialmente reconhecido, encontramos nos modernos compêndios de fitoterapia inúmeras outras indicações baseadas no seu uso tradicional, como sejam gastrites, ansiedade, hipertensão ou taquicardia, entre outras que podem, de alguma forma, estar relacionados com a sua potencial actividade ansiolítica (Proença da Cunha *et al.*, 2003).

A indicação tradicional desta planta para a recuperação de funções mentais (Culpeper, 1652; Gerard, 1636) e do seu efeito benéfico sobre a memória, deu origem, mais recentemente, à pesquisa sobre a eventual acção sobre os receptores da acetilcolina (Wake *et al.*, 2000) e ao estudo da sua potencial utilização no tratamento da doença de Alzheimer (Kennedy *et al.*, 2003).

Apesar da longa história de utilização desta planta e das diversas acções que lhe são atribuídas não está cabalmente estabelecido qual o perfil farmacológico das suas infusões ou extractos. Por outro lado, não são conhecidos quais os

constituintes eventualmente envolvidos nas actividades farmacológicas descritas ou os mecanismos pelos quais estes exercem a sua actividade, não obstante o facto de desde à bastante tempo serem conhecidas propriedades farmacológicas relevantes de alguns dos principais constituintes (Koch-Heitzmann e Schultze, 1984; Wagner e Sprinkmeyer, 1973). Torna-se, portanto, necessário proceder a uma revisão dos estudos farmacológicos e fitoquímicos para enquadrar o estudo da actividade ansiolítica / sedativa das infusões obtidas com a folha desta planta.

2.2.1. Actividades farmacológicas descritas e mecanismos propostos

A actividade antimicrobiana do óleo essencial (Larrondo *et al.*, 1995), bem como a actividade antiviral (Wölbli e Leonhardt, 1994; Koytchev *et al.*, 1999; Dimitrova *et al.*, 1993) e acção antioxidante (Herodez *et al.*, 2003) dos extractos aquosos foram já objecto de inúmeros estudos nesta espécie mas não nos parece existir uma relação entre estas actividades farmacológicas e o uso tradicional desta planta como ansiolítico ou sedativo. Analisaremos em maior detalhe o estudo daquelas actividades farmacológicas, potencialmente mais correlacionadas com este uso tradicional.

Estudos neurofarmacológicos - o estudo *in vivo* das alterações comportamentais após a inalação do óleo essencial por ratos, revelou que este possui um ligeiro efeito sedativo (Buchbauer *et al.*, 1993). A administração do óleo essencial bem como dos seus principais terpenóides isoladamente, originou uma diminuição da actividade motora em ratos, sugerindo também um efeito do tipo sedativo (Wagner *et al.*, 1984). Parecendo claro que o óleo essencial desempenhará um papel no eventual efeito sedativo desta espécie, não é contudo evidente qual o mecanismo pelo qual este exercerá a sua acção ou quais os constituintes envolvidos, não obstante o estudo preliminar de Elliot *et al.* (2006) com os radioligandos, [³H]-cetanserina, [³H]-8-hidroxi-2-(di-n-

propilamino)tertralina) (8-OH-DPAT) e [³H]-pirenzepina sugerir o envolvimento dos receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A} e receptores M1, respectivamente.

Os efeitos comportamentais da inalação do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. foram também já estudados em humanos (Ballard *et al.*, 2002) num ensaio duplamente cego com 71 doentes sofrendo de demência severa. Após 4 semanas de tratamento os índices de agitação e qualidade de vida do grupo sujeito a tratamento apresentava-se, por comparação com o grupo tratado com placebo, menos agitado, mais socialmente activo e dispensava mais tempo em actividades construtivas, reforçando assim a possibilidade de o óleo essencial exercer *per se* uma actividade neurofarmacológica.

O extracto hidroalcoólico liofilizado de *Melissa officinalis* L. também evidenciou uma actividade do tipo sedativo em murganhos ao reduzir os parâmetros comportamentais avaliados num ensaio de ambiente não-familiar (teste das escadas) e num ensaio de ambiente familiar (caixa de dois compartimentos), para além de potenciar o sono barbitúrico (Soulimani *et al.*, 1991). Contudo, estes mesmos autores não verificaram qualquer actividade sedativa para o óleo essencial desta mesma planta.

O estudo do efeito sedativo agudo da administração de um extracto hidroalcoólico de *Melissa officinalis* L. num ensaio randomizado e duplamente cego, com 12 voluntários saudáveis previamente tratados com 100mg de cafeína, não revelou um efeito significativamente diferente do placebo (Schulz *et al.*, 1998). No entanto, encontram-se na literatura diversos ensaios clínicos de formulações contendo extractos de *Melissa officinalis* L. em associação com outras plantas, que sugerem uma actividade ansiolítica / sedativa destas formulações.

Uma das associações mais comuns encontradas é com *Valeriana officinalis* L. e um dos estudos clínicos foi realizado com uma formulação de comprimidos com 120mg de um extracto de *Valeriana officinalis* L. e 80mg de *Melissa officinalis* L. (Cerny e Schmid, 1999) (também disponível nas farmácias Portuguesas). Os resultados deste ensaio duplamente cego, com 98 voluntários saudáveis dos

quais 32 foram incluídos no grupo administrado com placebo, evidenciaram que uma percentagem significativamente superior dos doentes do grupo de tratamento descreveu melhorias significativas na qualidade do seu sono, com uma eficácia comparável ao triazolam, mas a análise da pontuação na escala visual análoga não revelou diferenças significativas entre os dois grupos.

Num outro ensaio duplamente cego, desta feita envolvendo doentes com insónia e testando uma formulação semelhante (+40mg de extracto de *Valeriana officinalis* L.), com duas tomas diárias durante duas semanas, verificou-se igualmente que o grupo de tratamento referiu uma melhoria significativa da qualidade e eficiência do seu sono (Dressing *et al.*, 1992 e 1996). Encontram-se também na literatura estudos clínicos com formulações ainda mais complexas contendo, por exemplo, uma associação de *Valeriana officinalis* L., *Humulus lupulus* L. e *Melissa officinalis* L. (Orth-Wagner, 1995), e para a qual foram igualmente verificadas melhorias significativas na qualidade de sono dos grupos em tratamento mas, contudo, a complexidade da formulação não permite aferir em que medida o extracto de *Melissa officinalis* L. seria relevante para a actividade verificada.

Actividade colinérgica e doença de Alzheimer – as referências históricas sobre os efeitos benéficos da *Melissa officinalis* L. nos casos de perda de memória levaram alguns autores a sugerir o potencial interesse desta planta no tratamento da doença de Alzheimer (Perry *et al.*, 1999). De facto, a investigação neste domínio tem demonstrado que diversos extractos de *Melissa officinalis* L. possuem actividade no sistema nervoso central ao nível dos receptores da acetilcolina, tendo sido demonstrada a sua capacidade de ligação aos receptores nicotínicos (Perry *et al.*, 1996; Wake *et al.*, 2000) e muscarínicos (Wake *et al.*, 2000). Os estudos de Perry *et al.* (1996) demonstraram ainda que o extracto da folha fresca, mas não da folha seca, possuía uma ligeira actividade inibidora da acetilcolinesterase em cérebro humano. Esta última actividade não foi confirmada

por Kennedy et al (2003) que, no entanto, relativamente à afinidade para os receptores muscarínicos e nicotínicos, verificaram existirem diferenças entre extractos desta mesma planta, podendo essas diferenças estar na origem de alguns resultados aparentemente inconsistentes (Kennedy *et al.*, 2002).

Assim, os resultados dos estudos citados que envolvem doentes com doença de Alzheimer estão, pelo menos parcialmente, em linha com o uso tradicional da planta pelas suas propriedades sedativas, uma vez que caracteristicamente estes doentes podem apresentar-se com alguma agitação. Por outro lado a actividade colinérgica poderá ser um elemento adicional para corrigir o défice colinérgico também característico desta doença. Ainda, foi também sugerido que a actividade antioxidante já demonstrada para os extractos desta planta (Hohmann *et al.*, 1999; Mantle *et al.*, 2000) poderá conferir alguma protecção contra os efeitos nocivos dos radicais livres de oxigénio nas situações de demência.

Actividade antiespasmódica – Parece não existirem dúvidas sobre a actividade antiespasmódica do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. verificada em diversos modelos *in vitro* e admite-se que essa actividade possa estar relacionada com o teor de citral presente no óleo essencial (Sadraei *et al.*, 2003). O óleo essencial inibiu as contracções induzidas em íleo de porco-da-guiné, duodeno e canais deferentes de rato e jejuno e aorta de coelho *in vitro* (Wagner e Sprinkmeyer, 1973; Debelmas e Rochat, 1967). O óleo essencial exibiu igualmente actividade relaxante sobre o músculo da traqueia de porco-da-guiné e sobre uma outra preparação de músculo liso (Reiter e Brandt, 1985). Contudo, o estudo desta actividade em extractos aquosos ou etanólicos tem produzido resultados menos evidentes. Um extracto etanólico obtido a partir das folhas inibiu as contracções induzidas em íleo de porco-da-guiné pela histamina ou bário (200mg/ml) mas esta actividade não se verificou com o extracto aquoso (Itokawa *et al.*, 1983) e, um outro extracto etanólico a 30%, não inibiu as contracções induzidas pela histamina ou acetilcolina no mesmo modelo farmacológico (Forster *et al.*, 1980).

2.3 *Tilia x europaea* L.

Às infusões preparadas com as inflorescências *Tilia x europaea* L., mas também de outras como a *T. tomentosa*, *T. argentea* e *T. americana*, são atribuídas propriedades sedativas, anti-espasmódicas, diaforéticas, diuréticas e suavemente adstringentes. O seu uso tradicional é reportado para casos de ansiedade, insónia, estados gripais, tosse irritativa, más digestões, cólicas gastrointestinais, enxaqueca, histerismo, hipertensão associada a arteriosclerose ou tensão nervosa (Proença da Cunha, 2003). A Comissão E aprovou o uso de preparações desta planta na Alemanha para a gripe, tosse e bronquite. Em Portugal, as infusões de *Tilia* são bastante populares e as referências da literatura sobre o seu uso tradicional, mencionam a utilização desta planta em diversos distúrbios relacionados com a ansiedade mas também em resfriados e estados febris (Fontes-Ribeiro, 2000).

2.3.1. Actividades farmacológicas descritas e mecanismos propostos

Apesar do generalizado uso tradicional de diversas plantas deste género, o número de estudos dedicados à avaliação científica da sua utilização terapêutica é bastante limitado. Assim, não só não está validada a sua utilização nos distúrbios relacionados com ansiedade como também não são conhecidos os mecanismos implicados na eventual actividade terapêutica. Não obstante, alguns estudos relacionaram a actividade farmacológica *in vitro* e *in vivo* das infusões desta planta com a sua utilização tradicional em situações de algum modo relacionadas com a ansiedade. Cavadas *et al.* (1997) estudaram a interacção *in vitro* das infusões obtidas a partir das inflorescências de *Tilia x europaea* L. com o complexo-receptor GABA_A usando [³H]-muscimol e [³H]-flunitrazepam e, ainda, a captação de ³⁶Cl⁻ em sinaptoneurosomas do córtex de rato. Os autores concluíram que estes extractos possuíam uma quantidade significativa de GABA que poderia justificar, ainda que parcialmente, os resultados obtidos, mas, adiantaram

também a possibilidade de o extracto conter outras substâncias do tipo benzodiazepínico que deslocassem o [³H]-flunitrazepam, contrariando assim a ligação de [³H]-flunitrazepam induzida pelo GABA. Recorrendo igualmente a ensaios de ligação para os receptores benzodiazepínicos foi também possível ao grupo de Viola *et al.* (1994) isolar, a partir da *Tilia argentea*, uma fracção de flavonóides que apresentou uma significativa actividade do tipo ansiolítico, nos ensaios do labirinto elevado em cruz e da curiosidade, não obstante a afinidade específica de um dos ligandos gabaérgicos identificados (caempferol) ser demasiado baixa para poder justificar a actividade evidenciada.

2.4. *Passiflora edulis* Sims

A *Passiflora edulis* Sims é referida pelo seu uso na medicina popular Brasileira como “relaxante”, sendo este uso provavelmente originário das populações nativas da bacia amazónica (Maluf *et al.*, 1991; Vale e Leite, 1983). Ao longo do tempo, são inúmeras as referências ao uso terapêutico do infuso das folhas de diversas espécies de *Passiflora* na medicina popular para o tratamento de distúrbios relacionados com o sistema nervoso (Dhawan *et al.*, 2004). Existem também referências ao seu uso na prática clínica convencional embora uma revisão recente dos ensaios clínicos realizados tenha concluído da necessidade de realizar estudos mais detalhados para provar o benefício do uso de extractos de *Passiflora* no tratamento da ansiedade (Miyasaka *et al.*, 2007).

A *Passiflora incarnata* L. é de entre as *Passifloraceae* aquela que é mais vulgarmente utilizada na Europa, onde se encontra referenciada como uma espécie medicinal pelas suas propriedades ansiolíticas / sedativas, em diferentes publicações oficiais (ESCOP, German Commission E Monographs). Apesar deste facto, tem havido ao longo dos anos várias referências sobre a actividade ansiolítica / sedativa de várias outras espécies do género *Passiflora*,

nomeadamente *P. edulis* Sims (Petry *et al.*, 2001), *P. coerulea* L. (Wolfman *et al.*, 1994) ou *P. alata* Curtis (Oga *et al.*, 1984). Estes estudos, geralmente realizados com diferentes modelos animais evidenciam uma insuficiente caracterização dos extractos e / ou do material vegetal utilizado e este dado tem gerado alguma controvérsia sobre quais as espécies deste género que possuem actividade neurofarmacológica e quais os constituintes envolvidos nessa actividade (Dhawan *et al.*, 2004).

2.4.1. Actividade farmacológica e mecanismos de acção propostos

A principal actividade farmacológica atribuída a várias espécies de *Passiflora*, tem sido a acção ansiolítica ou sedativa do infuso das suas folhas (Aoagy *et al.*, 1974; Lutomski e Malek, 1975; Vale e Leite, 1983; Oga *et al.*, 1984; Duraffourd e Pratz, 1990; Maluf *et al.*, 1991; Petry *et al.*, 2001; Dhawan *et al.*, 2001 a e b; Shinomiya *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005; Reginatto *et al.*, 2006; Lolli *et al.*, 2007; de Castro *et al.*, 2007; Nassiri *et al.*, 2007). Comparativamente, poucos destes estudos abordam a actividade da *Passiflora edulis* Sims. No entanto, foi já demonstrado que os extractos aquosos desta planta possuem uma acção depressora inespecífica sobre o sistema nervoso central (Maluf *et al.*, 1991) e, num ensaio comparativo, os extractos hidro-alcoólicos desta espécie exibiram uma actividade do tipo ansiolítico no labirinto elevado em cruz, significativamente superior à *Passiflora alata* (incluída na Farmacopeia Brasileira, 1977) (Petry *et al.*, 2001).

Não se encontram descritos quais os prováveis mecanismos de acção desta planta embora nos estudos mais recentes com outras espécies do mesmo género (*P. actinia* e *P. incarnata* L.) se sugira um possível envolvimento dos receptores benzodiazepínicos (Lolli *et al.*, 2007 e Dhawan *et al.*, 2004).

Estudo bioguiado

3.1 Introdução

Antes da apresentação e análise dos resultados obtidos na avaliação da actividade neurofarmacológica das diferentes plantas e dos compostos isolados, é necessário fazer algumas considerações sobre a estratégia adoptada na pesquisa e sobre algumas questões conceptuais relacionadas com o tipo de ensaios realizados.

Quando está em causa a análise de uma dada actividade farmacológica num número elevado de amostras de material vegetal ou de compostos isolados, a estratégia de pesquisa normalmente adoptada começa pelo estudo *in vitro* da sua interacção com um ou mais sistemas biológicos (proteína, célula, membranas), que sirvam de modelo para uma determinada via biomolecular associada com a actividade farmacológica em estudo. A evolução da robótica, dos detectores e dos sistemas de software para gerir a integração e funcionamento de equipamentos complexos, permitiu o advento do "high-throughput screening", possibilitou a análise de muitos milhares de amostras num reduzido espaço de tempo (Castagné *et al.*, 2006). Este é o tipo de "screening" levado a cabo pela indústria farmacêutica como ponto de partida na busca de novas moléculas com actividade terapêutica. Neste caso, o recurso aos ensaios com modelos animais *in vivo* aparece apenas numa segunda fase, já com vista à confirmação dos resultados do estudo farmacológico *in vitro*.

Quando a actividade farmacológica em estudo é a ansiedade, não podemos esquecer que esta caracteriza uma emoção descrita apenas em mamíferos superiores e humanos. Como consequência não estão disponíveis modelos de ansiedade *in vitro* ou *in silico* (Schmidt e Müller, 2006), não obstante, em face do

conhecimento actual sobre os mecanismos neurobiológicos da ansiedade, ser possível identificar um conjunto de ensaios *in vitro* que constituem uma ferramenta fundamental na pesquisa de novas moléculas com capacidade de interagirem especificamente com um determinado complexo/receptor/proteína (os estudos *in vitro* são abordados no Cap. II, secções 3.4, 4.5 e 5.3).

Quando no estudo de um determinado material vegetal seguimos uma indicação de uso tradicional bem estabelecida e minimamente consolidada (por exemplo, com estudos de outros autores), partimos já do princípio que algum ou alguns dos constituintes desse material possuirão actividade farmacológica, como foi o caso das plantas seleccionadas para o nosso estudo. Nestes casos, um problema comum às plantas seleccionadas, bem como à maioria das plantas usadas com fins terapêuticos, é não só o desconhecimento dos constituintes envolvidos nessa actividade, como também o mecanismo de acção envolvido. Assim, quando o objectivo é identificar qual ou quais os constituintes envolvidos numa actividade farmacológica que é exercida através de um mecanismo desconhecido, pareceu-nos evidente a necessidade de, pelo menos numa primeira fase, recorrer a modelos animais válidos para o estudo da actividade em questão, de modo a avaliar o potencial envolvimento dos diferentes grupos de compostos presentes na planta.

3.2 Ensaios "*in vivo*": Algumas questões conceptuais

Para melhor perceber a natureza dos ensaios realizados para aferir a actividade ansiolítica dos extractos e compostos em estudo, é fundamental considerar primeiro o que é a ansiedade:

A ansiedade é um estado psicológico, fisiológico e comportamental, induzido em humanos e animais por uma ameaça, real ou potencial, à sua sobrevivência ou bem-estar. É caracterizada por um aumento da excitação e expectativa, por uma

activação autonómica e neuroendócrina e por padrões comportamentais específicos. A função destas alterações é preparar o organismo para enfrentar situações adversas ou inesperadas e pode ser desencadeado como resposta a estímulos exteriores visuais, auditivos, olfactivos ou somatosensoriais, ou a estímulos interoceptivos através das vísceras e dos sistemas nervoso autónomo e endócrino. A ansiedade também pode ser produzida através de processos cognitivos mediando a antecipação, interpretação ou recordação de ameaças percebidas (Charney e Drevets, 2002).

A ansiedade patológica interfere com a capacidade do organismo de enfrentar os desafios quotidianos (Steimer, 2002) e, sumariamente, uma classificação dos seus distúrbios primários incluirá a ansiedade generalizada, pânico, ansiedade social e de separação, agorafobia, stress pós-traumático e perturbações obsessivo-compulsivas (Klein, 2002; Nutt, 2001).

Em face da definição já referida, qual a distinção entre medo e ansiedade?

A ansiedade é um conceito complexo. Uma das razões para alguma confusão em torno da ansiedade é a sua semelhança com o medo. Ambos os estados emocionais envolvem uma sensação de apreensão e o medo, definido pelos etologistas como um estado motivacional despoletado por estímulos específicos que originam comportamentos defensivos ou fuga (Steimer, 2002), pode ser sentido como “parte” da ansiedade embora, ao contrário do medo que é fortemente dependente do seu objecto, a ansiedade possa ser definida como uma resposta generalizada a uma ameaça desconhecida ou um estímulo interno. Aparentemente os etologistas não utilizam o conceito de ansiedade, provavelmente porque a definição de medo que empregam compreende os principais aspectos biológicos da ansiedade. Assim, tem sido sugerido que a ansiedade só pode ser compreendida se forem considerados alguns dos seus aspectos cognitivos, particularmente porque um dos aspectos fundamentais da

ansiedade parece ser o factor incerteza (Steimer, 2002). Porque ambos os estados partilham um conjunto de características é por vezes difícil a sua distinção, levando alguns autores a sugerir que se tratam de situações indistintas enquanto outros, argumentando diferenças na sua etiologia, padrões de resposta, duração e intensidade, defendem tratarem-se de fenómenos claramente distintos e separados (Craig *et al.*, 2000).

O facto de a ansiedade e o medo serem provavelmente estados emocionais distintos não exclui alguma sobreposição dos mecanismos cerebrais e comportamentais subjacentes. De facto, a ansiedade pode ser uma forma mais elaborada de medo que “fornece” ao indivíduo uma melhor capacidade para se adaptar e planear o seu futuro (Barlow, 2000).

No seu trabalho sobre “A expressão das emoções no homem e nos animais” (1872) Charles Darwin lançou as fundações para que os padrões defensivos de outras espécies fossem vistos como percursos essenciais das reacções humanas de medo e ansiedade. Mais recentemente, diversos ensaios clínicos conceptualizaram as perturbações de ansiedade em humanos como alterações do sistema de defesa em que a característica fundamental é uma activação desadequada do comportamento defensivo como consequência de uma avaliação errónea do perigo (Rodgers *et al.*, 1997). O trabalho de Blanchard e colaboradores enfatizou esta visão Darwiniana e demonstrou claramente o paralelismo entre os comportamentos defensivos humanos em face de ameaças potenciais e os padrões de comportamento relacionados com a ansiedade em mamíferos não humanos (Blanchard *et al.*, 2001).

Fazemos aqui esta breve referência aos aspectos evolutivos e à relação entre medo e ansiedade pois muitos dos modelos animais que constituem a espinha dorsal do estudo pré-clínico dos distúrbios afectivos relacionados com a ansiedade (Kalueff *et al.*, 2007), são modelos comportamentais que reproduzem

alguns dos sintomas observados em humanos (Hamon, 1994; Sanger, 1991). Está hoje bem estabelecido que a ansiedade é um comportamento altamente conservado em todas as espécies e que o seu estudo pode ser realizado de modo fiável e satisfatório com roedores usando paradigmas do comportamento específicos e padronizados (Ohl, 2003).

Mas, em face do exposto, quais serão então os requisitos necessários para o uso de modelos animais no estudo da ansiedade e em que medida estes testes poderão servir como modelo de um estado emocional complexo e com componentes cognitivos?

Idealmente, qualquer modelo animal deverá mimetizar a condição humana em questão, com respeito à sua etiologia, sintomatologia e tratamento (Geyer e Markou, 1995). Os modelos animais de ansiedade não são excepção, pelo que em princípio deverão possuir validade preditiva, facial e teórica. Na farmacologia experimental o termo validade descreve a relação entre os resultados de um modelo comportamental experimental e as observações clínicas do distúrbio modelado (Green e Hodges, 1991). A validade preditiva refere-se à sensibilidade do modelo aos ansiolíticos conhecidos mas não a outros tipos de agentes psicoactivos (Rodgers e Cole, 1994). A validade facial implica que a resposta comportamental do animal em face da ameaça ou do estímulo causador da aversão é semelhante ao comportamento conhecido em humanos. Para cumprir o requisito da validade teórica os mecanismos subjacentes à ansiedade, bem como as suas causas psicológicas devem ser idênticos (Ohl, 2005). Infelizmente, apesar de muitos modelos possuírem um razoável grau de validade facial, todos apresentam insuficiências em termos de validade preditiva e teórica (Rodgers e Cole, 1994). Em todos os modelos conhecidos são detectados falsos positivos ou negativos e a validação teórica é comprometida pelo nosso conhecimento incompleto da ansiedade humana (Lister, 1990). De facto, no contexto de

doenças psiquiátricas complexas, em que a presença de alguns dos seus elementos caracterizadores (por exemplo, ansiedade antecipatória, sentimentos de culpa ou impotência, ideação suicidária) é definida através de uma verbalização subjectiva, é impossível que um modelo animal possa preencher os requisitos enunciados (Schmidt e Müller, 2006). No entanto, uma vez que a resposta fisiológica e comportamental a estímulos ameaçadores ou causadores de aversão é semelhante em humanos e animais, podemos assumir que os modelos animais podem servir para pelo menos dois fins distintos: 1) como testes comportamentais para a pesquisa de fármacos ansiolíticos e 2) como ferramentas para o estudo de aspectos específicos de sintomas relacionados com distúrbios da ansiedade (Ohl, 2005).

Por vezes os termos "modelos" e "testes" são empregues indistintamente mas a diferença entre a evocação da patologia e a medida das respostas deve ser reconhecida. Por exemplo, alguns autores indicam que o "campo-aberto" não é um teste e a "suspensão pela cauda" não é um modelo, enquanto outros usam ambos os termos como sinónimos. De facto, o teste da natação forçada não induz depressão (não é portanto um modelo do comportamento depressivo) mas pode detectar efeitos antidepressivos (como um teste), enquanto que, após repetidos ensaios pode induzir depressão tornando-se um modelo. O "campo-aberto" induz ansiedade (como um modelo) é sensível a fármacos ansiolíticos (como um teste) e também detecta efeitos antidepressivos em animais deprimidos (novamente como um teste). Assim, cabe ao investigador definir claramente o papel dos ensaios no contexto específico em que são empregues (Kalueff *et al.*, 2007; Staay, 2006). No nosso caso os ensaios com animais foram genericamente empregues como testes embora, por vezes, na análise dos resultados nos referamos a alguns ensaios como modelos (por exemplo, o labirinto elevado em cruz) pois, de facto, se considera que induzem no animal um estado de ansiedade.

3.3. Ensaio "in vivo"

3.3.1. Labirinto elevado em cruz – de entre os ensaios "in vivo" com animais actualmente em uso, o labirinto elevado em cruz será seguramente um dos mais populares (Carobrez e Bertoglio, 2005). O seu desenvolvimento resultou do trabalho de Montgomery (1955) sobre a relação entre o medo e o impulso exploratório em ratos, cuja premissa básica assentava no despoletar simultâneo de medo e curiosidade suscitados pela introdução do rato num novo ambiente, assim criando um conflito típico entre aproximação/ afastamento. Usando a exploração a partir da gaiola de manutenção, Montgomery verificou que os ratos apresentavam maiores níveis de exploração de áreas fechadas do que áreas abertas e, quando confrontados com a opção entre ambas num labirinto em forma de Y, consistentemente preferiam a zona fechada. Estes dados foram interpretados como indicação de que as zonas abertas induzem um nível mais elevado de medo o que origina uma maior aversão do animal para estas áreas (Rodger e Cole, 1994). Este trabalho foi posteriormente desenvolvido por Handley e Mithani (1984) para a criação de um potencial modelo animal de ansiedade. Estes autores usaram pela primeira vez um labirinto elevado 70cm acima do solo em forma de X, com dois braços opostos fechados e dois abertos e verificaram que ansiolíticos como o diazepam aumentavam a razão entre o número de entradas nos braços (zonas) abertos e o número total de entradas nos quatro diferentes braços (zonas), enquanto substâncias ansiogénicas como a picrotoxina diminuían essa mesma razão. Deste período inicial de desenvolvimento do labirinto elevado em cruz, valerá ainda a pena citar o trabalho de Pellow *et al.* (1985), que procederam à sua validação farmacológica e analisaram a validade comportamental e fisiológica do modelo, tendo introduzido um índice adicional de ansiedade: razão entre o tempo na zona aberta e o tempo total do ensaio, bem como o de Lister (1987), que desenvolveu uma versão do mesmo labirinto para

murganhos e concluiu que os resultados obtidos eram comparáveis àqueles obtidos anteriormente com ratos.

As medidas inicialmente validadas como índices de ansiedade foram, portanto, a % de entradas e a % de tempo que o animal permaneceu nas zonas abertas do labirinto, cuja expressão surge aumentada quando os animais estão sob a acção de fármacos ansiolíticos. Ao longo dos anos em que este ensaio tem estado em uso na pesquisa de fármacos e no estudo da ansiedade, foram introduzidas e validadas novas medidas não só relacionadas com a análise da localização do animal ao longo do tempo do ensaio, mas também resultantes de uma abordagem etológica, resultante de uma melhor compreensão do comportamento defensivo dos roedores.

Apesar de o labirinto elevado em cruz se ter revelado bastante sensível a fármacos que exercem a sua acção ansiolítica através da modulação do complexo-receptor GABA, também se verificou que os resultados obtidos com fármacos cuja acção fosse exercida por outro mecanismo, nomeadamente serotoninérgico (por ex., buspirona), eram bastante mais variáveis (Rodgers e Cole, 1994; Griebel, 1995; Handley e McBlane, 1993; revistos recentemente por Pinheiro *et al.*, 2007). O significado desta aparente inconsistência foi questionado dada a grande variabilidade de metodologias adoptadas pelos diferentes laboratórios (Hogg, 1996) e o início de acção demorado da buspirona (Rodgers, 1997) mas, em todo o caso, a introdução da análise dos chamados comportamentos de avaliação do risco (Griebel *et al.*, 1995), baseados no trabalho de Blanchard *et al.* (1991, 1994) sobre comportamentos defensivos, com a adopção de uma análise do tipo etológico do comportamento (ver Tabela 3.3.1a, com etograma típico e descrição de cada parâmetro), melhorou a sensibilidade deste ensaio para fármacos como a buspirona (Cole e Rodgers, 1994), tendo-se concluído que, em geral, as medidas dos comportamentos de avaliação de risco (retorno à zona fechada, mergulhos e "stretch approach

postures” - SAP) são mais sensíveis à acção de fármacos do que os índices tradicionais de ansiedade (Rodgers e Cole, 1994). Por outro lado, a introdução da análise destes parâmetros aumentou a validade ecológica deste ensaio, pela relação entre os comportamentos observados e o repertório defensivo dos murganhos (Rodgers e Dalvi, 1997).

Tabela 3.3.1a

Etograma de comportamentos dos murganhos registados no labirinto elevado em cruz (Adaptado de Espejo, 1997)

Entrada na zona aberta*	Movimentação da plataforma central com entrada (membros anteriores e posteriores) num dos braços abertos
Entrada na zona fechada*	Movimentação da plataforma central com entrada (membros anteriores e posteriores) num dos braços fechados
Levantamentos	Postura erecta apoiada nos membros posteriores com os membros anteriores movimentando-se no ar ou apoiados sobre uma das paredes do labirinto
Comportamento de auto-limpeza (“Grooming”)	Murganho morde/lambe o pêlo, “lava” a face ou lambe os genitais
Retorno ao braço fechado	Saída de um dos braços fechados apenas com os membros anteriores seguida de regresso a essa mesma zona fechada
“Stretched attention posture” (SAP)	Elongação de cabeça e ombros para a frente seguido de retracção à posição original. Este parâmetro é subdividido em duas categorias consoante ocorra na zona fechada ou na plataforma central (SAP protegido) ou na zona aberta (SAP desprotegido)
Mergulhos	Exploração sobre os bordos do labirinto em direcção ao chão. Este parâmetro é subdividido em duas categorias consoante ocorra na zona fechada ou na plataforma central (Mergulho protegido) ou na zona aberta (Mergulho desprotegido)

(* A % de entradas e de tempo na zona aberta do labirinto, são considerados as medidas espaciais e temporais clássicas)

Adicionalmente, a análise factorial dos parâmetros etológicos e das medidas espaciais e temporais do comportamento dos murganhos no labirinto elevado em cruz, não só melhoraram a sensibilidade do ensaio, como já referido, mas também puseram em evidência as correlações entre os parâmetros espaciais e temporais clássicos (entradas/ tempo na zona aberta) e os diferentes comportamentos relacionados com o repertório defensivo, demonstrando a possibilidade de analisar neste ensaio diferentes dimensões comportamentais (Rodgers e Johnson, 1995). (Tabela 3.3.1b).

Tabela 3.3.1b: Comportamentos registados na análise etológica do comportamento de murganhos no labirinto elevado em cruz, agrupados de acordo com a análise factorial (in Rodgers, 1997)

Factor	Interpretação	Elementos comportamentais
1	"Ansiedade"	Nº total de entradas, nº entradas na zona aberta (ZA) , % entradas ZA , % tempo ZA , % tempo na zona fechada (ZF) (-) , % tempo zona central (-), nº de retornos à zona fechada (-), % de mergulhos protegidos (-), % de "stretch approach posture" (SAP) protegido (-) , % de "sniffing" protegido (-) e % de "flat back approach" protegida (-)
2	"Locomoção"	Nº total de entradas, nº de entradas na zona fechada , total de "flat back approach"
3	"Avaliação de risco"	SAP total , "Sniffing" total
4	"Tomada de decisões"	Nº de retornos à zona fechada (-), "grooming" (-), % tempo na zona central , % tempo zona fechada (-)

5	"Actividade vertical"	Nº total de entradas, nº de entradas na zona fechada, frequência de levantamentos, duração de levantamentos , "grooming" (-)
6	"Exploração"	Total de mergulhos , Total de SAP

(Os níveis de correlação mais significativos (carga do factor > 0,4) são apresentados a negrito; A indicação (-) indica uma correlação negativa entre o parâmetro/comportamento e o factor considerado)

A análise factorial revelou que as medidas espaciais e temporais classicamente associadas com a ansiedade (entradas e tempo na zona aberta) apresentavam correlações elevadas para o mesmo factor (1) que algumas das medidas etológicas como o retorno à zona fechada, mergulhos protegidos e SAP protegido (Rodgers e Johnson, 1995), já anteriormente interpretadas como indicadores de ansiedade (Rodgers et al, 1994). SAP é considerado um índice primário de avaliação de risco, parte do conjunto de comportamentos que se pensa estarem associados à aquisição de informação em ambientes potencialmente perigosos (Molewijk *et al.*, 1995), enquanto o número total de mergulhos é um índice primário do comportamento exploratório (Lister, 1987). Uma diminuição da expressão destes comportamentos na sua versão protegida indicará, portanto, de acordo com a análise factorial, um efeito do tipo ansiolítico. Por outro lado, a análise da estrutura do comportamento recorrendo a cadeias de Markov e análise do componente principal, revelou a estreita relação entre os mergulhos protegidos e SAP protegido, sugerindo um significado comum, provavelmente o reflexo da relutância em sair da zona "segura" fechada do labirinto (Espejo, 1997; Rodgers e Johnson, 1995). Neste contexto, foi sugerido que o número de entradas na zona aberta e mergulhos desprotegidos (directamente relacionados com o nível de ansiólise), bem como o SAP protegido e os mergulhos protegidos (que variam na relação inversa com a ansiólise) seriam os melhores indicadores

para aferir a ansiedade em murganhos sujeitos ao labirinto elevado em cruz (Espejo, 1997).

Relativamente aos parâmetros mais directamente relacionados com a actividade motora, a análise factorial revelou que o número de entradas na zona fechada é uma medida mais fiável da actividade motora que o número total de entradas. Este último parâmetro apresenta uma correlação significativa com o factor ansiedade e, apesar de ter já sido erradamente usado como um indicador geral da actividade motora, não pode, portanto, ser visto independentemente do factor ansiedade (Rodgers e Cole, 1994; Rodgers e Johnson, 1995). Por outro lado, a correlação de ambos os parâmetros com o factor denominado "actividade vertical", para o qual os parâmetros frequência e duração dos levantamentos apresentam a correlação mais elevada, sugere que estes parâmetros também poderão ser considerados como indicadores gerais da actividade motora do animal. Não obstante, mesmo adoptando uma análise do tipo etológico, é difícil avaliar a actividade motora no labirinto elevado em cruz sem a interferência do factor ansiedade (e vice-versa) (Weiss *et al.*, 1998), pelo que associámos a este ensaio a análise do comportamento do murgancho em campo-aberto, por forma a adquirir um maior número de dados sobre o comportamento do animal após a administração dos tratamentos e assim despistar eventuais falsos positivos ou negativos no labirinto elevado em cruz por interferência de alterações da actividade motora.

3.3.2 Ensaio em campo-aberto

Apesar de este ensaio ter sido inicialmente desenvolvido na área da psicologia comportamental para o estudo dos estados emocionais em ratos (Hall, 1934), o seu uso estendeu-se a outras disciplinas como a psicofarmacologia e diversas áreas das neurociências (Choleris *et al.*, 2001). Nos estudos psicofarmacológicos os animais são colocados numa área nova, bem iluminada e delimitada por

paredes elevadas, monitorizando-se os efeitos de diversos agentes farmacológicos na duração e frequência de determinados comportamentos (movimentação entre as diferentes secções do campo aberto, levantamentos, *grooming*, imobilidade, etc.). Neste ensaio, que envolve normalmente uma confrontação forçada do animal com a situação, os roedores preferem espontaneamente as zonas próximas das paredes que delimitam a área do campo-aberto, movimentando-se junto das paredes. Um aumento do tempo dispendido nas zonas centrais, bem como da razão entre as movimentações efectuadas na zona central e o número de movimentações totais, são indicativos de um efeito do tipo ansiolítico, pelo que este ensaio é também usado no estudo de fármacos ansiolíticos, que reduzem a inibição do comportamento exploratório induzida pelo *stress* da situação em que o animal é colocado (Prut e Belzung, 2003). Por outro lado, no estudo dos efeitos comportamentais de fármacos ansiolíticos, o ensaio em campo aberto é normalmente usado para avaliar efeitos “não específicos” ou secundários do fármaco em estudo (Schmitt e Hiemke, 1998). Especificamente, a avaliação dos parâmetros como o número de movimentações totais, o número de levantamentos e o tempo de imobilidade, permite que este ensaio seja utilizado para avaliar se comportamentos não relacionados com a ansiedade, como sejam a locomoção e o sono, são afectados por fármacos que evidenciam efeitos do tipo ansiolítico em outros ensaios, como é o caso do labirinto elevado em cruz (Choleris *et al.*, 2001; Carola *et al.*, 2002). Assim, dependendo dos parâmetros registados, este ensaio é não só um modo conveniente de avaliar a actividade motora mas também uma das formas de aferir potenciais efeitos ansiolíticos ou sedativos, particularmente das benzodiazepinas clássicas ou dos agonistas do receptor 5-HT_{1A} (Prut e Belzung, 2003).

Um aumento da locomoção, indiciado pelo aumento do número de movimentações entre as diferentes secções da área do campo aberto (sem subdivisão entre as zonas centrais e laterais), pode ser considerado como um

efeito estimulante enquanto que uma diminuição da actividade vertical (número total de levantamentos) e da locomoção está relacionado com a sedação. Juntamente com o tempo de imobilidade (também directamente relacionado com a sedação) estes foram os parâmetros que monitorizámos no nosso estudo para avaliação da actividade motora.

3.3.3 Teste das esferas (*Marble-burying test*)

Um dos comportamentos característicos dos roedores, quer no seu habitat natural quer nas condições de laboratório, é o chamado enterrar-defensivo (*defensive-burying*) (Nicolas *et al.*, 2006; Archer *et al.*, 1987). Este enterrar-defensivo refere-se ao comportamento de deslocar o material que cobre a superfície da gaiola, com movimentos característicos das patas anteriores, de modo a cobrir (e, portanto, remover do campo visual) as fontes localizadas de estímulo aversivo ou perigo potencial. Este comportamento é exibido também na presença de objectos aparentemente inofensivos (Broekkamp *et al.*, 1989; Poling *et al.*, 1981; Njung'e e Handley, 1991), como é o caso dos berlindes usados no nosso ensaio, o que tem levado diversos autores a questionarem a natureza defensiva deste comportamento (Archer *et al.*, 1987). Não obstante, a demonstração de que fármacos ansiolíticos clinicamente eficazes suprimem esta resposta de "active-avoidance", tornou a medida deste comportamento como um dos índices de ansiedade nos estudos pré-clínicos da neurobiologia e farmacologia desta emoção humana (Boer e Koolhas, 2003; Nicolas *et al.*, 2006), muitas vezes usado em complementaridade com o labirinto elevado em cruz, que é um ensaio em que a medida do efeito ansiolítico nos é dada por parâmetros que resultam da "passive-avoidance", enquanto o resultado do teste das esferas é reflexo de um comportamento de "active-avoidance" (Boer e Koolhas, 2003).

Em termos farmacológicos, os agonistas dos receptores benzodiazepínicos como o diazepam ou o clordiazepóxido diminuem o número de berlindes enterrados (Archer *et al.*, 1987, Broekkamp *et al.*, 1986 e Gyertyan, 1995), enquanto a

inibição selectiva deste comportamento não foi verificada para fármacos ansiolíticos cuja acção está relacionada com o receptor 5-HT_{1A} (buspirona, gepirona, ipsapirona, ritanserina) ou do antagonista 5-HT₃ (ondansetron), contrariamente ao verificado com os inibidores selectivos da recaptação da serotonina (fluvoxamina, fluoxetina, zimelidina, indalpina e citalopram) (Boer e Koolhas, 2003) e trcíclicos antidepressivos (Broekkamp *et al.*, 1986), que suprimiram este comportamento após tratamento agudo. Estes dados sugerem que este ensaio isoladamente tem uma validade preditiva limitada para a ansiedade, no entanto a introdução da medida de parâmetros adicionais torna possível a distinção entre as diferentes classes de fármacos referidas (Broekkamp *et al.*, 1986; Nicolas *et al.*, 2006) e a sua utilização em conjugação com outros ensaios pode fornecer informação adicional sobre o perfil farmacológico de um determinado fármaco potencialmente ansiolítico.

3.3.4 Teste do arame e Teste da Chaminé

O teste do arame (Boissier *et al.*, 1961) e o teste da chaminé (Boissier *et al.*, 1960) são ensaios que foram desenvolvidos para a avaliação do efeito de fármacos sobre o relaxamento muscular e coordenação motora, respectivamente. A fiabilidade, rapidez e facilidade de execução fazem com que ainda hoje sejam ensaios bastante usados em diversos estudos farmacológicos (Adeyemi *et al.*, 2006; Luszczki *et al.*, 2007a e b; Borowicz *et al.*, 2007).

No teste do arame, um fármaco que induza o relaxamento muscular limitará (ou impossibilitará) o murganho de segurar o arame com as suas patas posteriores. O relaxamento muscular pode aparecer associado a um efeito sedativo que, para algumas classes de fármacos (por ex., benzodiazepinas), sobrevém ao aumento das doses que evidenciam um efeito ansiolítico (Hui *et al.*, 2002). O teste da chaminé é empregue como um ensaio complementar na avaliação de diferentes classes de fármacos com acção no sistema nervoso central, pois o aumento do

tempo necessário para cumprir a tarefa indicia uma perturbação da coordenação motora e, portanto, um eventual efeito indesejado do fármaco em estudo.

3.4 Estudos *in vitro* para avaliar a afinidade para os receptores benzodiazepínicos dos extractos e compostos testados *in vivo*

Previamente à completa elucidação da estrutura dos seus constituintes, havíamos já verificado que a subfracção de flavonóides isolada da *Passiflora edulis* Sims (SF I), que exibiu actividade do tipo ansiolítico nos ensaios *in vivo*, era constituída por flavonas glicosiladas, nomeadamente derivados da luteolina.

Desde a descoberta que certos tipos de flavonóides, mais particularmente flavonas, reconhecem especificamente os receptores benzodiazepínicos centrais (Nielsen *et al.*, 1988; Medina *et al.*, 1989) têm sido desenvolvidos esforços no sentido de identificar novos ligandos naturais dos locais de ligação das benzodiazepinas no complexo-receptor GABA (Marder e Paladini, 2002), para perceber a natureza da interacção destes com os referidos receptores (Huang *et al.*, 2001; Dekermendjian *et al.*, 1999; Marder *et al.*, 2001; Hong e Hopfinger, 2003) e para estabelecer a actividade no sistema nervoso central de diferentes flavonóides de origem natural (Medina *et al.*, 1997) e sintética (Wang *et al.*, 2007; Griebel *et al.*, 1999). Na literatura publicada encontramos diversas referências à actividade do tipo ansiolítico em modelos animais de diversos derivados flavonóides com uma estrutura base do tipo flavona, tais como a apigenina (Viola *et al.*, 1994; Avallone *et al.*, 2000), crisina (Wolfman *et al.*, 1994) e wogonina (Hui *et al.*, 2002). Estes flavonóides com afinidade para os receptores benzodiazepínicos e/ou com actividade do tipo ansiolítico têm sido isolados de plantas medicinais usadas pela medicina tradicional pelas suas propriedades ansiolíticas / sedativas, tais como a *Passiflora coerulea* (Medina *et al.*, 1990), *Matricaria recutita* (Viola *et al.*, 1995), *Jatropha cillata* (Okuyama *et al.*, 1996), *Salvia guaranitica* (Marder *et al.*, 1996), *Tilia tormentosa* (Viola *et al.*, 1994), *Matricaria chamomilla* (Avallone *et al.*, 2000), *Ziziphus jujuba* (Peng *et al.*, 2000).

Assim, na sequência do isolamento da luteolina-7-O-[2-ramnosilglucosido] da *Passiflora edulis* Sims e da demonstração da sua actividade ansiolítica (Coleta *et al.*, 2006), pareceu-nos fundamental verificar a afinidade deste composto para os locais de ligação das benzodiazepinas no complexo-receptor GABA.

Por outro lado, um estudo exclusivamente focado nos mecanismos da actividade evidenciada pela luteolina-7-O-[2-ramnosilglucosido] estaria claramente fora do âmbito deste trabalho mas, na sequência do *screening* neurofarmacológico realizado com os extractos aquosos das diferentes plantas e da caracterização da actividade *in vivo* da fracção flavonóide total da *Passiflora edulis* Sims e de compostos isolados a partir desta, pensamos que o trabalho não estaria completo sem aferir o eventual envolvimento de um mecanismo Gabaérgico na actividade dos diversos extractos e compostos testados *in vivo*.

Por último, após termos verificado que os constituintes da subfracção de derivados flavonóides que exibiu actividade ansiolítica, eram derivados glicosilados da luteolina, e na ausência de estudos sobre a actividade deste composto no sistema nervoso central, resolvemos avaliar também a actividade neurofarmacológica da luteolina (Coleta *et al.*, *in press*). Este composto exibiu uma série de actividades nos diversos ensaios *in vivo* realizados, nomeadamente, potenciando o tempo de indução do sono barbitúrico, antagonizando a actividade cataléptica do haloperidol e induziu diversas alterações no comportamento avaliado no labirinto elevado em cruz e no teste da curiosidade, consistentes com um efeito do tipo ansiolítico, sem afectar a actividade motora e não protegendo os animais do electrochoque (Coleta *et al.*, *in press*). Assim, considerando a actividade evidenciada por este composto *in vivo*, bem como por diversos dos seus derivados glicosilados (Fernández *et al.*, 2006; Okuyama *et al.*, 1996), nomeadamente aqueles que isolámos no decurso deste trabalho (Coleta *et al.*, 2006), procedemos igualmente à determinação da afinidade da luteolina com os locais de ligação das benzodiazepinas no complexo-receptor GABA.

4. Material e Métodos

4.1. Animais

Os estudos desenvolvidos neste trabalho foram realizados em Portugal e no Brasil. Sendo que em Portugal foram usados murganhos machos adultos (25-35G) estirpe Swiss adquiridos ao Instituto Gulbenkian de Ciência e nos ensaios realizados no Brasil foram usados animais da mesma estirpe do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina. Durante o período da realização dos ensaios estes animais foram mantidos no biotério local do laboratório em grupos de dez animais, com um ciclo de luz controlado de 12h, pellets de ração comercial e água *ad libitum*. Cada animal foi usado apenas uma vez e todas as experiências envolvendo animais foram conduzidas de acordo com os padrões internacionais de respeito pelo bem-estar animal e recomendados pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. Usámos o número de animais e a duração de observações estritamente necessária para obter dados consistentes e, no caso dos ensaios realizados na Universidade Federal de Santa Catarina, os protocolos experimentais foram também aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (#23080.001156/2001-50/UFSC).

4.2. Procedimentos gerais

No *screening* preliminar da actividade farmacológica das infusões de *Passiflora edulis* Sims, *Tilia x europaea* L., *Hypericum perforatum* L. e *Melissa officinalis* L. as soluções foram administradas por via intra peritoneal 30min antes dos ensaios e as soluções testadas foram preparadas retomando o liofilizado das infusões em soro fisiológico. Nos restantes ensaios, as soluções a testar foram preparadas com água destilada e os animais administrados 60min antes do ensaio por via oral usando uma sonda intra-gástrica. Em todos os ensaios usámos como controlo positivo o diazepam, preparado extemporaneamente por diluição de uma

formulação comercial (Valium® Roche/ 5mg), e como controlo negativo água destilada (administração oral) ou soro fisiológico (administração intra-peritoneal). O diazepam foi usado na dose de 0,8mg/kg (administração intra-peritoneal) e 1mg/kg (administração oral). No caso da infusão de *Passiflora edulis* Sims e da sua fracção flavonóide total foi também aferida a actividade farmacológica 30, 60, 90 e 120min após a sua administração por via oral. No dia da realização dos ensaios os animais foram colocados no laboratório uma hora antes do início do ensaio, que foi sempre conduzido entre as 09h00m e as 13h00m. Os liofilizados das infusões das diferentes plantas foram testados com doses entre os 5 e 100mg/kg. No caso da *Passiflora edulis* Sims o liofilizado da infusão foi adicionalmente testado por administração oral com doses entre os 14,4mg/kg e os 230mg/kg. A fracção flavonóide total desta planta, bem como as subfracções a que deu origem e os compostos isolados, foram testados na dose correspondente à sua concentração no extracto que lhes deu origem e, complementarmente com doses entre 1 e 100mg/kg.

4.3. Registo e análise dos resultados

Os ensaios comportamentais foram registados em vídeo e analisados sem indicação do tratamento administrado a cada animal. Alternativamente, alguns ensaios foram realizados com monitorização dos parâmetros experimentais *in situ* por dois operadores treinados. Cada solução foi testada num mínimo de 10 animais e a análise estatística dos resultados foi feita com software GraphPad InStat® usando análise de variância (ANOVA) seguido do teste post-hoc de Tukey ou o teste de Dunette, para comparação entre tratamentos e o teste exacto de Fisher para os testes do arame e da chaminé. As diferenças entre os grupos experimentais foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4.4. Ensaio farmacológico *in vivo*

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

O labirinto usado foi uma ligeira modificação daquele descrito por Lister (1987). Basicamente, consistia em dois braços abertos (30x5x0,25cm) e dois braços fechados (30x5x15cm) cruzando-se numa plataforma central (5x5cm) e dispostos de modo a que os dois pares de braços idênticos se encontram em extremidades opostas. A base do labirinto é feita de Plexiglas preto e as paredes de Plexiglas transparente. No início de cada ensaio o animal foi colocado na plataforma central voltado para um dos braços fechados e deixado explorar o labirinto livremente durante 5min. Os ensaios decorreram ao abrigo da luz natural, com o mínimo possível de ruídos externos e com a iluminação de apenas uma lâmpada vermelha de 15W. Entre cada ensaio o labirinto foi cuidadosamente limpo com papel absorvente humedecido com etanol 10% e seco com papel absorvente. As medidas espaciais e temporais registadas foram o número de entradas na zona aberta e na zona fechada (usando como critério para entrada o posicionamento das quatro patas no braço em questão), expressos como percentagem do número total de entradas em cada uma das zonas, o tempo passado na zona aberta (expresso como percentagem do tempo total) e o tempo passado na plataforma central. As medidas etológicas registadas foram o "grooming" (comportamento de auto-limpeza), o número de levantamentos, o número de mergulhos e o número de "stretched attention postures" (protegidos e desprotegidos) (Rodgers e Dalvi, 1997)

Um aumento selectivo dos parâmetros espaciais e temporais directamente relacionados com a exploração dos braços abertos do labirinto é indicativo de um efeito do tipo ansiolítico.

4.4.2. Ensaio em campo aberto (*Open-field test*)

Sobre uma superfície lisa de cor negra, onde previamente foi desenhado com marcador branco uma grelha de quadrados (10x10cm), delimitou-se uma área (60 x 60 cm) com paredes (50cm) de plexiglas (coberto com um plástico preto). Após a administração, cada animal foi colocado no centro do quadrado e a sua actividade motora monitorizada durante 5 minutos, registando-se o número de cruzamentos (número de vezes que o animal atravessou os quadrados da grelha desenhada na superfície), o número de levantamentos, o tempo de imobilidade e o tempo de "grooming" (Kelley, 1993).

4.4.3. Teste das esferas (*Marble burying test*)

Para este ensaio utilizou-se uma caixa construída em plexiglas branco (23 x 17 x 14 cm) com uma tampa transparente perfurada. O fundo da caixa foi coberto por uma camada de serradura fina com cerca de 5 cm de altura. No centro da caixa colocaram-se, dispostas lado a lado, 25 esferas brilhantes de vidro. Os murganhos foram colocados no centro da caixa, sobre as esferas, explorando livremente o espaço durante 15 minutos e, findo este tempo, contabilizou-se o número de esferas que o animal cobriu com serradura (consideraram-se todas as esferas cobertas em mais de 2/3 com serradura). O ensaio foi sempre realizado directamente por baixo de uma luz fluorescente forte e entre cada experiência a serradura da caixa foi substituída. (Broekkamp *et al.*, 1986; Treit *et al.*, 1981)

4.4.4. Avaliação da actividade motora

A actividade miorrelaxante foi avaliada usando o teste do arame. Usando um fio de arame esticado a 20cm acima da superfície da bancada, o animal é suspenso no arame pelas patas anteriores e é registado o tempo necessário para que o animal se equilibre no arame com as patas posteriores e/ou cauda. Considerou-se que o animal falhava o teste quando levava mais do que 5 segundos para atingir

o equilíbrio sendo, portanto um sinónimo de relaxamento muscular (Boissier *et al.*, 1961; Vogel e Vogel, 1997).

A coordenação motora foi avaliada através do teste da chaminé. Neste ensaio o animal foi forçado a entrar dentro de um tubo de vidro transparente (25 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro) colocado na posição horizontal. Quando o animal atinge a extremidade oposta, o tubo foi colocado na vertical sobre a mesa. A reacção natural do animal é recuar subindo o tubo. A performance do animal é avaliada pelo tempo que este leva para, após a inversão do tubo, atingir a extremidade mais distante com as patas posteriores. Considerou-se que a coordenação motora estava comprometida quando o animal se mostrou incapaz de subir o tubo em 30 segundos (Boissier *et al.*, 1960).

4.5. Ensaaios farmacológicos in vitro

4.5.1. Animais

Foram usados ratos Wistar do sexo masculino com peso compreendido entre 250 e 350g. Os animais foram mantidos em grupos de cinco com ciclos de luz de 12h e água e comida *ad libitum*.

4.5.2. Isolamento do córtex cerebral de rato

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical seguido de decapitação e os cérebros retirados rapidamente e imersos numa solução de sacarose (0,32M em HEPES-Tris, pH 7.4 10mM) à temperatura de 0-4°C. Todo o processo de isolamento foi realizado a baixas temperaturas (0-4°C). Desprezado o cerebelo, o cérebro foi dissecado longitudinalmente ao longo da cisura longitudinal e a substância cinzenta do córtex cerebral isolada, separando-a da substância branca e meninges.

4.5.3. Homogeneização

Homogeneizou-se o córtex cerebral em solução de sacarose a 0-4°C (10ml por cada córtex) num homogeneizador de vidro Potter-Elvehjem com pistão de teflon, a 500rpm/10 vezes (Heidolph RZR 2000).

4.5.4. Isolamento das membranas do córtex cerebral de rato

A fracção de membranas neuroniais de rato foi preparada de acordo com a técnica descrita por Cavadas *et al.* (1995). Após a obtenção do homogeneizado centrifugou-se a 1500g durante 10 min a 4°C (Cryofuge 20-3, Heraeus-Christ) e desprezou-se o sedimento. O sobrenadante foi centrifugado a 9000g durante 20 min, obtendo-se o sedimento mitocondrial rico em terminais nervosos pré- e pós-sinápticos. (Uma vez que as nossas preparações não possuem ácido gama-aminobutírico (GABA) não procedemos à lise osmótica deste sedimento com água destilada). O sedimento foi então ressuspenso em 10ml de tampão HEPES 40mM-Tris (pH 7.4) a 0-4°C, e centrifugado a 25000g durante 30min. Esta última operação foi repetida mais uma vez e o sedimento ressuspenso em 1ml do mesmo tampão e congelado a -80°C.

4.5.5. Determinação da concentração de proteína segundo o método colorimétrico do biureto

A concentração de proteína foi determinada pelo método do biureto (Layne, 1957), utilizando a albumina sérica bovina como padrão. Este método de determinação da concentração de proteína consiste numa reacção colorimétrica de formação de complexos violeta cupro-proteicos em meio básico.

Soluções:

Albumina bovina padrão 0,4%

SDS (dodecilsulfato de sódio) 10%

Reagente do Biureto (CuSO₄.5H₂O a 0,15%; tartarato de sódio e potássio a 0,6%)

NaOH a 3%

KI a 0,1%

Procedimento:

Os tubos com água, SDS, tampão, proteína (padrões e amostras) foram preparados de acordo com o indicado no quadro seguinte:

Tubos com padrão	Albumina (μl)	Água (μl)	SDS (μl)	Tampão (μl)	Biureto (ml)
1	0	500	50	50	2
2	100	400	50	50	2
3	250	250	50	50	2
4	500	0	50	50	2
Amostras	Amostra (μl)	Água (μl)	SDS (μl)	-	Biureto (ml)
A1	50	500	50	-	2
A2	50	500	50	-	2

10-15min após a adição do reagente do biureto foi feita a leitura da absorvância de cada solução a $\lambda = 540\text{nm}$

4.5.6. Ensaio de ligação do [³H]-flunitrazepam a membranas de córtex cerebral de rato

Para a realização dos ensaios de ligação o sedimento obtido pelo processo de isolamento de membranas acima descrito foi ressuspensão em tampão HEPES 40mM-Tris (pH 7.4), a 0-4°C, de modo a obter uma concentração de proteína de 0,3 a 0,4 mg/ml. A suspensão final foi homogeneizada por ultrassons durante 10 segundos na posição 7 (Tissumizer, Teckmar TR-10)

A marcação directa do local de ligação das benzodiazepinas no receptor GABA_A foi realizada pela técnica de filtração.

A fracção membranar (200µl) foi incubada durante 30 minutos a 4°C com [³H]-flunitrazepam 0,5nM e concentrações apropriadas dos extractos e compostos a testar.

A ligação não específica foi determinada na presença de diazepam 100µM. A ligação foi terminada pela técnica de filtração rápida usando filtros Whatman GF/B. Os filtros foram lavados com tampão TRIS-HCl 0,005M, para eliminar a radioactividade não ligada. A radioactividade que permaneceu nos filtros foi contada por espectrometria de cintilação líquida num contador de cintilações Packard Tri-Carb 2500 TR. Os filtros foram colocados em frascos próprios para o contador de cintilação β aos quais se adicionou 8ml de líquido de cintilação (1 litro de tolueno, 7,3g de 2,5-difeniloxazol (PPO, Sigma, USA); 167mg de p-bis[2(5-feniloxazoil)]-benzeno (POPOP, Sigma, USA) e 250ml de Triton X-100 (Merck)). Paralelamente, calculámos a quantidade exacta de radioligando em 50µl.

5. Resultados e Discussão

5.1. Screening neurofarmacológico das diferentes plantas em estudo

5.1.1. *Hypericum perforatum* L. – No ensaio em campo aberto o número de cruzamentos (Fig. 5.1.1a) e levantamentos (Fig. 5.1.1b) foram significativamente diminuídos ($p < 0,01$) para as doses de 25, 50 e 100 mg/kg e os tempos de imobilidade (Fig. 5.1.1c) foram significativamente aumentados ($p < 0,05$) para estas mesmas doses. A diminuição do número total de cruzamentos, que

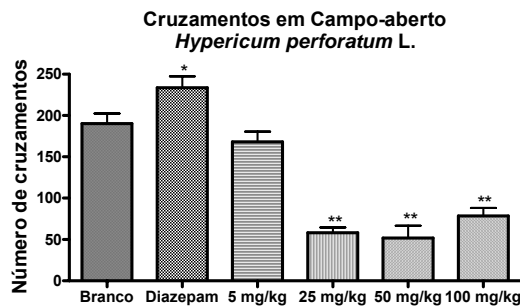


Fig. 5.1.1a: ANOVA - $F_{5,51} = 28.35$ com $p < 0.0001$
Teste de Dunette - * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

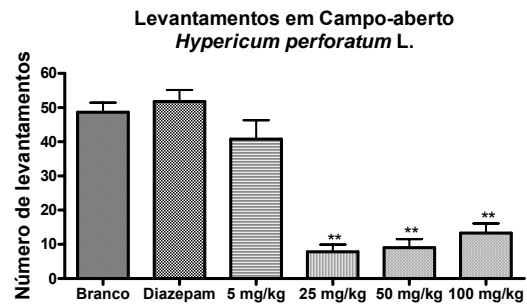


Fig. 5.1.1b: ANOVA - $F_{5,51} = 27.96$ com $p < 0.0001$
Teste de Dunette - ** $p < 0,01$

representa uma medida da distância percorrida pelo animal, indica uma inibição do "drive" exploratório dos murganhos e sugere uma diminuição da actividade

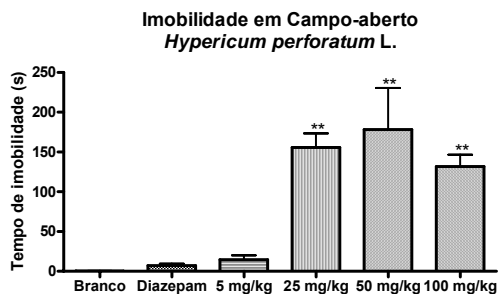


Fig. 5.1.1c: ANOVA - $F_{5,44} = 49.5$ com $p < 0.0001$
Teste de Dunette - ** $p < 0,01$

motora normal o que, conjuntamente com a diminuição do número de levantamentos e aumento dos tempos de imobilidade, é consistente com um efeito do tipo sedativo (Prut e Belzung, 2003). A diminuição da actividade motora também foi evidente no

labirinto elevado em cruz onde se verificou uma diminuição do número total de entradas ($p < 0,01$) e também do número de entradas na zona fechada ($p < 0,01$)

(Fig. 5.1.1d), que é um parâmetro directamente relacionado com a actividade motora (Rodgers e Cole, 1994).

Por outro lado, para estas mesmas doses (25, 50 e 100 mg/kg), verificou-se que a performance dos animais no teste do arame ficou também significativamente comprometida, indicando uma acção do tipo miorrelaxante (Boissier *et al.*, 1961).

No seu conjunto estes dados sugerem claramente uma acção do tipo sedativo para as doses de 25, 50 e 100 mg/kg. As alterações na actividade motora podem produzir variações significativas nos parâmetros clássicos do labirinto elevado em cruz (tempo e número de entradas na zona aberta) (Dawson e Tricklebank, 1995) comprometendo assim o valor interpretativo destes parâmetros enquanto indicadores dos níveis de ansiedade do animal. Assim, considerando os dados obtidos no ensaio em campo aberto para estas doses, podemos concluir que a

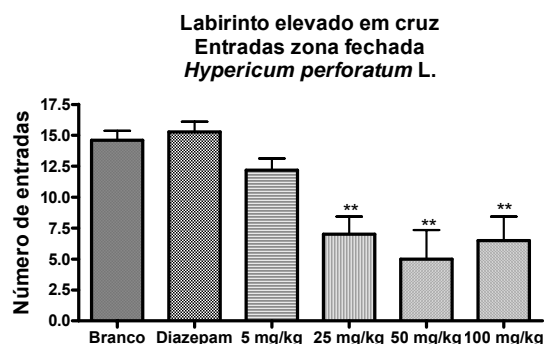


Fig. 5.1.1d: ANOVA - $F_{5,43} = 12.45$ com $p < 0.0001$
 Teste de Dunette - $**p < 0,01$

alteração de um dos parâmetros clássicos medidos no labirinto elevado em cruz, nomeadamente a % de entradas na zona aberta, verificada para a dose de 25 mg/kg (Fig. 5.1.1e), é consequência da sua acção sedativa e não de um efeito

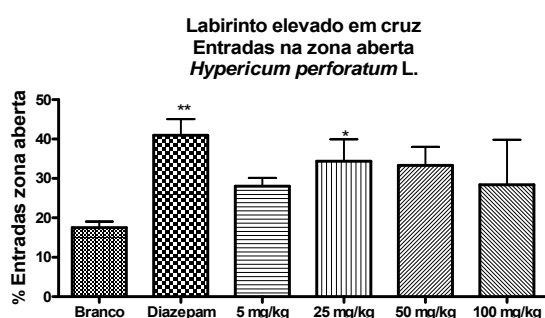


Fig. 5.1.1e: ANOVA - $F_{5,41} = 3.7$ com $p = 0.0074$
 Teste de Dunette - $**p < 0,01$ $*p < 0.05$

especificamente ansiolítico. Na análise dos parâmetros etológicos, como por exemplo o total de SAP (Fig. 5.1.1g) ou o número de mergulhos desprotegidos (Fig. 5.1.1h), também verificamos alterações significativas em algumas das doses

mais elevadas, que foram condicionadas pela perturbação da actividade motora e do comportamento exploratório e não por um efeito ansiolítico.

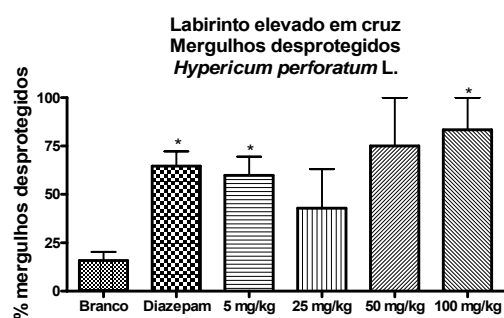


Fig. 5.1.1f: ANOVA - $F_{5,41} = 3.06$ com $p = 0.023$
 Teste de Dunette * $p < 0.05$

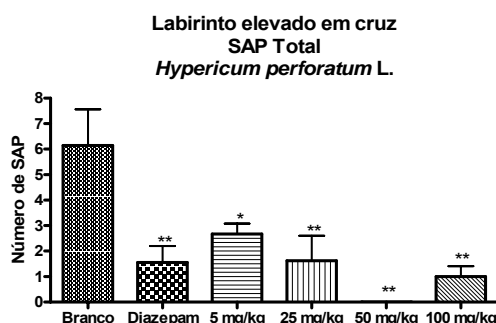


Fig. 5.1.1g: ANOVA - $F_{5,41} = 5.387$ com $p = 0.0009$
 Teste de Dunette * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$

Por outro lado, a dose de 5 mg/kg evidenciou efeitos diferentes daqueles descritos acima para as doses mais elevadas. Assim, no ensaio em campo aberto não se verificaram alterações significativas do número de cruzamentos, do

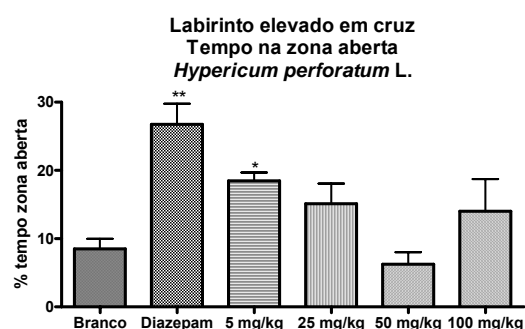


Fig. 5.1.1h: ANOVA - $F_{5,43} = 8.564$ com $p < 0.0001$
 Teste de Dunette * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$

número de levantamentos ou do tempo de imobilidade, indicando que a dose de 5 mg/kg não induziu alterações significativas na actividade motora. Este dado é consistente com a observação no labirinto elevado em cruz onde também não se verificou uma alteração significativa do número de

entradas na zona fechada. No teste do arame também não se verificou que esta dose induzisse relaxamento muscular. Assim, os efeitos do tipo sedativo verificados nas doses mais elevadas não foram, portanto, verificados na dose de 5 mg/kg. No entanto, esta dose produziu alterações significativas em alguns dos parâmetros avaliados no labirinto elevado em cruz. Relativamente às medidas espaciais e temporais, apesar de não ter havido uma alteração significativa do número de entradas nas zonas abertas do labirinto (Fig. 5.1.1e), destaca-se a observação de que o tratamento administrado aumentou significativamente o

tempo de permanência nessas zonas (Fig. 5.1.1h). Não tendo havido alteração da actividade motora [situação em que o aumento do tempo de permanência nas zonas abertas poderia ser uma consequência da inibição do "drive" exploratório por sedação do animal (Dawson e Tricklebank, 1995), embora normalmente esta situação de imobilidade se verifique nas zonas fechadas (McBlane e Handley, 1994)], podemos tomar o aumento isolado do tempo de permanência nas zonas abertas do labirinto elevado em cruz como o resultado de um efeito do tipo ansiolítico (Pellow *et al.*, 1985; Handley e McBlane, 1993). Por outro lado, esta interpretação é consistente com a observação de que houve uma diminuição do número total de SAP, que ocorreu particularmente como consequência da diminuição da expressão de SAP nas zonas abertas do labirinto (SAP desprotegido) (Rodgers e Cole, 1994). Considerando que o parâmetro SAP é um índice primário de avaliação de risco (Blanchard *et al.*, 1994), este último dado poderá ser indiciador de um tipo de comportamento exploratório mais "distendido". Ainda, verificou-se também um aumento da % de mergulhos desprotegidos, que é um parâmetro que varia directamente com a ansiólise (Rodgers e Cole, 1994).

Após a administração de inúmeros fármacos pode ocorrer um efeito do tipo sedativo, seja por modulação de diferentes tipos de receptores (dopaminérgicos, histaminérgicos, opióides, por exemplo) ou por uma acção depressora inespecífica do sistema nervoso central (Laloux *et al.*, 2007). Por outro lado, a sedação é um dos característicos efeitos secundários à acção de fármacos ansiolíticos do tipo benzodiazepínico, particularmente dos modeladores não selectivos do complexo-receptor GABA (como por exemplo o diazepam) actualmente em uso clínico, que exibem uma actividade ansiolítica em doses baixas ou moderadas e uma acção sedativa em doses elevadas (Mathiasen *et al.*, 2007). Inversamente, os ansiolíticos do tipo serotoninérgico não exibem

normalmente o mesmo tipo de actividade sedativa. As benzodiazepinas clássicas exercem os seus efeitos ansiolíticos, sedativos, hipnóticos, miorelaxantes, anticonvulsivos e amnésicos através da potenciação da neurotransmissão nos receptores GABA_A contendo as subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, ou $\alpha 5$ (Savic *et al.*, 2007). Quando o GABA se liga ao complexo-receptor este é activado fazendo com que o canal iónico permeável ao Cl⁻ se abra, assim produzindo o influxo deste anião para o neurónio. Este influxo de Cl⁻ resulta numa corrente post-sináptica inibitória que hiperpolariza o neurónio. A diminuição da actividade neuronal após a activação do complexo-receptor GABA_A pode alterar rapidamente a função cerebral perturbando o estado de consciência e o controlo motor (Basile *et al.*, 2004). O diazepam interage com os receptores GABA_A contendo as subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, ou $\alpha 5$, com afinidade e eficácia agonista equivalentes. (Fradley *et al.*, 2007). Foi já demonstrado que a acção sedativa deste fármaco é mediada através da subunidade $\alpha 1$ (Rudolph *et al.*, 1999; McKernan *et al.*, 2000), enquanto a actividade ansiolítica é mediada através da subunidade $\alpha 2$ do complexo receptor GABA_A (Low *et al.*, 2000). [o que tem motivado inúmeras pesquisas de novos fármacos que possam exibir selectividade para esta subunidade e que, teoricamente, poderão induzir um efeito ansiolítico sem o comprometimento da actividade motora e sedação (Rudolph e Möhler, 2006)]

Embora os resultados obtidos não permitam estabelecer qual o mecanismo pelo qual se exercem os efeitos observados, poder-se-á afirmar que o perfil de actividade do extracto se assemelha mais com o dos fármacos do tipo benzodiazepínico do que com os ansiolíticos do tipo serotoninérgico. No caso de a actividade observada se dever a uma modulação do complexo-receptor GABA_A não parece que esta modulação possa ser específica de uma das suas respectivas subunidades. Contudo, pelo facto de se tratar de um extracto bruto com inúmeros tipos de constituintes não podemos descartar a hipótese da presença no

extracto de compostos que exibam uma afinidade selectiva para os receptores benzodiazepínicos.

A hiperforina é um dos principais constituintes do *Hypericum perforatum* L., tendo sido já demonstrada a sua capacidade para interagir com diversos tipos de receptores e o seu envolvimento na actividade antidepressiva dos extractos desta planta (Zanoli, 2004). Contudo, conjugando os resultados do estudo farmacológico acima apresentados com os dados relativos à caracterização química do extracto de *Hypericum perforatum* L., que revelaram a ausência de hiperforina, podemos concluir que a actividade farmacológica evidenciada não está relacionada com a presença deste constituinte. Assim, os nossos resultados apontam para a existência no extracto de outros constituintes que serão relevantes para a actividade farmacológica, porquanto têm capacidade de desencadear uma acção do tipo ansiolítico mesmo para doses relativamente baixas (5 mg/kg). Tratando-se de um extracto bruto com inúmeros constituintes (entre os quais flavonóides e hipericinas), não é possível identificar quais serão aqueles que estão envolvidos na actividade farmacológica evidenciada, embora os dados publicados por outros autores sugiram o envolvimento de diversos tipos de constituintes (Butterweck, 2003).

5.1.2. *Tilia x europaea* L. – No ensaio em campo aberto, para as doses de 25, 50 e 100 mg/kg verificou-se um aumento significativo do tempo de imobilidade (Fig. 5.1.2a). Com as doses de 50 e 100 mg/kg verificou-se adicionalmente uma diminuição do número de cruzamentos (Fig. 5.1.2b) e de levantamentos (Fig. 5.1.2c).

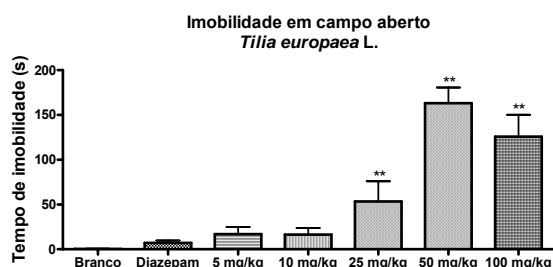


Fig. 5.1.2a: ANOVA - $F_{6,47} = 32.61$ com $p < 0.0001$
 Teste de Dunette - $**p < 0,01$

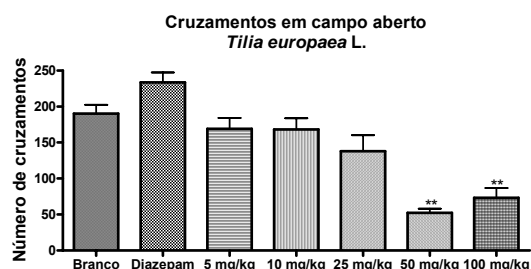


Fig. 5.1.2b: ANOVA - $F_{6,51} = 11.00$ com $p < 0.0001$
 Teste de Dunette - $**p < 0,01$

Estes dados sugerem um efeito do tipo sedativo (Prut e Belzung, 2003) nas doses \geq que 25 mg/kg sendo particularmente evidente nas doses de 50 e 100 mg/kg.

No labirinto elevado em cruz, estas mesmas doses induziram igualmente uma

diminuição significativa do número total de entradas nas diferentes secções do labirinto, incluindo o número de entradas na zona fechada, o que está em linha com as observações no ensaio em campo aberto. No ensaio do arame o

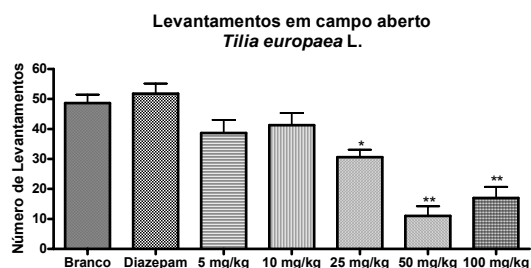


Fig. 5.1.2c: ANOVA - $F_{6,51} = 10.59$ com $p < 0.0001$
 Teste de Dunette - $**p < 0,01$; $*p < 0,05$

relaxamento muscular foi detectado para as doses \geq a 25 mg/kg. As doses de 5 e 10 mg/kg não induziram alterações significativas nos diferentes parâmetros medidos nos vários testes efectuados.

Estes dados indicam que o extracto da *Tilia x europaea* L. em estudo evidenciou uma actividade do tipo sedativa e, tal como foi verificado para o *Hypericum perforatum* L., a perturbação da actividade motora levou à alteração significativa de alguns dos parâmetros clássicos (Figs. 5.1.2d/e) e etológicos (Figs. 5.1.2f/g) do labirinto elevado em cruz, particularmente após a administração da dose de 100 mg/kg.

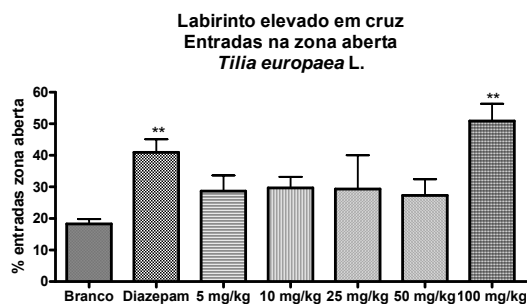


Fig. 5.1.2d: ANOVA - $F_{6,41} = 4.375$ com $p = 0.0017$
Teste de Dunette - ** $p < 0,01$

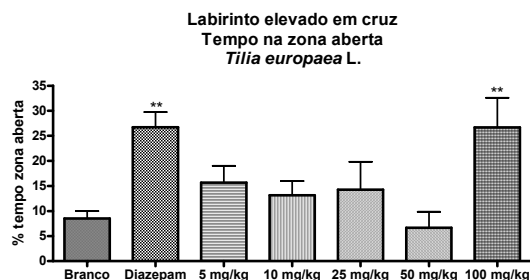


Fig. 5.1.2e: ANOVA - $F_{6,41} = 5.504$ com $p = 0.0003$
Teste de Dunette - ** $p < 0,01$

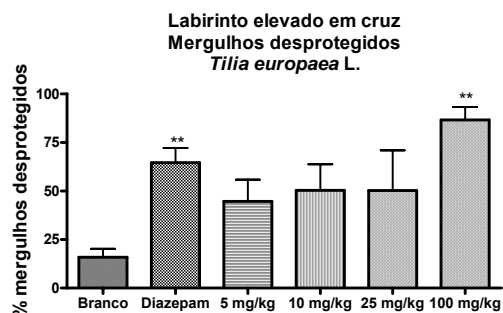


Fig. 5.1.2f: ANOVA - $F_{5,33} = 3.448$ com $p = 0.0129$
Teste de Dunette - ** $p < 0,01$

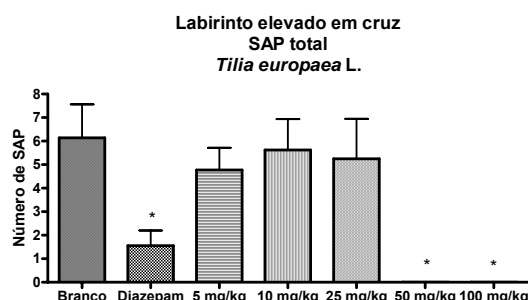


Fig. 5.1.2g: ANOVA - $F_{6,36} = 4.150$ com $p = 0.0029$
Teste de Dunette - * $p < 0.05$

Embora os resultados obtidos não permitam identificar o mecanismo pelo qual se exerce o efeito sedativo observado (que poderá ocorrer pela modulação de diferentes tipos de receptores), o perfil farmacológico deste extracto é diferente daquele evidenciado pelo *Hypericum perforatum* L., não tendo sido detectados efeitos do tipo ansiolítico nas doses inferiores aquelas que induziram sedação. Assim, pudemos confirmar que o extracto aquoso evidencia uma actividade sedativa, no entanto, a actividade do tipo ansiolítico sugerida por outros autores (Cavadas *et al.*, 1995) não foi confirmada.

5.1.3. *Melissa officinalis* L. - Apesar de, curiosamente, a monografia da German Commission E (1998) indicar o uso desta planta em situações de espasmos gastrointestinais, verificou-se que as doses de 5 e 25 mg/kg induziram nos animais fortes contracções abdominais comprometendo, portanto, o seu

comportamento nos testes realizados. No ensaio em campo aberto, mas também no labirinto elevado em cruz, as contracções abdominais eram bem visíveis e os parâmetros relacionados com a actividade motora foram significativamente diminuídos (Figs. 5.1.3c/d).

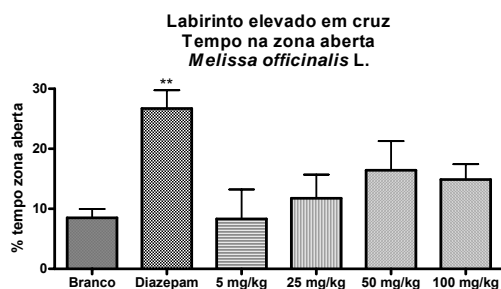


Fig. 5.1.3a: ANOVA - $F_{5,37} = 5.338$ com $p = 0.0009$
 Teste de Dunette - ** $p < 0,01$

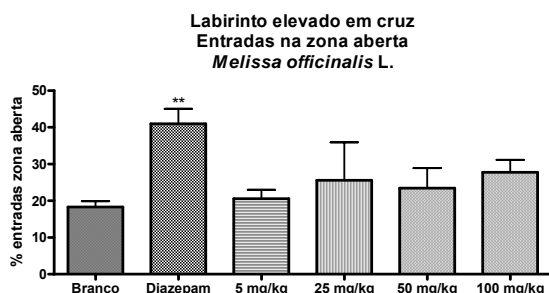


Fig. 5.1.3b: ANOVA - $F_{5,37} = 4.332$ com $p = 0.0033$
 Teste de Dunette - ** $p < 0,01$

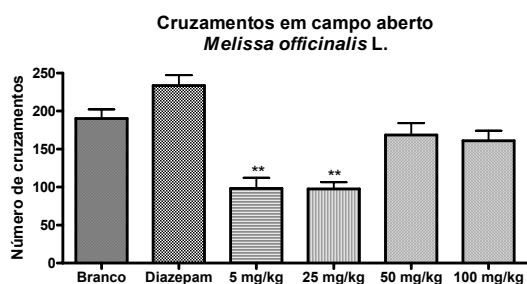


Fig. 5.1.3c: ANOVA - $F_{5,47} = 9.609$ com $p < 0.0001$
 Teste de Dunette - ** $p < 0,01$

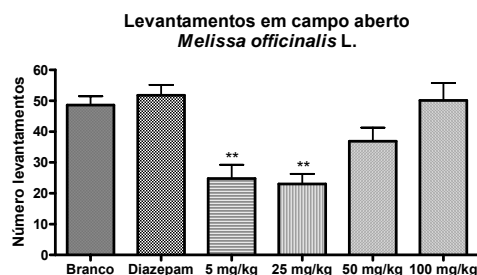


Fig. 5.1.3d: ANOVA - $F_{5,47} = 6.741$ com $p < 0.0001$
 Teste de Dunette - ** $p < 0,01$

As doses de 50 e 100 mg/kg não induziram as mesmas contracções abdominais e não alteraram significativamente a actividade motora dos animais mas, por outro lado, também não induziram alterações significativas nos parâmetros clássicos (Figs. 5.1.3a/b) ou etológicos (Figs. 5.1.3e/f) do labirinto elevado em cruz.

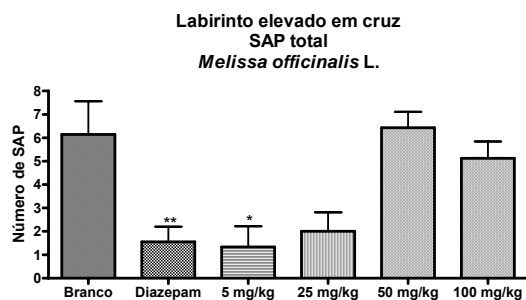


Fig. 5.1.3e: ANOVA - $F_{5,32} = 6.331$ com $p = 0.0003$
Teste de Dunette - ** $p < 0,01$; * $p < 0.05$

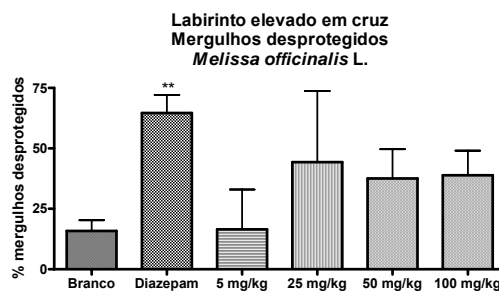


Fig. 5.1.3f: ANOVA - $F_{5,32} = 2.858$ com $p = 0.0316$
Teste de Dunette - ** $p < 0,01$

As contracções abdominais observadas com as doses de 5 e 25 mg/kg poderão ter sido causadas por uma irritação inespecífica provocada pela administração do extracto por via i.p. e, por qualquer razão que desconhecemos, este efeito desaparece ou é mascarado nas doses mais elevadas.

Contrariamente aos resultados apresentados por outros autores que verificaram um efeito sedativo após a administração de um extracto hidroalcoólico desta planta (Soulimani *et al.*, 1991) ou do seu óleo essencial (Buchbauer *et al.*, 1993; Elliot *et al.*, 2006), as doses de 50 e 100 mg/kg do extracto aquoso de *Melissa officinalis* L. não evidenciaram qualquer actividade farmacológica nos ensaios realizados. Contudo, os dados obtidos com a *Melissa officinalis* L. são inconclusivos e, sem uma repetição dos ensaios, eventualmente testando também outra via de administração, não será possível confirmar as indicações bibliográficas sobre a actividade neurofarmacológica desta planta.

5.1.4. *Passiflora edulis* Sims

No ensaio em campo aberto não foram observadas alterações da actividade motora e vertical (Figs. 5.1.4a/b, respectivamente).

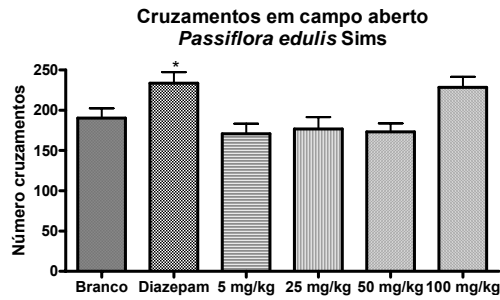


Fig. 5.1.4a: ANOVA - $F_{5,55} = 4.109$ com $p = 0.0031$
 Teste de Dunette - * $p < 0.05$

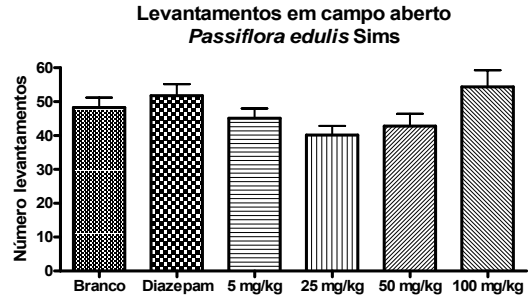


Fig. 5.1.4b: ANOVA - $F_{5,54} = 2.049$ com $p = 0.0863$

Ainda no campo aberto, verificámos na análise dos parâmetros etológicos que houve uma diminuição significativa comportamento de auto-limpeza ("grooming")

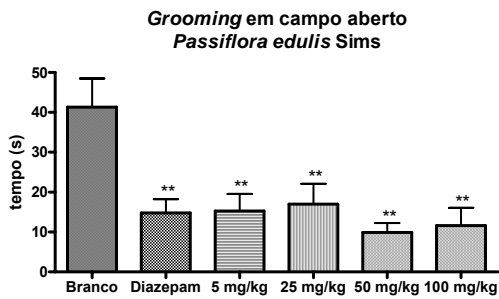


Fig. 5.1.4c: ANOVA - $F_{5,49} = 5.876$ com $p = 0.0002$
 Teste de Dunette - ** $p < 0.01$

para todas as doses do extracto testadas (Fig. 5.1.4c). A redução da expressão deste comportamento, particularmente junto das paredes do campo aberto, aparece normalmente associada a um efeito do tipo

ansiolítico (Choleris *et al.*, 2001). Uma vez que não registámos este comportamento em função da sua localização espacial não é possível com estes dados fazer essa interpretação. Contudo, o facto de o diazepam ter induzido igualmente uma redução do tempo de "grooming", também sugere a possibilidade deste efeito ser devido a uma acção do tipo ansiolítico.

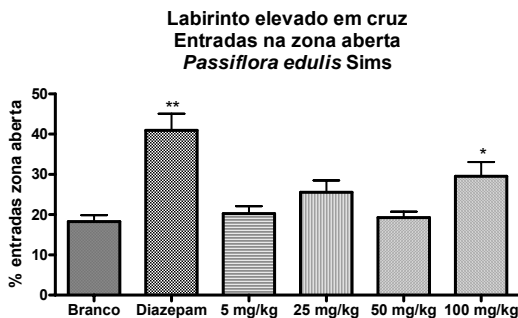


Fig. 5.1.4d: ANOVA - $F_{5,45} = 9.809$ com $p < 0.0001$
 Teste de Dunette - * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$

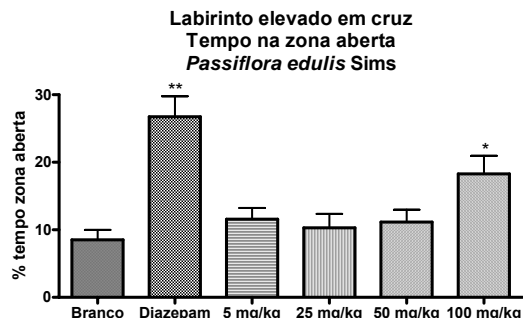


Fig. 5.1.4e: ANOVA - $F_{5,44} = 10.46$ com $p < 0.0001$
 Teste de Dunette - * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$

No labirinto elevado em cruz verificámos que a dose de 100 mg/kg incrementou os níveis de exploração da zona aberta, nomeadamente aumentando as percentagens do número de entradas e de tempo dispendido nesta zona (Figs. 5.1.4d/e). Na análise dos parâmetros etológicos registados no labirinto elevado em cruz verificámos não haverem diferenças significativas na expressão do comportamento de SAP, tanto no seu número total (Fig. 5.1.4f) como na sua expressão diferencial nas diferentes zonas do labirinto (Figs. 5.1.4g/h).

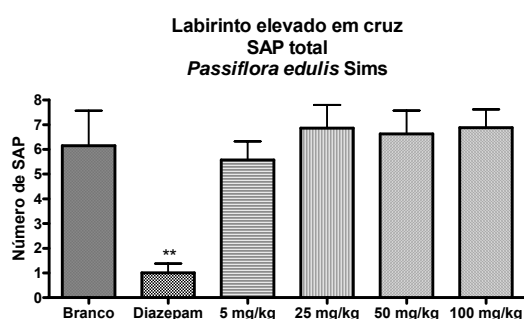


Fig. 5.1.4f: ANOVA - $F_{5,40} = 5.762$ com $p = 0.0001$
Teste de Dunette - ** $p < 0,01$

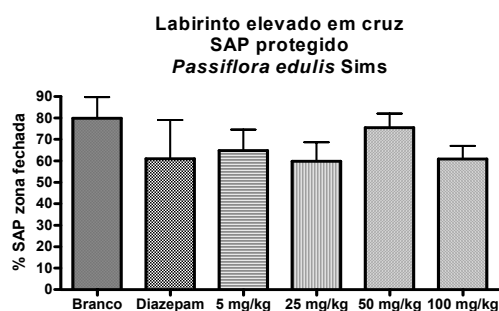


Fig. 5.1.4g: ANOVA - $F_{5,40} = 0.7586$ com $p = 0.5853$

De salientar que em termos da expressão diferencial deste comportamento o diazepam não aumentou significativamente o SAP desprotegido, ao contrário do que seria de esperar (Rodgers e Cole, 1994). Este dado sugere que poderá ter havido um problema no registo deste comportamento que nem sempre é fácil de identificar. Por outro lado, verificamos que houve um aumento da percentagem de mergulhos desprotegidos (Fig. 5.1.4i) que varia directamente com a ansiólise e é um dos parâmetros mais sensíveis deste ensaio (Espejo, 1997).

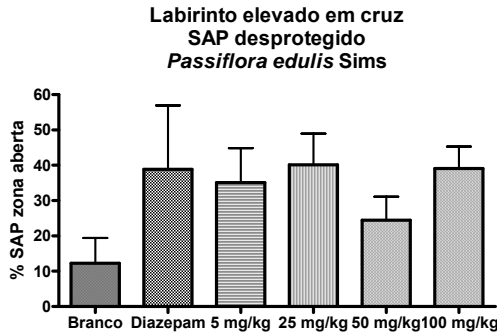


Fig. 5.1.4h: ANOVA - $F_{5,40} = 1.240$ com $p = 0.3111$

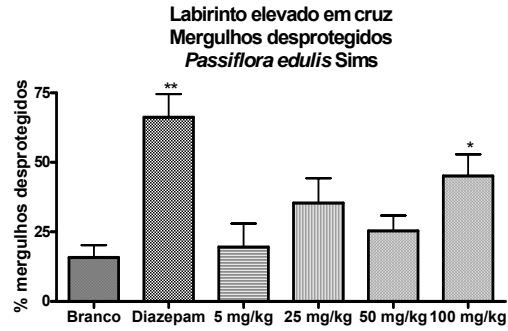


Fig. 5.1.4i: ANOVA - $F_{5,40} = 6.701$ com $p = 0.0002$
Teste de Dunette - * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

No seu conjunto estes resultados sugerem que a dose de 100 mg/kg do extracto aquoso liofilizado de *Passiflora edulis* Sims evidencia uma actividade do tipo ansiolítico. Para nenhuma das doses testadas se verificaram alterações significativas na actividade motora medida no ensaio em campo aberto ou na performance dos animais no teste do arame, pelo que se poderá concluir que a dose que evidenciou o efeito do tipo ansiolítico no labirinto elevado em cruz, não perturbou a actividade motora nem induziu relaxamento muscular. Já outros autores haviam verificado uma actividade do tipo ansiolítico para um extracto aquoso desta planta (Cotrim *et al.*, 1995), embora os resultados não sejam comparáveis pois nesse estudo a dose não foi calculada em função do resíduo seco do infuso mas sim do volume de infusão administrado e, por outro lado, a via de administração usada foi diferente (no nosso caso com administração i.p.), o que poderá interferir com a actividade farmacológica dos extractos desta planta (Para uma discussão mais detalhada deste ponto ver secção 5.4, Cap. II).

Assim, em face dos resultados apresentados verificamos que o *Hypericum perforatum* L. apresentou um perfil farmacológico bastante interessante, nomeadamente exibindo uma actividade do tipo ansiolítico para doses relativamente baixas, o que justificaria o aprofundamento do estudo deste extracto. Contudo, um aspecto prático que deve ser considerado é que, para além de esta ser uma das plantas mais estudadas do ponto de vista químico (o que

relativiza o interesse do seu estudo num trabalho eminentemente fitoquímico), foram também surgindo ao longo do período inicial do trabalho inúmeros trabalhos dedicados ao estudo desta planta nas vertentes fitoquímica, farmacológica e clínica. Numa pesquisa através do PubMed encontrar-se-ão 123 citações no período entre 1997-1999 e se incluirmos o ano de 2000 esse número passa a ser de 283 (incluindo mais de 40 revisões), enquanto que em período equivalente anterior a 1997 (1994-1996) o número de citações era de apenas 24. Não sendo exaustivos estes dados revelam bem o número de investigadores que nessa época se dedicou a este tema, mas também ilustram as limitações inerentes em termos do desenvolvimento de um trabalho original, numa planta que historicamente já havia sido bastante estudada.

Relativamente à *Tilia europea* L. a questão da originalidade do seu estudo fitoquímico não se colocava, porquanto se trata de uma planta ainda pouco estudada, contudo, apesar de os resultados do *screening* evidenciarem uma forte acção no sistema nervoso central, não foi observada uma actividade especificamente ansiolítica.

A *Melissa officinalis* L. foi excluída em função dos resultados do *screening* farmacológico onde não foi detectada qualquer actividade do tipo ansiolítico ou sedativo, pese embora a necessidade de clarificar os resultados obtidos.

Das quatro plantas testadas a *Passiflora edulis* Sims foi aquela que apenas exibiu uma actividade ansiolítica sem induzir relaxamento muscular nem afectar a actividade motora. Não sabemos se aumentando as doses administradas estes efeitos poderiam vir a ser observados mas, em face dos dados obtidos, os efeitos observados parecem específicos e confirmam os dados de anteriores experiências (apesar das diferenças de dose em que foi observado este efeito). Por outro lado, é importante referir que esta é uma planta ainda pouco estudada do ponto de vista químico.

Assim, ponderados os aspectos acima referidos e ainda a nossa experiência anterior no estudo desta planta, seleccionámos a *Passiflora edulis* Sims para a fase subsequente do trabalho.

5.2 Avaliação neurofarmacológica dos putativos efeitos ansiolíticos da *Passiflora edulis* Sims e seus constituintes

Tendo já verificado a actividade neurofarmacológica da infusão e de um extracto de flavonóides obtido a partir desta (Coleta, 1998) mas não havendo qualquer referência sobre o tempo necessário para que os constituintes activos desta planta produzam efeito, entendemos ser necessário aferir a eventual influência do tempo entre a administração do extracto ao animal e a realização do ensaio (Tabela 5.2a).

	30'		60'		90'		120'	
	% EA	% TA	% EA	% TA	% EA	% TA	% EA	% TA
Branco	21,3±5,8	19,4±8,6	18,3±4,5	16,3±6,6	14,5±10,5	13,6±11,1	20,8±6,7	14,2±10,2
Diazepam	25,5±13,4	30,3±16,5	49,9±14,7**	54,8±12,8**	44,8±17,6*	47,8±19,8*	33,9±16,8	43,2±15,0*
TFF	22,5±16,4	14,6±9,3	43,4±16,5*	40,1±12,1**	39,4±12,2*	37,3±8,4**	29,6±12,4	34,3±14,4
Infusão	30,3±9,5	23,4±7,5	36,9±9,3*	35,3±10,1*	29,8±4,3*	25,1±5,2	30,1±7,4	14,5±12,3

Tabela 5.2a: Variação dos efeitos no labirinto elevado em cruz em função do tempo de administração - análise dos parâmetros espaciais e temporais no labirinto elevado em cruz 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração do branco, diazepam, infusão liofilizada de *Passiflora edulis* Sims e TFF. %EA – razão entre o número de entradas nas zonas abertas e o número total de entradas nas diferentes áreas; % TA – razão entre o tempo na zona aberta e o tempo total de ensaio. Os dados são apresentados como média±emp. Análise estatística, *p<0,05, **p<0,01 com ANOVA e teste de Tukey.

Apenas foram observados efeitos significativos 60 minutos após administração oral da infusão e do extracto que, aparentemente, não são tão evidentes 120 minutos após a administração. Assim, os resultados da avaliação neurofarmacológica dos constituintes da *Passiflora edulis* Sims que são

apresentados neste trabalho foram obtidos por ensaio dos animais 60 minutos após a sua administração.

Fizemos a avaliação neurofarmacológica do extracto aquoso (infusão) liofilizado por administração oral de doses entre 5 e 230 mg/kg. Neste caso apenas a dose mais elevada produziu um aumento estatisticamente significativo nas percentagens de entradas e de tempo dispendido a explorar as zonas abertas do labirinto elevado em cruz (Fig. 5.2a).

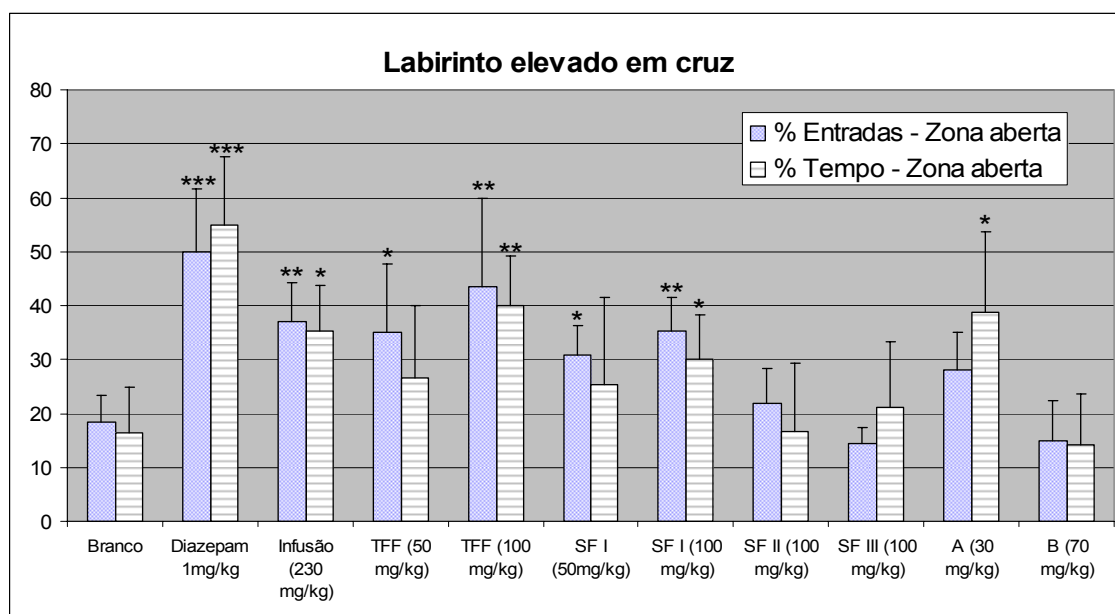


Fig. 5.2a: Análise do comportamento dos murganhos no labirinto elevado em cruz. Os resultados são expressos como média (\pm SEM) da percentagem de entradas nas zonas abertas do labirinto e percentagem média do tempo dispendido nas zonas abertas do labirinto. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ são significativamente diferentes do controlo (ANOVA; Teste de Tukey). O número de murganhos por grupo variou entre 9 e 16 animais.

Também no teste das esferas verificámos uma diminuição significativa do reflexo de enterrar as esferas na dose de 230 mg/kg (Fig. 5.2b). No conjunto das doses testadas não detectámos qualquer alteração da performance dos animais nos testes do arame e da chaminé (Fig. 5.2c).

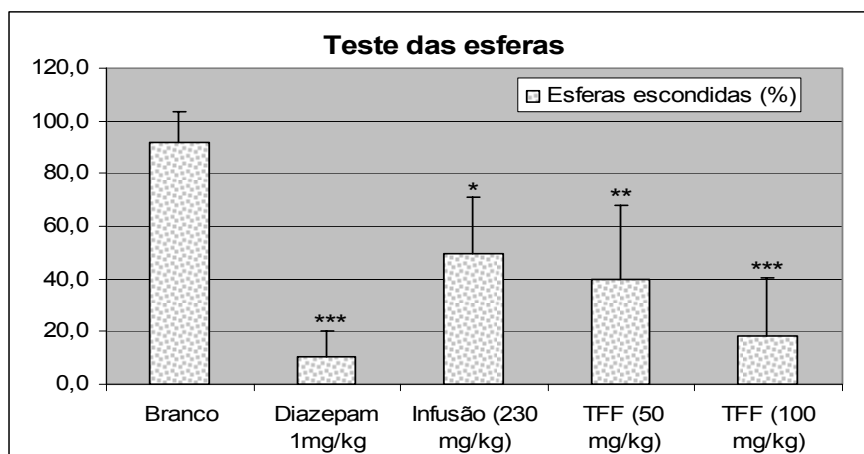


Fig. 5.2b: Comportamento dos murganhos no teste das esferas. Resultados expressos como média (\pm SEM) da percentagem de esferas escondidas. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ são significativamente diferentes do controlo (Branco) (ANOVA; Teste de Tukey). O número de animais por grupo variou entre 8 e 11.

No caso da fracção flavonóide total (TFF) isolada a partir da infusão testámos doses entre 1 e 100 mg/kg. Na dose correspondente à dose activa da infusão (3,2 mg/kg) verificámos não existirem alterações significativas em nenhum dos testes realizados. Contudo, para a dose de 100 mg/kg verificou-se um aumento significativo nas percentagens de entradas e de tempo dispendido a explorar as zonas abertas do labirinto elevado em cruz (Fig. 5.2a). Nesta mesma dose verificou-se no teste do arame um efeito miorreaxante (Fig.5.2c) e uma diminuição da coordenação motora no teste da chaminé.

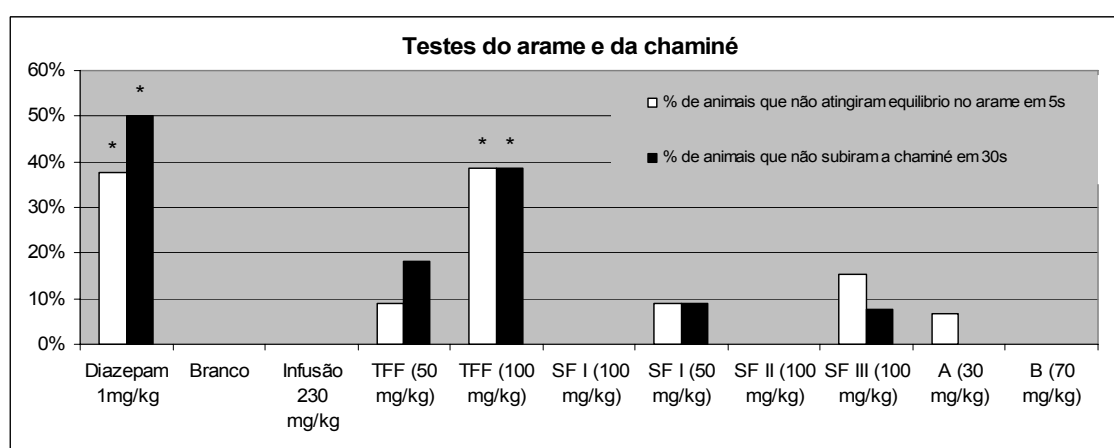


Fig. 5.2c: Performance dos murganhos nos testes do arame e da chaminé. * $p < 0,01$ é significativamente diferente do controlo (Teste de Fisher). O número de murganhos por cada grupo variou entre 11 e 16.

O efeito da TFF na performance dos animais no teste das esferas, nomeadamente a inibição do reflexo espontâneo de enterrar as esferas, foi verificado com as doses de 50 e 100 mg/kg (Fig 5.2b).

Após separação dos flavonóides da TFF obtivemos 3 subfracções distintas (SF I, SF II, SF III) que foram testadas isoladamente. Para as doses aproximadamente correspondentes ao teor de cada uma destas subfracções na dose activa de TFF (100 mg/kg), não observámos quaisquer efeitos nos diferentes testes. Contudo, ao aumentar as doses testadas verificámos que a SF I aumentou significativamente o tempo dispendido (100 mg/kg) e o número de entradas (50 e 100mg/kg) nas zonas abertas do labirinto (Fig. 5.2a) sem induzir relaxamento muscular ou descoordenação motora, tal como medidos pelos testes do arame e chaminé, respectivamente (Fig. 5.2c). Da análise dos parâmetros etológicos pudemos também verificar que as doses de 50 e 100 mg/kg aumentaram o número total de mergulhos e diminuíram a expressão do comportamento de SAP (Tabela 5.2b). As restantes subfracções (SF II e SF III) não induziram alterações significativas nos parâmetros dos testes realizados.

	% Mergulhos protegidos	SAP (Stretched Attend Postures) (#)
Branco (n=13)	72,1/6,7	16,2/3,8
Diazepam (1 mg/kg) (n=11)	50,1/11,2**	6,8/2,1**
SF I (100mg/kg) (n=10)	60,3/5,4*	6,4/2,5**
SF I (50mg/kg) (n=9)	68,2/7,3	7,3/5,7*
A (30 mg/kg) (n=9)	58,6/6,5*	17,3/8,0
B (70 mg/kg) (n=10)	70,1/9,2	18,4/7,1

Tabela 5.2b: Análise de parâmetros etológicos no labirinto elevado em cruz. Dados apresentados como media/SEM. *p<0,05, **p<0,01 significativamente diferentes do controlo (ANOVA com teste de Tukey).

Partindo da SF I foi possível isolar dois dos seus constituintes, designados de composto A e composto B, que foram submetidos a uma avaliação neurofarmacológica detalhada. O composto B (0,7-100 mg/kg) não pareceu evidenciar qualquer actividade farmacológica nos diferentes ensaios realizados,

enquanto o composto A (0,3-30 mg/kg) aumentou significativamente a percentagem de tempo dispendido nas zonas abertas do labirinto para a dose de 30 mg/kg, aumentando também o número total de mergulhos (Tabela 5.2b).

O labirinto elevado em cruz é hoje largamente aceite enquanto ensaio para o estudo da ansiedade (Carobrez e Bertoglio, 2005). A razão entre o número de entradas nas zonas abertas do labirinto e o número total de entradas nas diferentes zonas do labirinto, bem como a razão entre o tempo dispendido nas zonas abertas e o tempo total do ensaio, são usadas como marcadores da aversão natural dos roedores para as zonas abertas e foi demonstrado que estes dois parâmetros são aumentados por acção de ansiolíticos clinicamente eficazes e diminuídos pela acção de substâncias ansiogénicas (Lister, 1987; Pellow *et al.*, 1985). O chamado enterrar-defensivo (defensive-burying) é um comportamento característico nos roedores que pode ser desencadeado em resposta a um estímulo aversivo e pode ser inibido pelo diazepam ou clordiazepóxido (Treit *et al.*, 1981). Este comportamento também pode ser desencadeado em resposta á presença de objectos estranhos inofensivos como berlindes, sendo igualmente inibido pela acção de ansiolíticos clinicamente eficazes (Boer e Koolhas, 2003; Nicolas *et al.*, 2006). Assim, os resultados evidenciados pela infusão de *Passiflora edulis* Sims no labirinto elevado em cruz e no teste das esferas são consistentes com um efeito do tipo ansiolítico sem interferência com a actividade motora.

A TFF também evidenciou uma actividade do tipo ansiolítico no labirinto elevado em cruz e no teste das esferas mas, contrariamente à infusão, os resultados nos testes do arame e da chaminé sugerem que esta actividade aparece acompanhada de relaxamento muscular e perturbação da coordenação motora. Não obstante, o número de entradas na zona fechada do labirinto elevado em cruz, que é um parâmetro directamente relacionado com a actividade motora (Rodgers e Cole, 1994), permaneceu inalterado, sugerindo que a locomoção não terá sido afectada. Uma vez que a TFF é constituída fundamentalmente por

flavonóides, não tendo sido detectada a presença de outros compostos possivelmente activos como taninos (Takahashi *et al.*, 1986) ou alcalóides (Aoagy *et al.*, 1974), concluímos que os flavonóides extraídos da *P. edulis* Sims poderiam estar envolvidos na actividade neurofarmacológica evidenciada pela infusão das folhas da planta. Contudo, não só as doses de TFF necessárias para induzir uma actividade do tipo ansiolítica (50 e 100 mg/kg) foram superiores ao seu teor na dose activa da infusão, como também o perfil farmacológico foi diferente com a TFF a evidenciar efeitos miorrelaxantes e perturbação da coordenação motora. Estes dados claramente sugerem o envolvimento directo ou indirecto de outros constituintes da infusão na sua actividade.

Os parâmetros etológicos como os mergulhos protegidos ou o número de SAP analisados no labirinto elevado em cruz variam inversamente com a ansiólise e são tidos como indicadores mais sensíveis da acção de fármacos ansiolíticos do que os parâmetros clássicos (Rodgers e Cole, 1994). Assim, podemos concluir que o aumento dos índices de exploração das zonas abertas do labirinto, medido pelos parâmetros espaciais e temporais clássicos, a diminuição da percentagem de mergulhos protegidos e do número total de comportamentos de SAP, induzidos pelas doses de 50 e 100 mg/kg da SF I, são indicadores consistentes de um efeito do tipo ansiolítico, embora estas doses não correlacionem com o teor desta subfracção na dose activa da TFF, da qual foi obtida. Por outro lado, a SF I não induziu qualquer efeito no teste das esferas. Como já foi referido noutra secção, o teste das esferas é muitas vezes usado em associação com o labirinto elevado em cruz, pois este é um ensaio em que a medida do efeito ansiolítico nos é dada por parâmetros que resultam da "passive-avoidance", enquanto o resultado do teste das esferas é reflexo de um comportamento de "active-avoidance" (Boer e Koolhas, 2003). Os dois testes poderão assim estar relacionados com diferentes "tipos" de ansiedade (Andreatini e Bacelar, 2000) pelo que, naturalmente poderão exhibir diferentes sensibilidades à acção de um dado fármaco como foi o nosso caso com a SF I.

Por último, a análise dos parâmetros espaciais e temporais clássicos e etológicos no labirinto elevado em cruz, indicam que o composto A possui uma actividade do tipo ansiolítico e a dose para a qual esta actividade foi verificada (30 mg/kg) correlaciona bem com o seu teor na dose activa de SF I (100 mg/kg).

5.3 Estudos *in vitro* para avaliar a afinidade para os receptores benzodiazepínicos dos extractos e compostos testados *in vivo*

A determinação dos diferentes parâmetros considerados nesta avaliação foi feita por recurso às ferramentas estatísticas (regressão não linear) e às fórmulas incluídas no software Graphpad Prism v4.03 para determinação do IC₅₀, constante de dissociação (*K_d*) e constante de inibição (*K_i*).

5.3.1 Afinidade para os receptores benzodiazepínicos dos infusos liofilizados de *Passiflora edulis* Sims, *Tilia x europaea* L., *Melissa officinalis* L. e *Hypericum perforatum* L.

No contexto da avaliação *in vivo* da actividade no sistema nervoso central dos liofilizados das infusões das diferentes plantas em estudo, procedemos igualmente à realização de um ensaio *in vitro* de competição desses mesmos extractos com a ligação de [³H]-flunitrazepam (Fig. 5.3.1a). Fundamentalmente, pretendemos verificar se a afinidade para os receptores benzodiazepínicos poderia de alguma forma justificar as actividades evidenciadas pelos diferentes extractos *in vivo*.

	IC ₅₀ (mM)
<i>Passiflora edulis</i> Sims	9.0 ± 1.64
<i>Hypericum perforatum</i> L.	9.1 ± 1.49
<i>Melissa officinalis</i> L.	1.4 ± 2.06
<i>Tilia x europaea</i> L.	6.0 ± 3.58

Fig. 5.3.1a: Ensaio de competição dos diversos extractos aquosos liofilizados com [³H]-flunitrazepam. Os resultados representam a média ± erro padrão de dois ensaios independentes com 6 concentrações dos respectivos extractos testadas em triplicado. Para facilitar a comparação entre a afinidade evidenciada por todos os extractos ou compostos isolados em estudo, convertimos a concentração dos extractos em mM equivalentes de orientina.

Os resultados obtidos, com um IC₅₀ na ordem de grandeza mM, indicam que os extractos em estudo não possuem uma significativa afinidade para os locais de ligação das benzodiazepinas no complexo-receptor GABA, sugerindo que a interacção com este receptor não parece justificar as actividades farmacológicas observadas *in vivo* para nenhuma das infusões liofilizadas.

Estes resultados são, de alguma forma, surpreendentes porquanto existem na literatura diversas referências à capacidade de interacção com este receptor de extractos de *Hypericum perforatum* L. (Gobbi *et al.*, 2001; Vandenberghe *et al.*, 2000; Cott, 1997), da *Tilia x europaea* L. (Cavadas *et al.* 1997), mas também de outras espécies do género *Passiflora* (Lolli *et al.*, 2007) ou de compostos isolados a partir de plantas do mesmo género (Wolfman *et al.*, 1994). Contudo, como frequentemente acontece quando está em causa a avaliação farmacológica de extractos brutos de plantas, será difícil retirar conclusões da comparação dos resultados, uma vez que nos diversos exemplos citados a caracterização química dos extractos testados é insuficiente.

5.3.2 Afinidade para os receptores benzodiazepínicos da *Passiflora edulis*

Sims e respectivos extractos flavonóidicos

Seguindo a lógica já enunciada para a caracterização fitoquímica e isolamento de constituintes da *Passiflora edulis* Sims concentrámos o estudos *in vitro* também nesta planta, que foi sujeita a um fraccionamento bioquímico pelos resultados dos estudos *in vivo*, e realizámos igualmente um ensaio de ligação competitiva com o [³H]-flunitrazepam para a fracção flavonóide total e para a SF I obtida a partir desta, uma vez que ambas exibiram actividade do tipo ansiolítico (Fig. 5.3.2a).

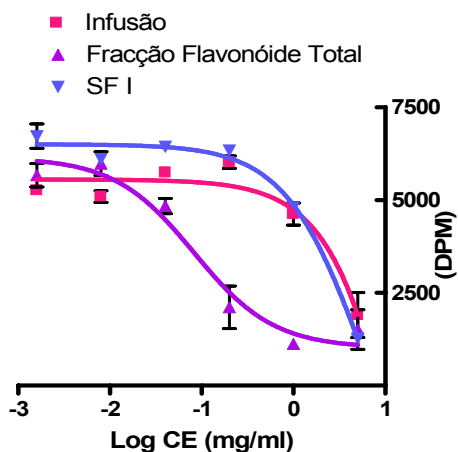


Fig. 5.3.2a: *Passiflora edulis* Sims
Ensaio de competição com
[3H]-flunitrazepam

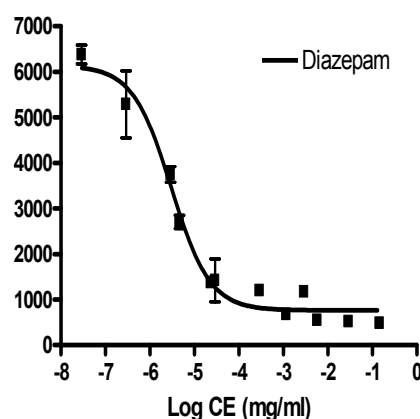


Fig. 5.3.2b: Ensaio de competição com
diazepam e [3H]-flunitrazepam

Cada ponto representa a média \pm erro padrão de duas experiências independentes realizadas em triplicado.

Neste caso o infuso (não liofilizado) exibiu inclusive uma menor afinidade para os receptores benzodiazepínicos ($IC_{50} = 25.2 \text{ mM}$) do que o respectivo liofilizado, podendo este facto estar simplesmente relacionado com o maior grau de hidratação do resíduo seco por comparação com o resíduo liofilizado ou mesmo por alterações na composição química originadas durante o processo de secagem do resíduo. Mais significativa foi, por outro lado, a afinidade evidenciada para estes receptores pela Fracção Flavonóide Total ($IC_{50} = 0,06 \text{ mM}$). Apesar de *per se* este dado não constituir justificação para a actividade evidenciada *in vivo*, trata-se de um valor bastante superior aquele observado para a infusão (liofilizada ou não) ($F_{2,45} = 48.43$; $p < 0.0001$) sugerindo que de entre os flavonóides contidos nesta fracção alguns poderão exibir alguma afinidade para os receptores benzodiazepínicos. Curiosamente, com a SF I, isolada a partir da Fracção Flavonóide Total, e a única das subfracções que evidenciou actividade *in vivo*, não verificámos que existisse uma afinidade da mesma ordem de grandeza ($IC_{50} = 4,5 \text{ mM}$). Enquanto no caso da Fracção Flavonóide Total os resultados sugerem um possível envolvimento Gabaérgico na actividade do tipo ansiolítico evidenciada *in vivo* pela *Passiflora edulis* Sims, analisando conjuntamente os resultados obtidos com a infusão e com a SF I, e cruzando a informação com os

dados do estudo *in vivo*, facilmente se concluirá que o mecanismo de acção poderá ser mais complexo e envolver outros locais de ligação para além dos locais de ligação das benzodiazepinas nos receptores GABA e, por outro lado, poderão existir, para além dos constituintes da subfracção I, outros flavonóides das subfracções II e III que poderão ser importantes para a actividade farmacológica observada *in vivo* com a fracção flavonóide total.

5.3.3 Avaliação da afinidade de SF Ia, SF Ib e SF IIIb para o local de ligação das benzodiazepinas no complexo-receptor GABA.

Apesar de a subfracção I (SF I), a partir do qual os compostos SF Ia e SF Ib foram isolados, não ter exibido uma afinidade significativa para os receptores benzodiazepínicos ($IC_{50} = 4,5mM$) um dos seus constituintes (SF Ia) evidenciou actividade do tipo ansiolítico nos ensaios *in vivo* realizados. Assim, testámos também a capacidade dos dois constituintes desta subfracção para, isoladamente, deslocarem a ligação do [3H]-flunitrazepam. Considerando a diferença significativa entre a afinidade relativamente elevada da fracção flavonóide total e a baixa afinidade da SF I, incluímos também neste ensaio um terceiro composto, isolado de uma das restantes subfracções (SF III) da fracção flavonóide total (Fig. 5.3.3a).

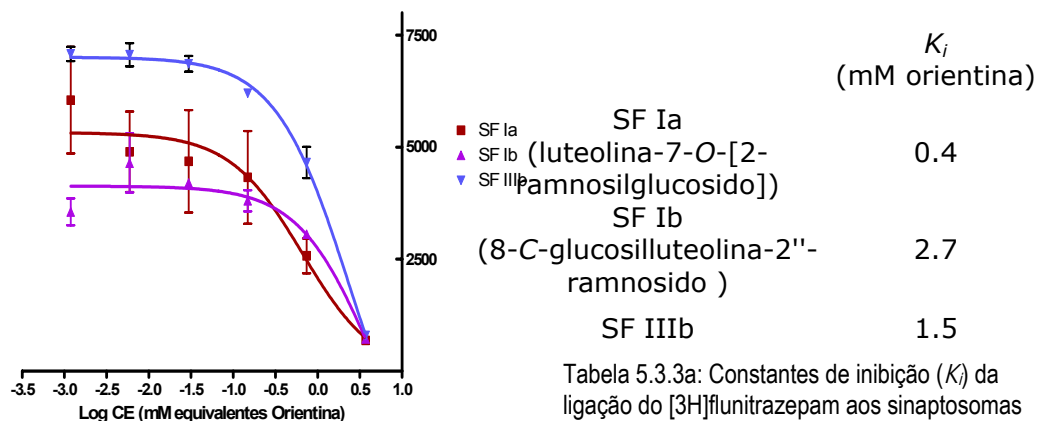


Fig. 5.3.3a: Curvas de inibição competitiva da ligação do [3H]flunitrazepam aos sinaptosomas do córtex cerebral de rato

Tabela 5.3.3a: Constantes de inibição (K_i) da ligação do [3H]flunitrazepam aos sinaptosomas do córtex cerebral de rato

Cada ponto representa a média \pm erro padrão de duas experiências independentes realizadas em triplicado.

Tal como esperado, na sequência dos resultados obtidos com a SF I, os compostos isolados SF Ia e Ib não mostraram uma afinidade para os receptores benzodiazepínicos nas membranas de córtex cerebral de rato que justificasse a actividade *in vivo*. Contudo, o composto SF Ia, que contrariamente a SF Ib exibiu actividade nos ensaios *in vivo*, também mostrou uma afinidade superior para aquele receptor ($F_{4,74} = 6.006$; $p = 0.0003$) (Tabela 5.3.3a).

5.3.4 Avaliação da afinidade da luteolina para o local de ligação das benzodiazepinas no complexo-receptor GABA

Dos ensaios de saturação com [3H]flunitrazepam a constante de dissociação (K_d) determinada foi 13.9 ± 3.3 nM. Nos ensaios de ligação competitiva realizados na presença de [3H]flunitrazepam (5nM), a luteolina inibiu a ligação deste composto com as membranas do córtex cerebral de rato (Fig. 5.3.4a) com uma constante de inibição (K_i) de $60,1 \mu\text{M}$ e um coeficiente de Hill de $-0,91$.

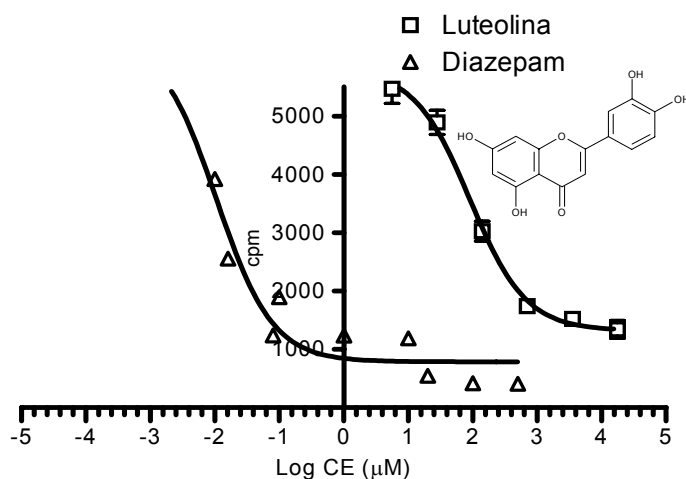


Fig. 5.3.4a: Curvas de inibição competitiva para o diazepam e luteolina da ligação do [³H]flunitrazepam aos sinaptosomas do cortex cerebral de rato

Cada ponto representa a média ± erro padrão de duas experiências independentes realizadas em triplicado.

Já anteriormente havia sido reportado que a luteolina não possuía capacidade de deslocar a ligação de [³H]flunitrazepam dos receptores benzodiazepínicos (IC₅₀ > 100 μM) (Viola *et al.*, 1994). Não obstante, nestes ensaios verificámos que a luteolina possui, de facto, alguma capacidade para deslocar a ligação de [³H]-flunitrazepam, apesar de exibir uma afinidade para estes receptores relativamente baixa. Para estabelecer mais um ponto de comparação entre os ensaios realizados e os dados disponíveis na literatura incluímos ainda nestes ensaios de ligação a crisina. Segundo Wolfman *et al.* (1994) este composto possui actividade do tipo ansiolítico e uma elevada afinidade para os receptores benzodiazepínicos, com uma K_i de 3 nM. Contudo nos ensaios com crisina não confirmámos este dado e o IC₅₀ determinado foi de 0.3 mM.

Apesar da necessidade de analisar em maior detalhe a interacção da luteolina (e também da crisina) com os receptores benzodiazepínicos, estes resultados sugerem que *per se* a interacção com estes receptores não parece explicar completamente os resultados observados *in vivo*, suscitando assim renovado interesse no estudo da interacção da luteolina com outros tipos de receptores. Na verdade, convirá referir que o estudo da actividade ansiolítica de compostos com uma estrutura do tipo das flavonas tem estado focada na capacidade destas

moléculas de interagirem com os locais de ligação das benzodiazepinas no complexo-receptor GABA_A (revisões por Wang *et al.*, 2005; Marder e Paladini, 2002) mas, no entanto, estes compostos possuem um largo espectro de actividades biológicas interagindo com diversos tipos de receptores (Middleton *et al.*, 2000). No caso específico da luteolina foi, por exemplo, já demonstrada a sua actividade anti-oxidante (Shimoi *et al.*, 1994), anti-tumoral (Yasukawa *et al.*, 1989), anti-inflamatória e anti-alérgica (Ziyan *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 1989) bem como a inibição da proteína quinase C (Ferriola *et al.*, 1989) e a lipo-oxigenase (Yamamoto *et al.*, 1989).

5.4 Algumas considerações sobre o metabolismo das flavonas

Outra questão que nos foi suscitada pela aparente discrepância entre as afinidades genericamente baixas para os receptores benzodiazepínicos dos extractos flavonóidicos e respectivos compostos isolados e as actividades evidenciadas por estes *in vivo*, tem que ver com a metabolização destes compostos. Na verdade, no ensaio *in vitro*, quando testamos a capacidade da luteolina-7-O-[2-ramnosilglucosido], da 8-C-glucosilluteolina-2"-ramnosido, ou dos extractos flavonóidicos, para deslocar competitivamente o [³H]-flunitrazepam da ligação às membranas do córtex cerebral de rato, não estamos, muito provavelmente, a colocar em competição com o radioligando o(s) composto(s) que *in vivo* entram em contacto com o receptor e o mesmo acontecerá com a genina destes compostos. Isto acontece porque para serem absorvidos estes compostos têm que ser metabolizados e o resultado dessa metabolização poderá alterar significativamente a sua capacidade para interagirem com os locais de ligação das benzodiazepinas no receptor GABA.

Justifica-se assim uma análise mais detalhada do eventual processo de metabolização sofrido por estes compostos.

Durante muito tempo considerou-se que a absorção dos flavonóides seria muito baixa dada a sua presença normalmente na forma glicosilada. Considerava-se que apenas os flavonóides livres (geninas) seriam capazes de atravessar a mucosa intestinal e chegar à circulação sistémica (Hollman e Katan, 1997). Pensava-se que a hidrólise ocorria apenas no cólon por acção de microorganismos que, ao mesmo tempo, degradariam extensivamente os flavonóides por clivagem do anel heterocíclico C (Kühnau, 1976), sendo portanto de esperar apenas uma absorção marginal dos flavonóides administrados na dieta. Contudo, apesar de Gugler *et al.* (1975) terem demonstrado que a quercetina livre era fracamente absorvida (<1%) após administração oral em humanos, Hollman *et al.* (1995) verificaram que a absorção de quercetina quando administrada a indivíduos

ileostomizados na forma glicosilada (tal como existe naturalmente na cebola ou como rutinósido puro) pode atingir valores elevados (52% e 17%), demonstrando assim a possibilidade de absorção destes compostos glicosilados no intestino delgado.

Numa revisão relativamente recente Manach e Donovan (2004) contabilizaram cerca de 100 estudos em que foi reportada a farmacocinética de flavonóides individuais em voluntários saudáveis. Os dados disponíveis apontam para diferenças consideráveis entre os diferentes tipos de flavonóides presentes na dieta. A absorção no intestino delgado varia entre 0 e 60% da dose administrada e a semi-vida de eliminação entre 2 a 28h. Os flavonóides absorvidos são sujeitos a intenso metabolismo de "first-pass" de fase II nas células epiteliais do intestino e no fígado, sendo as formas predominantes no plasma metabolitos conjugados com grupos metilo, sulfato e glucoronato. Németh *et al.* (2003) identificaram apenas duas das β -glicosidases presentes no intestino delgado como sendo capazes de hidrolizar os glicósido de flavonóides. Tratam-se da "lactase phlorizin hydrolase" (LPH) e da "cytosolic beta-glucosidase" (CBH). Curiosamente, a actividade de ambas as enzimas está sujeita a grande variação inter-individual e, em ambos os casos, são conhecidos os seus polimorfismos genéticos (Cheetham *et al.*, 1978; Harvey *et al.*, 1995), que poderão de alguma forma ter um significativo impacto na capacidade individual de absorver e metabolizar estes compostos, quer sejam provenientes da dieta ou de administração terapêutica.

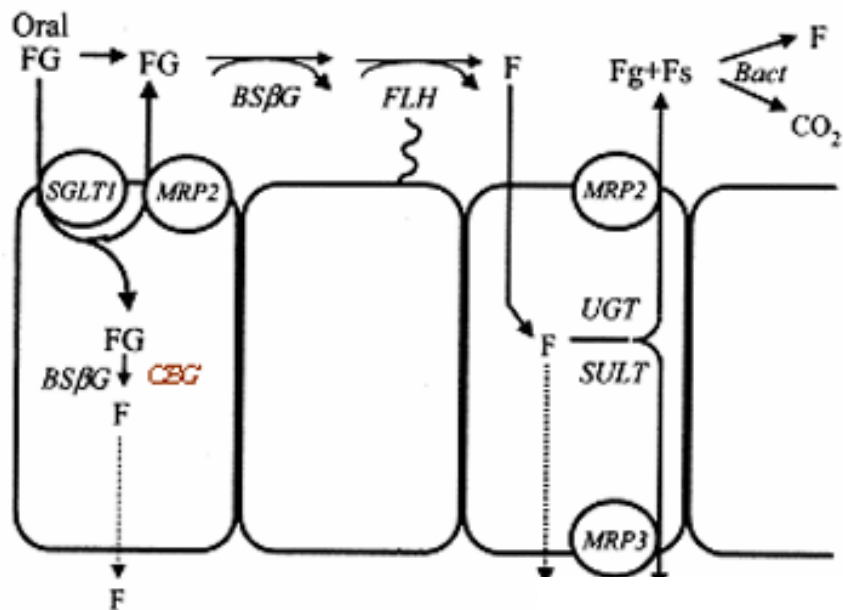


Fig. 5.4a: Vias para o transporte e metabolismo dos glicosídeos de flavonóides (FG) e das correspondentes geninas (F), no lúmen e enterócitos do tracto digestivo. O Transportados de glucose sódio-dependente (SGLT1) e as proteínas multiresistentes 2 e 3 (MRP2 e MRP3) são transportadores membranares. BSβG, β-glucosidase "broad-specific"; LPH, "lactase phloridzin hydrolase"; Bact, enzimas bacterianas; UGT, UDP-glucoroniltransferase; SULF, sulfotransferase; Fg, glucoronídeo de flavonóide; Fs, sulfato de flavonóide (Adaptado de Walle, 2004)

Foi também demonstrado que os derivados glucosilados da quercetina podem ser hidrolizados na saliva humana em poucos minutos (apesar de existirem grandes diferenças inter-individuais) enquanto que flavonóides combinados com outros açucares (rutina, quercitrina) não são hidrolizados nesse meio (Walle *et al.*, 2005).

Nos diversos estudos disponíveis dedicados à absorção e metabolismo de glicosídeos de flavonóides derivados da flavona os compostos estudados foram apenas derivados *O*-glicosilados pelo que a informação disponível para as flavonas *C*-glicosiladas é bastante escassa ou inexistente.

Absorção e metabolismo de derivados glicosilados de luteolina

Num modelo experimental em que foi usada uma secção de intestino de rato foi demonstrado que a luteolina 7-*O*-β-glucósido praticamente não era absorvida,

mas foram detectados glucoronídeos de luteolina após absorção intestinal, sugerindo que a conversão de luteolina nos seus derivados glucoronídeos ocorre na passagem através da mucosa intestinal (Shimoi *et al.*, 1998). Apesar de se considerar que é no fígado que existe grande capacidade para a glucoronoconjugação (Hollman e Katan, 1998) e que, genericamente, esse seria o local onde se concretizaria a glucoronoconjugação de flavonóides foi demonstrado que esta ocorre rapidamente, por acção da UDP-glucoronosiltransferase na mucosa intestinal (Shimoi *et al.*, 1998). Ainda, a luteolina 7-O- β -glucósido não foi detectada no plasma de rato após administração oral. Os resultados obtidos por estes autores sugerem que a luteolina 7-O- β -glucósido deve primeiro ser hidrolizada pelas microbactérias da flora intestinal, originando luteolina que é em seguida absorvida (Shimoi, 2001).

Por outro lado, os mesmos autores, demonstraram que a 4G- α -D-glucopiranosilrutina (bastante hidrossolúvel) é rapidamente absorvida na circulação e o metabolito presente no plasma encontra-se na sua forma glicosilada. É, portanto, sugerido que a absorção ou não dos heterósidos flavonóides pode depender do tipo de glicosilação, sendo que os flavonóides glicosilados hidrossolúveis podem ser absorvidos sem serem submetidos a hidrólise pelas bactérias intestinais.

Após administração oral de luteolina foram detectados no plasma do rato luteolina livre, derivados sulfatados e glucoronídeos de luteolina e de O-metil-luteolina, indicando que alguma luteolina consegue “escapar” à conjugação intestinal e sulfatação/metilação hepática, confirmando os dados apresentados por Hollman e Katan (1998) para flavanonas, que sugeriam que a dose administrada condiciona grandemente os metabolitos formados. A análise por LC/MS demonstrou que o principal metabolito é um monoglucoronídeo não tendo sido determinado em qual dos -OH disponíveis ocorre a glucoronidação.

Assim, na falta de estudos específicos que elucidem os mecanismos da sua absorção e metabolismo do derivado flavonóide que isolámos do extracto aquoso de *Passiflora edulis* Sims, cuja estrutura identificámos como sendo luteolina-7-O-[2-ramnosilglucósido] e cuja actividade ansiolítica foi demonstrada *in vivo*, podemos especular, em face da informação bibliográfica disponível, que a actividade farmacológica verificada não é exercida pelo composto tal como é encontrado na natureza. A absorção deste composto processar-se-á muito provavelmente na forma glicosilada mas a passagem para a circulação sistémica e conseqüentemente para os tecidos onde exercerá a sua actividade, ocorrerá já na forma dos seus metabolitos monoglucorónidos, sulfatados e/ou o-metilados e sem os glicósidos originalmente presentes, tal como acontece com outros glicósidos da luteolina (Shimoi *et al.*, 1998; Németh *et al.*, 2003).

Eventualmente, a diferença de actividade *in vivo* verificada para os dois compostos isolados e identificados (luteolina-7-O-[2-ramnosilglucósido] e 8-C-glucosilluteolina-2''-ramnosido) poderá estar relacionada com a diferente absorção destes compostos pois no caso da 8-C-glucosilluteolina-2''-ramnosido a biodisponibilidade dos seus metabolitos deverá ser bastante mais baixa pois, previsivelmente, a sua absorção é dificultada pela glucose na posição 8, logo o seu tempo de permanência no lúmen intestinal será maior (não é tão facilmente transportado e hidrolizado pelas células epiteliais) e estará mais sujeito à acção degradativa da microflora intestinal.

Conclusões

Analisando os resultados apresentados nos dois capítulos precedentes podem-se inferir as seguintes conclusões:

- Não é possível conhecer com precisão o número de plantas e formulações existentes no mercado Português. Estas são disponibilizadas através de diferentes tipos de estabelecimentos comerciais, incluindo herbanárias, lojas especializadas em diferentes tipos de produtos ditos naturais, parafarmácias, grandes superfícies comerciais, mercados tradicionais de produtos agrícolas, ou farmácias e são apresentadas com indicações para o uso em diversos distúrbios relacionados com ansiedade. Contudo, da análise da literatura disponível podemos concluir que o número de plantas para as quais existe esse tipo de indicação é bastante elevado e, de entre estas, aquelas usadas mais frequentemente em Portugal ascenderão no mínimo a mais de uma dezena.
- São inúmeras as plantas referidas na literatura pelas suas propriedades ansiolíticas e/ou sedativas, sendo que algumas são espontâneas da flora Portuguesa (*H. perforatum* L.), enquanto outras foram introduzidas, nomeadamente após a chegada de navegadores Portugueses à América do Sul (*Passiflora spp.*) e são actualmente cultivadas pelo interesse comercial dos seus frutos, ou como plantas ornamentais, ou ainda pelas suas propriedades medicinais e, muitas outras ainda, não se encontram normalmente no nosso país (*Rauwolfia serpentina* Benth. ex Kurz). Dado o enfoque do nosso trabalho, estas últimas foram excluídas do nosso estudo logo à partida e, da análise inicial da literatura relativa às restantes,

nomeadamente aquelas plantas mais comuns, pudemos extrair algumas conclusões preliminares:

Muito sucintamente, poder-se á afirmar que, de todas as plantas analisadas o *Hypericum perforatum* L. será aquela que já foi mais extensivamente estudada. Esta planta aparece referenciada, na literatura científica, fundamentalmente pela sua acção anti-depressiva. São inúmeros os estudos farmacológicos já realizados e incluem vários ensaios clínicos de larga escala. Apresenta vários constituintes com actividades farmacológicas descritas, não estando ainda determinado qual o principal responsável pela actividade antidepressiva da planta. Relativamente às restantes plantas, nomeadamente a *Melissa officinalis* L., *Passiflora edulis* Sims e *Tilia x europaea* L., pudemos concluir que, de um modo geral, todas elas apresentam insuficiente caracterização fitoquímica e neurofarmacológica, não sendo conhecidos quais os compostos ou os mecanismos envolvidos na sua eventual actividade no SNC e também não existem dados clínicos suficientes que sustentem o seu uso na prática clínica convencional.

- A metodologia adoptada para a análise das infusões das diferentes plantas estudadas, permitiu estabelecer um perfil cromatográfico de referência para cada uma delas e verificar que a composição qualitativa e quantitativa das diferentes infusões preparadas durante o período em que foi realizado o screening neurofarmacológico não variou significativamente, bem como não foram detectadas diferenças significativas entre a composição das infusões e respectivos liofilizados, pelo que podemos concluir que não houve interferência deste factor nos resultados obtidos no estudo farmacológico. Por outro lado, o perfil

cromatográfico estabelecido permitirá, no futuro, a comparação dos resultados obtidos neste estudo com os de outros autores.

- Em face dos resultados obtidos no *screening* neurofarmacológico das diferentes plantas, podemos concluir que o *Hypericum perforatum* L. apresenta uma acção sedativa com doses elevadas (> 25 mg/kg) e evidenciou um efeito do tipo ansiolítico para doses mais baixas (5 mg/kg). Este efeito não está relacionado com a presença de hiperforina, pelo que podemos concluir com segurança que existem outros constituintes da planta que estarão envolvidos na sua actividade neurofarmacológica.
- A *Tilia x europaea* L. também exibiu uma acção sedativa com doses mais elevadas (> 25 mg/kg) mas, contrariamente ao *H. perforatum* L., não se verificou qualquer actividade quando foram testadas doses mais baixas.
- A caracterização da actividade neurofarmacológica da *Melissa officinalis* L. foi comprometida pelo facto de os animais apresentarem contracções abdominais para as doses mais baixas que administrámos (5 e 25 mg/kg), provavelmente originadas pela via de administração seleccionada. Contudo, também para as concentrações mais elevadas que testámos não se verificou que esta planta induzisse actividade neurofarmacológica significativa.
- A *Passiflora edulis* Sims evidenciou uma actividade do tipo ansiolítico para a dose mais elevada (100 mg/kg).

Relativamente aos estudos fitoquímicos com o *H. perforatum* L. podemos retirar as seguintes conclusões:

- Não foram identificados constituintes para além daqueles cuja presença nesta planta já era conhecida e os principais constituintes que detectámos

e identificámos na planta foram: ácido clorogénico, rutina, hiperósido, quercitrina, isoquercitrina, quercetina, I3, II8-biapigenina, amentoflavona, hipericina, pseudohipericina e hiperforina.

- Os dados relativos à distribuição e acumulação dos principais constituintes nas diferentes partes da planta e ao longo do seu ciclo de vida, estão em linha com os resultados mais recentes de outros autores e, nalguns casos, contrariam algumas das referências mais antigas.
- O teor global de flavonóides varia significativamente em termos qualitativos e quantitativos, ao longo do ciclo de vida da planta, atingindo valores mais elevados no período imediatamente anterior à floração. Esses teores globais são mantidos durante as fases iniciais da floração embora se registem nesse período alterações qualitativas significativas, também na distribuição dos principais derivados de flavonóides pelas diferentes partes da planta.
- As biflavonas, nomeadamente a I3, II8 – biapigenina e amentoflavona, foram detectadas apenas durante o período de floração, acumulando-se exclusivamente nas flores.
- Os ácidos fenólicos atingem valores mais elevados durante a floração, acumulando-se principalmente nas folhas e flores.
- A hipericina aparece desde as primeiras fases de desenvolvimento da planta e atinge os valores máximos durante a floração. A pseudohipericina, por outro lado, também aparece desde as primeiras fases de desenvolvimento da planta mas o seu teor máximo parece ser atingido ainda antes da floração.
- A hiperforina e adhiperforina estão também presentes desde as primeiras fases de desenvolvimento da planta, mas só atingem os teores mais elevados durante a floração. Confirmou-se, por outro lado, que, para além

das flores, estes compostos estão presentes também nas folhas. Nas condições experimentais descritas foi possível isolar e dosear a hiperforina e concluímos que esta apresenta uma crescente instabilidade quando consideramos sucessivamente o material vegetal, extractos etanólicos, extractos com *n*-heptano e compostos isolados, o que sugere que existem na planta compostos, possivelmente de natureza fenólica, que contribuirão para a sua estabilidade.

- Assim, a definição do momento da colheita é extremamente importante na determinação do teor dos principais constituintes presentes no material vegetal e os resultados obtidos confirmam que, em termos dos principais constituintes bioactivos, faz sentido que a colheita se processe durante o período da floração. Por outro lado, factores como o processamento do material vegetal após a colheita (temperatura, luz), no caso dos floroglucínóis, ou a proporção das diferentes partes da planta, no caso da maioria dos compostos, também afectarão decisivamente o teor dos constituintes bioactivos.

Relativamente aos estudos fitoquímicos e neurofarmacológicos realizados com a *Passiflora edulis* Sims podemos retirar as seguintes conclusões:

- Os resultados obtidos pela análise da actividade farmacológica das infusões desta planta nos diferentes ensaios demonstram que esta possui um efeito do tipo ansiolítico. Uma vez que não se verificaram alterações nos parâmetros relacionados com a actividade motora concluímos que este efeito não é acompanhado de outros efeitos sobre a actividade motora. Acreditamos também, que os nossos resultados permitem afastar uma hipótese levantada por outros autores, segundo a qual os efeitos farmacológicos atribuídos à *Passiflora edulis* Sims resultavam de uma deficiente identificação do material vegetal.

- A fracção flavonóide total (TFF) isolada a partir das infusões evidenciou, igualmente, um efeito do tipo ansiolítico mas, contrariamente ao verificado com a infusão, para além do efeito ansiolítico, verificou-se que esta induzia relaxamento muscular e descoordenação da actividade motora. Contudo, as doses necessárias de TFF para induzir actividade neurofarmacológica são bastante superiores ao teor desta fracção nas doses activas da infusão, sugerindo que poderão existir compostos de outros grupos químicos envolvidos na actividade farmacológica e / ou sinergias que potenciam a actividade evidenciada pelos derivados de flavonóides.
- A Subfracção I (SF I) isolada a partir da fracção flavonóide total também exibiu uma actividade do tipo ansiolítico sem alteração da actividade motora e, também neste caso, as doses em que evidenciou actividade farmacológica foram bastante superiores ao seu teor na dose activa da TFF da qual foi extraída, assim sugerindo o possível envolvimento, directo ou indirecto, de outros derivados de flavonóides presentes em TFF.
- Foram isolados e identificados dois compostos de SF I:

SF IA - luteolina-7-O-[2-ramnosilglucósido]

SF IB - 8-C-glucosilluteolina-2''-ramnósido

Destes dois compostos apenas o SF IA exibiu uma actividade do tipo ansiolítico e a dose necessária para induzir esse efeito correlacionava bem com o seu teor na dose activa de SF I, sugerindo que este será o único composto activo desta subfracção. Por outro lado, os resultados obtidos parecem sugerir que a presença de uma ligação não hidrolisável na posição 8, afecta negativamente a actividade farmacológica deste tipo de compostos, por comparação com a presença de uma ligação hidrolisável na posição 7.

- Por outro lado, os resultados do estudo *in vitro* com sinaptosomas de córtex cerebral de rato e o radioligando [³H]-flunitrazepam, permitiram concluir que não há uma relação entre a afinidade das infusões liofilizadas das diferentes plantas para o local de ligação das benzodiazepinas no complexo-receptor GABA e a actividade neurofarmacológica evidenciada por estas *in vivo*. Já no caso da fracção flavonóide total (TFF) isolada a partir da infusão de *Passiflora edulis* Sims parece haver um envolvimento Gabaérgico na actividade evidenciada *in vivo*. No entanto, no caso da SF I isolada a partir da TFF, também não parece existir correlação entre a actividade *in vivo* e a sua afinidade *in vitro* para o local de ligação das benzodiazepinas no complexo-receptor GABA, sugerindo a presença na TFF de outros derivados de flavonóides com maior afinidade para este receptor e, portanto, com envolvimento na actividade neurofarmacológica.
- Da afinidade dos compostos isolados (SF IA: luteolina-7-O-[2-ramnosilglucósido] e SF IB: 8-C-glucosilluteolina-2"-ramnósido) para o local de ligação das benzodiazepinas no complexo-receptor GABA também podemos concluir que esta não justifica a actividade evidenciada por SF IA *in vivo*.
- Estes dados sugerem duas possibilidades distintas, mas não mutuamente exclusivas, para justificar as actividades evidenciadas *in vivo*:
 - a primeira será a possibilidade de, para além de um envolvimento Gabaérgico, poder existir uma interacção com outros tipos de receptores, que não o local de ligação das benzodiazepinas no complexo-receptor GABA;
 - a segunda tem que ver com a transformação dos derivados de flavonóides durante o processo de absorção e metabolização, que poderá

transformar alguns destes derivados de flavonóides em espécies químicas com uma maior afinidade para o complexo-receptor GABA. Se considerarmos, a título de exemplo, os dois compostos isolados, SF IA e SF IB, podemos especular, em face da informação bibliográfica disponível (secção 5.4, Cap. 2), que o facto de SF IA possuir uma ligação glicosídica hidrolisável favorecerá a sua absorção e, desse processo, surgirá uma espécie química com maior actividade Gabaérgica, o que justificaria a aparente discrepância entre os resultados observados *in vivo* e *in vitro*.

Resumo

Neste trabalho identificámos um conjunto de quatro plantas, nomeadamente o *Hypericum perforatum* L., a *Melissa officinalis* L., a *Passiflora edulis* Sims e a *Tilia x europaea* L., que são espontâneas da flora nacional ou que se encontram actualmente cultivadas no nosso país, e para as quais o seu uso tradicional indica uma potencial actividade sedativa ou ansiolítica. Os extractos destas plantas foram sumariamente caracterizados e submetidos a um *screening* neurofarmacológico *in vivo*.

Baseados nos dados disponíveis na literatura e nos resultados obtidos no *screening* neurofarmacológico focámos a nossa atenção na análise dos principais constituintes activos no *Hypericum perforatum* L. e no fraccionamento bioquímico dos derivados de flavonóides presentes na *Passiflora edulis* Sims. Com os compostos isolados da *Passiflora edulis* Sims, bem como com a respectiva genina (luteolina), tentámos estabelecer uma possível relação entre a actividade evidenciada *in vivo* e a interacção com o local de ligação das benzodiazepinas no receptor GABA_A.

A infusão do *Hypericum perforatum* L. apresentou uma acção sedativa com doses elevadas (> 25 mg/kg) e evidenciou um efeito do tipo ansiolítico para doses mais baixas (5 mg/kg). A análise da composição do extracto revelou que o efeito observado não estava relacionado com a hiperforina, uma vez que esta substância não se encontrava presente. A *Tilia x europaea* L. também exibiu uma acção sedativa com doses mais elevadas (> 25 mg/kg) mas, contrariamente ao *H. perforatum* L., não se verificou qualquer actividade quando foram testadas doses mais baixas. No caso da *Melissa officinalis* L. não foram detectados efeitos neurofarmacológicos significativos enquanto que a *Passiflora edulis* Sims

evidenciou uma actividade do tipo ansiolítico para a dose mais elevada (100 mg/kg).

Relativamente aos estudos fitoquímicos com o *H. perforatum* L., realizados ao longo do ciclo de vida da planta e nas diferentes partes da planta, verificámos diferenças qualitativas e quantitativas significativas, concluindo-se que a definição do momento da colheita, o processamento do material vegetal após a colheita (temperatura, luz) e a proporção das diferentes partes da planta afectarão decisivamente o teor de diversos constituintes bioactivos nos extractos desta planta.

Relativamente aos estudos fitoquímicos e neurofarmacológicos realizados com a *Passiflora edulis* Sims pudemos concluir que as infusões desta planta possuem um efeito do tipo ansiolítico sem induzir relaxamento muscular ou efeitos sedativos. Por outro lado, a fracção flavonóide total (TFF) isolada a partir das infusões, evidenciou, igualmente, um efeito do tipo ansiolítico mas, contrariamente ao verificado com a infusão, para além do efeito ansiolítico, verificou-se que esta induzia relaxamento muscular e descoordenação da actividade motora. Contudo, as doses necessárias de TFF para induzir actividade neurofarmacológica são bastante superiores ao teor desta fracção nas doses activas da infusão, sugerindo que poderão existir compostos de outros grupos químicos envolvidos na actividade farmacológica e / ou sinergias que potenciam a actividade evidenciada pelos derivados de flavonóides. A Subfracção I (SF I) isolada a partir de TFF também exibiu uma actividade do tipo ansiolítico sem alteração da actividade motora e, também neste caso, as doses em que evidenciou actividade farmacológica foram bastante superiores ao seu teor na dose activa da TFF da qual foi extraída, assim sugerindo o possível envolvimento, directo ou indirecto, de outros derivados de flavonóides presentes. Da SF I foram

isolados dois compostos cuja estrutura foi determinada recorrendo a diversas técnicas de RMN (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY ^1H - ^1H e HMBC) e identificados como sendo a luteolina-7-*O*-[2-ramnosilglucósido] (SF IA) e a 8-*C*-glucosilluteolina-2"-ramnósido (SF IB). Destes dois compostos apenas o SF IA exibiu uma actividade do tipo ansiolítico e a dose necessária para induzir esse efeito correlacionava bem com o seu teor na dose activa de SF I.

Adicionalmente, os resultados dos estudos *in vitro*, permitiram concluir que não há uma relação entre a afinidade das infusões liofilizadas das diferentes plantas para o local de ligação das benzodiazepinas no receptor GABA_A e a actividade neurofarmacológica evidenciada por estas *in vivo*. Já no caso da TFF parece haver um envolvimento Gabaérgico na actividade evidenciada *in vivo*. No entanto, no caso da SF I, também não parece existir correlação entre a actividade *in vivo* e a sua afinidade *in vitro* para o local de ligação das benzodiazepinas no receptor GABA_A. Estas observações sugerem duas possibilidades distintas embora não mutuamente exclusivas. Uma é a possibilidade de, para além da modulação Gabaérgica, existirem outros mecanismos envolvidos na actividade neurofarmacológica dos flavonóides encontrados na *Passiflora edulis* Sims. A outra tem que ver com a transformação dos derivados de flavonóides durante o processo de absorção e metabolização, que poderá originar espécies químicas com uma maior afinidade para o receptor GABA_A. Em ambos os casos estas hipóteses carecem de um estudo mais aprofundado.

Abstract

In this study we have identified a batch of 4 plants, namely *Hypericum perforatum* L., *Melissa officinalis* L., *Passiflora edulis* Sims and *Tilia x europaea* L., spontaneous or currently cultivated in our country, for which its traditional use indicates a potential sedative or anxiolytic-like activity. We have submitted the extracts of these plants to a preliminary neuropharmacological screening *in vivo* and briefly characterized its chemical composition.

Based on the literature data available and on the results obtained in the neuropharmacological screening we've focused on the analysis of the main active constituents in *Hypericum perforatum* L. and on the bioguided fractionation of *Passiflora edulis* Sims flavonoid constituents. With the compounds isolated from *Passiflora edulis* Sims and its respective aglycon (luteolin) we've attempted to establish a possible relation between the observed activity *in vivo* and the interaction with benzodiazepine binding site at the GABA_A receptor.

Hypericum perforatum L. lyophilized aqueous infusion exhibited sedative activity *in vivo* with the higher doses tested (> 25 mg/kg) whereas with the lower doses (5 mg/kg) it evidenced an anxiolytic-like effect. Analysis of the extract composition revealed that the observed effect was not related with hyperforin, as this substance was not found in the extract. *Tilia x europaea* L. lyophilized aqueous infusion also exhibited sedative effects for the higher doses tested (> 25 mg/kg) but unlike *H. perforatum* L. did not elicit any anxiolytic-like effects when lower doses were tested. The characterization of *Melissa officinalis* L. activity was compromised by the fact that the animals tested presented abdominal contractions with the lower doses tested (5 and 25 mg/kg) but, nevertheless, for

the higher doses tested we did not detect any neuropharmacological effects. *Passiflora edulis* Sims lyophilized aqueous infusion evidenced an anxiolytic-like effect for the higher dose tested (100 mg/kg).

In the phytochemical studies with *H. perforatum* L. plants, carried out during different development stages of the plant and also with the different plant parts, we've detected significant variations of the main constituents. We've concluded that the time of harvest, processing of the plant material and the proportion of the different plant parts, can significantly alter the level of several bioactive constituents of this plant.

As for the phytochemical and neuropharmacological studies performed with *Passiflora edulis* Sims we have concluded that the infusion of this plant presents an anxiolytic-like effect devoid of muscle relaxant or other sedative activity. Also, the total flavonoid fraction evidenced an anxiolytic-like effect but, unlike it was observed with the lyophilized aqueous infusion, it also induced muscle relaxation and motor impairment. However, the doses of the total flavonoid fraction necessary to induce any neuropharmacological effect are much higher than the flavonoid content in the active doses of the lyophilized aqueous infusion, suggesting that other compounds besides the flavonoids might be involved directly or indirectly in the neuropharmacological effects of the extracts. The subfraction I (SF I) isolated from the total flavonoid fraction also exhibited an anxiolytic-like activity but, as it was observed with the lyophilized aqueous infusion, it did not elicit any sedative effects. Again, the effective doses were much higher than the active dose of the extract that originated it (total flavonoid fraction) thus suggesting a possible involvement of other flavonoids present. From SF I we were able to isolate two compounds, whose structure was characterized and determined to be luteolin-7-O-[2-rhamnosylglucoside] (SF IA)

and 8-C-glucosylluteolin-2''-rhamnoside (SF IB). Of these two compounds only SF IA exhibited an anxiolytic-like activity in a dose that correlated well with its content in SF I.

Additionally, the results of the *in vitro* studies with synaptosomes from rat cerebral cortex and the radioligand [³H]-flunitrazepam showed there was no relation between the affinities of the lyophilized aqueous infusions of the different plants towards the benzodiazepine binding site in the GABA_A receptor and the neuropharmacological activity evidenced by this same extracts *in vivo*. However in the case of the total flavonoid fraction isolated from *Passiflora edulis* Sims there seems to be a Gabaergic mechanism for the activity evidenced *in vivo*, but this was not observed for the active subfraction (SF I) it originated nor for any of the isolated compounds. These data suggest two different possibilities that are not mutually exclusive. One is the possibility of having other mechanisms besides Gabaergic modulation involved in the neuropharmacological effects of *Passiflora edulis* Sims flavonoids. The other concerns the biotransformation of the different flavonoids during the absorption and metabolization processes that can yield metabolites with a greater affinity for the GABA complex-receptor. In both cases these possibilities need to be further analysed.

Lista de siglas, abreviaturas e termos ou expressões não traduzidos

- ^{13}C -RMN – Ressonância magnética nuclear de carbono
- ^1H -RMN – Ressonância magnética nuclear de próton
- 5-HT – 5-hidroxitriptamina = serotonina
- 5-HT_x – receptor x (1A, 2, 3, etc.) da serotonina
- 8-OH-DPAT - 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tertralina
- Active-avoidance – acto de evitar activamente
- ACTH - hormona adrenocorticotropica
- AHP – American Herbal Pharmacopoeia
- AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
- ANOVA - análise de variância
- BAW - *n*-butanol/ácido acético/água (4/1/5)
- BMAA - β -metilamina-1-alanina
- BZD-R - receptor benzodiazepínico
- CBH - “cytosolic beta-glucosidase”
- COMT – Catecol-O-metiltransferase
- CORT – cortisol
- COSY – “homonuclear correlation spectroscopy”
- CYP450 - citocromo P450
- DA – dopamina
- Defensive burying – comportamento característico dos murganhos que consiste em enterrar objectos estranhos que sejam colocados na gaiola em que se encontram
- DHD – doses diárias definidas por 1000 habitantes/dia
- DMSO – dimetil-sulfóxido
- DOP – denominação de origem protegida
- EMA – Agência Europeia do Medicamento
- ESCoP – European Scientific Cooperative on Phytotherapy
- FDA – Food and Drug Administration
- First-pass – empregue em relação a um fármaco e refere-se ao metabolismo que ocorre após a absorção e previamente à entrada em circulação
- Flat-back-approach – forma de locomoção do murganho quando este se estica a todo o comprimento do seu corpo e se move cautelosamente para a frente
- FP VIII - Farmacopeia Portuguesa VIII
- GABA – Ácido γ -amino-butírico
- GH - hormona de crescimento
- Grooming - comportamento de auto-limpeza

High throughput screening – screening de elevado rendimento
HMBC – “heteronuclear multiple bond correlation”
HMPC – Herbal Medicinal Products Committee
HMPWG – Working Group on Herbal Medicinal Products
HPA - função hipotalâmica-pituitária-adrenérgica
HPLC – “High performance liquid chromatography” ou cromatografia líquida de alta resolução
i.p. – intra-peritoneal
IC₅₀ – concentração (dose) inibitória a 50%
ICH – International Conference of Harmonization
I&D – investigação e desenvolvimento
IL-6 – interleucina-6
INCB – International Narcotics Control Board
INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
 K_d - constante de dissociação
 K_i - constante de inibição
LPH - “lactase phlorizin hydrolase”
mAChR - receptor muscarínico da acetilcolina
MAO – monoaminoxidase
NA – noradrenalina
NEQ’s – novas entidades químicas
NEU – solução metanólica a 1% em difenilborato de aminoetanol
NMDA - N-metil-D-aspartato
OMS – Organização Mundial de Saúde
Passive-avoidance – acto de evitar passivamente
PEG - solução metanólica a 5% em polietilenoglicol 400
PRL - prolactina
Pubmed – motor de busca do US National Library of Medicine: www.pubmed.gov
PXR - receptor pregnano X
Rf – factor de retenção
RMN – ressonância magnética nuclear
SAP - “stretched attention (também referida como *approach* ou *attended*) posture” = comportamento do murganho que envolve a alongação de cabeça e ombros para a frente seguido de retracção à posição original, mantendo os membros anteriores e posteriores fixos na mesma posição. Este parâmetro é subdividido em duas categorias consoante ocorra na zona fechada ou na plataforma central (SAP protegido) ou na zona aberta (SAP desprotegido)

Screening – empregue com o sentido de uma análise prospectiva de uma determinada actividade farmacológica

Sh – Sholder = ombro

Steady state – estado ou condição de um sistema ou processo que não se altera com o tempo

SEM – erro médio padrão

SF – subfracção

SF IA – composto A isolado da subfracção I

SF IB – composto B isolado da subfracção I

SF IIIB - composto B isolado da subfracção III

SNC – sistema nervoso central

Sniffing – farejamento característico do murganho

SP - substância P

SSRI's – Inibidores selectivos da recaptção de serotonina

Stress – estado de tensão (emocional) que resulta de factores que tendem a alterar um equilibrio existente

TBA - *t*-butanol/ácido acético/água (3/1/1)

TCA's – tricíclicos antidepressivos

TFF – fracção flavonóide total

TLC – Thin Layer Chromatography = Cromatografia em Camada Fina (CCF)

TMS – tetrametilsilano

t_R - Tempo de retenção

USDA - United States Department of Agriculture

WHO – World Health Organization = Organização Mundial de Saúde

Referências bibliográficas

Abourashed EA, Vanderplank JR, Khan IA. High-Speed Extraction and HPLC Fingerprinting of Medicinal Plants - I. Application to Passiflora Flavonoids. *Pharm Biol*, 2002; 40 (2): 81 – 91.

Adam P, Arigoni D, Bacher A, Eisenreich W. Biosynthesis of hyperforin in *Hypericum perforatum*. *J Med Chem*, 2002; 45: 4786–4793.

Adeyemi OO, Yemitan OK, Taiwo AE. Neurosedative and muscle-relaxant activities of ethyl acetate extract of *Baphia nitida* AFZEL. *J Ethnopharmacol*, 2006; 106 (3): 312-316.

Agata I, Kusakabe H, Hatano T, Nishibe S, Okuda T. Melitric acids A and B, new trimeric caffeic acid derivatives from *Melissa officinalis*. *Chem Pharm Bull*, 1993; 41: 1608-1611.

American herbal pharmacopeia and therapeutic compendium, Santa Cruz: American Herbal Pharmacopeia, 1997.

Andreatini R, Bacellar LFS. Animal models: trait or state measure? The test-retest reliability of the elevated plus-maze and behavior despair. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psych*, 2000; 24: 549-560.

Aoagy N, Kimura R, Murata T. (1974) Studies on *Passiflora incarnata* dry extract. I. Isolation of maltol and pharmacological action of maltol and ethyl maltol. *Chem Pharm Bull*, 1974; 22 (5) 1006-1013.

Archer T, Fredriksson A, Lewander T, Soderberg U. Marble burying and spontaneous motor activity in mice: interactions over days and the effect of diazepam, *Scand J Psychol*, 1987; 28: 242–249.

Arriaza, AMC, Craveiro AA, Machado MIL, Pouliquen YBM. Volatile constituents from fruit shells of *P. edulis* Sims. *J Essent Oil Res*, 1997; 9: 235–236.

Atack JR. Anxiolytic Compounds Acting at the GABAA Receptor Benzodiazepine Binding Site. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets (Formerly Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders)*, 2003; 2 (4): 213-232.

Avallone R, Zanolli P, Puia G, Kleinschnitz M, Schreier P, Baraldi M. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochem Pharmacol*, 2000; 59(11):1387-94.

Avato P, Guglielmi G. Determination of Major Constituents in St. John's Wort Under Different Extraction Conditions. *Pharm Biol*, 2004; 42(1): 83 – 89.

Bagdat RB, Cosge B. The essential oil balm (*Melissa officinalis* L.), its component and using fields. *J of Fac of Agric, OMU*, 2006; 21(1):116-121.

Baldwin DS, Ajel K. Development and evaluation of psychotropic drugs. *Psychiatry*, 2007; 6(7): 279-283.

- Ballard C, O'Brien J, Reichelt K, Perry E. Aromatherapy as a safe and effective treatment for the management of agitation in severe dementia: the results of a double blind, placebo controlled trial. *J Clin Psychiatry*, 2002; 63: 553–8.
- Barlow DH. Unraveling the mysteries of anxiety and its disorders from the perspective of emotion theory. *Am Psychol*, 2000; 55:1247-1263.
- Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. Herbal medicines. A guide for health-care professionals (2nd ed), London: Pharmaceutical Press, 2002.
- Basile AS, Lippa AS, Skolnick P. Anxiolytic anxiolytics: can less be more? *Eur J Pharmacol*, 2004; 500 (1-3): 441-451.
- Batista MT. Estudo fitoquímico e ultraestrutural da semente em *Ceratonia Siliqua* L. Tese de Doutorado. Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 1994.
- Baureithel KH, Büter KB, Engesser A, Burkard W, Schaffner W. Inhibition of benzodiazepine binding in vitro by amentoflavone, a constituent of various species of *Hypericum*. *Pharm Acta Helv*. 1997 Jun; 72(3):153-7.
- Beerhues L. Hyperforin. *Phytochemistry*, 2006; 67(20): 2201-2207.
- Belofsky G, Carreno R, Lewis K, Ball A, Casadei G, Tegos GP. Metabolites of the "Smoke Tree", *Dalea spinosa*, Potentiate Antibiotic Activity against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Nat Prod*, 2006; 69 (2): 261 -264.
- Belofsky G, Percivill D, Lewis K, Tegos GP, Ekart J. Phenolic Metabolites of *Dalea versicolor* that Enhance Antibiotic Activity against Model Pathogenic Bacteria. *J Nat Prod*, 2004; 67 (3): 481 -484.
- Benigni R, Capra C, Cattorini PE. *Hypericum*. *Piante Medicinale: Chimica, Farmacologia e Terapia*. Milano: Inverni e Della Beffa, 1971.
- Bennet GJ, Lee HH. Xanthenes from the Guttiferae. *Phytochemistry*, 1989; 28: 967-998.
- Bennett DA; Phun L; Polk JF; Voglino SA, Zlotnik V, Raffa RB. Neuropharmacology of St. John's Wort. *Ann Pharmacother*, 1998; 32: 1201-1208.
- Benthin B, Danz H, Hamburger M. Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *J Chromatogr A*, 1999; 837 (1-2): 211-219.
- Berghoefer R, Hoelzl J. Biflavonoids in *Hypericum perforatum*; Part 1. Isolation of I3, II8 – biapigenin. *Planta Med*, 1987; 53: 216-217.
- Berghoefer R., Hoelzl J. Isolation of I3', II8 – biapigenin (amentoflavone) from *Hypericum perforatum*. *Planta Med*, 1989; 55: 91.
- Berghofer R, Holz J. Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L) Prüfung auf Verfälschung. *Dtsch Apoth Ztg*, 1986; 126 (47) 2569-2573.

- Bergonzi MC, Bilia AR, Gallori S, Guerrini D, Vincieri FF. Variability in the content of the constituents of *Hypericum perforatum* L. and some commercial extracts. *Drug Dev Ind Pharm*, 2001; 27(6):491-7.
- Bermack JE, Debonnel G. The Role of Sigma Receptors in Depression. *J Pharmacol Sci*, 2005; 97 (3):317-336.
- Bernreuther A, Christoph N, Schrier P. Determination of the enantiomeric composition of gamma-lactones in complex natural matrices using multidimensional capillary gas chromatography. *J Chromatogr*, 1989; 481: 363-367.
- Bhattacharya SK, Chakrabarti A, Chatterjee SS. Activity profiles of two hyperforin containing *Hypericum* extracts in behavioral models. *Pharmacopsychiatry*, 1998; 31 (1): 22-29.
- Bilia AR, Bergonzi MC, Mazzi G, Vincieri FF. Analysis and stability of the constituents of artichoke and St. John's wort tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Drug Dev Ind Pharm*. 2002;28(5):609-19.
- Bilia AR, Bergonzi MC, Morgenni F, Mazzi G, Vincieri FF. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. *Int J Pharm*, 2001; 213 (1-2): 199-208.
- Bladt S, Wagner H. Inhibition of MAO by fractions and constituents of *Hypericum* extract. *J Geriatric Psych Neur*, 1994; 7(1): 57-59.
- Blanchard DC, Blanchard RJ, Rodgers RJ. Risk assessment and animal models of anxiety. In: Olivier B, Mos J, Slangen JL, editors. *Animal models in psychopharmacology*, Basel: Birkhauser, 1991, 117-134.
- Blanchard DC, Hynde AI, Minke KA, Minemoto T, Blanchard RJ. Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. *Neurosci Biobehav Rev*, 2001; 25: 761-770.
- Blanchard RJ, Rodgers RJ, Blanchard DC. Ethological approaches to the preclinical psychopharmacology of anxiety. In: Palomo T, Archer T, editors. *Strategies for studying brain disorders*, Madrid: Editorial Complutense and Farran Press, 1994, 145-160.
- Boissier JR, Drenont C, Robbins R, Pagny J. Tentative de pharmacologie previsionelle dans de domain des neuroleptiques: actions sedative centrale et adrenolytique de la *N*(dimethoxy-3,4 phenethyl) *N*(chloro-2 phenyl) piperazine, *Arch Int Pharmacodyn*, 1961; 133: 29-32.
- Boissier JR, Tardy J, Diverres JC. Une nouvelle methode simple pour explorer l'action 'tranquillisante': le test de la cheminee. *Med Exp*, 1960; 3: 81-84.
- Bombardelli E, Bonati A, Gabetta B, Martinelli E, Mustich G. Passiflorine, a new glycoside from *Passiflora edulis*. *Phytochemistry*, 1975; 14 :2661-2665.
- Bombardelli E, Morazzoni P. *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*, 1995; 66:43-68.
- Borowicz KK, Karwowska KF, Sawicka K, Luszczki JJ, Czuczwar SJ. Chronically administered fluoxetine enhances the anticonvulsant activity of conventional

antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock model. *Eur J Pharmacol*, 2007; 567(1-2): 77-82.

Bradley PR, editor. *British Herbal Compendium*, Vol. 1. Bournemouth: British Herbal Medicine Association, 1992.

Brantner A, Kartnig T, Quehenberger F. Vergleichende phytochemische Untersuchungen an *Hypericum perforatum* L. und *Hypericum maculatum* Crantz. *Scient Pharm*, 1994; 62: 261-276.

Brasseur T, Angenot L. Contribution a l'étude pharmacognostique de la Passiflore. *J Pharm Belg*, 1984; 39 (1): 15-22.

Bratt K. Secondary plant metabolites as defense against herbivores and oxidative stress. PhD Thesis, Univ. Uppsala, 2000.

Brenner ED, Stevenson DW, Twigg RW. Cycads: evolutionary innovations and the role of plant-derived neurotoxins. *Trends Plant Sc*, 2003; 8 (9):446-452.

British herbal pharmacopoeia, London:British Herbal Medicine Association, 1996.

Brockmann HV, Falkenhausen EH, Neef R, Dorlars A, Budde G. Partialsynthese von Proto-hypericin und Hypericin aus Penicilliosin. *Chem Ber*, 1951; 84: 865-887.

Brockmüller J, Reum T, Bauer S, Kerb R, Hübner WD, Roots I. Hypericin and pseudohypericin: pharmacokinetics and effects on photosensitivity in humans. *Pharmacopsychiatry*, 1997; 30 (2):94-101.

Broekkamp CL, Berendsen HH, Jenck F, Van Delft AM. Animal models for anxiety and response to serotonergic drugs. *Psychopathology*, 1989; 22 (1): 2- 12.

Broekkamp HW, Rijk D, Gelouin J, Lloyd KL. Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice, *Eur J Pharmacol*, 1986; 126: 223-229.

Brondz I, Greibrokk T, Groth PA, Aasen AJ. The absolute configuration of hyperforin, an antibiotic from *Hypericum perforatum* L., based on the crystal structure determination of its *p*-bromobenzoate ester. *Acta Chem Scand*, 1983; 37: 263-265.

Brondz I, Greibrokk T, Groth PA, Aasen AJ. The relative stereochemistry of hyperforin – an antibiotic from *Hypericum perforatum* L. *Tetrahedron Lett*, 1982; 23: 1299-1300.

Browicz K. Tilia. In: Tutin TG et al., eds. *Flora europaea*, Vol.2, Cambridge: Cambridge University Press, 1968, 247-248.

Bruneton J. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*, Paris: Lavoisier, 1995.

Buchbauer G, Jirovetz L, Jäger W, Plank C, Dietrich H. Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. *J Pharm Sci*, 1993; 82:660-664.

- Buchholzer ML, Dvorak C, Chatterjee SS, Klein J. Dual modulation of striatal acetylcholine release by hyperforin, a constituent of St. John's wort. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002; 301(2): 714-719.
- Büter B, Orlacchio C, Soldati A, Berger K. Significance of genetic and environmental aspects in the field cultivation of *Hypericum perforatum* L. *Planta Med*, 1998; 64: 431-437.
- Butler MS. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *J Nat Prod*, 2004; 67 (12): 2141 -2153.
- Butterweck V, Hegger M, Winterhoff H. Flavonoids of St. John's Wort reduce HPA axis function in the rat. *Planta Med*, 2004; 70 (10): 1008-1011.
- Butterweck V, Jürgenliemk G, Nahrstedt A, Winterhoff H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med*, 2000;66(1):3-6.
- Butterweck V, Liefänder-Wulf U, Winterhoff H, Nahrstedt A. Plasma Levels of Hypericin in Presence of Procyanidin B2 and Hyperoside: A Pharmacokinetic Study in Rats. *Planta Med*, 2003; 69: 189-192.
- Butterweck V, Wall A, Liefänder-Wulf U, Winterhoff H, Nahrstedt A. Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry*, 1997; 30 (2): 117-124.
- Butterweck V. Mechanism of action of St John's wort in depression: what is known? *CNS Drugs*, 2003; 17(8):539-62.
- 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*, 1998; 64: 291-29.
- Bystrov NS, Chernov BK, Dobrynin VN, Kolosov MN, The structure of hyperforin, *Tetrahedron Lett*, 1975; 32: 2791-2794.
- Bystrov NS, Gupta SR, Dobrynin VN, Kolosov MN, Chernov BK. Chemistry of hyperforin. IX. Structure of hyperforin. *Bioorg Khim*, 1978; 4: 948-955.
- Cakir A, Duru ME, Harmandar M, Ciriminna R, Passannati S, Piozzi F. Comparison of the volatile oils of *Hypericum scabrum* L. and *Hypericum perforatum* in Turkey, *Flavour Fragrance J*, 1997; 12:285-287.
- Calapai G, Crupi A, Firenzuoli F, Constantino G, Inferrera G, Campo GM, Caputi AP. Effects of *Hypericum perforatum* on levels of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and dopamine in the cortex, diencephalon and brainstem of the rat. *J Pharm Pharmacol*, 1999; 51 (6): 723-728.
- Campos MG, Markham K, Cunha A. Quality assessment of bee-pollens using flavonoid/ phenolic profiles. *Bull Group Polyphenols*, 1996; 18: 54-55.
- Campos MG, Markham KR, Mitchell KA, Cunha AP. An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. *Phytochem Anal*, 1997; 8 (4): 181-185.

Campos MG. Caracterização do pólen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas. Tese de Doutoramento, Coimbra: Universidade de Coimbra, 1997.

Campos MG, Proença da Cunha A. Efeitos tóxicos no homem e em animais domésticos provocados por plantas espontâneas de Portugal. Ed. Associação Nacional de Farmácias, 2001.

Campos MG, Markham KR. Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra – Flavone, Flavonols and Phenolic Acids. Ed. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra (Portugal), 2007.

Carnat AP, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. Pharm Acta Helv, 1998; 72: 301-305.

Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. Neurosci Biobehav R, 2005; 29: 1193-1205.

Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. Behav Brain Res, 2002; 134: 49-57.

Cassano GB; Rossi NB; Stefano Pini S. Psychopharmacology of anxiety disorders. Dialogues Clin Neurosci, 2002; 4 (3): 271-285.

Castagné V, Porsolt RD, Moser P. Early behavioral screening for antidepressants and anxiolytics. Drug Develop Res, 2006; 67 (9): 729 – 742.

Cavadas C, Araújo I, Cotrim MD, Amaral T, Cunha AP, Macedo T, Fontes Ribeiro CA. In vitro Study on the Interaction of *Valeriana officinalis* L. Extracts and Their Amino Acids on GABA_A Receptor in Rat Brain. *Arzneimittel-Forschung – Drug Research*, 1995; 45 (II): 753 - 765.

Cavadas C, Ribeiro CAF, Santos MS, Cunha AP, Macedo T, Caramona MM, Cotrim MD. In vitro study of the interaction of *Tilia europeae* L. aqueous extract with GABAA receptors in rat brain. *Phytotherapy Research*, 1997; 11 (1): 17-21.

Čellarová E, Daxnerová Z, Kimaková K, Halusková J. The variability of the hypericin content in the regenerants of *Hypericum perforatum*. Act Biotechnol, 1994; 14: 267-274.

Cerny A, Schmid K. Tolerability and efficacy of valerian/lemon balm in healthy volunteers (a double-blind, placebo-controlled, multicentre study). *Fitoterapia* 1999; 70: 221-228.

Chang YW, Su JD. Antioxidant activity of major anthocyanins from skins of Passion fruit. *Shipin Kexue*, 1998; 25:651-656.

Charlton BG. Self-management of psychiatric symptoms using over-the-counter (OTC) psychopharmacology: The S-DTM therapeutic model – Self-diagnosis, self-treatment, self-monitoring. *Med Hypotheses*, 2005; 65: 823-828.

Charney DS, Drevets WC. The neurobiological basis of anxiety disorders. In: Davis KL, Charney DS, Coyle JT, Nemeroff CB, editors. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2002, 901-930.

Chassagne D, Boulanger R, Crouzet J. Enzymatic hydrolysis of edible *Passiflora* fruit glycosides. *Food Chem*, 1999; 66: 281-288.

Chassagne D, Crouzet J, Bayonove CL, Baumes RL. Identification and quantification of passion fruit cyanogenic glycosides. *J Agric Food Chem*, 1996; 44: 3817-3820.

Chassagne D, Crouzet J, Bayonove CL, Brillout JN, Baumes RL. Glycosidically bound eugenol and methyl salicylate in the fruit of edible *Passiflora* species. *J Agric Food Chem*, 1997; 45: 2685-2689.

Chassagne D, Crouzet J. A cyanogenic glycoside from *Passiflora edulis* fruits. *Phytochemistry*, 1998; 49: 757-759.

Chatterjee SS, Bhattacharya SK, Wonnemann M, Singer A, Müller WE. Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life Sci*, 1998; 63 (6): 499-510.

Chatterjee SS, Filippov V, Lishko P, Maximyuk O, Nöldner M, Krishtal O. Hyperforin attenuates various ionic conductance mechanisms in the isolated hippocampal neurons of rat. *Life Sci*, 1999; 65 (22): 2395-2405.

Chatterjee SS, Nöldner M, Koch E, Erdelmeier C. Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and Hyperforin: the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry*, 1998; 31 (1): 7-15.

Chatterjee SS, Koch E, Nöldner M, Biber C, Erdelmeier C. Hyperforin and *Hypericum* extract: interaction with some neurotransmitter systems. *Phytomedicine*, 1996; 3 (1): 106.

Cheetham PSJ, Dance NE, Robinson D. A benign deficiency of type B β -galactosidase in human liver. *Clin Chim Acta*, 1978; 83: 67-74.

Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: Effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev*, 2001; 25, 235-260.

Cirak C, RadusiñėJ, Karabük, Janulis V, Ivanauskas L. Variation of bioactive compounds in *Hypericum perforatum* growing in Turkey during its phenological cycle. *J Integr Plant Biol*, 2007; 49 (5): 615-620.

Clardy J, Walsh C. Lessons from natural molecules. *Nature*, 2004; 432(7019):829-37.

Coghan T. *The Haven of Health*. 1584. (Citado em Kennedy *et al.*, 2003)

Cole JC, Rodgers RJ. Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: comparison with haloperidol. *Psychopharmacology*, 1994; 114: 288-296.

- Coleta M, Batista MT, Campos MG, Carvalho R, Cotrim MD, Lima TC, Cunha AP. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. *Phytother Res*, 2006; 20(12):1067-1073.
- Coleta M. Caracterização da actividade ansiolítica / sedativa em *Passiflora edulis* Sims. Tese de Mestrado. Coimbra: Universidade de Coimbra, 1998.
- Costa AF. Farmacognosia, II Vol, Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1977.
- Cotrim MD, Martins MA, Figueiredo IV, Cavadas C, Cunha AP, Caramona MM, Macedo TR. Effects of *Passiflora edulis* aqueous extracts on 5-HT₃ receptors in guinea-pig ileum and rat brain. *Pharmacol Res*, 1995; EPHAR (Proceedings of the Federation of European Pharmacological Societies): 266.
- Cott JM. (1997) *In vitro* receptor binding and enzyme inhibition by *Hypericum perforatum* extract. *Pharmacopsychiatry*, 1997; 30 (2): 108-112.
- Coutinho AXP. Flora de Portugal: plantas vasculares dispostas em chaves dicotómicas. Ed. Lehre: J. Cramer, 1994.
- Craig KJ, Brown KJ, Baum A. Environmental factors in the etiology of anxiety. In: Bloom FE, Kupfer DJ, editors. *Psychopharmacology: the Fourth Generation of Progress*. New York, NY: Raven Press, 1995, 1325-1339.
- Culpeper, N., 1652. Culpeper's Complete Herbal, Undated edition, Foulsham & Co. New York. i, pp. 36-37, Balm, ii. pp. 311-312, Sage. iii. pp. 393-397, Wormwood.
- Dastmalchi K, Damien HJ, Dorman HJD, Oinonen PP, Darwis Y, Into Laakso I, Hiltunen R. Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT - Food Science and Technology*, available online: doi: 10.106/j.lwt.2007.03.007
- Dawes NH, Paul JS. Volatile constituents of passion fruit juice. *J Food Sci*, 1961; 26: 557-563.
- Dawson GR, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci*, 1995; 16:33-36.
- De Boer SF, Koolhaas JM. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology, *Eur J Pharmacol*, 2003; 463 (1):145-161.
- De Castro PC, Hoshino A, da Silva JC, Mendes FR. Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in experimental models. *Phytother Res*, 2007;21(5):481-484.
- Debelmas AM, Rochat J. Étude pharmacologique des huiles essentielles. Activité antispasmodique étudiée sur une cinquantaine d'échantillons différents. *Plantes médicinales et Phytothérapie*, 1967; 1:23-27.
- Dekermendjian K, Kahnberg P, Witt MR, Sterner O, Nielsen M, Liljefors T. Structure-activity relationships and molecular modeling analysis of flavonoids binding to the benzodiazepine site of the rat brain GABA(A) receptor complex. *J Med Chem*, 1999; 42(21):4343-4350.

- Demisch L, Hölzl J, Gollnik B, Kaczmarczyk P. Identification of selective MAO_A inhibitors in *Hypericum perforatum* L.. *Pharmacopsychiatry*, 1989; 22: 194.
- Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. Passiflora: a review update. *J Ethnopharmacol*, 2004; 94(1): 1-23.
- Dhawan K, Kumar R, Kumar S, Sharma A. Correct identification of *P. incarnata* L.—a promising anxiolytic and sedative of the future. *J Med Food*, 2001; 4(3): 137-144.
- Dhawan K, Kumar S, Sharma A. Comparative biological activity study on *P. incarnata* and *P. edulis*. *Fitoterapia*, 2001; 72: 698-702.
- Dias ACP, Seabra RM, Andrade PB, Ferreres F, Ferreira MF. Xanthone production in calli and suspended cells of *Hypericum perforatum* *J Plant Physiol*, 2001; 158 (7): 821-827.
- Dias ACP, Seabra RM, Andrade PB, Fernandes-Ferreira M. The development and evaluation of an HPLC-DAD method for the analysis of the phenolic fractions from in vivo and invitro biomass of *Hypericum* species. *J Liq Chrom Rel Technol*, 1999; 22(2), 215-227.
- Dimitrova Z, Dimov B, Manolova N, Pancheva S, Ilieva D, Shishkov S. Antiherpetic effect of *Melissa officinalis* L. extracts. *Acta Microbiol Bulg*, 1993; 29: 65-72.
- Dimpfel W, Schober F, Mannel M. Effects of a methanolic extract and a hyperforin-enriched CO₂ extract of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) on intracerebral field potentials in the freely moving rat (Tele-Stereo-EEG). *Pharmacopsychiatry*, 1998; 31 (1):30-35.
- Dorman HJD, Bachmayer O, Koşar M, Hiltunen R. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *J Agric Food Chem*, 2003; 51: 4563-4569.
- Dorman HJD, Koşar M, Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars, *J Agric Food Chem*, 2003; 51: 4563-4569.
- Dressing H, Köhler S, Müller WE. Verbesserung der Schlafqualität mit einem hochdosierten Baldrian-Melisse-Präparat. Eine plazebokontrollierte Doppelblindstudie. *Psychopharmakotherapie*, 1996; 3: 123-130.
- Dressing H, Riemann D, Low H, Schredl M, Reh C, Laux P. Insomnia: are valerian/balm combinations of equal value to benzodiazepine? *Therapiewoche*, 1992; 42: 726-736.
- Duke J. *The green pharmacy herbal handbook*, Ed. Rodale Books, 2000.
- Duncan GE, Knapp DJ, Little KY, Breese GR. Neuroanatomical specificity and dose dependence in the time course of imipramine-induced β -adrenergic receptor down-regulation in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994; 271: 1699-1704.
- Duraffourd C, Pratz JC. Étude de l'activité anxiolytique et hypnotique de l'association de passiflore et de mélisse dans le traitement des états anxieux. *Rev Phytoth Prat*, 1990; 4: 9-12.

Eckert GP, Keller JH, Jourdan C, Karas M, Volmer DA, Schubert-Zsilavec M, Müller WE. Hyperforin modifies neuronal membrane properties in vivo. *Neurosci Lett*, 2004; 367(2): 139-143.

Eckert GP, Müller WE. Effects of hyperforin on the fluidity of brain membranes. *Pharmacopsychiatry*, 2001; 34 (1): 22-25.

Eckert GP, Keller J-H, Jourdan C, Karas M, Volmer DA, Zsilavec MS, Müller WE. Hyperforin modifies neuronal membrane properties in vivo. *Neurosci Lett*, 2004; 367(2):139-143.

Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van Rompay M *et al.* Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: Results of a follow-up national survey. *JAMA*, 1998; 280: 1569-1575.

Eisenberg DM, Kessler RC, C. Foster, Norlock FE, Calkins DR, Delblanco TL. Unconventional medicine in the United States-prevalence, costs, and patterns of use. *New Engl J Med*, 1993; 328: 246-252.

Eisenbrand G, Hippe F, Jakobs S, Muehlbeyer S. Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytomedicine. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004; 130(11):627-35.

Elliott MSJ, Abuhamdah S, Huang L, Perry E, Ballard C, Lees G, Chazot P, Holmes C, Burns A, Francis P. P1-435 Essential oils as potential treatment for agitation in severe dementia: Elucidation of the pharmacological mechanism of Melissa and Lavender oils. *Alzheimer's and Dementia*, 2006; 2 (3): 225-225.

ESCOP monographs on the medicinal use of plant drugs. Fascicule 1, Elburg: European Scientific Cooperative on Phytotherapy, 1996.

Espejo EF. Structure of mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behav Brain Res*, 1997; 86 (1):105-112.

Evelyn J. *Acetaria*. London. 1699 (Citado em Kennedy *et al.*, 2003).

Falk H, Schmitzberger W. On the nature of soluble hypericin in *Hypericum* species. *Monatshefte Chem*, 1992; 123, 731-739.

Fang TT, Chang KJ. Standardization on the inspection of natural fruit juice. 3. Determination of sugar pattern of natural fruit juice. *Kuo Li Tai-wan Ta Hsueh Nung Hsueh Yuan Yen Chui Pao Kao*, 1981; 21:62-69.

Fang TT, Ling SF. Standardization on the inspection of natural fruit juices. 6. Inspection of 6 fruit juices authenticity by aminoacid distribution patterns. *Chung-hua Nung Hsueh Hui Pao*, 1984; 126:90-102.

FARMACOPEIA PORTUGUESA VIII, Lisboa: Imprensa Nacional Casa da Moeda, 2005.

Fernández S, Wasowski C, Loscalzoa LM, Grangerb RE, Johnston G, Paladini AC, Marder M. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *Eur J Pharmacol*, 2006; 539: 3: 168-176.

Ferrari F, Pasqua G, Monacelli B, Cimino P, Botta B. Xanthones from calli of *Hypericum perforatum subsp. perforatum*. *Nat Prod Res*, 2005; 19(2):171-176.

Ferriola PC, Cody V, Middleton Jr. E. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol*, 1989;38(10): 1617-1624.

Fiebich B-L, Hollig A, Lieb K. Inhibition of substance P-induced cytokine synthesis by St. John's wort extracts. *Pharmacopsychiatry*, 2001; 34 (1): 26-28.

Foley WJ, Moore BD. Plant secondary metabolites and vertebrate herbivores – from physiological regulation to ecosystem function. *Curr Opin Plant Biol*, 2005; 8: 430-435.

Fontes-Ribeiro CA. Justifica-se o uso de extractos de plantas medicinais na terapêutica da ansiedade e da depressão? *Revista Saúde Mental*, 2000; 4 (2).

Forster HB, Niklas H, Lutz S. Antispasmodic effects of some medicinal plants. *Planta Med*, 1980; 40: 309-19.

Fourneron J-D, Herbette G, Caloprisco E. Pseudohypericin and hypericin in St. John's wort extracts. Breakdown of pseudohypericin. *Cr Acad Sci II C*, 1999; 2 (3): 127-131(5).

Fradley RL, Guscott MR, Bull S, Hallett DJ, Goodacre SC, Wafford KA, Garrett EM, Newman RJ, O'Meara GF, Whiting PJ, Rosahl TW, Dawson GR, Reynolds DS, Atack JR. Differential contribution of GABA(A) receptor subtypes to the anticonvulsant efficacy of benzodiazepine site ligands. *J Psychopharmacol*, 2007; 21(4):384-91.

Franke R, Heisig W, Muggenburg (1993) Quality variation in some medicinal plants. *Acta Horticulturae*, 1993; 333: 123-127.

Franklin M, Chi J, McGavin C, Hockney R, Reed A, Campling G, Whale RW, Cowen, PJ. Neuroendocrine evidence of dopaminergic actions of *Hypericum* extract (LI 160) in healthy volunteers. *Biol Psychiatry*, 1999; 46 (4): 581-584.

Freeman D, Konstantinovskii L, Mazur Y. The structure of hypericin in solution. Searching for hypericin 1,6 tautomer. *Photochem Photobiol*, 2001; 74: 206-216.

Furtado C, Teixeira I. *Evolução da Utilização das Benzodiazepinas em Portugal Continental entre 1999 e 2003*. Observatório do Medicamento e Produtos de Saúde – INFARMED, 2005. Estudo disponível em: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO_DO_MERCADO/OBSERVATORIO/INTRODUCAO_DE_FICHEIROS/Estudo-BZD.pdf

Gartner M, Müller T, Simon JC, Giannis A, Sleeman JP. Aristoforin, a novel stable derivative of hyperforin, is a potent anticancer agent. *Chembiochem*, 2005; 6(1):171-177.

Gaspar M, Singer A, Zeller K. Comparative efficacy and safety of a once-daily dosage of hypericum extract STW3-VI and citalopram in patients with moderate depression: a double-blind, randomised, multicentre, placebo-controlled study. *Pharmacopsychiatry*, 2006; 39(2):66-75.

- Gaster B, Holroyd J. St John's Wort for depression: a systematic review. Arch Intern Med, 2000; 160: 152–156.
- Gerard J. Gerard's Herbal or Generall Historie of Plantes (1636). Abridged version, 1927. Gerald Howe, London.pp. 104, 152, 156,185, 278,
- Gilbert B, Alves L. Synergy in Plant Medicines. Curr Med Chem, 2003; 10(1): 13-20.
- Gobbi M, Moia M, Funicello M, Riva A, Morazzoni P, Mennini T. *In vitro* effects of the dicyclohexylammonium salt of hyperforin on interleukin-6 release in different experimental models. Planta Med, 2004; 70(7): 680.
- Gobbi M, Moia M, Pirona L, Morizzoni P, Mennini T. *In vitro* binding studies with two *Hypericum perforatum* extracts–hyperforin, hypericin and biapigenin–on 5-HT₆, 5-HT₇, GABA(A)/benzodiazepine, sigma, NPY-Y1/Y2 receptors and dopamine transporters. Pharmacopsychiatry, 2001; 34 (1): 45– 48.
- Gobbi M, Valle FD, Ciapparelli C, Diomede L, Morazzoni P, Verotta L, Caccia S, Cervo L, Mennini T. *Hypericum perforatum* L. extract does not inhibit 5-HT transporter in rat brain cortex. N-S Arch Pharmacol, 1999; 360 (3), 262-269.
- Goday HT, Rodriguez ADB. Occurance of cis isomers of Provitamin A in Brazilian fruits. J Agric Food Chem; 1994; 42: 1306–1313.
- Gracza L, Ruff P. Occurrence and analysis of phenylpropane derivatives in medicinal plants. V: Rosmarinic acid in drugs of pharmacopeias and its determination by HPLC. Arch. Pharm, 1984; 317: 339-345.
- Gray DG, Rottinghaus GE, Garrett HEG, Pallardy, SG. Simultaneous determination of the predominant hyperforins and hypericins in St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by liquid chromatography. J AOAC Int, 2000; 83: 944.
- Green S, Hodges H. Animal models of anxiety. In: Willner P, editor. Behavioural Models in Psychopharmacology. Cambridge: CUP, 1991, 21-49.
- Griebel G, Perrault G, Tan S, Schoemaker H, Sanger DJ. Pharmacological studies on synthetic flavonoids: comparison with diazepam. Neuropharmacol, 1999; 38(7):965-977.
- Griebel G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. Pharmacol Ther, 1995; 65: 319–395.
- Grieve M. A Modern Herbal. Jonathan Cape: London, 1931 (reprinted by Penguin Books Ltd, London, 1980).
- Gugler R, Leschik M, Dengler HJ. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. Eur J Clin Pharmacol, 1975; 9: 229-234.
- Guo Z, Li M. Partial purification and regulatory properties of the cytoplasmic pyruvate kinase from *Passiflora edulis* leaves. Zhiwu Shengli Xuebao, 1993; 19:105–110.

- Gurevich AI, Dobrynin VN, Kolosov MN, Popravko SA, Riabova ID. Antibiotic hyperforin from *Hypericum perforatum*. *Antibiotiki*, 1971; 16(6):510-3.
- Gutmann H, Bruggisser R, Schaffner W, Bogman K, Botomino A, Drewe J. Transport of amentoflavone across the blood-brain barrier *in vitro*. *Planta Med* 2002; 68: 804-807.
- Gyertyan I. Analysis of the marble burying response: marbles serve to measure digging rather than evoke burying. *Behav Pharmacol*, 1995; 6: 24-31.
- Hall CS. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol*, 1934; 18:385-403.
- Haller C. St. John's wort, depression, and catecholamines. *Clin Pharmacol Ther*, 2004; 76 (5): 393-395.
- Hamon M. Neuropharmacology of anxiety: perspectives and prospects. *Trends Pharmacol Sci*, 1994; 15: 36-39.
- Handley S, Mitthani S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. *Arch Pharmacol*, 1984; 327:1-5.
- Handley SL, McBlane JW. 5HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacology*, 1993; 112: 13-20. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*
- Handley SL, McBlane JW. An assessment of the elevated X maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1993; 29:129-38.
- Hänsel R et al editors. *Hagers Handbuch der pharmazeutischen. Praxis. Bd. 6: Drogen P-Z*, 5th ed. Berlin: Springer-Verlag, 1994.
- Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Berlin: Springer Verlag, 1993.
- Harborne JB. *Introduction to ecological biochemistry*, London: Academic Press, 1993.
- Harvey CB, Pratt WS, Islam I, Whitehouse DB, Swallow DM. DNA polymorphisms in the lactase gene. Linkage disequilibrium across the 70-kb region. *Eur J Hum Genet*, 1995; 3:27-41.
- Heinrich M, Gibbons S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *J Pharm Pharmacol*, 2001; 53, 425-432.
- Heitz A, Carnat A, Fraisse D, Carnat AP. Luteolin 3-glucuronide, the major flavonoid from *Melissa officinalis*. *Fitoterapia*, 2000; 71: 201-202.
- Herodez S, Hadolin M, Skerget M, Knez Z. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chem*, 2003; 80(2): 275-282(8).

Hickey M, King C. 100 Families of Flowering Plants, Cambridge: Cambridge University Press, 1998: 130–133.

Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996; 54:21–30.

Hohmann J, Zupko I, Redei D, Csanyi M, Falkay G, Mathe. Protective effects of the aerial parts of *Salvia Officinalis*, *Melissa Officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. *Planta Med*, 1999; 65: 576–578.

Hollman PCB, Katan MB. Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids. In: Rice-Evans CA, Packer L, editors. *Flavonoids in Health and Disease*, New York: Marcel Dekker Inc, 1998.

Hollman PCH, de Vries JHM, van Leeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*, 1995; 62: 1276-1282.

Hollman PCH, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed & Pharmacother* 1997; 51: 305-310

Hölz J, Ostrowski W. Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.). HPLC-Analyse der wichtigen Inhaltsstoffe und deren Variabilität in einer Population. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 1987; 127 (23): 1227-1230.

Hong X, Hopfinger AJ. 3D-pharmacophores of flavonoid binding at the benzodiazepine GABA(A) receptor site using 4D-QSAR analysis. *J Chem Inf Comput Sci*, 2003; 43(1):324-36.

Huang X, Liu T, Gu J, Luo X, Ji R, Cao Y, Xue H, Wong JT, Wong BL, Pei G, Jiang H, Chen K. 3D-QSAR model of flavonoids binding at benzodiazepine site in GABA_A receptors. *J Med Chem*, 2001; 44(12):1883-1891.

Hui KM, Huen MS, Wang HY, Zheng H, Sigel E, Baur R, Ren H, Li ZW, Wong JT, Xue H. Anxiolytic effect of wogonin, a benzodiazepine receptor ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochem Pharmacol*, 2002; 64(9):1415-1424.

Hwang BY, Lee JH, Koo TH, Kim HS, Hong YS, Ro JS, Lee KS, Lee JJ. Kaurane diterpenes from *Isodon japonicus* inhibit nitric oxide and prostaglandin E₂ production and NF- κ B activation in LPS-stimulated macrophage RAW264.7 cells. *Planta Med*, 2001; 67(5):406-410.

Hyperici herba (Johanniskraut) *Deutscher Arzneimittel-Codex (DAC)*. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 1986.

Hypericum Depression Trial Study Group. Effect of *Hypericum perforatum* (St John's Wort) in Major Depressive Disorder: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 2002; 287: 1807-1814.

Itokawa H, Mihashi S, Watanabe K, Matsumoto H, Hamanaka T. Studies on the constituents of crude drugs having inhibitory activity against contraction of the ileum caused by histamine or barium chloride. I. Screening test for the activity of commercially available crude drugs and the related plant materials. *Shoyakugaku Zasshi*, 1983, 37:223–228.

- Jeffrey B, Harborne JB. Twenty-five years of chemical ecology. *Nat Prod Rep*, 2001; 18: 361–379.
- Jurgenliemk G, Nahrstedt A. Dissolution, solubility and cooperativity of phenolic compounds from *Hypericum perforatum* L. in aqueous systems. *Pharmazie*, 2003; 58(3):200-203.
- Jürgenliemk G, Nahrstedt A. Phenolic Compounds from *Hypericum perforatum*. *Planta Med*, 2002; 68: 88-91.
- Kalueff AV, Wheaton M, Murphy DL. What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. *Behav Brain Res*, 2007; 179(1):1-18.
- Karppinen K, Hokkanen J, Tolonen A , Mattila S , Hohtola A. Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*, 2007; 68(7): 1038-1045.
- Kartal M. Intellectual property protection in the natural product drug discovery, traditional herbal medicine and herbal medicinal products. *Phytother Res*, 2007; 21(2): 113 – 119.
- Kasper S, Anghelescu I-G, Szegedi A, Dienel A, Kieser M. Superior efficacy of St John's wort extract WS® 5570 compared to placebo in patients with major depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-center trial. *Bio Med Central*, 2006, 4:14.
- Kasper S. Treatment of seasonal affective disorder (SAD) with *Hypericum* extract. *Pharmacopsychiatry*, 1997; 30 (2): 89-93.
- Kaufeler R, Meier B, Brattstrom A. Efficacy and tolerability of Ze 117 St. John's wort extract in comparison with placebo, imipramine and fluoxetine for the treatment of mild to moderate depression according to ICD-10. An overview. *Pharmacopsychiatry*, 2001; 34(1):49-50.
- Kelley AE. Locomotor activity and exploration. *Tech behav neural sci*. In: van Haaren F. *Methods in Behavioral Pharmacology*, 1993, 10 (3):499-518
- Kennedy DO, Scholey AB, Tildesley NTJ, *et al.*. Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of *Melissa officinalis* lemon balm. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002; 72: 953-964
- Kennedy DO, Wake G, S Saveley S, NTJ Tildesley NTJ, EK Perry EK, Wesnes KA, Scholey AB. Modulation of Mood and Cognitive Performance Following Acute Administration of Single Doses of *Melissa Officinalis* (Lemon Balm) with Human CNS Nicotinic and Muscarinic Receptor-Binding Properties. *Neuropsychopharmacol*, 2003; 28: 1871–1881.
- Kessler RC, Davis RB, Foster DF, Van Rompay MI, Walters EE, Wilkey SA et al. Long-term trends in the use of complementary and alternative medical therapies in the United States. *Ann Intern Med*, 2001; 135: 262–268.
- Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, et al. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States: results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry*, 1994; 51:8-19.

- Kidoey L, Nygaard AM, Andersen OM, Pedersen AT, Aksnes DW, Kiremire BT. Anthocyanins in fruits of *Passiflora edulis* and *P. suberosa*. *J Food Comp Anal*, 1997; 10:49-54.
- Kieser M, Szegedi A. Predicting stable treatment response in patients with major depression treated with hypericum extract WS 5570/5572. *Pharmacopsychiatry*, 2005; 38(5):194-200.
- Kiewert C, Buchholzer ML, Hartmann J, Chatterjee SS, Klein J. Stimulation of hippocampal acetylcholine release by hyperforin, a constituent of St. John's Wort. *Neurosci Lett*. 2004; 364(3):195-8.
- Kleber E, Obry T, Hippeli S, Schneider W, Elstner EF. Biochemical activities of extracts from *Hypericum perforatum* L. 1st communication: inhibition of dopamine-beta-hydroxylase. *Arznei-Forschung*, 1999; 49 (2):106-109.
- Klein DF. Historical aspects of anxiety. *Dialogues in clinical neurosciences*, 2002; 1 (4): 295-304.
- Koch-Heitzmann I, Schultze W. 2000 Jahre *Melissa officinalis*. *Z Phytother*, 1988; 9: 77-85.
- Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2005; 4(3): 206-220.
- Kopleman SH, NguyenPho A, Zito WS, Muller FX, Augsburg LL. Selected physical and chemical properties of commercial *Hypericum perforatum* extracts relevant for formulated product quality and performance. *AAPS Pharm Sci*, 2001; 3(4): 26.
- Kosuth J, Koperdakova J, Tolonen A, Hohtola A., Cellarova E. The content of hypericins and phloroglucinols in *Hypericum perforatum* L. seedlings at early stage of development. *Plant Sci*, 2003; 165 (3): 515-521.
- Koytchev R, Alken RG, Dundarov S. Balm mint extract (Lo-701) for topical treatment of recurring *Herpes labialis*. *Phytomedicine*, 1999; 6: 225-230.
- Kram G, Franz G. Structural investigations on the water soluble polysaccharides of lime tree flowers (*Tilia cordata* L.). *Pharmazie*, 1985; 40: 501.
- Kramer R, Cohen D. Functional genomics to new drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 2004; 3(11):965-72.
- Kubin A, Wierrani F, Burner U, Alth G, Grünberger W. Hypericin--the facts about a controversial agent. *Curr Pharm Des*, 2005; 11(2): 233-253.
- Kuhlmann F. Recent analysis of passion fruit juices. *Fluess Obstetrics*, 1984; 51: 59-63.
- Kühnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 1976; 24: 117-191
- Kutchan TM. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiol*, 2001; 125: 58-60.

Laakmann G, Schule C, Baghai T, Kieser M. St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry*, 1998; 31: 54-59.

Lacher SK, Mayer R, Sichert K, Nieber K, Muller CE. Interaction of valerian extracts of different polarity with adenosine receptors: identification of isovaltrate as an inverse agonist at A1 receptors. *Biochem Pharmacol*, 2007; 73(2):248-258.

Laloux C, Derambure P, Jacquesson J-M, Bordet R, Destée A, Monaca C. The effects of serotonergic, noradrenergic, cholinergic and dopaminergic drugs on vigilance states in MPTP-treated mice. *Brain Res*, 2007; 1161 (3): 79-87.

Lamaison JL, Carnat A. Teneur en principaux flavonoïdes des fleurs et feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret) D.C. (Rosaceae). *Acta Pharm Helv*, 1990; 65 (11): 315-320.

Lamaison JL, Petitjean-Freytet C, Carnat A. Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties potential source of rosmarinic acid. *Pharm Acta Helv*, 1991; 66: 185-188.

Lapke C, Schilcher H, Riedel E. GABA in *H. perforatum* L. and in other herbal drugs [poster abstract]. In: 'Abstracts of lectures and poster presentations'. 44th annual congress of Society for Medicinal Plant Research, Prague, 1996, 63.

Larrondo JV, Agut M, Calvo-Torras MA. Antimicrobial activity of essences from labiates. *Microbios*, 1995; 82: 171-172.

Layne E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Meth Enzymol*, 1957; 3: 447-454.

Lee JH, Koo TH, Hwang BY, Lee JJ. Kaurane diterpene, kamebakaurin, inhibits NF-kappa B by directly targeting the DNA-binding activity of p50 and blocks the expression of antiapoptotic NF-kappa B target genes. *J Biol Chem*, 2002; 277(21):18411-18420.

Leonard BE. Comparative pharmacology of new antidepressants. *J Clin Psychiatry*, 1993; 54 (1): 6-15.

Li W, Fitzloff JF. High performance liquid chromatographic analysis of St. John's Wort with photodiode array detection. *J Chromatogr B*, 2001; 765 (1): 99-105.

Linde K, Berner M, Egger M, Mulrow C. St John's wort for depression: meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Psychiatry*, 2005;186:99-107.

Linde K, Ramirez G, Murlow CD, Pauls A, Weidenhammer W, Melchart D. St. John's Wort for depression – An overview and meta-analysis of randomised clinical trials. *Br Med J*, 1996; 313: 253-258.

Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*, 1990; 46:321-340.

Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacol*, 1987; 92: 180-185.

Liu F, Pan C, Drumm P, Ang CY. Liquid chromatography-mass spectrometry studies of St. John's wort methanol extraction: active constituents and their transformation. *J Pharm Biomed Anal*, 2005; 37(2): 303-12.

Liu FF, Ang CYW, Springer D. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* using response surface methodology. *J Agric Food Chem*, 2000; 48 (8), 3364 -3371.

Lohdenfink. J. Untersuchungen zur Flavonoidfuhrung einiger Passiflora-Arten. *Dtsch Apoth Ztg*, 1976; 116: 557-560.

Lolli LF, Sato CM, Romanini CV, Villas-Boas Lde B, Santos CA, de Oliveira RM. Possible involvement of GABA A-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. *J Ethnopharmacol*, 2007;111 (2): 308-314.

Low K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Rulicke T, Bluethmann H, Mohler H, *et al.* Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science*, 2000; 290: 131-134.

Luszczki JJ, Jankiewicz K, Jankiewicz M, Czuczwar SJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of aminophylline and topiramate in the mouse maximal electroshock-induced seizure model. *European Journal of Pharmacology*, 2007; 562(1-2): 53-59.

Luszczki JJ, Swiader MJ, Swiader K, Paruszewski R, Turski WA, Czuczwar SJ. Characterization of the anticonvulsant profile of isonicotinic acid benzylamide in various experimental seizure models in mice. *Neuroscience Letters*, 2007; 421(1): 87-90.

Lutowski J, Malek B. Pharmacological investigations on raw materials of the genus *Passiflora*. *Planta Med*, 1975; 27: 381-384.

Madabushi R, Frank B, Drewelow B, Derendorf H, Butterweck V. Hyperforin in St. John's wort drug interactions. *Eur J Clin Pharmacol*, 2006; 62 (3): 225-233.

Maisenbacher P, Kovar K-A. Adhyperforin: a homologue of hyperforin from *Hypericum perforatum*. *Planta Med*, 1992; 58: 291-293.

Maksyutina NP, Koget TA. Polyphenols from the grass *Hypericum perforatum* and the preparation novoimanin. *Khim Prir Soedin*, 1971; 7: 363-367.

Maluf E, Barros MT, Frochtengarten ML; Benti R, Leite JR. Assessment of the hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents and humans. *Phytoth Res*, 1991; 5: 262-266.

Manach C, Donovan JL. Pharmacokinetics of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res*, 2004; 38 (8): 771-85

Mannucci C, Pieratti A, Firenzuoli F, Caputi AP, Calapai G. Serotonin mediates beneficial effects of *Hypericum perforatum* on nicotine withdrawal signs. *Phytomedicine*, 2007; 14(10): 645-651.

Mantle D, Eddeb F, Pickering A. Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species in vitro. *J Ethnopharmacol*, 2000; 72: 47-51.

- Marder M, Estiu G, Blanch LB, Viola H, Wasowski C, Medina JH, Paladini AC. Molecular modeling and QSAR analysis of the interaction of flavone derivatives with the benzodiazepine binding site of the GABA(A) receptor complex. *Bioorg Med Chem*, 2001; 9(2):323-335.
- Marder M, Paladini AC. GABA(A)-receptor ligands of flavonoid structure. *Curr Top Med Chem*, 2002; 2(8):853-67.
- Marder M, Viola H, Wasowski C, Wolfman C, Waterman PG, Medina JH. Cirsiliol and caffeic acid ethyl ester, isolated from *Salvia guaranitica* are competitive ligands from the central benzodiazepine receptors. *Phytomedicine*, 1996; 3 (1): 29-31.
- Mareck U, Herrmann K, Galensa R, Wray V. The 6-C-chinocose and 6-C-fucose of luteolin from *Passiflora edulis*. *Phytochemistry*, 1991; 30 (10): 3486-3487.
- Mark A, Geyer, Markou A. Animal Models of Psychiatric Disorders. In: Bloom FE, Kupfer DJ, editors. *Psychopharmacology: the Fourth Generation of Progress*. New York, NY: Raven Press, 1995, 787-798.
- Markham KR. Flavones, flavonols and their glycosides. In: Dey PM, Harborne JB, editors. *Methods in Plant Biochemistry; Plant Phenolics*, London: Academic Press, 1989, VolI, 202-203.
- Markham KR. *Techniques of flavonoid identification*, London: Academic Press, 1982.
- Mártonfi P, Repcák M, Ciccarelli D, Garbari F. *Hypericum perforatum* L. - chemotype without rutin from Italy. *Biochem Syst Ecol*, 2001;29 (6):659-661.
- Martonfi P, Repcak M. Secondary metabolites during flower ontogenesis of *Hypericum perforatum* L. *Zahradnictvi*, 1984; 21:37-44.
- Mathiasen LS, Rodgers RJ, Mirza NR. Comparative effects of nonselective and subtype-selective gamma-aminobutyric acidA receptor positive modulators in the rat-conditioned emotional response test. , 2007; 18(3):191-203.
- Mathis C, Ourisson G, Étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*-III, *Phytochemistry*, 1964; 3:133-141.
- Mathis C, Ourisson G. Étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*-II, *Phytochemistry*, 1964; 3: 115-131.
- McBlane JW, Handley SL. Effects of two stressors on behaviour in the elevated X-maze: preliminary investigation of their interaction with 8-OH-DPAT. *Psychopharmacology*, 1994; 116 (2): 173-182.
- McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, et al. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci*, 2000; 3: 587-592.
- Medina JH, Paladini AC, Wolfman C, Levi de Stein M, Calvo D, Diaz LE, Pena C. Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine

receptors, with anticonvulsant properties. *Biochem Pharmacol*, 1990; 40(10):2227-2231.

Medina JH, Pena C, Levi de Stein M, Wolfman C, Paladini AC. Benzodiazepine-like molecules, as well as other ligands for the brain benzodiazepine receptors, are relatively common constituents of plants. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; 165(2): 547-553.

Medina JH, Viola H, Wolfman C, Marder M, Wasowski C, Calvo D, Paladini AC. Overview--flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. *Neurochem Res*, 1997; 22(4):419-25.

Medina JH, Viola H, Wolfman C, Marder M, Wasowski C, Calvo D, Paladini AC. Overview--flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. *Neurochem Res*, 1997; 22(4):419-25

Melzer R. Untersuchungen zur analytischen und kardiovaskulären Wirkung der oligomeren Procyanidine von *Hypericum perforatum* L. Univ Marburg, 1990.

Mennini T, Gobbi M. The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. *Life Sci*, 2004; 5(9):1021-1027.

Mercadente AZ, Britton G, Rodriguez ADB. Carotenoids from yellow Passion fruit (*Passiflora*). *J Agric Food Chem*, 1998; 46:4102-4106.

Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 2000; 52(4):673-751

Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 2000; 52(4):673-751.

Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Progr Neurobiol*, 2003; 70: 83-244.

Mimica-Dukic IN, Ivanec-Tumbas R, Popovic IM, Gasic O. The content and composition of essential oil of *Hypericum perforatum* from Serbia. *Pharm Pharmacol Lett*, 1997; 8: 26-28.

Mirza NR, Nielsen O. Do Subtype-Selective γ -Aminobutyric Acid A Receptor Modulators Have a Reduced Propensity to Induce Physical Dependence in Mice? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics Fast Forward*, *Pharmacol. Exp Ther*, 2006; 316 (3): 1378-1385.

Miyasaka LS, Atallah AN, Soares BG. *Passiflora* for anxiety disorder. *Cochrane Db Syst Rev*, 2007; 24; (1):4518.

Modnicki D, Patora J, Klimek B. The content of rosmarinic acid, total content of phenolic acids, tannins and flavonoids in lemon balm leaves (*Melissae folium*). *Herba Polonica*, 2004; 50 (2): 42-49.

Molewijk E, van der Poel AM, Olivier B. The ambivalent behaviour "stretched approach posture" in the rat as a paradigm to characterize anxiolytic drugs. *Psychopharmacology*, 1995; 121 (1): 81-90.

- Monografia Herbae Passiflorae. Pharmacopoeia Helvetica, VII Edition, Bern: Eidgenossische Drucksachen und Medienzentrale, 1987.
- Monografia Passiflora. Pharmacopée Française, Xe edition, Paris: Adrapharm, 1989.
- Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J Comp Physiol Psychol*, 1955;48:254–60.
- Morris-Rosendahl DJ. Are there anxious genes? *Dialogues Clin Neurosci*, 2002; 4(3): 251-260.
- Mosandl A, Heusinger G. 1983. Stereoisomers of fruit flavor substances—some aspects of synthesis and analysis. *Anal Volatiles: Methods Appl, Proc—Int Workshop*, 1984: 343–356.
- Mulkens A, Kapetanidis I. Flavonoides des feuilles de *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*). *Pharm Acta Helv*, 1987; 62: 19-22.
- Müller WE, Schäfer C. Johanniskraut: in-vitro studie über *Hypericum* extrakt, hypericin und kämpferol. *Deutsch Apoth Zeit*, 1996; 136: 1015-1022.
- Müller WE, Rolli M, Schäfer C, Hafner U. Effects of *Hypericum* extract (LI-160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry*, 1997;30 (2): 102-107.
- Müller WE, Singer A, Wonnemann M, Hafner U, Rolli M, Schäfer C. Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of *Hypericum* extract. *Pharmacopsychiatry*, 1998; 31 (1): 16-21.
- Nahrstedt A, Butterweck V. Biologically active and other chemical constituents of *Hypericum perforatum* L., *Pharmacopsychiatry*, 1997; 30:129-134.
- Nassiri-Asl M, Shariati-Rad S, Zamansoltani F. Anticonvulsant effects of aerial parts of *Passiflora incarnata* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. *BMC Complement Altern Med*, 2007;7(1):26.
- Neary JT, Bu Y. *Hypericum* LI 160 inhibits uptake of serotonin and norepinephrine in astrocytes. *Brain Res*, 1999; 816 (2): 358-363.
- Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HI, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr*, 2003; 42: 29-42.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J Nat Prod*, 2003; 66 (7): 1022 -1037.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*, 2007;70(3):461-477.
- Nicolaou KC, Snyder SA. The essence of total synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101(33): 11929-11936.

Nicolas LB, Kolb Y, Prinssen EPM. A combined marble burying–locomotor activity test in mice: A practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. *Eur J Pharmacol*, 2006; 547 (1-3): 106-115.

Nicolas LB, Kolb Y, Prinssen EPM. A combined marble burying–locomotor activity test in mice: A practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. *Eur J Pharmacol*, 2006; 547 (1-3): 106-115.

Nielsen H, Arends P. Structure of the lignoid xanthone kielcorin. *Phytochemistry*, 1978; 17: 2040-2041.

Nielsen M, Frokjaer S, Braestrup C. High affinity of the naturally-occurring biflavonoid, amentoflavone, to brain benzodiazepine receptors in vitro. *Biochem Pharmacol*, 1988; 37: 3285-3287.

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, Kvan Norren K, van Leeuwen PAM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 2001; 74:418–425.

Nitz S, Kollmannsberger H, Drawert F. Determination of non-natural flavors in sparkling fruit wines. Part 2. Enantiomeric gamma-lactones in passion fruit and passion fruit products. *Chem Mikrobiol Technol Lebensm*, 1990; 12: 105–110.

Njung'e K, Handley SL. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 1991; 38: 63– 67.

Nogueira CMD, Lopes MFG, DeMorais NMT, Almeida MMB, DeVasconcelos NMS, DeSa MJHC. Determination of mineral elements in medicinal plants. *An Assoc Brasileira de Química*, 1998; 47:22–24.

Nöldner M, Schötz K. Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. , 2002;68(7):577-80.

Novais HM, Santos I, Mendes S, Pinto-Gomes C. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrábida Natural Park. *J Ethnopharmacol*, 2004; 93: 183–195.

Nutt DJ. Neurobiological mechanisms in generalized anxiety disorder, *J Clin Psychiatry*, 2001; 62: 22–28.

Oga S, Freitas PCD, Silva AG, Hanada S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. *Planta Med*, 1984; 50: 303-306.

Ohl F. Animal Models of Anxiety. In: Holsboer F, Andreas Ströhle A, editors. *Anxiety and Anxiolytic Drugs*, Heidelberg: Springer Berlin, 2005

Ohl F. Testing for anxiety. *Clin Neurosci Res*, 2003; 3: 233-238.

Okuyama E, Okamoto Y, Yamazaki M, Satake M. Pharmacologically active components of a Peruvian medicinal plant, huanarpo (*Jatropha cillata*). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1996; 44(2):333-336.

Olafsdottir ES, Andersen JV, Jaroszewski JW. Cyclopentenoid cyanohydrin glycosides. Part 9. Cyanohydrin glycosides of Passifloraceae. *Phytochemistry*, 1989; 28: 127–132.

Ortega GC, Schmidt PC. Stability studies on dried extracts of passion flower (*Passiflora incarnata* L.). S.T.P. Pharma Sciences, 1995; 5 (5) 385-389.

Orth HC, Rentel C, Schmidt PC. Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L. J Pharm Pharmacol, 1999; 51: 193-200.

Orth HCJ, Schmidt PC. Stability and stabilization of hyperforin, Pharm Ind, 2000; 62 (1): 60-63.

Orth-Wagner S *et al.* Phytosedativum gegen Schlafstörungen. Z Phytother, 1995; 16: 147-156.

Ostrowski E. Untersuchung zur analytik, 14C-markierung und pharmakokinetik phenolischer inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* L. Germany: Univ Marburg, 1988.

Panocka I, Perfumi M, Angeletti S, Ciccocioppo R, Massi M. Effects of *Hypericum perforatum* extract on ethanol intake and on behavioral despair: a search for the neurochemical systems involved. Pharmacol Biochem Behav, 2000; 6 (1): 105-111.

Patora J, Klimek B. Flavonoids from lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). Acta Pol Pharm, 2002; 59(2):139-43.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Meth, 1985; 14: 149-167.

Peng WH, Hsieh MT, Lee YS, Lin YC, Liao J. Anxiolytic effect of seed of *Ziziphus jujuba* in mouse models of anxiety. J Ethnopharmacol, 2000; 72(3):435-441.

Pereira CAM, Yariwake JH, Lanças FM, Wauters J-N, Tits M, Angenot L. A HPTLC Densitometric Determination of Flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and Comparison with HPLC Method. Phytochem Anal, 2004; 15, 241-248.

Perovic S, Müller WEG. Pharmacological profile of *Hypericum* extract. Arzneimittel-Forsch, 1995; 45: 1145-1148.

Perry EK, Pickering AT, Wang WW, Houghton PJ, Perry NSL. Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. J Pharm Pharmacol, 1999; 51, 527-534.

Perry N, Court G, Bidet N, Court JA, Perry EK. Cholinergic transmitter related activities in extracts of European herbs: potential in dementia therapy. Int J Geriatr

Peterson EA, Overman LE. Contiguous stereogenic quaternary carbons: a daunting challenge in natural products synthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 2004; 101(33): 11943-11948.

- Petrakis PV, Couladis M, Roussis V. A method for detecting the biosystematic significance of the essential oil composition: The case of five Hellenic *Hypericum* L. species. *Biochem Sys Ecol*, 2005; 33(9): 873-798.
- Petry RD, Reginatto F, de-Paris F, Gosmann G, Salgueiro JB, Quevedo J, Kapczynski F, Ortega GG, Schenkel EP. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. *Phytother Res*, 2001; 15(2): 162-164.
- Phillipson JD. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, 2001; 56: 237-243.
- Pichersky E, Gang DR. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci*, 2000; 5 (10): 439-445.
- Pietta P, Gardana C, Pietta A. Comparative evaluation of St. John's wort from different Italian regions. *Il Farmaco*, 2001;56: 491-496.
- Pigott CD, Sell PD. Nomenclature of the European species of *Tilia*: I. *Tilia europaea* L, *Kew Bull*, 1995, 135-139.
- Pinheiro SH, Zangrossi-Jr H, Del-Bem CM, Graeff FG. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. *Annals of the Brazilian academy of Sciences*, 2007; 79(1): 71-85.
- Piovan A, Filippini R, Caniato R, Borsarini A, Bini Maleci L, Cappelletti EM. Detection of hypericins in the "red glands" of *Hypericum elodes* by ESI-MS/MS. *Phytochemistry*, 2004; 65(4):411-414.
- Poling A, Cleary J, Monaghan M. Burying by rats in response to aversive and nonaversive stimuli. *J Exp Anal Behav*, 1981; 35: 31- 44
- Poutarau A, Girardin P. Improvement of medicinal plant quality: a *Hypericum perforatum* literature review as an example. *Plant Genetic Resources*, 2005; 3(2): 178-189.
- Proença da Cunha A, Pereira da Silva A, Roque OR. *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*, 2003; 463:3-33.
- Radusiene J, Judzentiene A, Bernotiene G. Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* L. growing in Lithuania. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2005; 33(2): 113-124.
- Raffa RB. Screen of receptor and uptake-site activity of hypericin component of St. John's wort reveals σ receptor binding. *Life Sci*, 1998; 62(16): 265-270.
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T. Pharmacological characterization of the cloned κ , δ and μ -opioid receptors. *Mol Pharmacol*, 1993; 45: 330-334.

- Reginatto FH, De-Paris F, Petry RD, Quevedo J, Ortega GG, Gosmann G, Schenkel EP. Evaluation of anxiolytic activity of spray dried powders of two South Brazilian *Passiflora* species. *Phytother Res*, 2006;20(5):348-351.
- Reiter M, Brandt W. Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea-pig. *Arznei-Forschung*, 1985; 35:408-414.
- Repcak M, Martonfi P. The localization of secondary substances in *Hypericum perforatum* flowers. *Biologia* 1997; 52, 91-94.
- Robson NKB. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). 4 (1). Sections 7. *Roscyna* to 9. *Hypericum sensu lato* (part 1). *Bull Br Mus Nat Hist Bot*, 2001; 31: 37- 88.
- Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res*, 1997 30, 289-304.
- Rodgers RJ, Cole JC, Davies A. Anti-anxiety and behavioral suppressant actions of the novel 5-HT_{1A} receptor agonist, flesinoxan. *Pharmacol Biochem Behav*, 1994; 48: 959-963.
- Rodgers RJ, Cole JC. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. Cooper SJ, Hendrie CA, editors. *Ethology and Psychopharmacology...*, Wiley & Sons, 2, 1994, 9-44.
- Rodgers RJ, Dalvi A. 1997. Anxiety, defence and the elevated plusmaze. *Neurosci Biobehav Rev*, 1997; 21: 801-810.
- Rodgers RJ, Johnson NJ. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 1995; 52: 297-303.
- Rodgers RJ. Animal models of 'anxiety': where next? *Behav Pharmacol*, 1997;8: 477-496.
- Rodrigues E, Carlini EA. Ritual use of plants with possible action on the central nervous system by the Krahô Indians, Brazil. *Phytother Res*, 2005; 9: 129 - 135.
- Rolli M, Schäfer C, Müller WE. Effect of *Hypericum* extract (LI-160) on neurotransmitter receptor binding and synaptosomal uptake systems. *Pharmacopsychiatry*, 1995; 28: 207.
- Roos G, Röseler C, Büter KB, Simmen U. Classification and correlation of St. John's wort extracts by nuclear magnetic resonance spectroscopy, multivariate data analysis and pharmacological activity. *Planta Med*, 2004; 70(8):771-777.
- Rote liste (2001). CMDI/Boehringer Ingelheim.
- Roz N, Mazur Y, Hirshfeld A, Rehavi M. Inhibition of vesicular uptake of monoamines by hyperforin. *Life Sci*, 2002; 71 (19): 2227-2237.
- Roz N, Rehavi M. Hyperforin inhibits vesicular uptake of monoamines by dissipating pH gradient across synaptic vesicle membrane. *Life Sci*, 2003; 73 (4): 461-70.

- Rückert U, Eggenreich K, Wintersteiger R, Wurglics M, Likussar W, Michelitsch A. Development of a high-performance liquid chromatographic method with electrochemical detection for the determination of hyperforin. *J Chromatogr A*, 2004; 1041(1-2):181-185.
- Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Mohler H. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature*, 1999; 401: 796–800.
- Rudolph U, Möhler H. GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Current Opinion in Pharmacology*, 2006; 6: 18-23.
- Sadraei H, Ghannadi A, Malekshahi K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Phytother Res*, 2003;17 (6):599-604.
- Sadraei H, Ghannadi A, Malekshahi K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Fitoterapia*, 2003;74: 445-452.
- Salgueiro J. Ervas, usos e saberes Plantas medicinais no Alentejo e outros Produtos Naturais, Lisboa: Edições Colibri, 2004, 264.
- Sanger DJ. Animal models of anxiety and the screening and development of novel anxiolytic drugs. In: Boulton A, Baker G, Martin-Iverson M, editors. *Animal models in Psychiatry II*. New York : The Humana Press, 1991: 147-198.
- Santos KC, Santos CA, de Oliveira RM. Passiflora actinia Hooker extracts and fractions induce catalepsy in mice. *J Ethnopharmacol*, 2005; 100(3):306-309.
- Sarı AO, Ceylan A. Yield characteristics and essential oil composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) grown in the Aegean Region of Turkey. *Turk J Agric For*, 2002; 22 (4): 217-224.
- Savić MM, Huang S, Furtmüller R, Clayton T, Huck S, Obradović DI, Ugrešić ND, Sieghart W, Bokonjić DR, Cook JM. Are GABA(A) Receptors Containing alpha5 Subunits Contributing to the Sedative Properties of Benzodiazepine Site Agonists?, *Neuropsychopharmacology*, 2007. doi: 10.1038/sj.npp.1301403
- Schmidt M, Müller M. Animal Models of Anxiety. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2006;3(4); 369-374
- Schmitt U, Hiemke C. Combination of open field and elevated plus-maze: a suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behavior, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1998; 22(7):1197-217.
- Schneider D, Wink M, Sporer F, Lounibos P. Cycads: their evolution, toxins, herbivores and insect pollinators. *Naturwissenschaften*, 2002; 89(7): 281-294.
- Schrader E. Equivalence of St John's Wort extract (Ze 117) and fluoxetine: a randomized, controlled study in mild-moderate depression. *Int Clin Psychopharmacol*, 2000; 15: 61-68.
- Schultes RE, Hofmann A, Rättsch C. *Plants of the Gods: their sacred, healing and hallucinogenic powers*. Vermont: Healing Arts Press, 1992.

- Schulz H, Jobert M, Huebner WD. The quantitative EEG as a screening instrument to identify sedative effects of single doses of plant extracts in comparison with diazepam. *Phytomedicine*, 1998; 5: 449-458.
- Schulz V. Safety of St. John's Wort extract compared to synthetic antidepressants. *Phytomedicine*, 2006; 13(3):199-204.
- Schütt H, Schulz V. *Hypericum*. In : Haensel RK, Keller K, Rimpler H, Schneider G. Hagers handbuch der pharmazeutischen praxis, Aufl Berlin: Springer, 474-495.
- Schwartz TL, Nihalani N, Simionescu M, Hopkins G. History repeats itself: Pharmacodynamic Trends in the Treatment of Anxiety Disorders. *Curr Pharm Des*, 2005; 11: 255-263.
- Schwob J-M, Bessièrè, Viano J. Composition of the essential oils of *Hypericum perforatum* L. from southeastern France. *C.R. Biologies*, 2002; 325: 781-785.
- Scott MK, Demeter DA, Nortey SO, Dubinsky B, Shank RP, Reitz AB. New directions in anxiolytic drug research. *Prog Med Chem*, 1999; 36: 169-200.
- Screening test for the activity of commercially available crude drugs and the related plant materials. *Shoyakugaku Zasshi*, 1983; 37:223-228.
- Seabra RM, Alves AC. Mangiferin and Chlorogenic Acid from *Hypericum* Species. *Planta Med*, 1989; 55: 404.
- Seabra RM, Vasconcelos MH, Costa MAC, Alves AC. Phenolic compounds from *Hypericum perforatum* and *H. undulatum*. *Fitoterapia*, 1992; 63(5): 473-474.
- Seabra RM, Vasconcelos MH. Análise de amostras de Hipericão existentes no mercado. *Rev Port Farm*, 1992; 17 (3): 39-42.
- Seger C, Römpf H, Sturm S, Haslinger E, Schmidt PC, Hadacek F. Characterization of supercritical fluid extracts of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) by HPLC-MS and GC-MS. *Eur J Pharm Sci*, 2004; 21(4):453-63.
- Seigler DS, Spencer KC. Corrected structures of passicoriacin, epipassicoriacin and epitetraphyllin B and their distribution in the Flacourtiaceae and Passifloraceae. *Phytochemistry*, 1989; 28: 931-932.
- Serdarevic N, Eckert GP, Müller WE. The effects of extracts from St. John's Wort and *Kava Kava* on brain neurotransmitter levels in the mouse. *Pharmacopsychiatry*, 2001; 34 (1):134-136.
- Shah AK, Avery BA, Wyandt CM. Content analysis and stability evaluation of selected commercial preparations of St. John's wort. *Drug Dev Ind Pharm*, 2005; 31(9): 907-916.
- Shang M, Hu LH, Chen ZL. Three new hyperforin analogues from *Hypericum perforatum*. *J Nat Prod*, 2001; 64: 127-130.
- Shibamoto T, Tang CS. Minor Tropical Fruits – Mango, Papaya, Passion Fruit and Guava. In: Morton ID, Macleod AJ, editors. *Food Flavours Part C: The Flavour of Fruits*, Amsterdam: Elsevier, 1990; 6: 252-267.

Shimizu KK, Purugganan MD. Evolutionary and Ecological Genomics of Arabidopsis: Plant Physiol, 2005; 138: 578-584.

Shimoi K, Masuda S, Furugori M, Esaki S, Kinai N. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in γ -ray irradiated mice. Carcinogenesis, 1994; 15(11): 2669-2672.

Shimoi K, Okada H, Furugori M, Goda T, Takase S, Suzuki M, Hara Y, Yamamoto H, Kinai N. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- β -glucoside in rats and humans. FEBS Lett, 1998; 438: 220-224.

Shimoi K, Saka N, Nozawa R, Sato M, Amano I, Nakayama T, Kinai N. Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. Drug metabolism and disposition, 2001; 29:1521-1524.

Shinomiya K, Inoue T, Utsu Y, Tokunaga S, Masuoka T, Ohmori A, Kamei C. Hypnotic activities of chamomile and passiflora extracts in sleep-disturbed rats. Biol Pharm Bull, 2005; 28(5):808-810.

Silva BA, Ferreres F, Malva JO, Dias ACP. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. Food Chem, 2005; 90 (1-2):157-167.

Simbrey K, Winterhoff H, Butterweck V. Extracts of St. John's wort and various constituents affect beta-adrenergic binding in rat frontal cortex. Life Sci, 2004; 74 (8): 1027-1038.

Simmen U, Schweitzer C, Burkard W, Schaffner W, Lundstrom K. *Hypericum perforatum* inhibits the binding of μ - and κ -opioid receptor expressed with the Semliki Forest virus system. Pharm Acta Helv, 1998; 73: 53-56.

Simmonds MSJ. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. Phytochemistry, 2001; 56: 245-252.

Simmonds MSJ. Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. Phytochemistry, 2003; 64: 21-30.

Simpson BK, Egyankor KB, Martin AM. Extraction, purification and determination of pectin in tropical fruits. J Food Process Pres; 1984; 8: 63-72.

Sinclair L, Nutt D. Anxiolytics. Psychiatry, 2007; 6(7): Pages 284-288.

Sirvent T, Gibson D. Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. Physiol Mol P, 2002;60: 311-320.

Sirvent TM, Krasnoff SB, Gibson DM. Induction of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* in response to damage by herbivores. J Chem Ecol, 2003; 29, 2667-2681.

Smelcerovic A, Spiteller M. 2006. Phytochemical analysis of nine *Hypericum* L. species from Serbia and the F.Y.R. Macedonia. Pharmazie, 2006; 61: 251-252.

Smirnov A, Fulton DB, Andreotti A, Petrich JW. Exploring Ground-State Heterogeneity of Hypericin and Hypocrellin A and B: Dynamic and 2D ROESY NMR Study. *J Am Chem Soc*, 1999; 121 (35): 7979.

Smith E, Cech R, Amarquaye A. Quality validation laboratory-Herb Pharm: Williams. OR. 1996

Soulimani R, Fleurentin J, Mortier F, Misslin R, Derrieu G, Pelt JM. Neurotropic action of the hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* in the mouse. *Planta Med*, 1991; 57(2):105-109.

Southwell IA, Campbell MH. Hypericin content variation in *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*, 1991; 30(2): 475-478.

Sparenberg B, Demisch L, Hoelzl J. Untersuchungen über antidepressive Wirkstoffe von Johanniskraut. *Pharm Ztg Wiss*, 1993; 6 (138): 50-54.

St. John's Wort – *Hypericum perforatum*. Quality control, analytical and therapeutic monograph, American Herbal Pharmacopoeia, 1997.

Steimer T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues Clin Neurosci*, 2002; 4:231-249.

Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA, Lewis K. Applied Biological Sciences Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarbin, a multidrug pump inhibitor (multidrug resistance/ efflux inhibitor). *PNAS*, 2000; 97(4): 1433-1437.

Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, 2003; 62(6):817-36.

Suzuki O, Katsumata Y, Oya M, Bladt S, Wagner H. Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med*, 1984; 50: 272-274.

Svanidze N, Sanchez A, Lanovenki V, Soler B, Rodriguez P. Resultados de la introducción y estudio farmacognóstico de la *Passiflora incarnata* L. en las condiciones de Cuba. *Rev Cub Farm*, 1974; 8: 309-314.

Taibi DM, Landis CA, Petry H, Vitiello MV. A systematic review of valerian as a sleep aid: safe but not effective. *Sleep Med Rev*, 2007; 11(3):209-30.

Takahashi RN, Lima TCM, Morato GS. Pharmacological actions of tannic acid; II. Evaluation of C.N.S. activity in animals. *Planta Med*, 1986; 4, 272-275.

Tekel'ova D, Repack M, Zemlova E, Toth J. Quantitative changes of dianthrones, hyperforin and flavonoids content in the flower ontogenesis of *Hypericum perforatum*. *Planta Med*, 2000; 66: 778–780.

Teufel-Mayer R, Gleitz J. Effects of long term administration of *Hypericum* extracts on the affinity and density of the central serotonergic 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. *Pharmacopsychiatry*, 1997; 30 (2): 113-116.

Theis N, Lerda M. The evolution of function in plant secondary metabolites. *Int J Plant Sci*, 2003; 164(3): 93-102.

Thiede HM, Walper A. Inhibition of MAO and COMT by *Hypericum* extract and hipericin. J Geriatric Psych Neur, 1994; 7 (1): 54-56.

Thieme H, Kitze C. Occurrence of flavonoids in *Melissa officinalis* L. Pharmazie, 1973; 28: 69-70.

Timmermans K. Intellectual property rights and traditional medicine: policy dilemmas at the interface. Soc Sci Med, 2003; 57(4):745-756.

Toker G, Aslan M, Yesilada E, Memisoglu M, Ito S. Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal Tiliae flos and Turkish lime species for quality assessment. J Pharm Biomed Anal, 2001; 26: 111-121.

Tolonen A, Hohtola A, Jalonen J. Fast HPLC/PDA analysis of naphthodianthrones and phloroglucinols from *Hypericum perforatum* extracts. Phytochem Anal, 2003; 14: 306-309.

Trautmann-Sponsel RD, Dienel A. Safety of Hypericum extract in mildly to moderately depressed outpatients: a review based on data from three randomized, placebo-controlled trials. J Affect Disord, 2004; 82(2):303-307.

Treit D, Pinel JPJ, Fibiger HC. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. Pharmacol Biochem Behav, 1981; 15: 619.

Trifunovic S, Vajs V, Macura S, Juranic N, Djarmati Z, Jankov R, Milosavljevic S. Oxidation products of hyperforin from *Hypericum perforatum*. Phytochemistry, 1998; 49(5):1305-10.

Tsitsina SI. Results of studying some medicinal plants containing flavone compounds. Tr Bot Sadov Akad Nauk Kaz, 1969:111-14.

Umek A, Kreft S, Kartnig T, Heydel B. Quantitative phytochemical analyses of six *Hypericum* species growing in Slovenia. Planta Med, 1999; 65: 388-390.

Unsel E, Klotz U. Benzodiazepines: Are They of Natural Origin? Pharm Res, 1989; 6(1): 1-3.

Upton R, Bunting D, Butterweck V, Cott J, Gatherum DA, Graff A, *et al.* (1997) St. John's Wort – *Hypericum perforatum* (Monograph), Santa Cruz, CA: American Herbal Pharmacopoeia (AHP), 1997, 1-32.

US Patent 6224906, <http://www.freepatentsonline.com/6224906.html>

Vajs V, Vugdelija S, Trifunović S, Karadžić I, Juranić N, Macura S, Milosavljević S. Further degradation product of hyperforin from *Hypericum perforatum* (St John's Wort). Fitoterapia, 2003; 74(5): 439-44.

Vale NB, Leite JR. Efeitos psicofarmacológicos de preparações de *Passiflora edulis* (maracujá). Ciência e Cultura, 1983; 35 (1), 11-24.

van der Staay FJ. Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. Brain Res Rev, 2006; 52(1): 131-159.

Vandenbogaerde A, Zanolì P, Puia G, Truzzi C, Kamuhabwa A, De Witte P, Merlevede W, Baraldi M. Evidence that total extract of *Hypericum perforatum* affects exploratory behavior and exerts anxiolytic effects in rats. , 2000; 65(4):627-633.

Verotta L, Appendino G, Jakupovic, J, Bombardelli. Furohyperforin, a prenylated phloroglucinol from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). J Nat Prod, 1999; 62 (5): 770-772.

Verotta, L.; Appendino, G.; Jakupovic, J.; Bombardelli, E. Hyperforin analogs from St. John's wort (*Hypericum perforatum*). J Nat Prod, 2000; 63(3): 412-415.

Verweij J, Lee SM, Ruka W, Buesa J, Coleman R, van Hoessel R, Seynaeve C, di Paola ED, van Glabbeke M, Tonelli D, Judson IR. Randomized phase II study of docetaxel versus doxorubicin in first- and second-line chemotherapy for locally advanced or metastatic soft tissue sarcomas in adults: a study of the European organization for research and treatment of cancer soft tissue and bone sarcoma group. J Clin Oncol, 2000; 18(10):2081-2086.

Viola H, Wasowski C, Levi de Stein M, Wolfman C, Silveira R, Dajas F, Medina JH, Paladini AC. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. Planta Med, 1995; 61(3): 213-216.

Viola H, Wolfman C, Levi de Stein M, Wasowski C, Peña C, Medina JH, Paladini AC. Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae). J Ethnopharmacol, 1994; 44(1):47-53.

Vogel HG, Vogel WH. Drug Discovery and Evaluation, Pharmacological Assay. Berlin: Springer, 1997, 260–261.

Vohora SB, Kumar I, Sha A, Khan M. Effect of biflavonoids of *Taxus bacata* on the central nervous system. Ind J Med Res, 1980; 71: 815-820.

Vollmer JJ, Rosenson J. Chemistry of St. John's Wort: Hypericin and Hyperforin. Journal of Chemical Education, 2004; 81 (10): 1450.

Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Plant Drug Analysis, London: Springer Verlag, 1984.

Wagner H, Bladt S. Pharmaceutical Quality of *Hypericum* Extracts. Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology, 1994; 7(1):65-68.

Wagner H, Sprinkmeyer L, Koch-Heitzmann I, Schultze W (1984) *Melissa officinalis*. Eine alte arzneipflanze mit neuen therapeutischen wirkungen. Dtsch Apoth, 1984; 124: 2137–2145.

Wagner H, Sprinkmeyer L. Über die pharmakologische Wirkung von Melissengeist. Dtsch Apoth Ztg, 1973 ; 113:1159–1166.

Wagner H. Natural products chemistry and phytomedicine research in the new millennium: new developments and challenges. Arkivoc, 2004;8: 277-284.

- Wake G, Court J, Pickering A, Lewis R, Wilkins R, Perry E. CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. *J Ethnopharmacol*, 2000; 69: 105–114.
- Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Walle UK. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr*, 2005; 135:48-52.
- Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, 2004;36 (7): 829 – 837.
- Wang F, Xu Z, Yuen CT, Chow CY, Lui YL, Tsang SY, Xue H. 6,2'-Dihydroxyflavone, a subtype-selective partial inverse agonist of GABA(A) receptor benzodiazepine site. *Neuropharmacol*, 2007; 53(4): 574-582.
- Wang Z, Ashraf-Khorassani M, Taylor LT. Air/light-free hyphenated extraction/analysis system: supercritical fluid extraction on-line coupled with liquid chromatography-UV absorbance/electrospray mass spectrometry for the determination of hyperforin and its degradation products in *Hypericum perforatum*. *Anal Chem*, 2004; 76 (22): 6771-6776.
- Waterman PG. The current status of chemical systematics. *Phytochemistry*, *in press*, doi:10.1016/j.phytochem.2007.06.029
- Weiss SM, Wadsworth G, Fletcher A, Dourish CT. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 1998; 23(2):265-271.
- Wekesa NMN, Chhabra SC, Thairu HM. Determination of α -ascorbic acid in Kenyan fresh and processed fruits and vegetables by differential pulse anodic stripping voltammetry. *Bull Chem Soc Ethiop*, 1996; 10: 165–169.
- Weyerstahl P, Splittgerber U, Marschall H, Kaul VK. Constituents of the leaf essential oil of *Hypericum perforatum* L. from India. *Flavour Fragrance J*, 1995; 12: 285–287.
- Wheaton AG, Blanck HM, Gizlice Z, Reyes M. Medicinal Herb Use in a Population-Based Survey of Adults: Prevalence and Frequency of Use, Reasons for Use, and Use Among Their Children. *Ann Epidemiol*, 2005; 15: 678-685.
- Whitfield FB, Last JH. The Flavour of the Passion Fruit – A Review. In: BRUNKE E-J, editors. *Progress in Essential Oil Research*, Berlin: Gruyter, 1986, 3-48.
- Whitfield FB, Murray KE, Stanley G, Sugowdz G. Structures of edulan I and edulan II and their role in the aroma of the juice of the purple passion fruit. *International Congress of Essential Oils*, 1974: 151–154.
- Whitten DL, Myers SP, Hawrelak JA, Wohlmuth H. The effect of St John's wort extracts on CYP3A: a systematic review of prospective clinical trials. *Br J Clin Pharmacol*, 2006; 62(5):512-526.
- Whitten DL, Myers SP, Hawrelak JA, Wohlmuth H. The effect of St John's wort extracts on CYP3A: a systematic review of prospective clinical trials. *Br J Clin Pharmacol*, 2006; 62(5):512-26.

Wichtl M, Bisset MG, editors. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 1994.

Wichtl M, Bisset MG editors. Passiflorae herbae. Herbal drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis, London: CRC Press, 1994, 363-365.

Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. Phytomedicine, 2001; 8(5): 401-409.

Wink M, Schimmer O. Modes of action of defensive secondary metabolites. In: Wink E, editor. Function of Plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Annual Plant Reviews. Sheffield: Sheffield Academic Press and CRC Press, 2000, 17-133.

Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry, 2003; 64:3-19.

Wink M. Interference of alkaloids with neuroreceptors and ion channels. In: Atta-Ur-Rahman X, editor. Bioactive Natural Products vol 11, Amsterdam: Elsevier, 2000, 3-129.

Winterhoff H, Butterweck V, Nahrstedt A. Pharmakologische untersuchungen zur antidepressiven wirkung von *Hypericum perforatum*. In: Loew D, Rietbrock M, editors. Phytopharmaka in Forschung und klinischer anwendung, Darmstadt: Steinkopff Verlag, 1995, 39-56.

Winterhoff H, Butterweck V, Nahrstedt A. Pharmakologische untersuchungen zur antidepressiven wirkung von *Hypericum perforatum*. In: Loew D, Rietbrock M, editors. Phytopharmaka in Forschung und klinischer anwendung. Darmstadt: Steinkopff Verlag, 1995, 39-56.

Wirz A, Meier B, Stichr O. Stability of hypericin and pseudohypericin in extract solutions of *Hypericum perforatum* and in standard solutions. Pharm Ind, 2001; 63 (4): 410-415.

Wölbling RH, Leonhardt K. Local therapy of herpes simplex with dried extract from *Melissa officinalis*. Phytomedicine 1994; 1: 25-31.

Wolfman C, Viola H, Paladini A, Dajas F, Medina JH. Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. Pharmacol Biochem Behav, 1994; 47(1):1-4.

Wong AHC, Smith M, Boon HS. Herbal remedies in psychiatric practice. Arch Gen Psychiat, 1998; 55: 1033-1044.

Wonnemann M, Singer A, Müller WE. Inhibition of synaptosomal uptake of 3H-glutamate and 3H-GABA by hyperforin, a major constituent of St. John's wort: the role of amiloride sensitive sodium conductive pathways. Neuropsychopharmacol, 2000; 23: 188-196.

World Health Organization. Folium Melissa. In: WHO monographs on selected medicinal plants, Vol. 2, Geneva: WHO, 2002.

Wu P, Fuller C, Liu X, Lee HC, Fan B, Hoven CW, Mandell D, Wade C, Kronenberg F. Use of complementary and alternative medicine among women with depression: results of a national survey. *Psychiatr Serv*, 2007; 58(3):349-56.

Xu MJ, Dong JF, Zhu MY. Nitric Oxide Mediates the Fungal Elicitor-Induced Hypericin Production of *Hypericum perforatum* Cell Suspension Cultures through a Jasmonic-Acid-Dependent Signal Pathway. *Plant Physiology*, 2005; 139: 991-998.

Yamamoto H, Sakakibara J, Nagatsu A, Sekiya K. Inhibitors of Arachidonate Lipoxygenase from Defatted Perilla Seed. *J Agric Food Chem*, 1998; 21(2): 71-74.

Yasukawa K, Takido M, Takeuchi M, Nakagawa S. Effect of chemical constituents from plants on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Chem Pharm Bull*, 1989; 37(4):1071-1073.

Yoshikawa K, Katsuta S, Mizumori J, Arihara S. New cycloartane triterpenoids from *Passiflora edulis*. *J Nat Prod*;2000; 63:1377-1380.

Yoshitake T, Ryuji Iizuka R, Yoshitake S, Weikop P, Müller WE, Ögren SO, Kehr J. *Hypericum perforatum* L (St John's wort) preferentially increases extracellular dopamine levels in the rat prefrontal cortex. *Br J Pharmacol*, 2004; 142: 414-418.

Youngken HW. Textbook of pharmacognosy, 6th ed., Philadelphia: Blakiston, 1950.

Yu H-S, Lee S-Y, Jang C-G. Involvement of 5-HT_{1A} and GABA_A receptors in the anxiolytic-like effects of *Cinnamomum cassia* in mice. *Pharmacol Biochem Be*, 2007; 87 (1):164-170.

Yu, PH. Effect of the *Hypericum perforatum* extract on serotonin turnover in the mouse brain. *Pharmacopsychiatry*, 2000; 33 (2): 60-65.

Zanoli P, Rivasi M, Baraldi C, Baraldi M. Pharmacological activity of hyperforin acetate in rats. *Behav Pharmacol*, 2002; 13(8):645-51.

Zanoli P. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. *CNS Drug Reviews*, 2004; 10(3): 203-218.

Zgórká G, Glowniak K. Variation of free phenolics acid in medicinal plants belongin to the Lamiaceae family, *J Pharm Biomed Anal*, 2006; 26: 79-87.

Zhang ZJ. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sci*, 2004; 75: 1659-1699.

Ziaková A, Brandšteterova E. Application of different preparation techniques for extraction of phenolic antioxidants from lemon balm (*Melissa officinalis*) before HPLC analysis. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2002; 25: 3017-3032.

Ziaková A, Brandšteterova E. Validation of HPLC determination of phenolic acids present in some Lamiaceae family plants. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2003; 26: 443-453.

Zibadi S, Watson R. Passion fruit (*Passiflora edulis*). Composition efficacy and safety. *Evid Based Integrative Med*, 2004; 1 (3): 183-187.

Ziyan L, Yongmei Z, Nan Z, Ning T, Baolin L. Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. , 2007;73(3):221-226.

Zobayed S, Saxena PK. Production of St. John's Wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2004; 40: 108-114.