

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Júlia Maria Peixoto Loureiro

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO FITOTERÁPICO *PASSIFLORAINCARNATA* POR  
MEIO DE TESTES NEUROCOMPORTAMENTAIS E CONTROLE DE QUALIDADE  
MICROBIOLÓGICO E FÍSICO-QUÍMICOS**

Rio de Janeiro

2023

Júlia Maria Peixoto Loureiro

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO FITOTERÁPICO *PASSIFLORA INCARNATA* POR  
MEIO DE TESTES NEUROCOMPORTAMENTAIS E CONTROLE DE QUALIDADE  
MICROBIOLÓGICO E FÍSICO-QUÍMICOS

Trabalho de Conclusão de Residência  
apresentado ao Programa de Pós-Graduação  
em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional  
de Controle de Qualidade em Saúde da  
Fundação Oswaldo Cruz como requisito  
parcial para obtenção do título de especialista  
em Vigilância Sanitária.

Tutor: Dr. Fausto Klabund Ferraris

Preceptor: Dr. Esdras Barbosa Garcia

Rio de Janeiro

2023

Catálogo na fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Loureiro, Júlia Maria Peixoto

Avaliação da eficácia do fitoterápico *Passiflora incarnata* por meio de testes neurocomportamentais e controle de qualidade microbiológico e físico-químicos. / Júlia Maria Peixoto Loureiro. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2023.

79 f. : il, tab

Trabalho de Conclusão de Curso – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2023.

Tutor: Dr. Fausto Klabund Ferraris

Preceptor: Dr. Esdras Barbosa Garcia

1. Passiflora. 2. Testes neurocomportamentais. 3. Controle de Qualidade 4. Ansiedade.

Júlia Maria Peixoto Loureiro

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO FITOTERÁPICO *PASSIFLORA INCARNATA* POR  
MEIO DE TESTES NEUROCOMPORTAMENTAIS E CONTROLE DE QUALIDADE  
MICROBIOLÓGICO E FÍSICO-QUÍMICOS

Trabalho de Conclusão de Residência  
apresentado ao Programa de Pós-Graduação  
em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional  
de Controle de Qualidade em Saúde da  
Fundação Oswaldo Cruz como requisito  
parcial para obtenção do título de especialista  
em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: 14/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

Me. Magno Maciel Magalhães  
INCQS/FIOCRUZ

Dr<sup>a</sup>. Thais Morais de Brito  
INCQS/FIOCRUZ

Me. Tamires da Cunha Fernandes  
IOC/FIOCRUZ

Dr. Fausto Klabund Ferraris (Tutor)  
INCQS/FIOCRUZ

Dr. Esdras Barbosa Garcia (Preceptor)  
INCQS/FIOCRUZ

Dedico este trabalho ao meu maior exemplo de vida e  
inspiração acadêmica; Professor, pastor, servidor  
público, Vitor Luis Rodrigues Loureiro (*in memoriam*),  
para sempre meu papai.

## **Agradecimentos**

Agradeço, primeiramente à Deus, que me sustentou todos os dias e me deu forças para percorrer e concluir mais uma etapa da minha vida;

Ao meu pai, Vitor Loureiro, por me incentivar a participar do processo seletivo da Residência Multiprofissional do INCQS, custear minha inscrição, me acompanhar em cada fase e vibrar com minha aprovação em 3º lugar. Sua filha estava começando a trilhar o caminho da Vigilância Sanitária e nós não poderíamos estar mais felizes. Infelizmente você não me viu concluir esse curso, mas sei que continua conduzindo todos os meus passos, me fortalecendo todas as vezes que penso em desistir e sendo meu maior fã. Obrigada por me ensinar os maiores valores da vida e por me apaixonar pela Vigilância Sanitária. Estaremos sempre juntos e espero continuar te orgulhando todos os dias, de onde estiver;

À minha rainha, minha mãe, Débora Monteiro, que mesmo sem condições de sorrir, se alegrou comigo em cada etapa concluída desse curso, que apesar de tudo continua me apoiando incondicionalmente e que faz todos os dias o impossível para se manter de pé e para que eu continue tendo uma educação de qualidade, honrando o compromisso que você e meu pai firmaram. O objetivo da minha vida é orgulhar você, espero estar chegando lá;

Aos melhores irmãos do mundo, Luiza Maria e João Vitor, que são meus maiores tesouros e meus motivos diários de estresse mas de muitas alegrias. Com todas as nossas diferenças, formamos o trio perfeito. Obrigada por aturarem meus surtos e por me ouvirem falando de camundongos e Passiflora por tanto tempo, vocês são minhas jóias preciosas;

Ao meu marido, o amor da minha vida, Gabriel Ourique, por ser meu porto seguro, minha rocha e meu abrigo no meio da tempestade. Obrigada por me manter firme, por me fazer acreditar em mim mesmo quando eu não acredito, por olhar e me mostrar minhas qualidades, por apreciar tanto minha inteligência, por me amar do jeito que sou e por se tornar meu maior admirador. Obrigada por confiar em mim e por decidir dividir a vida comigo. Amo você, nossa história e a família que estamos construindo;

À minha tia, Vivian Loureiro, por ser uma grande amiga e confidente, que sempre está disponível para me ajudar e me defender de tudo e de todos, por todos os dias que me emprestou sua casa e seu notebook, você é um exemplo enorme para mim e para minha carreira profissional e acadêmica;

Às minhas avós, Gleide e Ercília, que nunca economizaram nas orações, que se preocupavam com a minha segurança e principalmente com minha alimentação durante esses 2 anos, obrigada por terem sempre uma palavra de conforto e um almoço delicioso;

Ao meu tutor, Dr Fausto Ferraris Klabund, pela chance que me deu ao me aceitar no seu grupo, pela oportunidade de desenvolver esse projeto, por todo apoio, dedicação, disponibilidade e paciência ao me orientar;

Ao meu preceptor, Dr Esdras Barbosa Garcia, por todos os ensinamentos, pelas horas de testes neurocomportamentais dentro do biotério que passavam num piscar de olhos com a sua presença, por todas as horas usadas assistindo os vídeos dos experimentos, por todas as gargalhadas que demos juntos, por todas as histórias hilárias compartilhadas, por ser sempre tão paciente, didático, gentil e dedicado a me auxiliar em qualquer situação e principalmente pela linda amizade que criamos;

À minha dupla, meu bom encontro científico, Dr<sup>a</sup> Thais Morais de Brito, obrigada por toda conversa que tivemos, todos os conselhos recebidos, por todas as tardes de pleurisia com direito a bolo, por me viciar no café da tarde com cappuccino, por me acalmar quando precisei, por suas frases motivacionais inspiradoras, por todo conhecimento compartilhado e mais ainda por todo amor recebido, espero que nosso laço só cresça daqui para frente;

A todo o Laboratório de Farmacologia, em especial Fernanda Moura, Yasmin Crelier, Beatriz Scaramelo e Fábio Amendoeira, pelo apoio nos experimentos e pela amizade, pela descontração de sempre e por incentivarem meu desenvolvimento pessoal e profissional;

Aos demais amigos, em especial Maria Clara Rangel e Aline Yin, por acreditarem tanto em mim e por me motivarem todos os dias. Obrigada por nossa amizade, do Ensino Médio para a toda a vida;

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde e o Departamento de Farmacologia e Toxicologia, por terem se tornado minha casa durante esse tempo;

À Fundação Oswaldo Cruz, bem como todas as formas de fomento, que tornaram possível a realização deste trabalho.

“Palavras são, na minha não tão humilde opinião, nossa inesgotável fonte de magia. Capazes de ferir e de curar.”  
(Alvo Dumbledore - Harry Potter e as Relíquias da Morte)



## RESUMO

As espécies do gênero *Passiflora* possuem muita utilização na medicina tradicional, pois apresentam diversas aplicações. Inúmeras espécies desse gênero possuem comprovação científica de suas atividades sedativas e ansiolíticas, pois apresentavam efeitos significativos no sistema nervoso central. A espécie que mais possui estudos a respeito da sua atividade farmacológica é a *Passiflora incarnata* (*Pi*). O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da *Pi*, de fabricantes distintos, quanto ao seu efeito ansiolítico através de testes neurocomportamentais e alterações morfofuncionais, além de realizar testes de controle de qualidade microbiológico e físico-químicos. Utilizou-se camundongos Swiss Webster, machos, separados em 5 grupos experimentais (Veículo PBS, *Pi* referência 100, 200, 400 e 800 mg/kg) para obtenção da curva de doses, e foram realizados os ensaios comparativos entre a *Pi* referência e outras 3 marcas comerciais, nas doses de 200 e 800 mg/kg. Um grupo tratado com um produto natural não ansiolítico (Castanha da Índia) foi adicionado aos testes como uma espécie de controle negativo. Os animais receberam 3 doses em diferentes momentos, 1 hora antes do teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), 1 hora antes do teste Campo Vazado (CV) e 1 hora antes da eutanásia. Após a eutanásia, amostras de sangue e tecido cerebral foram recolhidas para análises bioquímicas e quantificação da proteína BDNF por ELISA. As amostras de medicamentos comerciais de *Pi* foram analisadas através de ensaios microbiológicos e físico-químicos (peso médio e cromatografia em camada delgada (CCD)) estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (FB). O tratamento com *Pi* referência nas doses de 400 e 800 mg/kg revelou um aumento significativo no tempo de permanência nos braços abertos no LCE, indicativo de uma atividade ansiolítica. No teste do CV, os animais não apresentaram diferença no número de deslocamentos, em contrapartida, os grupos de 400 e 800 mg/kg realizaram mais *head dipping* em comparação ao grupo PBS. Comparando as marcas comerciais com a *Pi* referência, foi possível observar um comportamento semelhante do grupo referência com as Marcas 1 e 3, apenas a Marca 2 não apresentou diferenças significativas, tanto no teste LCE como no CV. Observamos diferenças significativas nos parâmetros AST e Creatina Quinase entre os grupos experimentais na análise bioquímica, e a maioria dos valores encontrados estava dentro da faixa de valores padrões. Na quantificação de BDNF foi possível observar um resultado discrepante apenas para a Marca 1, indicando que a dose de 200 mg/kg nessa marca não é suficiente para tratar ansiedade. Observamos um perfil fitoquímico obtido após CCD semelhante em todas as amostras analisadas, indicativo de que todas as marcas apresentam as mesmas substâncias químicas que são responsáveis pela

ação ansiolítica do fitoterápico. A análise do parâmetro físico de peso médio demonstrou que todas as marcas cumpriam com os limites estabelecidos pela FB. Nos ensaios microbiológicos observou-se crescimento bacteriano na Marca 2 ( $10^3$  UFC/g), confirmada pela presença de *Staphylococcus epidermidis*. Observou-se o crescimento fúngico nas Marcas 2 e 3, ( $10^2$  UFC/g), e após determinação por morfologia, detectou-se a presença de *Aspergillus sp.*. Os resultados encontrados estão dentro dos parâmetros estabelecidos pela FB.

Palavras-Chave: Passiflora incarnata; Testes Neurocomportamentais; Controle de Qualidade; Ansiedade.

## ABSTRACT

The species of the genus *Passiflora* are widely used in traditional medicine, as they have several applications. Numerous species of this genus have scientific evidence of their sedative and anxiolytic activities, as they have significant effects on the central nervous system. The species that has more studies about it is the *Passiflora Incarnata (Pi)*. The objective of this work is to evaluate the effectiveness of Pi, from different manufacturers, regarding its anxiolytic effect through neurobehavioral tests and morphofunctional changes, in addition to carrying out microbiological and physical-chemical quality control tests. Male Swiss Webster mice were used, separated into 5 experimental groups (PBS vehicle, Pi reference 100, 200, 400 and 800 mg/kg) to obtain the dose curve, and then comparative tests between Pi reference and 3 other commercial brands, in doses of 200 and 800 mg/kg. A group treated with a non-anxiolytic natural product (Horse Chestnut) was added to the tests as a kind of negative control. The animals received 3 doses at different times, 1 hour before the Elevated Plus Maze (EPM) test, 1 hour before the Hole Board (HB) test and 1 hour before euthanasia. After euthanasia, blood and brain tissue samples were collected for biochemical analysis and BDNF protein quantification by ELISA. In addition, commercial Pi drug samples were analyzed using microbiological and physicochemical assays (mean weight and thin layer chromatography (TLC)) established by the Brazilian Pharmacopoeia (BP). Treatment with reference Pi at doses of 400 and 800 mg/kg revealed a significant increase in the time spent in the open arms in the EPM, indicative of anxiolytic activity. In the HB test, the animals showed no difference in the number of displacements, on the other hand, the 400 and 800 mg/kg groups performed more head dipping compared to the PBS group. Comparing the commercial brands with the Pi reference, it was possible to observe a similar behavior of the reference group with Brands 1 and 3, only Brand 2 did not show significant differences, both in the EPM test and in the HB. Again, there was no difference in the number of displacements, however, all 800 mg/kg groups, with the exception of Brand 2, performed more head dipping compared to the PBS group. We observed few significant differences between the experimental groups in the biochemical analysis, and most of the values found were within the range of standard values. In the quantification of BDNF, it was possible to observe a discrepant result only for Brand 1, indicating that the dose of 200 mg/kg in this brand is not enough to treat anxiety. We observed a very similar phytochemical profile obtained after TLC in all analyzed samples, indicating that all brands present the same chemical substances that are responsible for the anxiolytic action of the herbal medicine. The

analysis of the physical parameter of average weight showed that all brands complied with the limits established by BP. In the microbiological assays, bacterial growth was observed at Mark 2 ( $10^3$  CFU/g), confirmed by the presence of *Staphylococcus epidermidis*. Added to this, fungal growth was observed in Brands 2 and 3, ( $10^2$  CFU/g), and after determination by morphology, the presence of *Aspergillus sp.* was detected. The results found are within the parameters established by BP.

Key-words: *Passiflora incarnata*; Neurobehavioral Tests; Quality control; Anxiety.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Definições dos termos “medicamento fitoterápico” e “produto tradicional fitoterápico” .....	19
Figura 1 – <i>P. incarnata</i> L. Estrutura da planta, contendo flor, fruto e folhas.....	22
Figura 2 – Descrição e estrutura dos flavanoides livres que fazem parte da composição química de <i>Passiflora incarnata</i> .....	24
Figura 3 – Esquema demonstrando o receptor específico para ligação de GABA e as consequências que ocorrem quando o receptor está vazio ou ligado com GABA.....	25
Figura 4 – Esquema demonstrando o receptor específico de GABA ligado ao GABA e a um benzodiazepínico simultaneamente, e as consequências que ocorrem quando essas duas substâncias se ligam a esse receptor.....	26
Figura 5 – Número total de pessoas com transtorno de ansiedade em 2019, medido em todas as idades e em ambos os sexos.....	28
Figura 6 – Gráfico demonstrando o aumento gradativo do número de pessoas com algum tipo de transtorno de ansiedade no Brasil, no período de 1990 até 2019.....	29
Figura 7 – Principais manifestações clínicas observadas em pacientes com algum tipo de transtorno de ansiedade.....	30
Figura 8 – Regiões cerebrais envolvidas no sistema de defesa e no desenvolvimento de ansiedade.....	31
Figura 9 – Labirinto em Cruz Elevado.....	36
Figura 10 – Campo Vazado.....	37
Figura 11 – Obtenção da curva dose-resposta da <i>Passiflora</i> referência nas doses de 100, 200, 400 e 800 mg/kg no teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	51
Figura 12 – Efeito do tratamento com <i>Passiflora</i> referência nas doses de 100, 200, 400 e 800 mg/kg na deambulação total dos animais (A) e na quantificação de head-dipping (B) no teste do Campo Vazado.....	52
Figura 13 – Efeito do tratamento com <i>Passiflora</i> referência e marcas 1, 2 e 3 de <i>Passiflora</i> nas doses de 200 e 800 mg/kg no teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	54
Figura 14 – Efeito do tratamento com <i>Passiflora</i> referência e marcas 1, 2 e 3 de <i>Passiflora</i> nas doses de 200 e 800 mg/kg no teste do Campo Vazado, analisando a deambulação total.....	55

Figura 15 – Efeito do tratamento com Passiflora referência e marcas 1, 2 e 3 de Passiflora nas doses de 200 e 800 mg/kg no teste do Campo Vazado, analisando a quantificação de <i>head-dipping</i> .....	56
Quadro 2 – Resultados obtidos pós análise bioquímica do soro dos diferentes grupos experimentais tratados com Passiflora referência nas doses de 100, 200, 400 e 800 mg/kg.....	57
Quadro 3 – Resultados obtidos pós análise bioquímica do soro dos diferentes grupos experimentais tratados com Passiflora ref e Marcas distintas nas doses de 200 e 800 mg/kg.....	59
Quadro 4 – Resultados obtidos pós análise bioquímica do soro dos diferentes grupos experimentais tratados com Passiflora ref e Marcas distintas nas doses de 200 e 800 mg/kg.....	60
Figura 16 – Efeito da administração de Passiflora nos níveis de BDNF em amostras de tecido cerebral.....	62
Figura 17 – Caracterização do perfil fitoquímico de diferentes marcas de <i>Passiflora incarnata</i> por Cromatografia em Camada Delgada, seu padrão de corrida e suas respectivas bandas....	64
Quadro 5 – Descrição do peso de cada comprimido pesado em balança analítica para as diferentes marcas, seguidos dos limites superiores e inferiores permitidos.....	65
Quadro 6 – Descrição do peso de cada comprimido pesado em balança analítica para as diferentes marcas, seguidos dos limites superiores e inferiores permitidos.....	66
Quadro 7 – Descrição do peso de cada comprimido pesado em balança analítica para as diferentes marcas, seguidos dos limites superiores e inferiores permitidos.....	67
Quadro 8 – Descrição do peso de cada comprimido pesado em balança analítica para as diferentes marcas, seguidos dos limites superiores e inferiores permitidos.....	68
Figura 18 – Crescimento de colônias bacterianas em placas de ágar TSA (A) para o crescimento de bactérias totais e em placas de ágar salmanitol (B) para o crescimento indicativo de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	69
Figura 19 – Testes bioquímicos para confirmação de gênero e espécie do microrganismo.....	70
Figura 20 – Crescimento fúngico nas placas de ágar Saboroud nas Marcas 2 e 3 de <i>Passiflora incarnata</i> .....	71

## LISTA DE SIGLAS

Pi	<i>Passiflora Incarnata</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
MS	Ministério da Saúde
CEME	Central de Medicamentos
SVS	Sistema de Vigilância Sanitária
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
IN	Instrução Normativa
ABIFISA	Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde
SNC	Sistema Nervoso Central
GABA	Ácido Gama-aminoburítico
DSM-V	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
TCC	Terapia cognitivo-comportamental
CV	Campo Vazado
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
Ci	Castanha da Índia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 Medicina Tradicional.....	16
1.2 Fitoterápicos .....	17
1.3 Características gerais do gênero <i>Passiflora</i> .....	20
1.3.1 <i>Passiflora incarnata</i> .....	21
1.3.2 Características farmacológicas e mecanismos de ação da espécie <i>Passiflora incarnata</i>	23
1.4 Ansiedade.....	26
1.4.1 Definições e Epidemiologia .....	26
1.4.2 Fisiopatologia da ansiedade.....	30
1.4.3 Tratamentos .....	32
1.5 Modelos experimentais .....	34
1.5.1 Labirinto em Cruz Elevado .....	35
1.5.2 Campo Vazado .....	36
1.6 Justificativa.....	38
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
2.1 Objetivo Geral .....	40
2.2 Objetivos Específicos.....	40
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
3.1 Materiais .....	41
3.2 Desenho Experimental .....	41
3.3 Fármacos e Dosagens .....	42
3.4 Testes Neurocomportamentais.....	43
3.4.1 Labirinto em Cruz Elevado .....	43
3.4.2 Campo Vazado .....	44
3.5 Coleta de amostras .....	44
3.5.1 Sangue .....	44
3.5.2 Encéfalo .....	44
3.6 Análise Bioquímica.....	45
3.7 Dosagem de proteínas (BCA) .....	45
3.8 Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA).....	46
3.9 Caracterização Fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	46
3.10 Determinação do Peso Médio .....	47
3.11 Ensaios de controle de qualidade microbiológicos .....	47
3.12 Análise estatística .....	48



<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Tratamento com diferentes doses de <i>Passiflora incarnata</i> de referência e sua respectiva curva de Dose-Resposta no LCE.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2 O tratamento com diferentes doses de <i>Passiflora incarnata</i> de referência não impactou na deambulação total mas aumentou os níveis de <i>head-dipping</i> no teste CV .....</b>	<b>51</b>
<b>4.3 O tratamento com Passiflora Referência versus Marcas distintas resultou em diferenças no comportamento dos animais submetidos ao teste LCE .....</b>	<b>53</b>
<b>4.4 A administração de Passiflora Referência versus Marcas distintas resultou em diferenças no comportamento dos animais submetidos ao teste CV .....</b>	<b>54</b>
<b>4.5 O tratamento com Passiflora referência e seu impacto nos parâmetros bioquímicos .....</b>	<b>57</b>
<b>4.6 O tratamento com Passiflora referência versus Marcas distintas e seu impacto nos parâmetros bioquímicos .....</b>	<b>58</b>
<b>4.7 O impacto da administração de Passiflora nos níveis de BDNF em amostras de tecido cerebral.....</b>	<b>61</b>
<b>4.8 Caracterização do perfil fitoquímico de diferentes marcas de Passiflora por Cromatografia em Camada Delgada .....</b>	<b>63</b>
<b>4.9 Avaliação do parâmetro físico Peso Médio para determinação de qualidade das amostras de Passiflora comercializadas.....</b>	<b>64</b>
<b>4.10 Avaliação da qualidade microbiológica das amostras de Passiflora comercializadas .....</b>	<b>68</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Medicina Tradicional

A utilização de plantas medicinais e ervas com efeitos terapêuticos para tratar doenças é uma prática realizada há séculos, e tem um de seus primeiros registros datados em cerca de 2300 a.C., nas antigas civilizações Egípcias. Segundo relatos dos sumérios na Mesopotâmia, foram descritas receitas com misturas de diferentes plantas para a produção de substâncias capazes de curar enfermidades prevalentes na época. De forma semelhante, os Egípcios possuíam técnicas para embalsamar os mortos e preservar os corpos em suas pirâmides com líquidos provenientes de espécimes vegetais (Silva *et al.*, 2017).

No cenário nacional, a primeira descrição sobre o uso de plantas com efeito curativo foi realizada por Gabriel Soares de Souza, autor do Tratado Descritivo do Brasil, de 1587. Nesse documento eram relatados os produtos medicinais usados pelos índios, que eram denominados de “árvores e ervas da virtude”. Além disso, com a chegada dos primeiros médicos portugueses ao território nacional, os mesmos se viram obrigados a utilizar, entender e estudar as práticas locais, devido à escassez de medicamentos que eram utilizados na Europa. Sendo assim, o uso de plantas medicinais no Brasil se estabeleceu principalmente devido à cultura indígena e a cultura africana oriunda dos escravos, além do reconhecimento dessa cultura pelos médicos portugueses, e a junção dessas crenças resultou em uma rica e autêntica medicina tradicional (Crestanello Argenta *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a medicina tradicional é definida como “a soma de conhecimentos, capacidades e práticas baseadas em teorias, crenças e experiências de diferentes culturas, explicáveis pelos métodos científicos atuais ou não, utilizados para manter a saúde e prevenir, diagnosticar, melhorar ou tratar doenças físicas e mentais” (WHO, 2013).

Com o avanço da medicina no mundo e com o desenvolvimento da indústria farmacêutica, surgiram novas estratégias terapêuticas, como a utilização de medicamentos sintéticos ou semi-sintéticos, que foi sendo introduzida gradativamente na rotina da população. Apesar disso, a medicina tradicional continuou sendo uma forte vertente no tratamento de patologias, já que grande parte dos medicamentos industrializados ofertados possuem valores exorbitantes e incompatíveis com o orçamento de saúde de países e de indivíduos. Ademais, o uso de plantas medicinais traz um apelo ao desenvolvimento sustentável, além de contribuir na exploração de recursos naturais nacionais, representando

uma importante fonte de inovação em saúde de forma segura, eficaz e com preços acessíveis para todos (Hasenclever *et al.*, 2017).

Sendo assim, tornou-se imprescindível enxergar a importância da medicina tradicional e quais os benefícios e vantagens esta prática poderia trazer para a população como um todo. Assim, com o passar do tempo, essas práticas começaram a ser de fato validadas, e a partir das plantas medicinais, foi criada a classe dos fitoterápicos (Falzon; Balabanova, 2017).

## **1.2 Fitoterápicos**

No Brasil, apenas no início dos anos 80, com a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), foram sendo geradas iniciativas que englobavam os fitoterápicos. Isso porque o país também vivenciava grande influência da OMS, que visava uma estratégia global de desenvolvimento para a medicina tradicional, reforçando o compromisso de estimular a implementação de políticas públicas a fim de inseri-las no sistema oficial de saúde dos seus 191 Estados-membro, incluindo o Brasil (Brasil, 2006).

A inclusão brasileira nas iniciativas mundiais se justifica pelo fato do país ter a maior diversidade vegetal do mundo, com mais de 300.000 espécies catalogadas, sendo um total estimado na ordem de 1,8 milhão de espécies (Jhemes *et al.*, 2017), além de possuir um histórico de ampla tradição e passagem de geração em geração da cultura da medicina tradicional. Apesar disso, ainda são escassos os dados presentes na literatura a respeito da ação e dos efeitos da utilização de plantas no tratamento de doenças, prejudicando assim o crescimento desse mercado e inviabilizando a incorporação e distribuição de fitoterápicos no SUS e na Atenção Primária de Saúde (Antonio; Tesser; Moretti-Pires, 2014). Logo, tornou-se indispensável o estabelecimento de instrumentos normativos pelos órgãos governamentais e o estímulo à produção de estudos científicos para unir as instituições de pesquisa e o seguimento industrial, de modo a regulamentar e desenvolver a fitoterapia no Brasil (Brasil, 2006).

Dessa forma, foi publicada em 11 de setembro de 1981, a Portaria de n.º 212, do Ministério da Saúde (MS), que descreve em seu escopo a importância e urgência do estudo das plantas medicinais, tratando-o como uma das prioridades de investigação clínica. Já em 1982, foi criado o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos (CEME), com o objetivo de avaliar o verdadeiro teor farmacológico e seus efeitos a partir de elaborações de espécimes vegetais de uso comum, de maneira a produzir tratamentos

alternativos e complementares para doenças conhecidas, com fundamento científico, através da utilização de plantas medicinais. Esse programa foi responsável pela pesquisa de 55 espécies (Brasil, 2006; 2020).

Dentro desse contexto, todas as esferas políticas e sociais relacionadas à saúde se voltaram para legitimar os fitoterápicos, e em 1992, o Conselho Federal de Medicina emitiu o Parecer nº 04/92, reconhecendo a fitoterapia como método terapêutico, concluindo assim que essa classe necessitava de uma rigorosa supervisão do Estado por meio da Vigilância Sanitária. A Secretaria de Vigilância Sanitária por sua vez, em janeiro de 1995, emitiu a Portaria nº 06/SVS, que instituiu e normatizou o registro e a notificação de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária (SVS). Pouco tempo depois, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) revoga a Portaria nº 06/SVS e lança a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17 de 2000, que atualiza a regulamentação de registro de medicamentos fitoterápicos e também define o medicamento fitoterápico tradicional.

Com o passar do tempo e com o progresso no segmento da fitoterapia, mais iniciativas públicas foram criadas. A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) estabelecida através da Portaria do MS nº 971, de 03 de maio de 2006, tinha a intenção de ampliar as chances de tratamento aos usuários do SUS, incluindo a possibilidade do tratamento ser realizado com plantas medicinais, de maneira a garantir o acesso da população aos fitoterápicos, com segurança e com qualidade certificada pela máquina pública (Brasil, 2020). Em 2009, o MS produziu a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), um documento de muita importância no qual estão listadas 71 espécies vegetais de eficácia cientificamente comprovada, onde o gênero da *Passiflora* está incluído (Brasil, 2020).

Atualmente, segundo o MS e a legislação vigente, os fitoterápicos são denominados como produto obtido de matéria-prima vegetal, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, desde que não haja substâncias isoladas, podendo ser simples (quando os ativos são provenientes de uma única espécie vegetal) ou composto (quando os ativos são provenientes de mais de uma espécie vegetal) (RDC Nº 26/2014). Ou seja, os fitoterápicos consistem na industrialização de ervas medicinais, mas por se tratar de medicamentos industrializados, precisam passar por um rigoroso processo de controle de qualidade, diminuindo assim a contaminação por outras substâncias e por microrganismos, além de possuírem uma posologia padrão e serem comercializados a partir da legitimação de suas características perante a legislação em vigor (ANVISA, 2020). É importante ressaltar a diferença entres os termos “medicamento

fitoterápico” e “produto tradicional fitoterápico” (descritas no Quadro 1), pois é a partir dessa classificação que o produto terá seu registro e notificações junto a ANVISA.

Quadro 1 – Definições dos termos “medicamento fitoterápico” e “produto tradicional fitoterápico”

<p><b>Medicamento Fitoterápico</b></p>	<p>Obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade</p>
<p><b>Produto Tradicional Fitoterápico</b></p>	<p>Obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização. Esses produtos não podem se referir a doenças, distúrbios, condições ou ações consideradas graves, não podem conter matérias-primas em concentração de risco tóxico conhecido e não devem ser administrados pelas vias injetável e oftálmica.</p>

Fonte: ANVISA, 2014.

Logo, são enquadrados como medicamentos fitoterápicos aqueles que passaram por ensaios clínicos padronizados e que obtiveram resultados de segurança e eficácia cientificamente comprovados. Em contrapartida, os produtos tradicionais fitoterápicos são autorizados para comercialização após demonstração do uso seguro em seres humanos por um longo período de tempo, determinado pela ANVISA de no mínimo 30 anos. Além disso, a Agência produziu ainda a Instrução Normativa (IN) nº 02 de 13 de maio de 2014, que contém a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”, no qual as plantas citadas podem dar origem a medicamentos, sem a necessidade de comprovação adicional de eficácia e segurança. Portanto, para as plantas medicinais citadas na IN nº 02/14, as indústrias podem produzir seus medicamentos e obter um registro simplificado. Esse registro simplificado abrange inúmeras espécies brasileiras e outras plantas reconhecidas como seguras mundialmente. Os especialistas afirmam que esses marcos regulatórios foram importantes

para o crescimento do mercado de fitoterápicos, além de equiparar e harmonizar as regulamentações do setor no Brasil com as legislações internacionais.

De acordo com a Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (Abifisa), o mercado de medicamentos fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 20 bilhões dentre o total de US\$ 320 bilhões em vendas anuais da indústria farmacêutica, demonstrando crescente ascensão no decorrer dos anos. Isso revela que a população está cada vez mais adepta ao consumo de produtos naturais, principalmente pelo interesse por mais qualidade de vida (Valécio; Lourenço, 2016).

Diante de todo o exposto, torna-se notório a importância do segmento da fitoterapia no ambiente nacional e internacional. Em conjunto, a ANVISA, os órgãos de Vigilância Sanitária estaduais e municipais, e as instituições de pesquisa, precisam afirmar constantemente seu objetivo em promover e preservar a saúde populacional por meio da garantia sanitária dos produtos fitoterápicos (Silva *et al.*, 2017).

### **1.3 Características gerais do gênero *Passiflora***

O gênero *Passiflora* pertence à família Passifloraceae, sendo considerado uma família com ampla diversidade e diferentes características morfológicas. Em 1529, exploradores espanhóis descreveram as flores do gênero como símbolos da “paixão de Cristo”, e a partir disso surgiu a palavra *Passiflora*, que tem origem na palavra latina “*Passio*” (Miroddi *et al.*, 2013). São descritas cerca de 650 espécies, além de 400 híbridos elaborados de forma sintética (FONSECA *et al.*, 2020), sendo no mínimo 150 espécies oriundas do Brasil e pelo menos 70 delas produzem frutos comestíveis, encontradas principalmente nas regiões Sul e Norte (CROCHEMORE *et al.*, 2003, BARBOSA *et al.*, 2022). As espécies mais conhecidas são: *P. alata* L., *P. edulis* L. e *P. incarnatana* L..

Esse gênero costuma se desenvolver melhor em locais de clima tropical, dessa forma, sua prevalência ocorre nos continentes da América, Ásia e África (Mäder *et al.*, 2009). Os solos arenosos ou levemente argilosos que possuem boa profundidade e drenagem são os mais propícios para o cultivo. Sendo assim, de acordo com as condições climáticas da região e do tipo de solo onde será plantado, é possível obter até duas safras por ano, e sabe-se que o fruto está adequado para consumo assim que ele se soltar da planta e cair no chão (EMBRAPA, 2020). É importante ressaltar que o Brasil tem grande destaque na produção mundial de *Passiflora*, uma vez que é responsável pela fabricação anual de mais de 900 toneladas da planta (Fonseca *et al.*, 2020).

As espécies desse gênero são popularmente conhecidas como maracujá e/ou “maracujazeiro”. Além do aproveitamento nutricional dos frutos, o maracujá é cultivado como planta decorativa devido suas flores e é amplamente utilizado para produção de cosméticos e na indústria farmacêutica (Miroddi *et al.*, 2013). Dentro da classe das angiospermas, não há outro grupo de espécies que apresente maior variação de cor e tamanho das flores e enorme diversidade foliar (Barbosa, *et al.*, 2022). A maioria das espécies são trepadeiras herbáceas ou lenhosas, podendo apresentar gavinhas auxiliares ou não, e podem ser encontradas nos formatos de arbusto e subarbusto. Apresentam ramos subcilíndricos angulados ou achatados e são consideradas hermafroditas (Bernacci, 2003).

Essas espécies vegetais também possuem muita utilização na medicina tradicional, pois apresentam características sedativas e ansiolíticas, especialmente a partir das tinturas ou infusões produzidas com suas folhas (Leal *et al.*, 2016).

As diferentes espécies do gênero *Passiflora* possuem propriedades farmacológicas diversas e composição fitoquímica complexa. Segundo a literatura, extratos de *Passiflora* exibem efeitos potenciais para o tratamento de insônia, ansiedade, déficit de atenção, hiperatividade, tensão muscular, hipertensão e depressão (Miroddi *et al.*, 2013). Outros estudos apontam para atividades anticonvulsivantes a partir de preparações obtidas das folhas da planta (Dhawan *et al.*, 2003, Nassiri-ASL *et al.*, 2007). Essas propriedades terapêuticas cientificamente comprovadas ocorrem, pois, as substâncias presentes nessas espécies, como os flavanóides glicosilados, agem diretamente no Sistema Nervoso Central (SNC), causando então impactos locais e sistêmicos. Estudos correlacionam a ação de *Passiflora* com os efeitos causados pela classe de medicamentos dos benzodiazepínicos, demonstrando resultados semelhantes (Barbosa *et al.*, 2022). A espécie *Passiflora incarnata* L., também conhecida como “Flor da Paixão” é a que possui maior número de estudos com relação a sua atividade farmacológica e terapêutica (Fonseca *et al.*, 2020).

### 1.3.1 *Passiflora incarnata*

A *Passiflora incarnata* é uma planta herbácea trepadeira perene, nativa do sul da América do Norte, conhecida por diversos nomes, sendo os principais maracujá e “Flor da Paixão” (EMBRAPA, 2020). Foi descoberta em 1569 no Peru e introduzida na medicina em 1840 pelo Dr. L. Phares do Mississippi (EUA) (Hock, 1934).

Pode-se encontrar cultivos de *P. incarnata* em diferentes estados brasileiros, que originam matéria-prima para o uso na medicina tradicional e para a indústria cosmética e farmacêutica. A planta pode chegar até 10 metros de altura, e toda a sua estrutura pode ser aproveitada de alguma forma (Figura 1). O fruto comestível é rico em vitaminas A, C, B1 e B2, além de cálcio, fósforo e ferro. Ademais, as folhas e flores são utilizados para os fins medicinais, uma vez que as propriedades ansiolíticas, sedativas e antiespasmódicas estão relacionadas aos componentes presentes nestas partes aéreas da planta, como os flavanóides, taninos, alcaloides cumarínicos, etc (Lopes *et al.*, 2016; Fonseca *et al.*, 2020).

Figura 1 – *P. incarnata* L. Estrutura da planta, contendo flor, fruto e folhas



Fonte: [http://www.swsbm.com/NGSImages/Passiflora\\_incarnata.jpg](http://www.swsbm.com/NGSImages/Passiflora_incarnata.jpg).

*P. incarnata* é a variedade mais utilizada na fitoterapia ocidental contemporânea e é a espécie do gênero mais estudada, devido a sua composição química e seus efeitos farmacológicos. A eficácia clínica de *P. incarnata* já foi descrita para uma grande gama de doenças, mas o uso mais comum está associado ao tratamento de ansiedade e distúrbios do sono (Miroddi *et al.*, 2013).



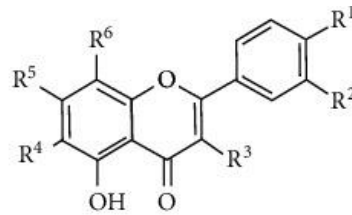
Além disso, essa espécie vegetal está descrita em diversas Farmacopeias do mundo, como a Britânica, dos Estados Unidos, Índia, França, e também a da Alemanha, que é considerado o país com maior mercado mundial de fitoterápicos (Fonseca *et al.*, 2020). Apesar de estar incluída nos mais variados compêndios internacionais, *P. incarnata* não é relatada na Farmacopeia Brasileira (6ª Edição), apenas são citadas as espécies *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora alata* Curtis. No Brasil, o gênero *Passiflora* está inserido na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS) de 2010, onde são encontradas inúmeras plantas medicinais que são de interesse a rede pública de saúde e que podem gerar novos fitoterápicos para a população. Nesse documento, a *P. incarnata* está incluída (Robre, 2015).

Portanto, fica evidente que, apesar de estar catalogada há muito tempo e possuir eficácia e segurança comprovada a mais de 30 anos conforme solicitado pela ANVISA, a espécie de *P. incarnata* precisa ser mais estudada para que seus mecanismos de ação sejam elucidados, de forma a resultar no desenvolvimento de terapias alternativas para diversas patologias, além de contribuir para a incorporação da espécie nos códigos farmacêuticos mais importantes do país.

### 1.3.2 Características farmacológicas e mecanismos de ação da espécie *Passiflora incarnata*

A composição fitoquímica da *P. incarnata* se baseia principalmente em flavonoides C-glicosilados, como a vitexina, isovitexina, orientina, iso-orientina, dentre outros. Estas moléculas são consideradas marcadores químicos da espécie, e podem servir como parâmetro para avaliar a qualidade e eficácia de fitoterápicos, permitindo ainda a determinação de diferentes espécies de *Passiflora*, apenas pelo teor e características dos flavonoides C-glicosilados analisados (Fonseca *et al.*, 2020). Ademais, os flavonoides livres também fazem parte da composição da planta, como a crisina, quercetina, apigenina, etc, todos listados na figura 2 (Dhawan *et al.*, 2001).

Figura 2 – Descrição e estrutura dos flavanoides livres que fazem parte da composição química de *Passiflora incarnata*



Flavonoids	R1	R2	R3	R4	R5	R6
(1) Vitexin	OH	H	H	H	OH	Glucose
(2) Isovitexin	OH	H	H	Glucose	OH	H
(3) Schaftoside	OH	H	H	Glucose	OH	Arabinose
(4) Isoschaftoside	OH	H	H	Arabinose	OH	Glucose
(5) Orientin	OH	OH	H	H	OH	Glucose
(6) Isoorientin	OH	OH	H	Glucose	OH	H
(7) Swertisin	OH	H	H	Glucose	OCH <sub>3</sub>	H
(8) Apigenin	OH	H	H	H	OH	H
(9) Luteolin	OH	OH	H	H	OH	H
(10) Quercetin	OH	OH	OH	H	OH	H
(11) Kaempferol	H	OH	OH	H	OH	H
(12) Chrysin	H	H	H	H	OH	H

Fonte: Fonseca *et al.*, 2020.

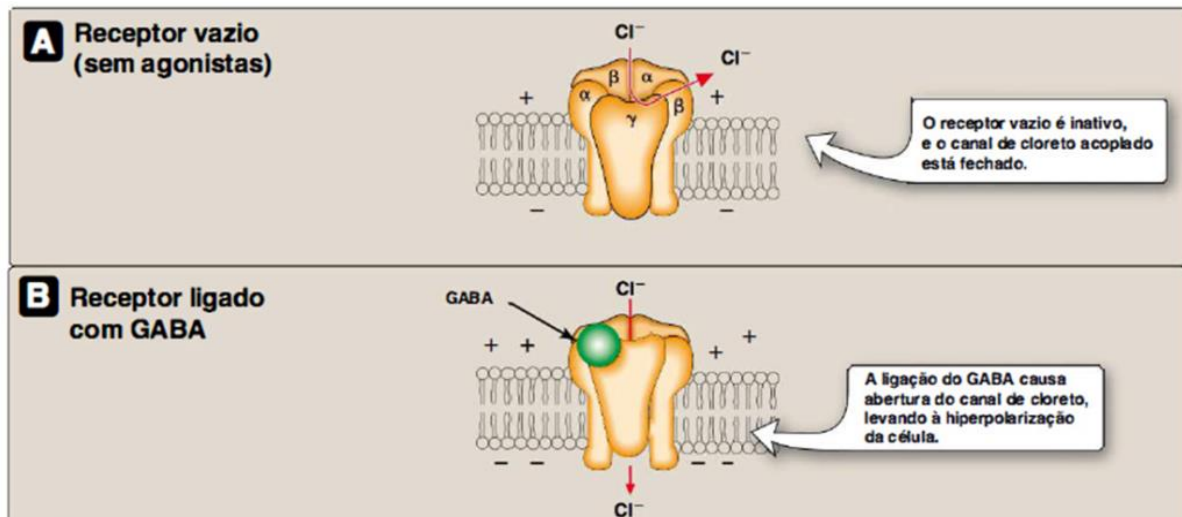
Além dos flavonoides, os alcaloides indólicos também são substâncias importantes para a ação farmacológica da espécie vegetal. Esses alcaloides são do tipo indol, baseados no sistema de anéis de carbolina, tais como harmina, harmol, harman, harmalol e harmolina. Todas as substâncias citadas podem ser identificadas na polpa e na casca do fruto e também nas folhas da planta (Fonseca *et al.*, 2020).

Os constituintes ativos, responsáveis pela ação farmacológica da planta, se concentram nas partes aéreas da *P. incarnata*, onde são detectados pelo menos 1,5% de vitexina. De forma conjunta, os flavonoides e alcaloides agem no organismo e ocasionam uma depressão inespecífica do SNC, resultando então no quadro calmante e sedante (Calmasyn, 2020).

O mecanismo de ação da *Passiflora* spp. em relação a desordem ligada a ansiedade ainda não é totalmente elucidado. Acredita-se que as substâncias presentes na planta possam estar envolvidas com a ativação dos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor de inibição associado à excitabilidade dos neurônios muito importante para o equilíbrio do sistema nervoso. Em situações de homeostase, as células neuronais produtoras de GABA sintetizam esse neurotransmissor, que de forma autócrina, se ligam aos seus receptores. Essa ligação resulta na abertura de canais iônicos que permitem a entrada de íons

cloreto para dentro da célula e a saída de íons potássio para fora da célula, promovendo a hiperpolarização da membrana celular. Esta cascata de eventos é responsável por reduzir a ansiedade (Figura 3) (Wasowski; Marder, 2012).

Figura 3 – Esquema demonstrando o receptor específico para ligação de GABA e as consequências que ocorrem quando o receptor está vazio ou ligado com GABA

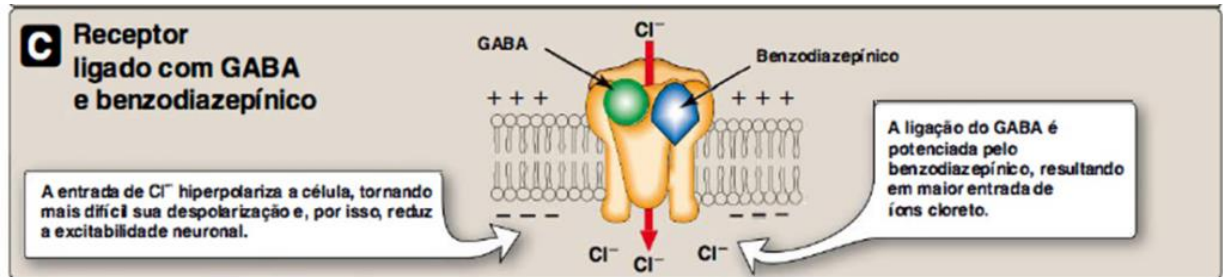


Fonte: Comunidade Sanar, 2021.

Entretanto, em situações de grande estresse, esse mecanismo se torna falho, e as células gabaérgicas acabam produzindo pequenas quantidades de GABA, aumentando assim a ansiedade (Lopes *et al.*, 2018).

Uma das hipóteses que explica o mecanismo de ação da planta está relacionada com a atividade dos benzodiazepínicos. Essa classe de medicamentos atua no estímulo da ação inibitória do receptor GABA, agindo nos neurônios pré-sinápticos liberadores de serotonina, noradrenalina, entre outros. São usados rotineiramente na clínica como sedativos, ansiolíticos, relaxantes musculares e para o tratamento de outras desordens neurológicas. Os benzodiazepínicos se ligam ao seu sítio de ligação no receptor GABA tipo A ( $\text{GABA}_A$ ), o que promove a regulação do fluxo de cloreto através do complexo de canais iônicos, agindo no sistema de neurotransmissão gabaérgico de forma a facilitar a ação do GABA e desencadeando os efeitos inibitórios no SNC (Leonardi, 2017). Acredita-se que as substâncias presentes na *P. incarnata*, também se ligam diretamente aos receptores gabaérgicos, provocando então a depressão do SNC (Wang *et al.*, 2005). Como essa atividade ainda não é bem consolidada, teorias sugerem que essas moléculas podem atuar assim como os benzodiazepínicos, potencializando a ligação do neurotransmissor GABA produzido, ou ainda tendo atividade do próprio GABA (Figura 4).

Figura 4 – Esquema demonstrando o receptor específico de GABA ligado ao GABA e a um benzodiazepínico simultaneamente, e as consequências que ocorrem quando essas duas substâncias se ligam a esse receptor.



Fonte: Comunidade Sanar, 2021.

Estudos consideram os flavanoides de *Passiflora* como agonistas parciais dos receptores GABA<sub>A</sub>, associando a ação desses flavanoides com uma semelhante atuação do excitador original endógeno. Elsas *et al.* (2010) comprovaram que um extrato de *P. incarnata* estimulou canais diretos via receptor GABA<sub>A</sub> em neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo. Wasowski e Marder (2012) descreveram os flavanoideis da planta como potenciais ligantes de GABA<sub>A</sub>, tais como a crisina e apigenina, que conseguem interagir diretamente no sítio de ligação dos benzodiazepínicos nesse receptor específico, desencadeando respostas ansiolíticas, sem gerar efeitos sedativos e relaxantes musculares.

Ensaio *in vitro* comprovaram que o flavanoide crisina (5,7-diidroxiflavona) possui afinidade pelos receptores benzodiazepínicos, levando a atividades depressoras no SNC. Todos esses achados são reforçados por estudos que demonstram que a pré-administração de um antagonista do receptor GABA<sub>A</sub>, o flumazenil, diminui os efeitos ansiolíticos provocados pelas substâncias do maracujá (WHO, 2016).

Além disso, os alcaloides pertencentes à classe das  $\beta$ -carbolinas presentes em *P. incarnata* possuem variadas estruturas, que interagem de forma harmônica com os receptores dos benzodiazepínicos, podendo então estar relacionados com as atividades ansiolíticas no organismo após o tratamento com a planta (Fonseca *et al.*, 2020).

## 1.4 Ansiedade

### 1.4.1 Definições e Epidemiologia

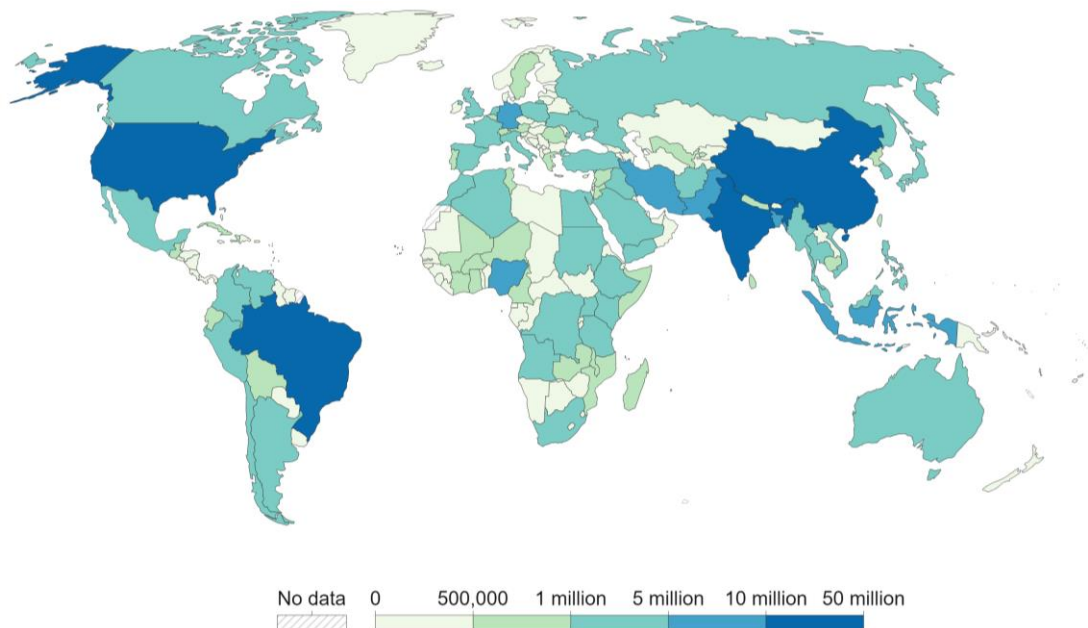
Como citado anteriormente, a *Passiflora incarnata* tem sido utilizada durante muito tempo para o tratamento de diversas patologias, sobretudo nas desordens neurológicas

relacionadas à ansiedade, devido a suas propriedades farmacológicas e atividades depressoras no SNC (Gonulalan *et al.*, 2020).

O termo ansiedade deriva da palavra *anxius*, do latim, sendo caracterizado por um estágio de inquietude e aflição. A palavra ansiedade é definida como “Sofrimento físico e psíquico; aflição, agonia, angústia, ânsia e nervosismo, sendo um estado emocional frente a um futuro incerto e perigoso no qual um indivíduo se sente impotente e indefeso” pelo dicionário da Língua Portuguesa - Michaelis (2023). A Associação Psiquiátrica Americana (2014) define ansiedade como a antecipação de uma ameaça futura, um sentimento que se distingue do medo; uma resposta emocional a uma ameaça iminente real. O Ministério da Saúde considera ansiedade como um fenômeno que ora nos beneficia ora nos prejudica, de acordo com as circunstâncias ou da intensidade, podendo tornar-se um evento patológico, ou seja, prejudicial ao funcionamento psíquico e somático. Em determinadas situações, a ansiedade estimula o indivíduo a entrar em ação, porém em excesso, pode deixar o indivíduo paralisado, impedindo suas reações. A ansiedade não patológica pode ser classificada em duas categorias: o estado de ansiedade, caracterizado por uma resposta imediata à alguma situação de perigo; e o traço de ansiedade, que seria uma resposta mais longa e permanente, que leva o indivíduo a exibir comportamentos ansiosos aumentados ao longo do tempo (Castillo *et al.*, 2000; Lantyer *et al.*, 2016; Lopes e Santos, 2018; Andrade *et al.*, 2019).

Existe um limiar entre a ansiedade essencial para o exercício das atividades cotidianas e a ansiedade patológica angustiante que requer um tratamento clínico (Marc-Antoine Crocq, 2015). Segundo associações de pesquisa psiquiátrica, o desenvolvimento de transtornos de ansiedade pode estar associado aos efeitos do uso de substâncias tóxicas ou de alguma condição física pré-existente e atualmente são um dos tipos de transtornos mais frequentes na população mundial (Figura 5).

Figura 5 – Número total de pessoas com transtorno de ansiedade em 2019, medido em todas as idades e em ambos os sexos. Os números tentam fornecer uma estimativa verdadeira (indo além do diagnóstico relatado) do número de pessoas com transtornos de ansiedade com base em dados médicos, epidemiológicos, pesquisas e modelagem de meta-regressão



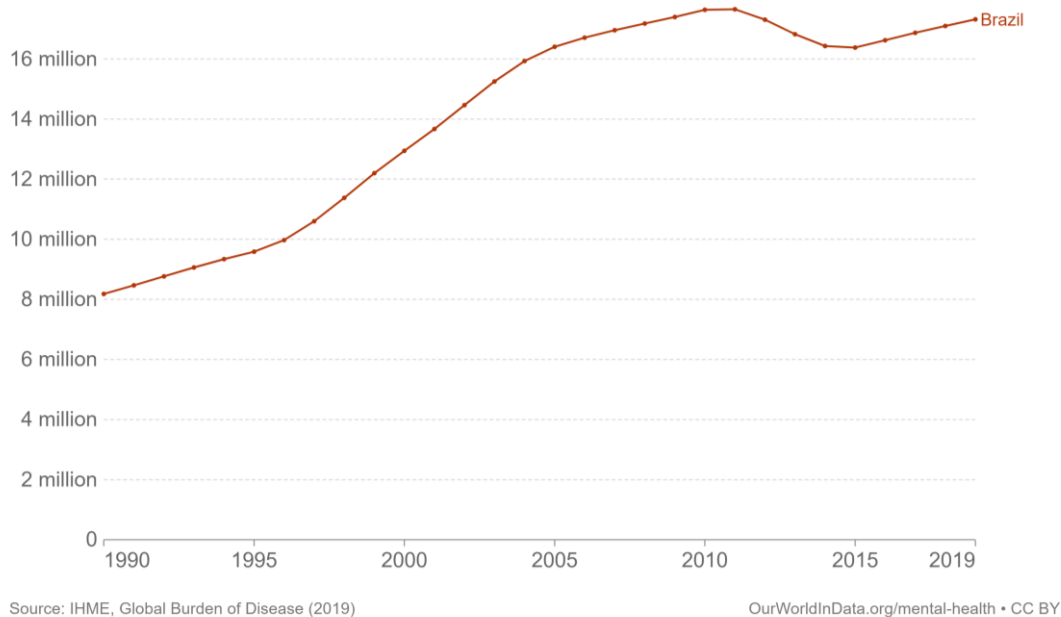
Source: IHME, Global Burden of Disease (2019)

OurWorldInData.org/mental-health • CC BY

Fonte: <https://ourworldindata.org/mental-health>

Os dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam para cerca de 18 milhões de pessoas com transtorno de ansiedade apenas no Brasil, ocupando uma das primeiras posições do ranking mundial de população acometida com ansiedade. Outras entidades epidemiológicas também mostram o crescimento dessa doença no território nacional ao longo dos anos conforme demonstrado na figura abaixo (Figura 6).

Figura 6 – Gráfico demonstrando o aumento gradativo do número de pessoas com algum tipo de transtorno de ansiedade no Brasil, no período de 1990 até 2019



Fonte: <https://ourworldindata.org/mental-health>

O *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* Edição 5 (DSM-V) é um documento muito importante que classifica e descreve todos os tipos de transtornos mentais, incluindo os transtornos de ansiedade. É a partir desse manual que houve uma padronização mundial nos conceitos referentes aos distúrbios neurológicos e é através dele que é possível chegar a um diagnóstico preciso e correto. Os transtornos de ansiedade são divididos em seis diferentes categorias, de acordo com os sintomas e com a intensidade do que é observado no paciente. Transtorno de ansiedade de separação, transtorno de ansiedade generalizada, mutismo seletivo, transtorno de pânico e ansiedade social são algumas das classificações da doença incluídas no DSM-V (Castillo *et al.*, 2000). Embora sejam classificadas em seis síndromes diferentes, todas compartilham características em comum, conforme descrito na figura 7.

É importante ressaltar que, a crise mundial sem precedentes ocasionada pela rápida disseminação do vírus Sars-Cov-2 e a pandemia de Covid-19 iniciada em 2020, afetaram diretamente a vida das pessoas. O isolamento social e as medidas de restrição impostas pelos governos e pela OMS, que serviram para retardar a transmissão do vírus e proteger a população mundial, também ameaçaram de forma grave o bem-estar físico e sobretudo o emocional das comunidades. Dados da literatura demonstram que as taxas de ansiedade na população em geral aumentaram em mais de 3 vezes durante a pandemia, com tendências cada vez mais altas, sugerindo um impacto substancial na saúde mental dos indivíduos

(Santabárbara *et al.*, 2021). Dessa forma, o problema da ansiedade no mundo se agravou ainda mais nos últimos anos.

Os transtornos de ansiedade são caracterizados por alta comorbidade, pois no geral, estão relacionados a outras disfunções neurológicas, como alteração de humor, mudança de personalidade, dentre outros. As manifestações clínicas podem ser observadas por meio de sintomas físicos, tais como falta de ar, sensação de aperto na região do coração, enjoos, problemas intestinais, irritabilidade, insônia, entre outras; ou ainda emocionais como por exemplo falta de concentração, falha em atividades simples, esquecimento, sintomas de nervosismo, pensamentos e preocupações com o futuro de modo acentuado, etc (Figura 7). Em geral, estes sintomas acontecem em conjunto (Nardi *et al.*, 1996). Portanto, é notório que todos esses distúrbios geram um impacto considerável na vida diária dos indivíduos acometidos.

Figura 7 – Principais manifestações clínicas observadas em pacientes com algum tipo de transtorno de ansiedade

<b>HIPERATIVIDADE AUTONÔMICA</b>	Taquicardia, hiperpnéia, sensação de falta de ar, sudorese, boca seca, náusea, urgência miccional, mal-estar abdominal ou diarreia, calafrios ou ondas de calor.
<b>HIPERPNEIA E HIPERVENTILAÇÃO</b>	Parestesias, vertigens, dor / pressão no peito, desrealização, despersonalização.
<b>AUMENTO DA TENSÃO MUSCULAR</b>	Sensação de tensão, dificuldade para relaxar, tremores, dores diversas e inespecíficas.
<b>ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS</b>	Inquietude, esquiva, obsessões e compulsões, irritabilidade, apreensão.
<b>AUMENTO-ATENÇÃO E VEL. ASSOCIAÇÕES</b>	Insônia, sobressaltos frequentes, baixa concentração e rendimento intelectual.

Fonte: <https://www.amban.org.br/transtorno-de-ansiedade/>

#### 1.4.2 Fisiopatologia da ansiedade

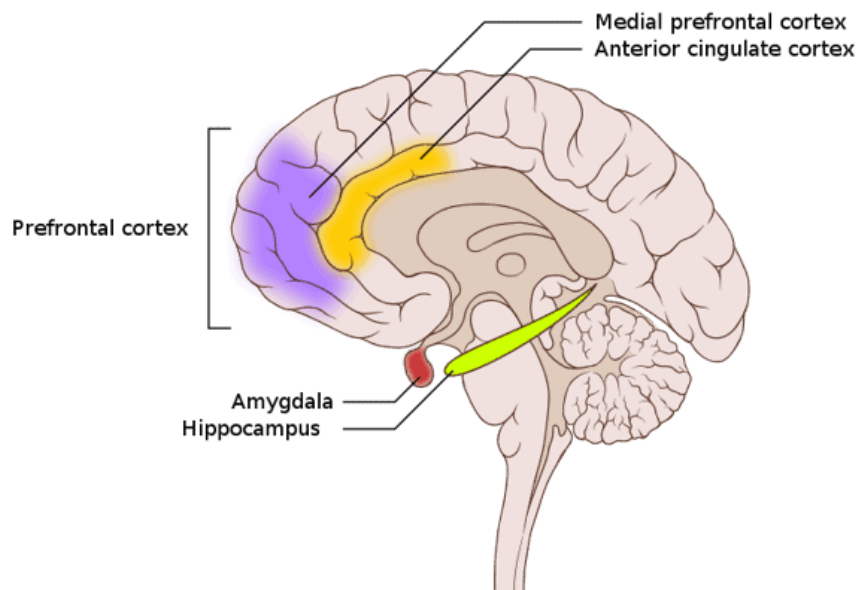
Os sistemas cerebrais envolvidos no mecanismo de defesa que são constituídos por estruturas nervosas organizadas longitudinalmente, e o sistema de inibição comportamental estão relacionados com a ansiedade. A amígdala e o córtex pré-frontal (Figura 8) são partes



do SNC que compõem essa maquinaria de defesa e estão associados aos distúrbios de ansiedade (Andrade *et al.*, 2019).

Em situações de homeostase, os estímulos trazidos pelo ambiente são detectados pelos sistemas sensoriais que então identificam sinais potencialmente perigosos e/ou ameaçadores, e em seguida, esses estímulos são traduzidos, desencadeando uma resposta ansiosa, para que o indivíduo possa reagir a essa ameaça. A amígdala e o córtex pré-frontal, em conjunto com outras estruturas interligadas entre si, possibilitam as interações dos microcircuitos para iniciar a vigilância e dar início aos comportamentos defensivos. Ou seja, todos esses componentes são importantes para a interpretação de ameaças oriundas do meio ambiente e para subseqüente resposta produzida. Após a resposta inicial, dependendo da amplitude do estímulo, as ameaças são interpretadas e sinalizadas como dignas de uma vigilância maior e mais reforçada (Andrade *et al.*, 2019; SOARES, 2017).

Figura 8 – Regiões cerebrais envolvidas no sistema de defesa e no desenvolvimento de ansiedade



Fonte: <https://nebula.org/blog/pt-br/e-ansiedade-genetica/>

Os neurotransmissores também fazem parte desse processo e integram o conjunto do sistema defensivo. As principais substâncias envolvidas são a epinefrina, noradrenalina, dopamina, serotonina, GABA e ainda peptídeos que participam como liberadores de corticotropina. A noradrenalina em especial, tem uma função específica na contenção da ansiedade e, em casos de queda na concentração dessa substância, ocorre uma regulação noradrenérgica insuficiente, o que pode ser prejudicial para o sistema como um todo. Já a

serotonina possui uma atividade inibitória assim como estimulatória, tudo irá depender do contexto apresentado. Quando os sistemas cerebrais de defesa são estimulados por sinais de perigo através da amígdala, inicia-se a ativação dos neurônios serotoninérgicos (Andrade *et al.*, 2019). O GABA por sua vez exerce uma função inibitória fundamental sobre os neurônios serotoninérgicos. Sua principal missão é controlar o SNC, garantindo seu funcionamento moderado, sem que haja intercorrências e respostas exageradas. Algumas classes de medicamentos, como os benzodiazepínicos, são indicadas para pacientes ansiosos, pois essas drogas atuam potencializando a ação de GABA e mantendo o SNC em equilíbrio. Hilbert e colaboradores (2014) comprovaram que, pacientes com ansiedade apresentam uma atividade irregular no córtex pré-frontal e na amígdala, além de terem sinalizações e conexões anatômicas bem reduzidas entre essas áreas (Hilbert; Lueken; Beesdo-Baum, 2014).

Outras proteínas e fatores de crescimento estão associados aos processos de aprendizado, memória e neuroplasticidade, e também integram o sistema de defesa e conseqüentemente o desenvolvimento de respostas ansiosas, tais como as neurotrofinas. O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF – *Brain-derived neurotrophic factor*) é um peptídeo que integra a família das neurotrofinas, atuando no tecido cerebral com importante função na manutenção da homeostase, sobrevivência neuronal, crescimento, dentre outros. O BDNF é produzido principalmente em regiões do córtex cerebral, hipocampo e amígdala. Sua produção e liberação pode ser afetada dependendo do estímulo e da intensidade dos estímulos que chegam ao SNC, como o estresse (Santos *et al.*, 2021). Essa molécula está intimamente envolvida em processos de crescimento dendrítico e potencialização da capacidade sináptica, mas também em estímulos a apoptose celular, atenuação da transmissão sináptica e supressão do crescimento dendrítico. Portanto, qualquer alteração no metabolismo de BDNF pode causar distúrbios graves no SNC. Estudos mostram a relação entre expressão de BDNF e doenças como transtorno bipolar, depressão, esquizofrenia e ansiedade (Silveira da Luz *et al.*, 2013; Haghghat; Rajabi; Mohammadshahi, 2021).

#### 1.4.3 Tratamentos

Por muito tempo o único tratamento disponível para os pacientes com problemas psiquiátricos era a internação em hospitais especializados e o uso excessivo de medicamentos. Com o passar dos anos, foram sendo criados outros métodos e alternativas mais eficazes e com uma abordagem psicossocial, focando no cuidado do paciente e não apenas no seu tratamento (Andrade *et al.*, 2019).

Atualmente as possibilidades de tratamento para os indivíduos acometidos com transtornos de ansiedade são muito variadas. Dentre as principais podemos citar a psicoterapia, terapia de família, terapia ocupacional realizadas em oficinas, terapia medicamentosa, terapia cognitivo-comportamental (TCC), ou uma combinação de várias terapias. O método mais utilizado costuma ser a TCC, que visa ensinar os pacientes a discutir e lidar com seus pensamentos, sentimentos e comportamentos. Durante esse tratamento, o indivíduo aprende a reconhecer e neutralizar os pensamentos que causam ansiedade, e ainda descobrem como conviver, enfrentar e superar os objetos e situações que geram medo e estão causando o transtorno (Nechita; Nechita; Motorga, 2018; Wolgensinger, 2015).

A terapia medicamentosa também ainda é muito utilizada, e se baseia no uso de medicamentos que agem no SNC e nos neurotransmissores envolvidos na fisiopatologia da ansiedade. Esses medicamentos são utilizados para diminuir os sintomas e manifestações clínicas da ansiedade. As classes mais indicadas são os ansiolíticos (como os benzodiazepínicos), os anti-depressivos e os beta-bloqueadores. Em geral, os medicamentos ansiolíticos compreendem o tratamento de primeira escolha, pois eles agem rapidamente no organismo quando comparado a outras opções. Contudo, os pacientes costumam desenvolver tolerância a esses medicamentos, ou seja, serão necessárias doses cada vez maiores para obtenção do mesmo efeito. Ademais, o uso prolongado destas drogas pode culminar em muitos efeitos colaterais, incluindo a dependência, sendo assim, os médicos costumam prescrever benzodiazepínicos por curtos períodos e suspendem a medicação de forma lenta para evitar os sintomas de abstinência (Andrade *et al.*, 2019).

Em contrapartida, o mercado dos fitoterápicos vem crescendo e a utilização de medicamentos fitoterápicos em doenças neurológicas aumenta gradativamente. Estudos demonstram que os compostos presentes nas plantas medicinais são fontes importantes de agentes neuroprotetores contra diversas patologias do SNC, como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e ainda lesões cerebrais pós infecção de Covid-19 (Pohl; Kong Thoo Lin, 2018; Singh *et al.*, 2019; Safdari *et al.*, 2021; Nawrot *et al.*, 2022). Além dos inúmeros benefícios que as espécies vegetais podem trazer para o organismo, as mesmas não estão relacionadas a grandes efeitos colaterais, o que torna esse tipo de tratamento ainda mais seguro para os pacientes (Soldatelli *et al.*, 2010), representando uma ótima opção de escolha.

## 1.5 Modelos experimentais

Modelos animais são cruciais para os estudos de muitas doenças humanas, incluindo doenças neurológicas, como a ansiedade (Kumar; Bhat; Kumar, 2013). Esses modelos são importantes para a descoberta de novos alvos terapêuticos e seus mecanismos de ação, e são necessários por causa da impossibilidade de realizar alguns procedimentos de pesquisa em humanos, por razões práticas e éticas (Basir *et al.*, 2012).

No entanto, é desafiador simular as mesmas condições geradas pelos transtornos de ansiedade em humanos em muitas espécies de animais utilizados em experimentos laboratoriais. Apesar disso, diferentes modelos animais foram desenvolvidos ao longo do tempo, devido a importância de estudar os mecanismos fisiopatológicos da ansiedade e testar novos medicamentos para o tratamento da mesma (Kumar; Bhat; Kumar, 2013).

No campo da pesquisa da ansiedade, os modelos utilizando animais podem ser classificados em duas categorias principais: a primeira que envolve respostas condicionadas do animal a eventos estressantes e até dolorosos, como por exemplo exposição a choques elétricos nas patas; e a segunda, baseada na etologia e reações naturais e espontâneas do animal, tais como fuga e congelamento, em resposta a estímulos estressantes que não estão associados a dor ou desconforto, como por exemplo a exposição do animal a uma caixa de teste muito iluminada. Dessa forma, os testes neurocomportamentais usuais são fundamentados na livre exploração, unindo o comportamento não condicionado com algum estímulo que gera agitação e ansiedade no animal. São muitos os testes validados na literatura, mas como principais podemos citar o campo aberto, a caixa claro-escuro, teste de Suok, labirinto em Y e labirinto em cruz elevado (*elevated plus maze* - EPM) (Kalueff *et al.*, 2007).

Sabe-se que os roedores possuem interesse automático por ambientes novos e pela procura de objetos, no entanto, a novidade também pode causar medo, levando então a redução da exploração e/ou fuga desses animais diante de uma nova circunstância. Alguns medicamentos, como os ansiolíticos e alguns fitoterápicos, conseguem reverter esse comportamento, aumentando os níveis de exploração, sem causar prejuízos a respostas à novidade (Gray, 1977). A partir desses modelos, é possível analisar se os ansiolíticos e os fitoterápicos usados no tratamento da ansiedade estão de fato cumprindo o seu papel, reduzindo a ansiedade dos animais expostos aos artefatos experimentais. Apesar disso, os testes neurocomportamentais não são usados como referência para determinar o controle de qualidade de medicamentos.

### 1.5.1 Labirinto em Cruz Elevado

Para o estudo sobre os transtornos de ansiedade, o labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos principais modelos utilizados. É muito empregado para a descoberta de novos fármacos e para compreender melhor as características da ansiedade, pois o método investiga questões farmacológicas, fisiológicas e comportamentais (Morato, 2006). Foi criado na década de 50, como uma variação do teste do labirinto em Y elevado, e validado pouco tempo depois, para o estudo em ratos em 1985 e posteriormente em 1990 para estudo em camundongos.

O teste tem como finalidade colocar o animal no labirinto que fica elevado do chão, contendo dois braços abertos e dois braços fechados por paredes (Figura 9). O animal possui um tempo de livre exploração, e então é avaliada a quantidade de vezes que esses animais visitam os braços e o tempo gasto tanto no braço aberto quanto no fechado. Durante sua validação, foi observado que os roedores ficavam menos tempo nos braços abertos quando comparados ao tempo de permanência nos braços fechados, e então surgiu a teoria de que essa circunstância de novidade traria respostas de curiosidade e medo, demonstradas pelo comportamento dos animais, pela aproximação e/ou afastamento dos braços abertos e fechados (Montgomery, 1955). Isso é explicado pelo evento “conflito de aproximação-esquiva” que ocorre com o animal diante de um ambiente desconhecido associado a tendência natural de evitar os braços abertos, que são potencialmente perigosos e conflituosos (Grossen; Kelly, 1972). Sendo assim, em situações de homeostase, o animal frequenta os dois braços, contudo mantêm-se mais tempo nos braços fechados. O teste é avaliado de modo que quanto maior o nível de ansiedade do animal, menor será o tempo de permanência nos braços abertos e a frequência de entradas e saídas de ambos os braços também será menor. Além disso, também é possível analisar alguns comportamentos etológicos, como o *stretching* (esticamento horizontal), *rearing* (levantamento vertical), *grooming* (autolimpeza do corpo), entre outros (Morato, 2006).

Figura 9 – Labirinto em Cruz Elevado



Fonte: Acervo pessoal, 2022.

Alguns fatores podem influenciar o comportamento do animal durante o teste, diminuindo a entrada nos braços abertos, tais como a idade, sexo e estado nutricional. Expor o animal mais de uma vez ao artefato pode prejudicar os resultados obtidos, e o horário em que o teste é realizado também pode afetar a eficiência do modelo (Pellow *et al.*, 1985; Pinto *et al.*, 2012). Logo, é necessário um estudo prévio para implementação e validação do teste nos centros de pesquisa, de forma a se obter o maior rendimento deste modelo neurocomportamental.

### 1.5.2 Campo Vazado

Quando animais são expostos a ambientes novos ou objetos desconhecidos, é normal que eles apresentem interesse de explorar, se locomovendo em toda extensão do novo local e farejando os objetos disponíveis. Esse comportamento acontece porque o ato de explorar pode trazer benefícios ao animal, como por exemplo encontrar alimento e abrigo, ou ainda ter a oportunidade de acasalar. No entanto, o ambiente novo pode conter inúmeros riscos para o roedor, como predadores e outros perigos iminentes. Quando o animal se opõe a exploração, é sinal de que ocorre um equilíbrio entre a neofilia e neofobia (Brown; Nemes, 2008).

Por esses e outros motivos, o comportamento exploratório dos roedores gera muito interesse de estudo entre as mais variadas áreas da farmacologia experimental. São muitos os

modelos experimentais que avaliam a exploração e a busca por novidade dos roedores, entre eles, podemos destacar o Campo Vazado (*Hole-Board*). Esse teste foi realizado pela primeira vez em 1962 por Boissier e Simon, com o objetivo de avaliar o resultado da exposição do animal a um ambiente novo. O teste analisa essencialmente a atividade locomotora do animal, e consegue ainda avaliar a tendência natural do roedor à neofilia, que é caracterizada pela busca por novidades (Nolan *et al.*, 1973).

O Campo Vazado (CV) (Figura 10) consiste em uma arena fechada preenchida por orifícios, no qual o animal pode mergulhar sua cabeça, tipificando o comportamento denominado de *head-dipping*. A quantidade de vezes e o tempo da imersão da cabeça compreendem medidas de neofilia que não são dependentes da atividade locomotora do roedor. O teste serve ainda para avaliar outros parâmetros, como números de *rearings*, *grooming*, *stretching*, número de pellets fecais, número de vezes em que os animais se mantêm nas bordas e número de quadrantes percorridos. Os elevados graus de *head-dipping* e de quadrantes percorridos são indicativos de neofilia, enquanto que a diminuição da neofilia pode ser interpretada como alto estado de ansiedade no animal (File; Wardill, 1975; Brown; Nemes, 2008).

Figura 10 – Campo Vazado



Fonte: Acervo pessoal, 2022.

## 1.6 Justificativa

A ansiedade é responsável por acometer mais de 18 milhões de pessoas atualmente no Brasil, deixando o país ocupar um dos primeiros lugares do ranking mundial do número de pessoas que sofrem com transtornos mentais no mundo inteiro. As manifestações clínicas observadas nos pacientes afetam atividades diárias, estando associadas à diminuição da qualidade de vida e da capacidade de trabalho. Além disso, os medicamentos utilizados para o tratamento da doença estão relacionados com muitos efeitos colaterais, sendo o mais preocupante deles, a dependência. Estes dados refletem a ausência de outras opções de terapias eficientes para a ansiedade. Sem uma melhora na estratégia de tratamento estes números tendem a aumentar devido a atual situação da sociedade como um todo, principalmente num cenário pós-pandemia de Covid-19.

A medicina tradicional sempre foi muito utilizada e respeitada pela população, e com seu crescimento ao longo dos anos, foi criada a classe dos fitoterápicos, que consistem em medicamentos feitos à base de plantas e ervas com efeitos medicinais, que passaram por um processo rigoroso de controle de qualidade e que precisam estar de acordo com a legislação vigente. O gênero *Passiflora* possui atividade ansiolítica e sedativa comprovada, e a espécie *Passiflora incarnata* tem sido utilizada na produção de fitoterápicos para o tratamento de transtornos de ansiedade. Os mecanismos de ação da *Passiflora* ainda não são bem compreendidos, mas sabe-se que os componentes químicos da espécie vegetal atuam diretamente no SNC de modo semelhante ao neurotransmissor GABA, causando efeitos depressores e mantendo o sistema em homeostase. Sendo assim, é indispensável à realização de estudos que visem o melhor entendimento das funções dos compostos de *P. incarnata*, de modo a subsidiar o desenvolvimento dessa nova abordagem terapêutica mais eficaz e segura para estas condições patológicas frequentes.

No presente trabalho utilizamos diferentes marcas comerciais de *Passiflora incarnata*, avaliando seu efeito ansiolítico através de testes neurocomportamentais, com o intuito de utilizar esses testes como uma ferramenta de controle de qualidade para esta classe de medicamentos. Sabe-se que existe uma lacuna na literatura e na legislação vigente, sobretudo no Brasil, a respeito da espécie de *Passiflora incarnata* e métodos para avaliar a qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos que a possuem em sua composição. Apesar de serem comercializados, em sua maioria, como produtos tradicionais fitoterápicos, e, portanto, não necessitarem de evidências clínicas para comprovar sua segurança e eficácia, é notório que não há nenhum tipo de protocolo na Monografia da espécie ou na própria



Farmacopeia Brasileira que, em possíveis casos de danos ao consumidor, sejam utilizados para solucionar algum tipo de problema na pós-comercialização desses produtos, por exemplo. Por isso, é fundamental que existam metodologias validadas e incluídas nos compêndios oficiais, para que, se necessário, sejam empregues nos momentos oportunos. Os testes neurocomportamentais representam uma ótima estratégia para aferir a qualidade dos medicamentos fitoterápicos, sendo assim, o estudo e posterior validação dos mesmos para este fim, configura um importante passo para o progresso deste mercado. Além disso, é fundamental analisar os efeitos desse tratamento, pois essa seria uma excelente estratégia terapêutica a ser adotada, já que as substâncias presentes na planta possuem eficácia comprovada em outros modelos experimentais e é de fácil acesso a população, possibilitando uma maior adesão dos pacientes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficácia de fitoterápicos a base de *Passiflora incarnata*, de fabricantes distintos, quanto ao seu efeito ansiolítico através de testes neurocomportamentais, associando os resultados encontrados com a análise do controle de qualidade microbiológico e físico-químico dessas amostras.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a ansiedade através do teste do LCE e CV para *P. incarnata* referência com diferentes doses;
- Avaliar a ansiedade através do teste LCE e CV para fabricantes distintos da *P. incarnata*;
- Realizar dosagem sérica de parâmetros bioquímicos e avaliar possíveis alterações nos mesmos;
- Avaliar alteração morfofuncional do SNC através da quantificação de BDNF por ELISA;
- Caracterizar os metabólitos secundários das marcas de *P. incarnata* por Cromatografia em Camada Delgada (CCD);
- Avaliar o parâmetro físico de peso médio das diferentes marcas segundo os requisitos preconizados pela Farmacopeia Brasileira;
- Avaliar a qualidade microbiológica das diferentes marcas segundo os limites estabelecidos na Farmacopeia Brasileira.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

Os comprimidos revestidos de *Passiflora incarnata* (Passiflora Referência na dosagem de 360 mg; Marca 1 na dosagem de 260 mg; Marca 2 na dosagem de 420 mg; e Marca 3 na dosagem de 300 mg) foram obtidos de 3 drogarias comerciais distintas independentes. Para selecionar a marca que seria designada como marca de referência, foi realizada um pré-estudo com todas as marcas de *Passiflora incarnata* comercializadas nas principais drogarias do Rio de Janeiro, seguido de uma busca no site da ANVISA para determinar quais dessas marcas era considerada um medicamento fitoterápico e qual delas possuía o tempo de registro mais longo. Somando essas duas buscas e adequando a realidade do estudo, uma marca comercial foi definida como Passiflora referência (dosagem de 360 mg). Além disso, foi utilizado um produto natural não ansiolítico, Castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum*), na forma de cápsulas na dosagem de 500 mg, obtido de uma quarta drogaria comercial.

#### 3.2 Desenho Experimental

Para a metodologia do trabalho, foram utilizados camundongos Swiss Webster, machos, com 3 a 5 semanas de idade, que foram fornecidos pelo Biotério Central da FIOCRUZ/ICTB sob licença CEUA LW-7/19. Os animais foram mantidos sob condição constante de temperatura ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e umidade ( $55 \pm 5\%$ ), em ciclo claro/escuro de 12 h, e com fornecimento de água e comida *ad libitum*. Em um primeiro momento, para estabelecer uma curva dose- resposta da *Passiflora incarnata* de referência, os animais foram divididos em 5 grupos contendo 10 animais em cada: Tampão Fosfato Salino-PBS (n=10), Passiflora de Referência (Passiflora ref) nas doses de 100 (n=10), 200 (n=10), 400 (n=10) e 800 mg/kg (n=10). Esse ensaio foi realizado em duplicata para obtenção de resultados robustos, sendo assim, obtivemos um “n” final de 20 animais por grupo.

Em seguida, para comparar a ação farmacológica da *Passiflora incarnata* (Pi) de diferentes fabricantes com a *P. incarnata* de referência, os animais foram divididos nos grupos: Tampão Fosfato Salino-PBS (n=7), Passiflora ref nas doses de 200 (n=7) e 800 mg/kg (n=7), Pi Marca 1 e Pi Marca 2 também nas doses de 200 (n=7/grupo) e 800 mg/kg (n=7/grupo). Na última bateria de experimentação animal, ainda para comparar a ação

farmacológica da *Passiflora incarnata* de diferentes fabricantes com a *P. incarnata* de referência, os animais foram divididos nos grupos: Tampão Fosfato Salino-PBS (n=7), Passiflora ref nas doses de 200 (n=7) e 800 mg/kg (n=7) e Pi Marca 3 também nas doses de 200 (n=7) e 800 mg/kg (n=7). Além disso, nessa última bateria de experimentação *in vivo*, um grupo tratado com produto natural não ansiolítico (Castanha da Índia - Ci) foi adicionado como uma espécie de controle negativo (n=7). Como os grupos Tampão Fosfato Salino-PBS e Passiflora ref nas doses de 200 e 800 mg/kg foram repetidos nas duas últimas baterias experimentais, terminamos os ensaios com um “n” final de 14 para ambos os grupos. Não houve repetição de experimentos com os grupos Pi Marca 1, Pi Marca 2, Pi Marca 3 e Ci, nas doses de 200 e 800 mg/kg, sendo assim, o “n” final para todos esses grupos foi de 7.

Somando todas as baterias experimentais realizadas, obtivemos um total de quatro experimentos *in vivo* com um “n” de 49 a 50 animais em cada. O esquema do desenho experimental com substâncias distintas analisadas justifica a variação do “n” representado nos resultados do estudo. Eventualmente, durante a realização de diferentes análises, houve perda de alguma das amostras, por isso, em alguns casos, houve diminuição do “n” demonstrado nos resultados do trabalho.

Os animais receberam 3 doses em momentos diferentes, uma hora antes do teste Labirinto em Cruz Elevado no primeiro dia, uma hora antes do teste Campo Vazado no segundo dia e uma hora antes da eutanásia no terceiro dia. A administração das substâncias foi feita via oral através de gavagem.

Para este desenho experimental não foi necessário adicionar um grupo controle positivo, pois um estudo prévio realizado pelo mesmo grupo (FERRARIS *et al.*, 2021) validou os testes neurocomportamentais inserindo um grupo controle positivo de Diazepam, na dose de 1,5 mg/kg diluído em PBS, que gerou como resultado esperado, um efeito ansiolítico em ambos os testes (LCE e CV), não sendo necessário repetir os testes adicionando mais um grupo experimental.

Após a eutanásia foram extraídas amostras de soro e do encéfalo para as análises bioquímicas e para o teste de ELISA.

### **3.3 Fármacos e Dosagens**

Antes da administração das substâncias, os animais foram pesados e separados em grupos (Tampão Fosfato Salino-PBS, Passiflora ref, Marca 1, Marca 2, Marca 3 e Castanha da Índia) onde cada animal recebeu a substância de acordo com seu peso, sendo padronizado o

volume de administração de 10 mL/kg de peso corpóreo. Designamos Marca 1, Marca 2 e Marca 3, pois eram fármacos de 3 fabricantes diferentes. Após o registro de ganho de peso eles receberam a substância via gavagem uma hora antes de serem submetidos aos testes. Os animais receberam 3 doses em momentos diferentes, uma hora antes do teste LCE no primeiro dia, uma hora antes do teste CV no segundo dia e uma hora antes da eutanásia no terceiro dia. Foram utilizadas as seguintes dosagens: 100, 200, 400 e 800 mg/kg diluído em PBS para o ensaio de curva dose-resposta com a Passiflora ref, e nos experimentos seguintes, as doses de 200 e 800 mg/kg foram mantidas para todos os grupos experimentais, com exceção do controle PBS.

### 3.4 Testes Neurocomportamentais

#### 3.4.1 Labirinto em Cruz Elevado

A atividade ansiolítica foi mensurada através do LCE. O labirinto consiste em dois braços abertos (10 cm largura × 50 cm de comprimento) e dois braços fechados (10 × 50 × 40 cm de altura) perpendicularmente dispostos e ligados por um centro (10 × 10 cm) possuindo 50 cm de altura. Uma hora após a administração da dose os animais foram colocados individualmente no quadrado central do labirinto com a face virada para o braço aberto, de costas para o avaliador, sendo permitida a exploração do ambiente durante um período de teste de 5 minutos. Todas as sessões foram gravadas por câmera frontal marca MOTOROLA® 5 megapixels usando sistema de vídeo para gravação do experimento. Após cada animal, o labirinto foi higienizado (solução a 20% de etanol) para que não houvesse influência do olfato ou excreta dos animais anteriores sobre o comportamento do camundongo subsequente. As seguintes medidas foram tomadas pelo observador: o tempo de permanência nos braços abertos e fechados; e o número de vezes que o animal realizou *stretching* (esticamento horizontal), *rearing* (levantamento vertical) e *grooming* (autolimpeza do corpo). Os vídeos foram analisados e o tempo de permanência em cada braço foi registrado com auxílio de dois cronômetros marca STOP WATCH VOLLO® contando o tempo nos braços abertos e fechados. Caso o animal permaneça predominantemente nos braços fechados ele é ditocomo ansioso, caso ele permaneça mais tempo nos braços abertos, pode-se dizer que o medicamento tem ação ansiolítica. Os 5 minutos foram convertidos em segundos, após a contagem dos segundos nos braços abertos e fechados, foi feita o cálculo da medida descontaminada, baseado na seguinte fórmula (Komada; Takao; Miyakawa, 2008):

Medida Descontaminada =  $\mathbf{BA/(BA+BF)}$ ;

Onde BA = Tempo nos Braços Abertos e BF = Tempo nos Braços Fechados.

### 3.4.2 Campo Vazado

O teste do campo vazado é frequentemente utilizado desde a década de 70 para averiguar o efeito de substâncias que possam interferir na tendência natural exploratória (neofilia). O aparelho consiste em uma caixa (de madeira ou acrílico) fechada em formato de arena com medidas de 80 x 60 x 50 cm, contendo 20 orifícios no seu interior com 3 cm de diâmetro espaçados e distribuídos regularmente. Cada animal submetido ao teste foi colocado na mesma borda do artefato com o focinho voltado para a parede. Cada camundongo possuiu o tempo de 5 minutos para explorar livremente o ambiente. Nesse teste foi registrado o número de vezes que o animal coloca o focinho dentro do orifício (“*head dipping*”), o número de quadrantes deslocados (espaço virtual entre um orifício e outro) e o número de vezes que o animal realizou *stretching* (esticamento horizontal), *rearing* (levantamento vertical) e *grooming* (autolimpeza do corpo). Após a realização do teste para cada camundongo, a caixa foi higienizada com álcool 20% para evitar que os vestígios do animal anterior interferissem nas decisões do animal subsequente (Brown; Nemes, 2008).

## 3.5 Coleta de amostras

### 3.5.1 Sangue

O sangue dos camundongos da linhagem Swiss Webster, incluindo todos os grupos experimentais, foi coletado por punção da artéria aorta descendente após a eutanásia com uma solução contendo os fármacos Cetamina (140 mg/kg) e Xilasina (20 mg/kg) aplicada via intraperitoneal. O sangue foi centrifugado a 13000 rpm em centrífuga por 10 minutos, e em seguida o soro foi coletado e estocado no freezer -80°C para análises bioquímicas.

### 3.5.2 Encéfalo

Após a coleta de sangue, foi feita a abertura do crânio para a remoção do tecido cerebral dos animais. Estes encéfalos foram coletados e armazenados em freezer -80°C para

avaliações dos níveis da neurotrofina BDNF, através do ensaio de imun absorção ligado à enzima (ELISA).

### **3.6 Análise Bioquímica**

Após a coleta do sangue, uma alíquota de 500  $\mu$ L do sangue total foi colocada em microtubos contendo gel separador e ativador de coágulo marca Biocon® para as análises bioquímicas. Logo após a coagulação nos tubos para análise bioquímica, os mesmos foram centrifugados em micro centrífuga marca ZENTRIFUGEN® modelo MIKRO20 a 13000 rpm por 10 minutos para separação do soro. Após a centrifugação, o soro foi coletado em tubos de polipropileno de 0,5 mL. Até a realização das análises as amostras de soro foram acondicionadas em placas de gelo. O sangue foi analisado pela plataforma do Instituto de Ciências e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) na FIOCRUZ. Para as análises bioquímicas foram dosados os seguintes parâmetros: glicose, ácido úrico, albumina, AsparatoAminotransferase (AST), creatina quinase, fosfatase alcalina, colesterol e proteínas totais. Os parâmetros bioquímicos foram dosados através do aparelho marca JHONSON E JHONSON®.

### **3.7 Dosagem de proteínas (BCA)**

Para realização do ensaio de ELISA, é necessário realizar uma etapa prévia para quantificar as proteínas presentes nas amostras analisadas. Para isso, as amostras do encéfalo foram extraídas dos animais e homogeneizadas em tampão apropriado para o ensaio de ELISA. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método BCA (Pierce, Thermo Scientific, EUA). O reagente de trabalho foi preparado adicionando-se cinquenta partes de Reagente BCA A e uma parte de Reagente BCA B. Uma curva padrão (de 0,01562 a 2 mg/mL) foi construída através de diluições seriadas a partir de albumina humana fornecida pelo fabricante.

As amostras totais homogeneizadas foram diluídas 10 vezes numa solução de PBS, de modo que 10  $\mu$ L de cada amostra foram adicionados em 90  $\mu$ L de PBS. Em seguida, 10 $\mu$ L das amostras que já foram diluídas foram pipetadas em placas de 96 poços de fundo chato e, posteriormente, adicionados 190  $\mu$ L do reagente descrito acima. A placa foi incubada em estufa a 37°C por trinta minutos, e após isso a placa passou por uma leitura no

espectrofotômetro, sob o comprimento de onda de 562 nm (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Catalog Number 23225).

### **3.8 Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA)**

Para avaliar possíveis alterações morfofuncionais no SNC, após a dosagem de proteínas realizada pelo método BCA (Pierce, Thermo Scientific, EUA), foi dosado o nível da neurotrofina BDNF, em amostras de encéfalo dos diferentes grupos experimentais, pelo kit R&D dual set, através da colaboração com o Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. Para isso, foram utilizadas placas de fundo chato para ensaio em volume reduzido, que foram cobertas com o anticorpo de captura diluído em PBS (50 µL/poço). Após incubação por 16 horas a 4°C, as placas foram lavadas 4 vezes com tampão de lavagem (PBS Tween® 0,05%) (100µL/poço) e incubadas durante uma hora com a tampão de bloqueio (PBS com 1% de albumina sérica bovina-BSA) (100 µL/poço) (Sigma Aldrich). A curva padrão foi diluída em tampão de bloqueio + Tween® (0,05%) e aplicada na placa, bem como as amostras (50 µL/poço). Após nova incubação por 16 horas a 4°C as placas foram lavadas 4 vezes com tampão de lavagem e o anticorpo de detecção diluído em tampão de bloqueio + Tween® (0,05%) (50 µL/poço) foi adicionado. Uma hora após a incubação com o anticorpo de detecção, as placas foram lavadas 6 vezes com tampão de lavagem e foi adicionada a solução de streptavidina-peroxidase (R&D dual set) (50 µL/poço). Trinta minutos após a incubação no escuro, as placas foram lavadas 8 vezes com tampão de lavagem e foi adicionada a solução de Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma Aldrich), substrato para a reação colorimétrica. Após desenvolvimento satisfatório de cor (coloração azul adequada) na curva-padrão, a reação foi interrompida com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,4N (50 µL/poço) e foi realizada a leitura da placa no espectrofotômetro, sob o comprimento de onda de 405nm (ELISA guide, Copyright © 2023 Abcam).

### **3.9 Caracterização Fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

Para realizar a caracterização fitoquímica das diferentes marcas de Passiflora, foi utilizada a metodologia de CCD descrita na Farmacopeia Britânica (2011), através da colaboração com o Laboratório de Produtos Naturais para a Saúde Pública de Farmanguinhos/FIOCRUZ. O ensaio preconizado na Farmacopeia Britânica é utilizado para extratos secos produzidos a partir de *P. incarnata*. Adaptamos o método para realizá-lo em



comprimidos de Passiflora. Sendo assim, os comprimidos foram triturados e 0,25g foi pesado e solubilizado em 5 mL de metanol. Após solubilização, foi feita a filtragem em papel de filtro. Como fase estacionária foi utilizada placa de TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) contendo 10 centímetros. A fase móvel de 10 mL utilizada era composta por ácido fórmico, água, metiletilcetona e acetato de etila, nas proporções 1:1:3:5 (V/V). A substância de referência utilizada foi a Passiflora referência usada em todo estudo. Foram aplicados cerca de 5 µL de amostra em suas respectivas bandas, e após secagem, a placa foi colocada em uma cuba de vidro, e em seguida a fase móvel foi adicionada. Após 15 minutos, o solvente atinge o limite máximo, a placa é removida e segue para uma nova secagem. Para revelação, uma solução de 10g/L de éster aminoetílico do ácido difenilbórico em 1% de metanol é pulverizada na placa, e em seguida, a solução de 50 g/L de macrogol 400 em metanol também é pulverizada na placa. Após isso a placa permanece em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos para secagem, e por fim, a mesma é examinada em luz ultravioleta a 365 nm para identificação dos cromatogramas obtidos e suas zonas de fluorescência.

### **3.10 Determinação do Peso Médio**

Para avaliar o parâmetro físico de peso médio das diferentes marcas de Passiflora, foi utilizada a metodologia descrita na 6ª Edição da Farmacopeia Brasileira. No caso da forma farmacêutica em dose unitária de comprimidos revestidos tendo um peso médio superior a 250 mg ou mais, o limite de variação estabelecido é de  $\pm 5\%$ . Sendo assim, 10 unidades de comprimido de cada marca foram pesados individualmente em balança analítica, seguido da realização do cálculo da média e determinação dos limites inferiores e superiores (onde pode haver até 2 unidades fora do padrão) e limites inferiores e superiores do dobro da porcentagem indicada ( $\pm 5\%$ , onde não pode haver nenhuma unidade fora do padrão). A pesagem e todos os cálculos foram feitos para a Passiflora de referência e também para os outros 3 fabricantes distintos.

### **3.11 Ensaios de controle de qualidade microbiológicos**

As amostras de medicamentos comerciais de *Passiflora incarnata* foram analisadas através de uma série de ensaios microbiológicos, com a finalidade de saber se essas amostras estavam seguindo os padrões estabelecidos na Farmacopeia Brasileira. Os comprimidos de cada marca foram triturados e 1g de cada marca foi pesada e separada para os testes

subsequentes. Foi realizada a contagem total de bactérias aeróbias e de fungos/leveduras, assim como a investigação da presença de Enterobactérias, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e bactérias gram negativas e bile tolerantes, utilizando as metodologias descritas na Farmacopeia Brasileira 6ª ed (2019d).

Realizando uma diluição seriada ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ), 1g das amostras foi diluído em 9 mL de caldo caseína. Utilizando o método de semeadura em profundidade, 1 mL de cada diluição foi colocado no fundo de uma placa de Petri e cobertos com 15 mL do Ágar Triptona de Soja (TSA), para determinação do número de bactérias aeróbicas. As diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  também foram semeadas por profundidade utilizando 15 mL do Ágar Sabouraud-dextrose (SAB), para a determinação de fungos e leveduras. Após solidificação do ágar, que até o momento da semeadura estavam sendo mantidos de 45 a 50 °C em banho-maria, as placas foram vertidas e incubadas (TSA por 5 dias a 32,5 °C e SAB por 7 dias a 22,5 °C) (Brasil, 2019d).

Para a investigação da presença de patógenos específicos, após 24h de incubação do caldo caseína contendo a amostra  $10^{-1}$ , uma alíquota de 1 mL foi adicionada a 100mL de caldo MacConkey; uma alíquota de 1 mL foi adicionada a 10 mL de caldo Mossel obtendo-se a diluição  $10^{-1}$  e em seguida 1 mL da diluição  $10^{-1}$  do caldo Mossel foi passada para mais 10 mL de caldo obtendo-se a diluição  $10^{-2}$ ; e outra alíquota de 0,1 mL foi adicionada a 10 mL do caldo Rappaport. Depois da incubação de todos os caldos a 32,5 °C por 24-48h foi realizada a semeadura por esgotamento de superfície nos seguintes meios de cultura sólidos: ágar MacConkey, ágar xilose lisina desoxicolato (XLD), ágar violeta vermelho neutro glicose (VRBG), ágar salmanitol, ágar cetrimida e ágar TSA. (Brasil, 2019d).

Para identificação das espécies que cresceram nos meios de cultura para pesquisa de bactérias, foram realizados testes confirmatórios, como a coloração de gram, prova da catalase, prova de oxidação/fermentação da glicose e prova da coagulase. Já nos meios para crescimento de fungos, foi realizada a determinação morfológica para identificação do microrganismo presente nas amostras.

### **3.12 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram analisados através do programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, inc.). Para a realização das análises estatísticas, foram realizadas: análises descritivas de média, desvio-padrão, erro padrão da média (variação interquartil, quando aplicável). Para os dados do modelo de LCE, CV, análise bioquímica e ELISA, as

análises foram feitas por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Em todas as análises, foram considerados estatisticamente significativos valores de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

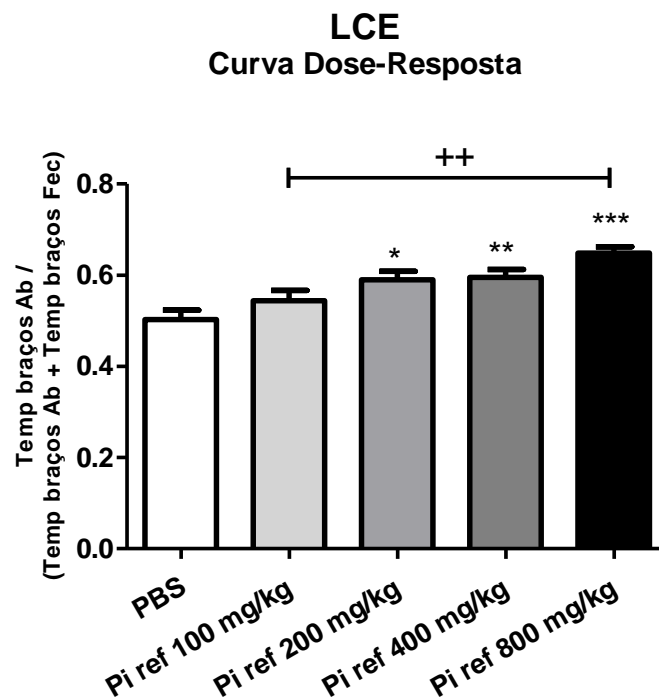
### 4.1 Tratamento com diferentes doses de *Passiflora incarnata* de referência e sua respectiva curva de Dose-Resposta no LCE

No presente estudo, os camundongos machos Swiss Webster foram utilizados para analisar a eficácia do tratamento com fitoterápicos de *Passiflora incarnata* na ansiedade. Para este primeiro ensaio, com o objetivo de traçar uma curva dose-resposta, os animais foram tratados com a *Passiflora* referência (Pi ref) nas doses de 100, 200, 400 e 800 mg/kg, 1 hora antes de serem submetidos ao teste LCE.

A figura 11 demonstra o resultado obtido e a definição da curva dose-dependente, ou seja, quanto maior a dose, maior o efeito ansiolítico observado, representado pelo aumento no tempo de permanência nos braços abertos. Os grupos tratados com as doses de 200, 400 e 800 mg/kg apresentaram aumento significativo quando comparados ao controle PBS. Além disso, foi possível observar uma diferença significativa entre as doses de 100 e 800 mg/kg.

Reginatto e colaboradores (2006) realizaram o mesmo ensaio com as espécies de *Passiflora edulis* e *Passiflora alata*, com as mesmas concentrações de 200, 400 e 800 mg/kg e encontraram dados semelhantes, o que corrobora os dados obtidos no presente estudo. Sampath *et al.* (2011) analisou os efeitos ansiolíticos de frações obtidas de *Passiflora incarnata* utilizando doses de 150, 300 e 700 mg/kg, e os resultados de permanência nos braços abertos encontrados no teste LCE foram iguais ou até maiores que o grupo controle positivo Diazepam, comprovando a ação ansiolítica da espécie.

Figura 11 – Obtenção da curva dose-resposta da *Passiflora* referência nas doses de 100, 200, 400 e 800 mg/kg no teste do Labirinto em Cruz Elevado, n=20/grupo. Diferença estatística entre os grupos tratados versus PBS é representado por \* e diferença estatística entre o grupo tratado com Pi Ref 100 mg/kg versus Pi Ref 800 mg/kg é representado por ++.  $p < 0,05$ . One-Way ANOVA seguido do pós-teste de múltiplas comparações Tukey



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

#### 4.2 O tratamento com diferentes doses de *Passiflora incarnata* de referência não impactou na deambulação total mas aumentou os níveis de *head-dipping* no teste CV

Para observar se houve diminuição do estado de alerta, gerando um efeito ansiolítico, analisamos as diferentes concentrações de *Passiflora* referência no teste do Campo Vazado, para determinar o deslocamento dos animais pelo artefato. Através desse teste também é possível quantificar o número de vezes que o animal realiza o *head-dipping*, um comportamento indicativo de neofilia. Animais menos ansiosos tendem a estar mais dispostos a explorar livremente o artefato e conseqüentemente realizar *head-dipping*.

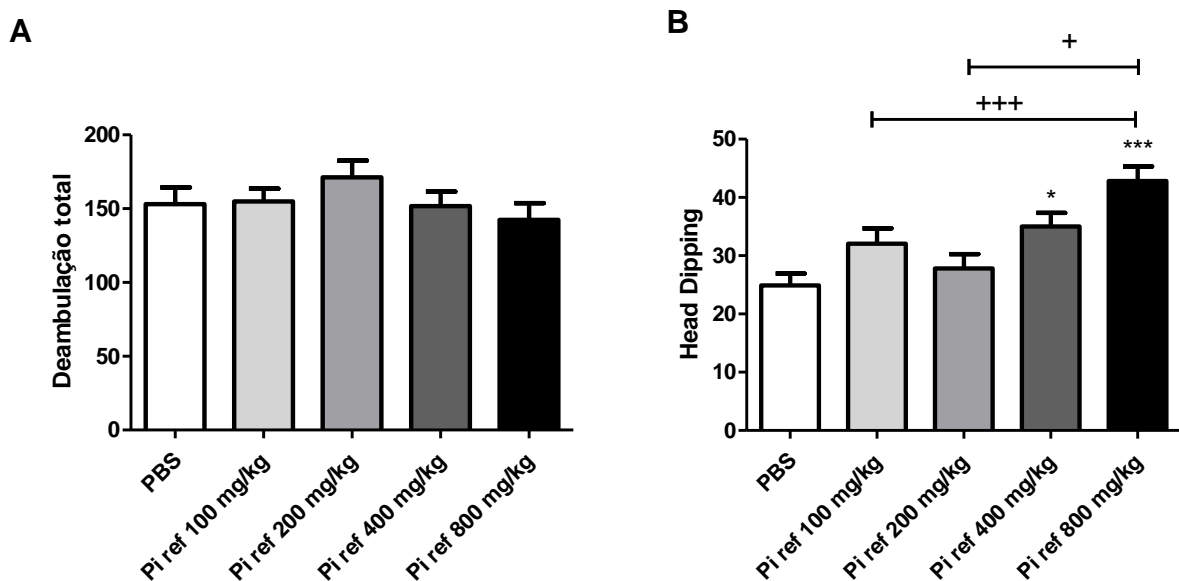
Como resultado foi observado que não houve nenhuma alteração significativa na deambulação total entre os diferentes grupos experimentais, sendo assim, todos os animais percorreram de forma uniforme o aparato (Figura 12A). Em contrapartida, os animais dos grupos tratados com as doses de 400 e 800 mg/kg demonstraram um aumento significativo na

quantificação de *head-dipping*, quando comparados ao grupo controle. A dose de 800 ainda apresentou diferença estatística com relação às doses de 100 e 200 mg/kg (Figura 13B).

De Castro e colaboradores (2007) observaram que o tratamento com extrato hidroalcolico de *Passiflora quadrangularis* na dose de 500 mg/kg levou ao aumento do número de *head-dipping* realizado pelos animais no teste do campo vazado, apresentando resultado semelhante ao grupo controle positivo Diazepam.

Um estudo recente mostrou os efeitos ansiolíticos de diferentes espécies brasileiras de *Passiflora* no teste do campo vazado. Nesse modelo, a *Passiflora incarnata* foi usada como controle positivo, e as demais espécies foram testadas observando a locomoção e busca por novidade dos animais. Algumas espécies reduziram a atividade locomotora dos camundongos, enquanto outras não interferiram nessa medida, que foi justamente o que ocorreu no presente estudo. Além disso, *P. sidaefolia* diminuiu o comportamento ansioso dos animais sendo caracterizado pelo aumento do *head-dipping*, de forma semelhante ao controle positivo, sem afetar a motricidade total (Sekalem *et al.*, 2022).

Figura 12 – Efeito do tratamento com *Passiflora* referência nas doses de 100, 200, 400 e 800 mg/kg na deambulação total dos animais (A) e na quantificação de *head-dipping* (B) no teste do Campo Vazado. n=20/grupo. Diferença estatística entre os grupos tratados versus PBS é representado por \* e diferença estatística entre os grupos tratados com Pi Ref é representado por +. \*p<0,05. One-Way ANOVA seguido do pós-teste de múltiplas comparações Tukey



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

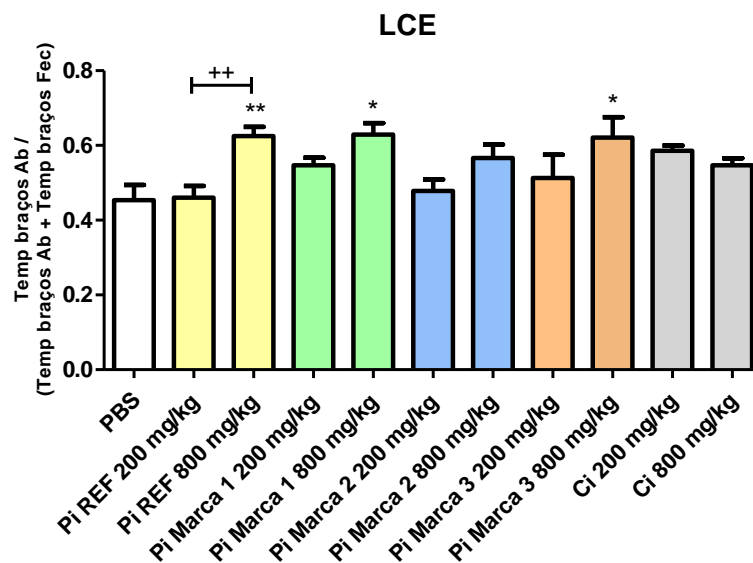
### **4.3 O tratamento com Passiflora Referência versus Marcas distintas resultou em diferenças no comportamento dos animais submetidos ao teste LCE**

Dando seguimento ao desenho experimental do projeto, foi realizado um novo teste de LCE, só que agora comparando a Passiflora referência com mais 3 marcas distintas de Passiflora, além do grupo Ci, onde os animais foram tratados com um produto natural não ansiolítico, a Castanha da Índia, funcionando como um controle negativo.

Como resultado, foi observado um desempenho semelhante entre todos os fabricantes de Passiflora, onde as doses de 200 mg/kg não apresentaram diferenças quando comparadas ao controle PBS, e as doses de 800 mg/kg por sua vez demonstraram um aumento significativo do tempo de permanência nos braços abertos (Figura 13), indicando ser uma dose suficiente para gerar os efeitos ansiolíticos. Esse panorama só não se repetiu na Marca 2, onde não foi observado nenhuma diferença estatística em nenhuma das doses. O grupo Ci também não apresentou resultados estatisticamente relevantes.

Esses dados estão de acordo com a literatura, uma vez que a dose considerada padrão para o tratamento da ansiedade é de pelo menos 400 mg/kg. De acordo com estudos anteriores e com as bulas do medicamento comercializado, a indicação do extrato da Passiflora para seres humanos de aproximadamente 70kg são 4 drágeas ao dia, correspondendo a 400 mg do extrato. Reginatto *et al.* (2006) demonstrou que extratos de *P. edulis* nas doses de 400, 640 e 800 mg/kg aumentaram significativamente o tempo dos animais nos braços abertos no teste LCE e apenas a dose de 200 mg/kg testada não alterou nenhum dos parâmetros analisados, como número de entradas e saídas dos braços e tempo de permanência nos braços fechados e abertos, o que indica que os efeitos ansiolíticos só são observados em doses maiores que 200 mg/kg.

Figura 13 – Efeito do tratamento com Passiflora referência e marcas 1, 2 e 3 de Passiflora nas doses de 200 e 800 mg/kg no teste do Labirinto em Cruz Elevado. O grupo Ci representa um controle negativo, onde os animais foram tratados com um produto natural não ansiolítico, a Castanha da Índia. n=7-14/grupo. Diferença estatística entre os grupos tratados versus PBS é representado por \* e diferença estatística entre os grupos tratados com Pi Ref é representado por +. \*p<0,05. One-Way ANOVA seguido do pós-teste de múltiplas comparações Tukey



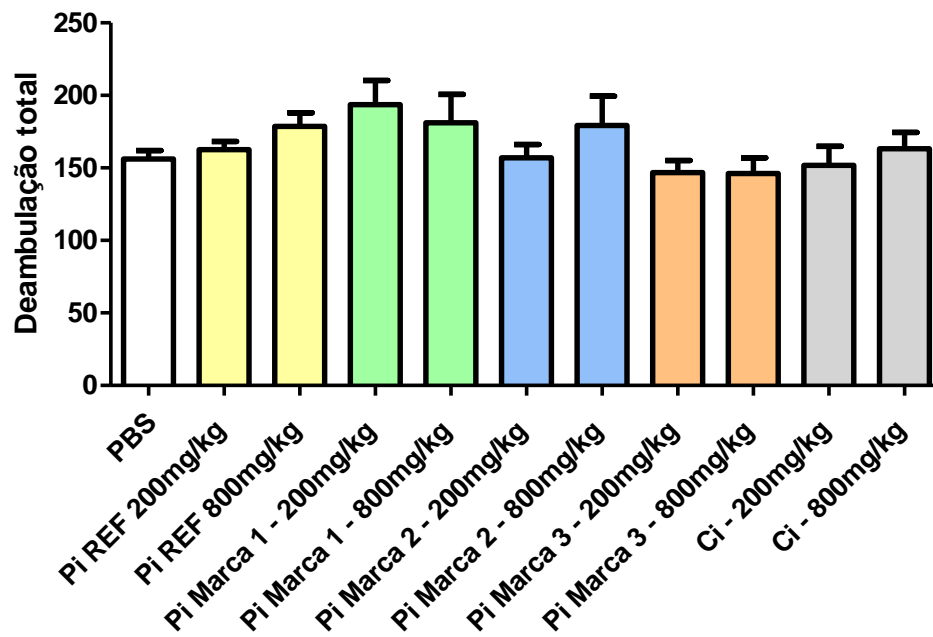
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

#### 4.4 A administração de Passiflora Referência versus Marcas distintas resultou em diferenças no comportamento dos animais submetidos ao teste CV

De forma semelhante aos achados do experimento da curva dose-resposta com Passiflora de referência no Campo Vazado, foi observado novamente que não houve nenhuma alteração significativa na deambulação total entre os fabricantes distintos de Passiflora, controle PBS e controle Ci (Figura 14). Esse fato pode ser explicado porque a dose de 200 mg/kg não é suficiente para interferir na atividade locomotora dos animais, enquanto a dose de 800 mg/kg, por representar uma alta dose, pode estar gerando efeitos sedativos que mascaram a ação ansiolítica. Muitos estudos associam o uso de fitoterápicos a base de valeriana, maracujá, erva-cidreira e outras plantas para o tratamento de distúrbios do sono, justamente devido a suas características sedativas (Rogério; Ribeiro, 2021).



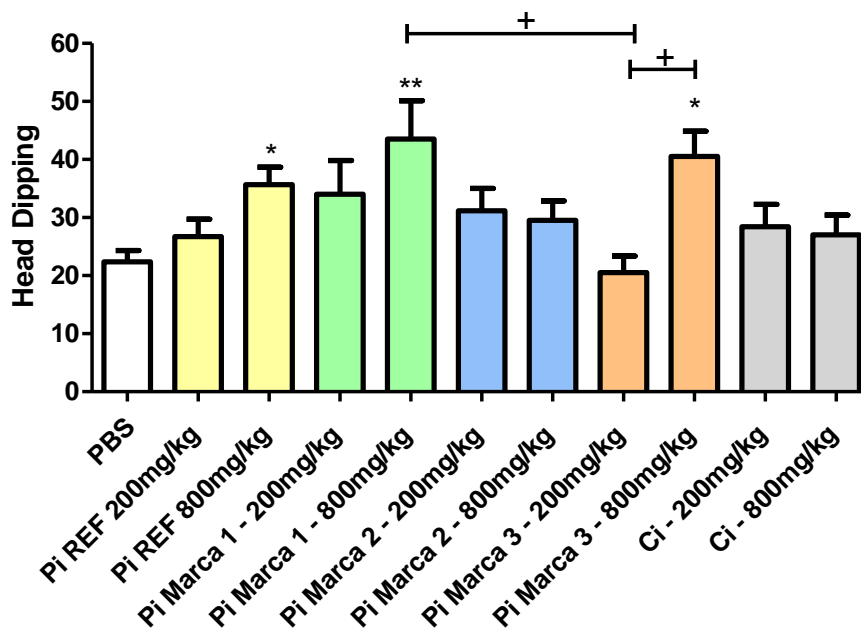
Figura 14 – Efeito do tratamento com Passiflora referência e marcas 1, 2 e 3 de Passiflora nas doses de 200 e 800 mg/kg no teste do Campo Vazado, analisando a deambulação total. O grupo Ci representa um controle negativo, onde os animais foram tratados com um produto natural não ansiolítico, a Castanha da Índia. n=7-14/grupo. \*p<0,05. One-Way ANOVA seguido do pós-teste de múltiplas comparações Tukey



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Apesar de não haver diferenças estatísticas entre os grupos experimentais no quesito de quadrantes percorridos no artefato, mais uma vez foi possível observar aumento significativo da quantidade de vezes que os animais realizaram *head-dipping* em todas as doses de 800 mg/kg de Passiflora, com exceção da Marca 2. Os grupos Pi ref, Marca 1 e Marca 3 na dose de 800 mg/kg apresentaram aumento significativo importante. Na Marca 3 observamos também uma diferença entre a dose de 200 e de 800 mg/kg (Figura 15). Todos esses resultados corroboram os dados anteriores e confirmam a hipótese de que a dose de 200 mg/kg é muito baixa para resultar em efeitos ansiolíticos, e a dose de 800 mg/kg costuma funcionar muito bem e apresentar tal ação, como exemplificado pelo fato dos animais estarem explorando livremente o artefato e pela busca por novidade pelos animais (*head-dipping*).

Figura 15 – Efeito do tratamento com Passiflora referência e marcas 1, 2 e 3 de Passiflora nas doses de 200 e 800 mg/kg no teste do Campo Vazado, analisando a quantificação de *head-dipping*. O grupo Ci representa um controle negativo, onde os animais foram tratados com um produto natural não ansiolítico, a Castanha da Índia. n=7-14/grupo. Diferença estatística entre os grupos tratados versus PBS é representado por \* e diferença estatística entre os grupos tratados com Pi é representado por +. \*p<0,05. One-Way ANOVA seguido do pós-teste de múltiplas comparações Tukey



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Apenas a Marca 2 apresentou resultados que destoam dos demais nos dois modelos experimentais (LCE e CV), e com esses achados podemos inferir que existe alguma diferença no processo produtivo e/ou nos componentes químicos dos fabricantes distintos de Passiflora. Seja na concentração da substância, ou na composição fitoquímica como um todo, pode haver alguma discrepância no processo de fabricação desses fitoterápicos que justificam os resultados ansiolíticos variados observados nos testes neurocomportamentais propostos no presente estudo. É importante então avaliar a composição química dos mesmos para determinar o que de fato pode estar ocasionando essa distinção no efeito ansiolítico.

Além dos parâmetros avaliados nos testes neurocomportamentais propriamente ditos, foram analisados os comportamentos etológicos (*stretching* (esticamento horizontal), *rearing* (levantamento vertical) e *grooming* (autolimpeza do corpo)) dos roedores submetidos aos ensaios LCE e CV. Como resultado, não houve alterações significativas nos parâmetros investigados em nenhum dos testes (dados não mostrados).

#### 4.5 O tratamento com *Passiflora* referência e seu impacto nos parâmetros bioquímicos

Os animais pertencentes aos grupos experimentais foram eutanasiados e amostras de soro foram recolhidas para posterior análise bioquímica, de forma a avaliar se o tratamento com *Passiflora incarnata* gera alterações nos parâmetros bioquímicos.

Os parâmetros analisados foram: glicose, ácido úrico, albumina, AST, creatina quinase, fosfatase alcalina, colesterol e proteínas totais. O Quadro 2 apresenta os valores obtidos com as amostras do experimento realizado apenas com a *Passiflora* referência nas doses de 100, 200, 400 e 800 mg/kg. Os valores de glicose encontram-se aumentados quando comparados aos valores de referência, e isso pode ser explicado pelo fato de que os animais não foram mantidos em jejum antes da eutanásia. Apesar disso, não houve diferença estatística desse parâmetro entre os grupos. De todos os marcadores analisados, foi observado uma diminuição significativa para AST nos grupos de 200, 400 e 800 mg/kg e para creatina quinase no grupo de 200 mg/kg quando comparadas ao grupo controle PBS. Apesar dessa redução, os valores encontrados estão dentro da faixa de normalidade de acordo com os valores de referência.

Quadro 2 – Resultados obtidos pós análise bioquímica do soro dos diferentes grupos experimentais tratados com *Passiflora* referência nas doses de 100, 200, 400 e 800 mg/kg, n=5-7/grupo. \*p<0,05. One-Way ANOVA seguido do pós-teste de múltiplas comparações Tukey

Parâmetros	PBS	Pi Ref 100mg/kg	Pi Ref 200mg/kg	Pi Ref 400mg/kg	Pi Ref 800mg/kg	Valores de Referência
Glicose (mg/dL)	300 ± 15	316 ± 17	277 ± 14	290 ± 11	267 ± 12	90 - 192
Ácido Úrico (mg/dL)	2,9 ± 0,3	3,5 ± 0,3	3,1 ± 0,3	3,0 ± 0,2	2,6 ± 0,3	1,7 - 5,4
Albumina (g/dL)	1,8 ± 0,0	1,8 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,0	2,5 - 4,8
AST (U/L)	87 ± 3	90 ± 2	73 ± 4 **	62 ± 3 ***	69 ± 5 **	59 - 247
Creatina Quinase (U/L)	143 ± 18	134 ± 15	102 ± 10 *	128 ± 18	142 ± 22	68 - 1070
Fosfatase Alcalina (U/L)	240 ± 8	229 ± 8	229 ± 15	236 ± 9	213 ± 7	62 - 209
Colesterol (mg/dL)	102 ± 8	103 ± 4	98 ± 4	95 ± 4	88 ± 4	36 - 96
Proteínas Totais (g/dL)	4,0 ± 0,0	3,7 ± 0,1	3,9 ± 0,0	4,0 ± 0,1	3,8 ± 0,1	3,6 - 6,6

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A enzima hepática AST e sua elevação em análises bioquímicas estão relacionadas com lesões e doenças no fígado. Neste estudo, notou-se uma redução sérica desse parâmetro

bioquímico nos grupos tratados com Pi ref. Um estudo utilizando *P. alata* como tratamento realizou investigação bioquímica e constatou diminuição sérica nos níveis de ALT (alanina aminotransferase), outra enzima hepática e marcador de dano no fígado (Braga *et al.*, 2013). Os pesquisadores encontraram também alterações histopatológicas, caracterizada por uma degeneração hidrópica, resultado de uma falha na homeostase de líquidos que leva a um acúmulo de água intracelular. Esse tipo de degeneração é um estágio reversível e não leva à lise celular, portanto não representa tanto risco. Entretanto, estudos sugerem que a redução dos níveis séricos de ALT/AST indicam diminuição na síntese dessas enzimas. A regulação negativa dessas enzimas pode afetar a capacidade do fígado para metabolizar aminoácidos e consequentemente prejudicar a produção de energia para o funcionamento celular, limitando a capacidade dos hepatócitos (Solter; Liu; Guzman, 2000). Sendo assim, a redução dos níveis séricos de AST/ALT pode representar toxicidade das substâncias da Passiflora.

Foi possível detectar uma diminuição significativa da enzima creatinina quinase (CK) no grupo Pi REF 200 mg/kg. Essa proteína está presente nos tecidos e células demandantes de energia, como os músculos, e é produzida no organismo de acordo com a quantidade de massa muscular. É considerada um marcador para detecção e monitoramento de doenças do músculo esquelético. Nas doenças como distrofia muscular de Duchenne, polimiosite e dermatomiosite, esta enzima está aumentada. Sua redução por sua vez, está associada à diminuição da massa muscular, portanto, indivíduos que possuem menos massa muscular e que realizam pouca atividade física, como idosos e pessoas doentes, costumam apresentar níveis séricos de CK reduzidos (Nogueira *et al.*, 2019). Não é possível determinar ao certo o que causou a atenuação de CK no grupo Pi REF 200 mg/kg, mas a própria diminuição de AST e o provável dano hepático presente nesses animais podem explicar a condição irregular nesse grupo experimental e, portanto, uma alteração em outro parâmetro bioquímico. Dados da literatura correlacionam danos musculares e hepáticos associados, que causam alterações nos níveis séricos de CK e AST (Ahmetov *et al.*, 2014).

#### **4.6 O tratamento com Passiflora referência versus Marcas distintas e seu impacto nos parâmetros bioquímicos**

A metodologia seguida foi a mesma que a descrita no resultado anterior, mas dessa vez, foram comparadas as amostras dos grupos tratados com Passiflora referência e com as 3 marcas distintas de Passiflora, além de incluir também o grupo tratado com a Castanha da Índia nas doses de 200 e 800 mg/kg (Quadros 3 e 4).

De forma semelhante aos dados anteriores, os valores de glicose continuaram aumentados quando comparados aos valores de referência, já que os animais não foram submetidos ao jejum antes da eutanásia. Dessa vez, foi observado um aumento significativo de glicose nos grupos da Pi Marca 2 nas duas doses (200 e 800 mg/kg), indicativo que nessa marca, pode estar presente na composição química do medicamento, muitos compostos açucarados, tais como componentes do revestimento dos comprimidos. Ou ainda, que essa marca influencia em sistemas do organismo que resultam nesse aumento de glicose. Nesse caso, os valores encontrados estão acima dos limites de normalidade. O grupo Pi Marca 2 na dose de 800 mg/kg também apresentou diminuição significativa de AST, como visto no ensaio anterior, indicando um potencial efeito tóxico das substâncias presentes nessa marca de Passiflora (Braga *et al.*, 2013).

Notou-se ainda que houve uma redução estatística no nível de glicose para o grupo Ci 800 mg/kg, mas ainda acima dos valores de referência. Curiosamente, nos grupos Ci 200 e 800 mg/kg houve um acréscimo significativo de CK quando comparados ao grupo controle PBS. Apesar disso os valores encontrados estão dentro da faixa de referência.

Quadro 3 – Resultados obtidos pós análise bioquímica do soro dos diferentes grupos experimentais tratados com Passiflora ref e Marcas distintas nas doses de 200 e 800 mg/kg. <sup>1</sup>

Parâmetros	PBS	Pi Ref 200mg/kg	Pi Ref 800mg/kg	Pi Marca 1 200mg/kg	Pi Marca 1 800mg/kg	Valores de Referência
Glicose (mg/dL)	270 ± 9	237 ± 13	262 ± 13	305 ± 22	247 ± 13	90 - 192
Ácido Úrico (mg/dL)	3,2 ± 0,4	2,4 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,7 ± 0,4	2,7 ± 0,4	1,7 - 5,4
Albumina (g/dL)	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,0	2,2 ± 0,0	2,3 ± 0,0	2,1 ± 0,0	2,5 - 4,8
AST (U/L)	93 ± 13	93 ± 10	95 ± 8	120 ± 15	83 ± 10	59 - 247
Creatina Quinase (U/L)	95 ± 12	72 ± 13	95 ± 14	187 ± 20	100 ± 23	68 - 1070
Fosfatase Alcalina (U/L)	299 ± 10	343 ± 13	323 ± 15	301 ± 14	308 ± 14	62 - 209
Colesterol (mg/dL)	95 ± 5	95 ± 5	102 ± 4	98 ± 4	102 ± 5	36 - 96
Proteínas Totais (g/dL)	3,9 ± 0,1	4,0 ± 0,1	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,0	4,0 ± 0,0	3,6 - 6,6

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

<sup>1</sup> O grupo Ci representa um controle negativo, onde os animais foram tratados com um produto natural não ansiolítico, a Castanha da Índia. n=5-7/grupo. \*p<0,05. One-Way ANOVA seguido do pós-teste de múltiplas comparações Tukey.

Quadro 4 – Resultados obtidos pós análise bioquímica do soro dos diferentes grupos experimentais tratados com Passiflora ref e Marcas distintas nas doses de 200 e 800 mg/kg.<sup>2</sup>

Parâmetros	Pi Marca 2 200mg/kg	Pi Marca 2 800mg/kg	Pi Marca 3 200mg/kg	Pi Marca 3 800mg/kg	Ci 200mg/kg	Ci 800mg/kg	Valores de Referência
Glicose (mg/dL)	380 ± 14 **	343 ± 33 *	316 ± 21	318 ± 22	268 ± 15	206 ± 14 *	90 - 192
Ácido Úrico (mg/dL)	5,4 ± 0,2	2,4 ± 0,7	4,9 ± 0,5	4,1 ± 0,5	3,1 ± 0,4	1,7 ± 0,4	1,7 - 5,4
Albumina (g/dL)	2,1 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,5 - 4,8
AST (U/L)	61 ± 3	74 ± 2 **	58 ± 3	63 ± 3	87 ± 5	91 ± 8	59 - 247
Creatina Quinase (U/L)	123 ± 11	127 ± 13	116 ± 7	117 ± 8	315 ± 73 **	460 ± 99 ***	68 - 1070
Fosfatase Alcalina (U/L)	311 ± 19	324 ± 15	327 ± 11	297 ± 12	330 ± 15	312 ± 15	62 - 209
Colesterol (mg/dL)	98 ± 5	87 ± 4	94 ± 3	92 ± 5	105 ± 5	99 ± 4	36 - 96
Proteínas Totais (g/dL)	3,9 ± 0,1	3,9 ± 0,1	3,7 ± 0,1	3,7 ± 0,2	4,1 ± 0,1	4,3 ± 0,1	3,6 - 6,6

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Com relação ao aumento significativo de CK nos grupos Ci 200 e 800 mg/kg, pode-se afirmar que, apesar dos valores encontrados ainda estarem dentro da faixa de normalidade, algo pode estar ocorrendo no organismo desses animais. Sabe-se que o consumo de alguns componentes da Castanha da Índia pode levar a efeitos colaterais graves, incluindo sintomas gastrointestinais, tontura, dor de cabeça e tonteira. Um estudo recente mostrou que um paciente que havia ingerido semente de Castanha da Índia apresentou dor abdominal, sudorese e náuseas. Seus parâmetros bioquímicos encontravam-se alterados, e o mais intrigante é que o paciente queixou-se de muitas palpitações e o resultado do eletrocardiograma mostrou fibrilação arterial (Yi; Lee, 2021). Como CK está associada aos músculos, sua alteração em níveis séricos pode estar relacionada a doenças cardíacas, dores no peito e arritmias, como foi o caso do paciente citado acima (Sax *et al.*, 1997). Sendo assim, podemos fazer uma correlação entre o consumo de Castanha da Índia e perturbações nos níveis sistêmicos de CK, como ocorrido no presente estudo.

<sup>2</sup> O grupo Ci representa um controle negativo, onde os animais foram tratados com um produto natural não ansiolítico, a Castanha da Índia. n=5-7/grupo. \*p<0,05. One-Way ANOVA seguido do pós-teste de múltiplas comparações Tukey.

#### **4.7 O impacto da administração de Passiflora nos níveis de BDNF em amostras de tecido cerebral**

De modo a avaliar o efeito do tratamento com Passiflora e sua interferência no SNC, foram analisados os níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) nos diferentes grupos experimentais, uma proteína secretada por inúmeras células, como fibroblastos, megacariócitos/plaquetas e células musculares lisas. É responsável por regular muitos aspectos do desenvolvimento neuronal tendo papel fundamental durante o desenvolvimento do SNC. O BDNF regula a sobrevivência e diferenciação de células-tronco neurais, diferenciação de axônios/dendritos, formação e maturação de sinapses e refinamento de circuitos em desenvolvimento. Seus baixos níveis estão associados à depressão e ansiedade (Silveira da Luz *et al.*, 2013; Haghghat; Rajabi; Mohammadshahi, 2021).

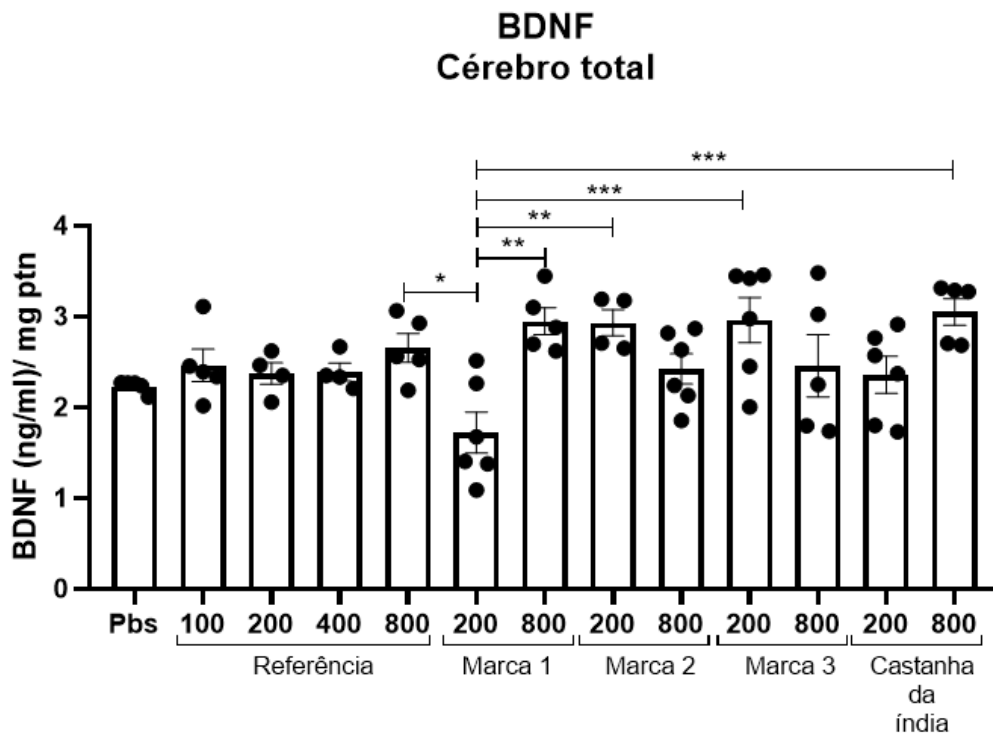
Como foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos nos testes neurocomportamentais, optou-se por realizar um ensaio para análise de possíveis alterações morfofuncionais do SNC. Além disso, os resultados de modelos experimentais de comportamento por si só não são suficientes para compreender de fato o que está ocorrendo no organismo, por isso eles precisam estar sempre relacionados com outras análises que demonstram alguma alteração funcional, como o ELISA de citocinas e proteínas importantes do SNC. Dessa forma, os animais pertencentes aos grupos experimentais foram eutanasiados e amostras do encéfalo foram recolhidas para posterior quantificação dos níveis de BDNF.

Como resultado da avaliação (Figura 16), apenas um grupo gerou dados significativos. A dose de 200 mg/kg da Marca 1 está relacionada a baixos níveis de BDNF e isso pode ser explicado por diversos fatores. Um deles é que esta dose não seria suficiente para manter os níveis de BDNF em normalidade no SNC, contribuindo assim para o desencadeamento da ansiedade. Nenhuma das marcas e doses difere do grupo controle PBS, onde o animal é sadio e, portanto, não apresenta ansiedade. Entende-se então que o tratamento com Passiflora, ao menos mantém os níveis de BDNF estáveis para manter o SNC em homeostase. Em contrapartida, isso não acontece na dose de 200 mg/kg da Marca 1, representando que as substâncias ansiolíticas presentes nesse medicamento com esta dose podem não causar efeitos benéficos. Além disso, a bula de *Passiflora incarnata* descreve que, em seres humanos, é necessário um tratamento de pelo menos 2 meses para que a mesma possa causar seus efeitos. Em nossos experimentos, apesar de utilizarmos um modelo animal com metabolismo muito acelerado, talvez seja necessário aumentar o esquema de tratamento com as marcas de Passiflora para conseguir visualizar a ação real desses fitoterápicos no SNC.

Apesar disso, todas as barras dos grupos tratados com Pi REF e as demais marcas na dose de 800 mg/kg estão um pouco acima da barra do grupo controle PBS, o que pode significar um indicativo de aumento, mesmo não apresentando diferenças estatísticas. Dessa forma, uma outra conclusão que temos é que esse ensaio apresenta uma limitação de “n” experimental reduzido, logo, essa análise precisa ser repetida com amostras maiores, para que possamos ter certeza do que está ocorrendo nesses cenários, e talvez conseguir observar o aumento significativo de BDNF nas doses de 800 mg/kg.

Ademais, sabe-se que BDNF é produzido e secretado em regiões específicas do cérebro, e nossas análises foram feitas com amostras do cérebro total, de forma íntegra. Sendo assim, podemos inferir que o excesso de proteínas e outras substâncias que estão presentes no encéfalo pode ter prejudicado a aferição dos níveis de BDNF, justificando os resultados não conclusivos. Para solucionar esse impasse, esse ensaio precisa ser realizado novamente, porém, a análise precisa ser feita com estruturas específicas do cérebro, como por exemplo o hipocampo (Von Bahlen Und Halbach; Von Bahlen Und Halbach, 2018).

Figura 16 - Efeito da administração de Passiflora nos níveis de BDNF em amostras de tecido cerebral. Avaliação dos níveis de BDNF através de ELISA nos diferentes grupos experimentais, n=6/grupo. One-Way ANOVA seguido do pós-teste de múltiplas comparações Tukey



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).



São poucos os dados da literatura que correlacionam os níveis de BDNF com o tratamento com extratos vegetais, mas um estudo recente mostrou que a administração em diferentes concentrações de algumas plantas, levou a um aumento significativo na expressão de BDNF em células SH-SY5Y. Foram utilizados extratos de *Melissa officinalis* L., *Hypericum perforatum* L., *Passiflora incarnata* L. e *Valeriana officinalis* L., nas doses de 100, 30 e 10 µg/mL. Como resultado, os pesquisadores observaram que o extrato com as partes aéreas de *P. incarnata* foram responsáveis pelo aumento de BDNF em 35,6%, 74,1% ( $p < 0,05$ ) e 56,6% ( $p < 0,05$ ), nas concentrações de 100, 30 e 10 µg/mL, respectivamente (Gonulalan *et al.*, 2020). Sendo assim, o tratamento com *P. incarnata* pode sim interferir na expressão de BDNF e conseqüentemente contribuir para a redução dos transtornos de ansiedade.

#### **4.8 Caracterização do perfil fitoquímico de diferentes marcas de Passiflora por Cromatografia em Camada Delgada**

De acordo com as diferenças observadas nos testes neurocomportamentais, se tornou necessário realizar a caracterização do perfil fitoquímico da Passiflora referência e demais marcas, de modo a identificar possíveis diferenças. Para isso, foi utilizado o método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) preconizada pela Farmacopeia Britânica.

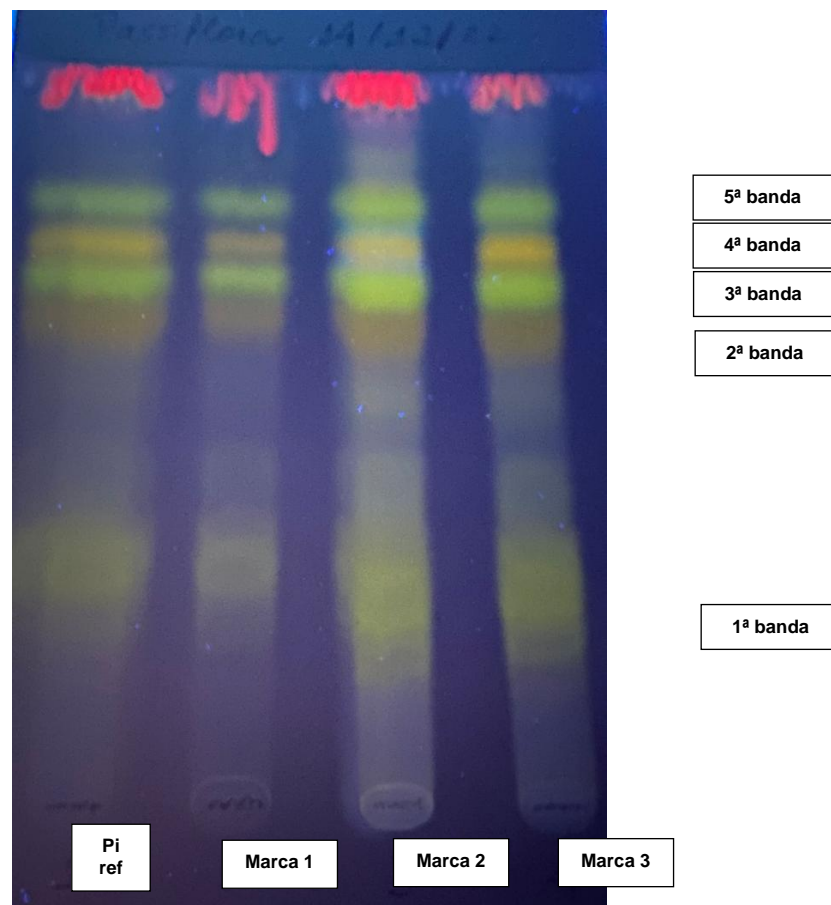
Conforme demonstrado na figura 17, todas as amostras, incluindo a amostra de referência, apresentam o mesmo padrão de corrida e as mesmas bandas com colorações muito semelhantes. O que difere entre elas é a intensidade, sendo a Marca 2 e 3 com bandas coloridas mais intensas. Isso está relacionado com a dosagem com que as marcas estão sendo comercializadas.

Com esse resultado, foi realizado o cálculo de Fator de Retenção (Rf), usado para comparar e auxiliar na identificação dos compostos. O cálculo é feito através da divisão entre a distância percorrida pela banda e a distância total da corrida. Assim, obteve-se os seguintes Rf's: 1ª banda Rf = 0,25; 2ª banda Rf = 0,58; 3ª banda Rf = 0,65; 4ª banda Rf = 0,71; 5ª banda Rf = 0,85. Segundo a literatura, bandas esverdeadas com Rf de aproximadamente 0,7 são características da substância isovitexina e bandas esverdeadas com Rf de 0,8 são indicativos da substância vitexina, que no nosso caso, correspondem a 4ª e 5ª banda respectivamente. Rf de até 0,65 de coloração amarelo-esverdeadas são características de flavanóides C-glicosilados, correspondendo a 1ª, 2ª e 3ª banda em nosso ensaio (Levine, 2018; Santana *et*

al., 2007). Dessa forma, os resultados presentes neste trabalho estão de acordo com os dados já publicados, indicando que todas as marcas analisadas no presente estudo possuem as principais substâncias da *Passiflora*, como a vitexina e isovitexina, que são responsáveis pelo potencial mecanismo de ação do medicamento no organismo.

No geral, pode-se concluir que todas as amostras apresentam um perfil muito parecido por meio do resultado obtido na CCD, e que análises mais específicas precisam ser feitas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para identificar possíveis diferenças na concentração da substância, por exemplo.

Figura 17 – Caracterização do perfil fitoquímico de diferentes marcas de *Passiflora incarnata* por Cromatografia em Camada Delgada, seu padrão de corrida e suas respectivas bandas



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

#### 4.9 Avaliação do parâmetro físico Peso Médio para determinação de qualidade das amostras de *Passiflora* comercializadas

Para abranger todas as áreas do controle de qualidade, além dos testes já mencionados, optou-se por realizar também testes de qualidade preconizados pela

Farmacopeia Brasileira para comprimidos revestidos de *Passiflora*. O objetivo era de avaliar diferentes parâmetros físicos, como peso médio, dissolução, dureza, entre outros. Porém, não existem metodologias validadas disponíveis para realização desses ensaios em comprimidos de *Passiflora incarnata* especificamente, para realizar esses ensaios seria necessário adaptar algum método já existente e validá-lo para a forma farmacêutica estudada. Portanto, devido a limitação logística, foi possível realizar apenas o teste de peso médio com as amostras comerciais.

Seguindo o protocolo descrito na Farmacopeia Brasileira, todos os comprimidos foram pesados, os cálculos de limites estabelecidos foram realizados, e como representado nos quadros a seguir, todas as marcas de *Passiflora* analisadas estão dentro dos limites estabelecidos pelo compêndio oficial.

Quadro 5 – Descrição do peso de cada comprimido pesado em balança analítica para as diferentes marcas, seguidos dos limites superiores e inferiores permitidos. Todas as marcas estão de acordo com a legislação vigente. n=9-10/grupo

Amostras de Pi REF	Peso (mg)
1	578,6
2	587,2
3	579,5
4	576,1
5	579,6
6	581,5
7	578,1
8	579,6
9	578,9
<b>Peso médio</b>	<b>579,9</b>
<b>Limite inferior</b>	<b>550,9</b>
<b>Limite superior</b>	<b>608,9</b>
<b>Limite inferior do dobro da % indicada</b>	<b>521,9</b>
<b>Limite superior do dobro da % indicada</b>	<b>637,9</b>

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Quadro 6 – Descrição do peso de cada comprimido pesado em balança analítica para as diferentes marcas, seguidos dos limites superiores e inferiores permitidos. Todas as marcas estão de acordo com a legislação vigente. n=9-10/grupo

Amostras de Marca 1	Peso (mg)
1	418.7
2	420.3
3	413.9
4	415.2
5	413.1
6	414.5
7	413.8
8	416
9	410.3
10	418.5
<b>Peso médio</b>	<b>416</b>
<b>Limite inferior</b>	<b>395,2</b>
<b>Limite superior</b>	<b>436,8</b>
<b>Limite inferior do dobro da % indicada</b>	<b>374,4</b>
<b>Limite superior do dobro da % indicada</b>	<b>457,6</b>

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Quadro 7 – Descrição do peso de cada comprimido pesado em balança analítica para as diferentes marcas, seguidos dos limites superiores e inferiores permitidos. Todas as marcas estão de acordo com a legislação vigente. n=9-10/grupo

Amostras de Marca 2	Peso (mg)
1	724.8
2	722.8
3	698
4	677.9
5	691.8
6	689
7	703.1
8	703.1
9	706
10	700.2
<b>Peso médio</b>	<b>697,7</b>
<b>Limite inferior</b>	<b>662,8</b>
<b>Limite superior</b>	<b>732,6</b>
<b>Limite inferior do dobro da % indicada</b>	<b>627,9</b>
<b>Limite superior do dobro da % indicada</b>	<b>767,4</b>

Fonte: Elaborado pelo autor (2022),

Quadro 8 – Descrição do peso de cada comprimido pesado em balança analítica para as diferentes marcas, seguidos dos limites superiores e inferiores permitidos. Todas as marcas estão de acordo com a legislação vigente. n=9-10/grupo

Amostras de Marca 3	Peso (mg)
1	819.1
2	804.4
3	808.8
4	808
5	795.9
6	809.1
7	820.7
8	807.5
9	788.5
10	799.5
<b>Peso médio</b>	<b>808</b>
<b>Limite inferior</b>	<b>767,6</b>
<b>Limite superior</b>	<b>848,4</b>
<b>Limite inferior do dobro da % indicada</b>	<b>727,2</b>
<b>Limite superior do dobro da % indicada</b>	<b>888,8</b>

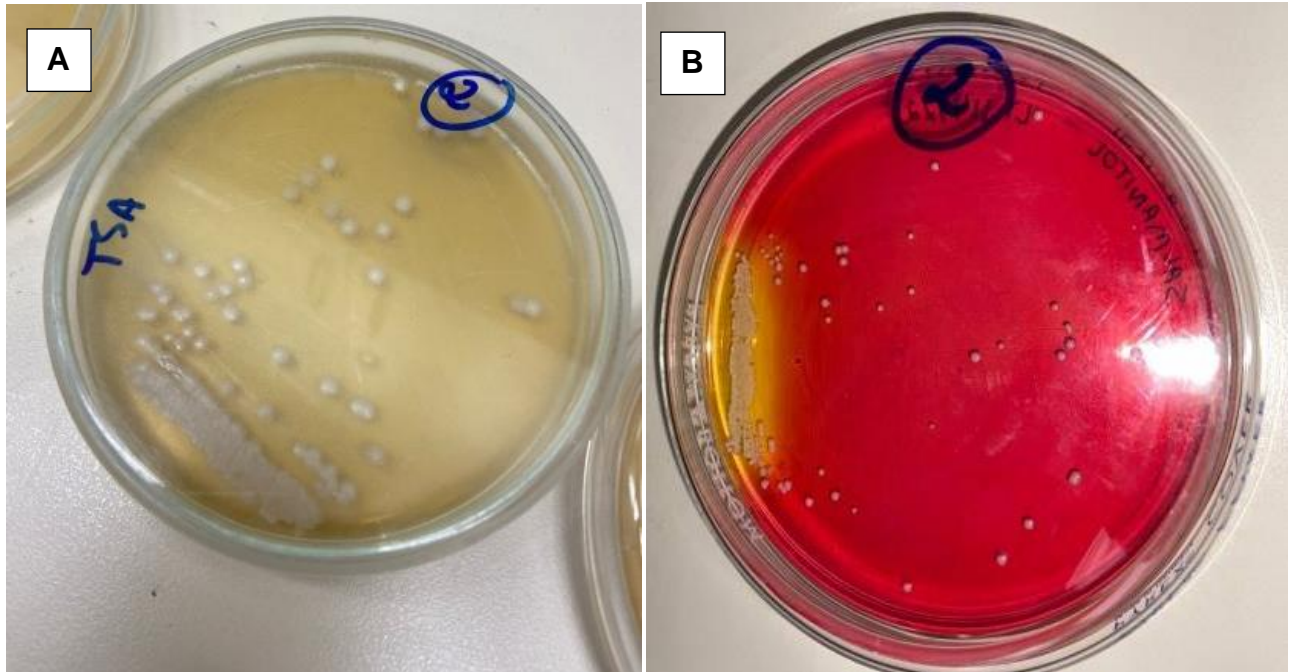
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

#### 4.10 Avaliação da qualidade microbiológica das amostras de Passiflora comercializadas

Por fim, para englobar no presente estudo multidisciplinar uma área do controle de qualidade muito importante, foram realizados os testes de controle de qualidade microbiológicos preconizados pela Farmacopeia Brasileira para comprimidos revestidos de Passiflora.

Como resultado, foi observado crescimento bacteriano apenas na Marca 2 ( $10^3$  UFC/g) nas placas de ágar TSA e de ágar salmanitol (Figuras 18 A e B respectivamente). Para identificação da espécie do microrganismo que havia crescido, foram feitos alguns testes confirmatórios.

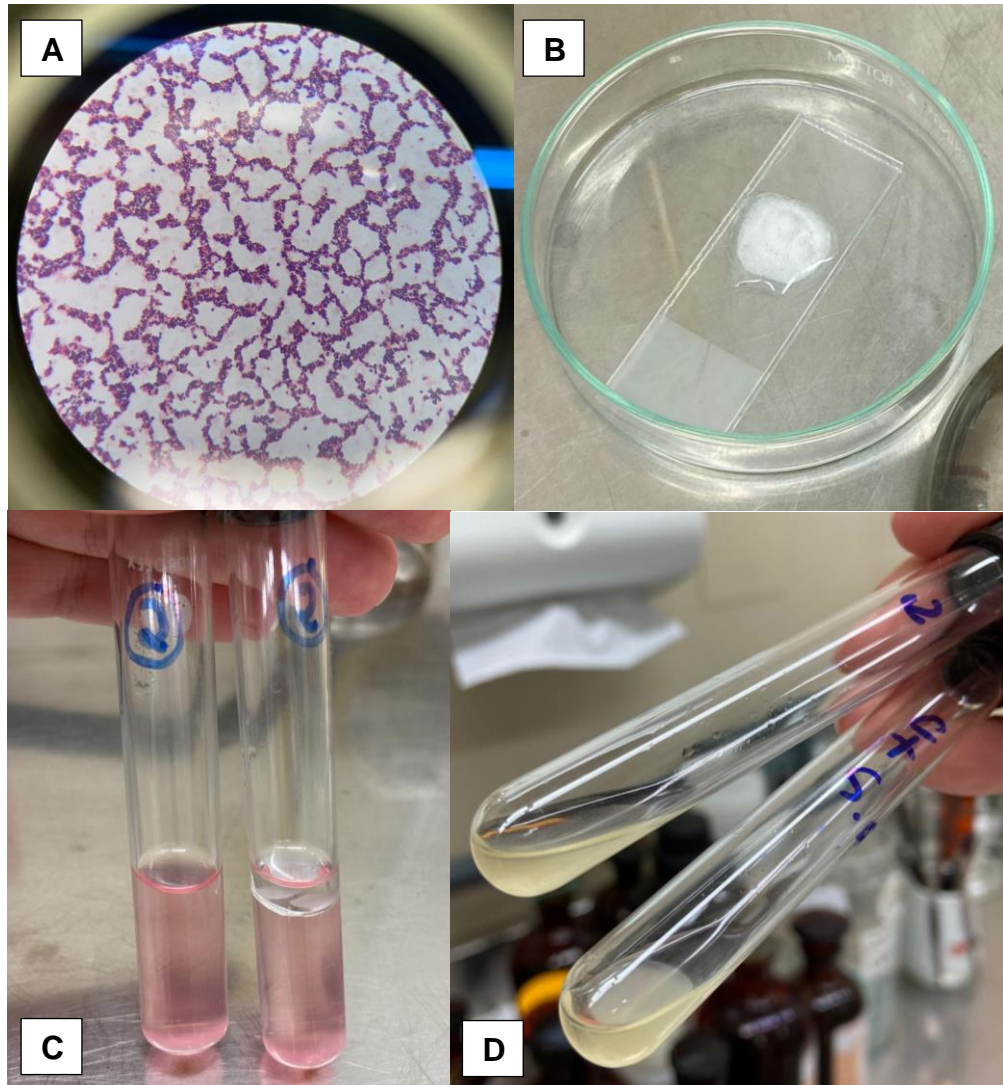
Figura 18 – Crescimento de colônias bacterianas em placas de ágar TSA (A) para o crescimento de bactérias totais e em placas de ágar salmanitol (B) para o crescimento indicativo de *Staphylococcus aureus*



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Iniciou-se pela Coloração de Gram, que teve como resultado presença de Cocos Gram-Positivos (Figura 19A). Em seguida, foi realizada prova da catalase, que apresentou resultado positivo (Figura 19B), excluindo a possibilidade do microrganismo em questão se tratar de um *Streptococcus*. Após isso, foi feita o teste de oxidação/fermentação da glicose, que também apresentou resultado positivo (Figura 19C), descartando a possibilidade do microrganismo pertencer ao gênero *Micrococcus*. Ao final desses testes foi realizada a prova da coagulase, que difere o *Staphylococcus aureus* dos demais. O resultado foi negativo (Figura 19D), concluindo então que o microrganismo presente na amostra era *Staphylococcus epidermidis*.

Figura 19 – Testes bioquímicos para confirmação de gênero e espécie do microrganismo. Coloração de Gram com cocos gram positivos (A), teste da prova da catalase positivo (B), teste da oxidação/fermentação da glicose positivo (C) e prova da coagulase negativo (D)



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

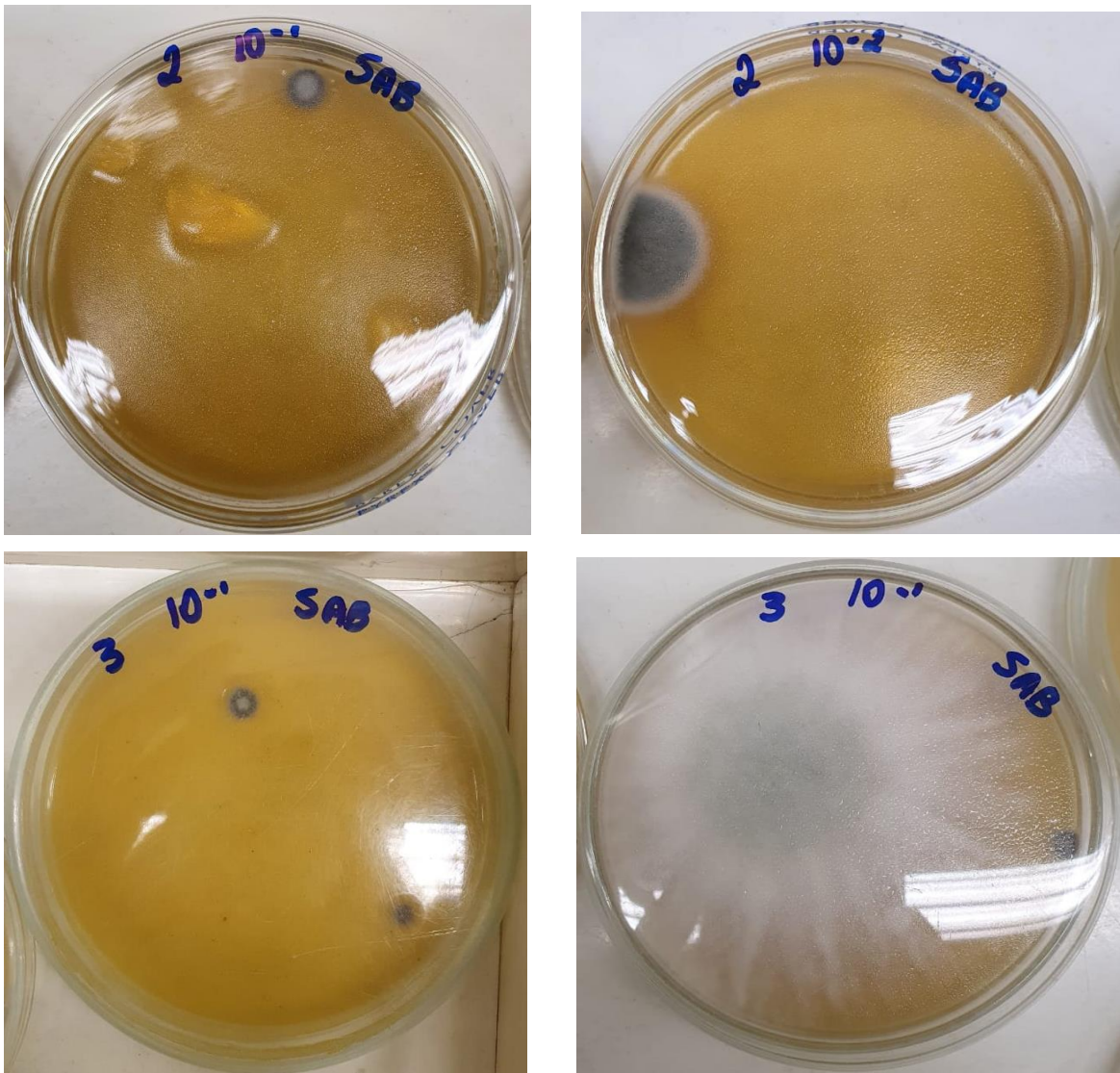
Somado a isso foi observado o crescimento fúngico nas Marcas 2 e 3 (Figura 20), ( $10^2$  UFC/g), e após determinação por morfologia, detectou-se a presença de *Aspergillus sp.*. Apesar do crescimento bacteriano e fúngico observado, a contagem dos mesmos está dentro dos parâmetros estabelecidos pela FB e, portanto, as amostras comerciais estão conformes.

Esse resultado levanta uma discussão sobre os valores de limites permitidos que são preconizados na FB. Mesmo com um crescimento relevante e com a identificação dos gêneros e espécies presentes nesses medicamentos que são amplamente comercializados, no ponto de vista de controle de qualidade, todos eles estão aprovados. Não é possível determinar ao certo se a bactéria e o fungo encontrado nessas amostras podem causar algum risco ao consumidor



final, mas pensando em Vigilância Sanitária e na promoção e proteção da saúde da população, talvez seja o momento de repensar os altos limites estabelecidos pelos compêndios oficiais. Para isso, mais testes de controle de qualidade microbiológico devem ser realizados, com uma amostragem maior e com mais marcas dos fitoterápicos, de maneira a demonstrar ou não um possível risco para os consumidores, e se isso além de afetar na segurança do produto final, pode interferir também na sua eficácia.

Figura 20 – Crescimento fúngico nas placas de ágar Saboroud nas Marcas 2 e 3 de *Passiflora incarnata*. As placas foram feitas em duplicata para cada diluição ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ) de cada marca. As imagens acima evidenciam apenas as placas onde o crescimento microbiano foi positivo



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

## 5 CONCLUSÃO

No presente estudo, utilizando os modelos comportamentais LCE e CV, em camundongos machos Swiss Webster, foi avaliado o efeito do tratamento com *Passiflora incarnata* de diferentes marcas, assim como foram realizadas outras análises de modo a pesquisar desvios na qualidade desse fitoterápico, e com isso, foi possível concluir que:

- Os testes neurocomportamentais LCE e CV funcionam como uma excelente ferramenta para garantir o controle de qualidade de fitoterápicos ansiolíticos;
- A *Passiflora* referência e as Marcas 1 e 3 demonstraram ter grande atividade ansiolítica, comprovado pelos resultados obtidos no estudo;
- O tratamento com as diferentes marcas de *Passiflora* tem pouco impacto nos parâmetros bioquímicos;
- A administração de *Passiflora* de fabricantes distintos parece manter os níveis de BDNF no SNC, com exceção da Marca 1 na dose de 200 mg/kg;
- O perfil fitoquímico das diferentes marcas de *Passiflora* visualizado pela CCD são muito semelhantes;
- Os parâmetros físicos, como peso médio, e microbiológicos das diferentes marcas estão satisfatórios e de acordo com a legislação vigente.

Assim, as marcas de fitoterápicos de *Passiflora incarnata* apresentam um papel promissor na retenção e prevenção dos danos provenientes dos mais variados transtornos de ansiedade e os testes neurocomportamentais podem e devem ser utilizados como uma opção para o controle de qualidade desta classe de medicamentos.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM 5**: manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- AHMETOV, I. I. *et. al.* SOD2 gene polymorphism and muscle damage markers in elite athletes. **Free radical research**, v. 48, n. 8, p. 948-955, 2014. DOI 10.3109/10715762.2014.928410.
- ANDRADE, J. V. *et. al.* Ansiedade, um dos problemas do século XXI. **Revista de Saúde da ReAGES**, v. 4, n. 2, p. 34-39, 2019. DOI 10.13140/RG.2.2.33335.75683.
- ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Phytotherapy in primary health care. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 3, p. 541-553, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0034-8910.2014048004985>.
- ANVISA. **Fitoterápicos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos>. Acesso em: 01 de julho de 2023.
- ANVISA. RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2014.
- BARBOSA, D. F.; LIMA, C. F. de. Efeitos do exercício físico em comportamentos relacionados com a ansiedade em ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 22, n. 2, p. 122-125, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1517-869220162202056634>.
- BRAGA, A. *et. al.* Repeated administration of an aqueous spray-dried extract of the leaves of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae) inhibits body weight gain without altering mice behavior. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 59-66, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.034>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p.
- BROWN, G. R.; NEMES, C. The exploratory behaviour of rats in the hole-board apparatus: is head-dipping a valid measure of neophilia? **Behavioural processes**, Netherlands, v. 78, n. 3, p. 442-448, jul. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2008.02.019>.
- CASTILLO, A. R. *et. al.* **Transtornos de ansiedade**. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbp/a/dz9nS7gtB9pZFY6rkh48CLt/#>. Acesso em: 01 jul. 2023.
- COMUNIDADE SANAR. **Benzodiazepínicos**: ações no sistema nervoso central e usos terapêuticos. 2021. Disponível em: <https://www.sanarmed.com/benzodiazepinicos-aco-es-no-sistema-nervoso-central-e-usos-terapeuticos-colunistas>. Acesso em: 01 jul. 2023.
- CRESTANELLO ARGENTA, S. *et. al.* Plantas medicinais: cultura popular versus ciência medicinal. **Vivências**: Revista Eletrônica de Extensão da URI, v. 7, p. 51-60, 2011.

CROCHEMORE, M. L.; MOLINARI, H. B.; STENZEL, N. M. C. Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 5-10, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-29452003000100004>.

DENG, J. *et. al.* Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 148-153, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.043>.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linnaeus. **Journal of ethnopharmacology**, Ireland, v. 78, n. 2-3, p. 165-170, Dec. 2001. DI: [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00339-7](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00339-7).

FALZON, C. C.; BALABANOVA, A. Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 44, n. 2, p. 217-227, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pop.2017.02.001>.

FILE, S.E.; WARDILL, A.G. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. **Psychopharmacologia**, v. 44, n. 1, p. 53-59, 1975. doi:10.1007/BF00421184. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1197580/> Acesso em: 01 jul. 2023.

FONSECA, L. R. D. *et. al.* Herbal Medicinal Products from *Passiflora* for Anxiety: An Unexploited Potential. **Scientific World Journal**, v. 2020, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/6598434>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7387951/#B57>. Acesso em: 01 jul. 2023.

FREITAS, L. B. História evolutiva das espécies de *Passiflora* L. de ocorrência no Rio Grande do Sul: aspectos genéticos, estrutura populacional e filogenia. **Revista Brasileira de Biociências**, n. 2009, p. 41-47, 2011.

GARCIA, E. B. *et. al.* Elevated plus-maze and the hole board test for use as a quality control assay of herbal medicines based on *passiflora incarnata* linnaeus. **ARS Veterinaria**, v. 37, n. 4, 2021. Disponível em: <https://www.arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/view/1432>. Acesso em: 01 jul. 2023.

SILVA, M. G. P. da; SILVA, M. M. P. da. Avaliação Do Uso De Fitoterápicos Em Distúrbios Psiquiátricos. **Rev. Aten**, v. 16, p. 77-82, 2018. DOI: <https://doi.org/10.13037/ras.vol16n56.4951>.

GONULALAN, E. M. *et. al.* Metabolomics and proteomics profiles of some medicinal plants and correlation with BDNF activity. **Phytomedicine**, v. 74, p. 152920, 2020. DOI 10.1016/j.phymed.2019.152920.

GROSSEN, N. E.; KELLY, M. J. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 81, 307-310. 1972. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5084446>. Acesso em: 14 mar. 2020. Acesso em: 01 jul. 2023.

HAGHIGHAT, N.; RAJABI, S.; MOHAMMADSHAHI, M. Effect of synbiotic and probiotic

supplementation on serum brain-derived neurotrophic factor level, depression and anxiety symptoms in hemodialysis patients: a randomized, double-blinded, clinical trial. **Nutritional Neuroscience**, v. 24, n. 6, p. 490-499, 2021. DOI 10.1080/1028415X.2019.1646975.

HASENCLEVER, L. *et. al.* The Brazilian phytotherapics industry: challenges and opportunities. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559-2569, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-81232017228.29422016>.

HILBERT, K.; LUEKEN, U.; BEESDO-BAUM, K. Neural structures, functioning and connectivity in Generalized Anxiety Disorder and interaction with neuroendocrine systems: A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 158, p. 114-126, 2014. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.01.022>.

HOCH, J. H. The legend and hystory of Passiflora. **American Journal of Pharmacy**, v. 5, p. 166- 70, 1934.

JANG, M. H. *et. al.* Inhibition of cholinesterase and amyloid- $\beta$  aggregation by resveratrol oligomers from *Vitis amurensis*. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 4, p. 544-549, 2008. DOI 10.1002/ptr.

JAWNA-ZBOIŃSKA, K. *et. al.* Passiflora incarnata L. Improves Spatial Memory, Reduces Stress, and Affects Neurotransmission in Rats. **Phytotherapy research : PTR**, England, v. 30, n. 5, p. 781-789, May 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.5578>.

LEONARDI, J. G.; AZEVEDO, B. M., OLIVEIRA, A. C. C.; 1. Benzodiazepínicos e seus efeitos no sistema nervoso central. **Revista Saúde em Foco**, v. 11, n. 2, p. 1-15, 2017.

JHEMES, I. *et. al.* a Diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde. **Uninga**, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2017.

KAPALKA, G. M. (ed.). Preface. *In*: KAPALKA, G. M. (ed.). **Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents**: practical resources for the mental health professional. San Diego: Academic Press, 2010b. p. ix–xix. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374927-7.00014-5>.

KAPALKA, G. M. (ed.). Copyright. *In*: KAPALKA, G. M. (ed.). **Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents**: practical resources for the mental health professional. San Diego: Academic Press, 2010a. p. iv. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374927-7.00015-7>.

KOMADA M, T. K.; MIYAKA, W. T. Elevated plus maze for mice. **J Vis Exp.**, v. 22, n. 22, p. 1088, 2008. doi: 10.3791/1088. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19229173/>. Acesso em: 01 jul. 2023.

KUMAR, V.; BHAT, Z. A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: a comprehensive review. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, United States, v. 68, n. 2, p. 175-183, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.05.003>.

LANTYER, A. S. *et. al.* Ansiedade e qualidade de vida entre estudantes universitários ingressantes: avaliação e intervenção. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e**

**Cognitiva**, v. XVIII, n. 2, p. 4-19, 2016. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/309385121\\_Ansiedade\\_e\\_Qualidade\\_de\\_Vida\\_entre\\_Estudantes\\_Universitarios\\_Ingressantes\\_Avaliacao\\_e\\_Intervencao](https://www.researchgate.net/publication/309385121_Ansiedade_e_Qualidade_de_Vida_entre_Estudantes_Universitarios_Ingressantes_Avaliacao_e_Intervencao). Acesso em: 01 jul. 2023.

LI, H. *et al.*. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* “edulis” and *Passiflora edulis* “flavicarpa.” **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 3, p. 1085-1090, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.039>.

LOPES, M. W.; TIYO, R.; ARANTES, V. P. Utilização de *Passiflora incarnata* no tratamento da ansiedade. **Uningá Review**, v. 29, n. 2 SE-Articles, 10 feb. 2017.

LOPES, K. C. S. P.; SANTOS, W. L. Transtorno de ansiedade. **Revista de Iniciação Científica e extensão**, v. 1, n. 1, p. 45-50, 2018. Disponível em: <https://revistasfacesa.senaaires.com.br/index.php/iniciacao-cientifica/article/view/47/14>. Acesso em: 01 jul. 2023.

MARTINS DE OLIVEIRA, L.; MENEZES FILHO, A. C. P. de; PORFIRO, C. A. Uso da *Passiflora incarnata* L. no tratamento alternativo do transtorno de ansiedade generalizada. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11 SE-, p. e2349119487, nov. 2020. DOI 10.33448/rsd-v9i11.9487.

MCGONIGLE, P.; RUGGERI, B. Animal models of human disease: challenges in enabling translation. **Biochemical pharmacology**, England, v. 87, n. 1, p. 162-171, Jan. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.08.006>.

MICHAELIS. **Moderno dicionário da língua portuguesa** (Verbete Ansiedade). Disponível em: <https://michaelis.uol.com.br/busca?id=vKKM>. Acesso em: 10 ago. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). <http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnmpf>. Acesso em: 01 jul. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/projeto-lean-nas-emergencias/693-acoes-e-programas/40041-programa-de-fitoterapico-e-plantas-medicinais>. Acesso em: 01 jul. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnmpf/plantas-medicinais-e-fitoterapicos-no-sus/linha-do-tempo-plantas-medicinais-e-fitoterapicos>. Acesso em: 01 jul. 2023.

MIRRODI, M. *et al.* *Passiflora incarnata* L.: ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. **J Ethnopharmacol.**, v. 150, n. 3, p. 791-804, 2013. doi:10.1016/j.jep.2013.09.047. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24140586/>. Acesso em: 01 jul. 2023.

MOCHCOVITCH, M. D.; CRIPPA, J. A. D. S.; NARDI, A. E. Transtornos de ansiedade. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, n. 11, p. 390-399, 2010. DOI:

<https://doi.org/10.1590/s1516-44462002000600004>.

MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia USP**, v. 17, n. 4, p. 159-174, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0103-65642006000400009>. Acesso em: 25 jul. 2019.

NECHITA, D.; NECHITA, F.; MOTORGA, R. A review of the influence the anxiety exerts on human life. **Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie**, Romania, v. 59, n. 4, p. 1045-1051, 2018. .

NOGUEIRA, A. A. R. *et. al.* Biochemical markers of muscle damage and high serum concentration of creatine kinase in patients on statin therapy. **Biomarkers in Medicine**, v. 13, n. 8, p. 619626, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2217/bmm-2018-0379>.

NUNES, E. A.; HALLAK, J. E. C. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, v. 17, n. 3, p. 528-543, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/1415-4714.2014v17n3p528-10>.

PASSARINHO, A. M. *et. al.* Análise total da qualidade em cápsulas de passiflora incarnata L. **Revista Saúde em Foco**, v. 5, n. 1, p. 64-77, 2018. DOI: <https://doi.org/10.12819/rsf.2018.5.1.4>.

PELLOW, S. *et. al.* Validation of open" closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PEREIRA, S. M. T. O uso medicinal da passiflora incarnata L. 2014. 22 f. Tese (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Coimbra, Coimbra, p. 1-25, 2014. .

PEREIRA, L. Ansiedade, um dos problemas do século XXI. **Revista de Saúde da ReAGES**, n. 4, v. 2, p. 34-39, 2019. DOI10.13140/RG.2.2.33335.75683. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Joao-Andrade-13/publication/334414107\\_ANSIEDADE\\_UM\\_DOS\\_PROBLEMAS\\_DO\\_SECULO\\_XXI/links/5d27fb4292851cf4407a7e16/ANSIEDADE-UM-DOS-PROBLEMAS-DO-SECULO-XXI.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Joao-Andrade-13/publication/334414107_ANSIEDADE_UM_DOS_PROBLEMAS_DO_SECULO_XXI/links/5d27fb4292851cf4407a7e16/ANSIEDADE-UM-DOS-PROBLEMAS-DO-SECULO-XXI.pdf). Acesso em: 01 jul. 2023.

PINTO, W. B. V. R. *et. al.* Test Elevated Plus Maze: applications and contributions to the study of animal disease models in neurology and psychiatry disorders. **Resbcal**, v. 1, p. 102-120, 2012.

REGINATTO, F. H.; *et. al.* Evaluation of anxiolytic activity of spray dried powders of two south Brazilian Passiflora species. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 5, p. 348–351, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.1853>.

REHWALD, A.; MEIER, B.; STICHER, O. Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in Passiflora incarnata L. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 69, n. 3, p. 153-158, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-6865\(94\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0031-6865(94)90017-5).

ROGÉRIO, L. V. F; RIBEIRO, J. C. Uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos em insônia: uma revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v. 3, n.

2, p. 35-44, 2021. DOI: <https://doi.org/10.29327/226760.3.2-4>.

ROMANI, A. *et. al.* Quality Control of Medicinal Plant Preparations: the Case of Passiflora Incarnata L. Tinctures. **Journal of commodity science, technology and quality: rivista di merceologia, tecnologia e qualità**. jan./mar. 1999

SAKALEM, M. E. *et. al.*. A Behavioral Pharmacology of Five Uncommon Passiflora Species Indicates Sedative and Anxiolytic-like Potential. **Central nervous system agents in medicinal chemistry**, United Arab Emirates, v. 22, n. 2, p. 125-138, 2022. DOI: <https://doi.org/10.2174/1871524922666220426102650>.

SAMPATH, C. *et. al.* Anxiolytic effects of fractions obtained from Passiflora incarnata L. in the elevated plus maze in mice. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 6, p. 789-795, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.3332>.

SANTANA, I. G. de. *et. al.* Determinação do perfil cromatográfico de extratos secos vegetais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IV, n. 2, p. 54-57, 2007.

SANTOS, T. B. dos. *et. al.* Associação entre o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e o transtorno depressivo: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e461101019139, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i10.19139>.

SAX, H. *et. al.* Creatine kinase MB during myocardial infarction: relationship to preexisting coronary heart disease and medication. **Acta cardiologica**, England, v. 52, n. 5, p. 423-430, 1997.

SEPÚLVEDA, P. *et. al.* Analysis of vitexin in aqueous extracts and commercial products of Andean Passiflora species by UHPLC-DAD. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 9, p. 081-086, 2018. DOI: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8912>.

SHUAYPROM, A. *et. al.* Quantitative determination of vitexin in Passiflora foetida Linn. leaves using HPTLC. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 3, p. 216-220, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.11.006>.

SILVA, N. C. D. S. *et. al.* A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos em prol da saúde. **Única Cadernos Acadêmicos**, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2017.

SILVEIRA DA LUZ, A. C. D. *et. al.* Translational findings on brain-derived neurotrophic factor and anxiety: Contributions from basic research to clinical practice. **Neuropsychobiology**, v. 68, n. 3, p. 129-138, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1159/000353269>.

SKAPER, S. D. Neurotrophic Factors - BDNF and Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Dysfunction. **Methods in Molecular Biology**, v. 846, p. 213-222, 2012. DOI: [10.1007/978-3-642-45106-5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5).

SOARES, C. S. M. **Mecanismos neuronais e tratamento farmacológico na perturbação da ansiedade generalizada em adultos**. 2017. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal, 2017. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.26/20195>. Acesso em: 10 ago. 2023.



SOLTER, P.; LIU, Z.; GUZMAN, R. Decreased hepatic ALT synthesis is an outcome of subchronic microcystin-LR toxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, United States, v. 164, n. 2, p. 216-220, Apr. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/taap.2000.8895>.

VALÉCIO, M. de; LOURENÇO, V. Fitoterápicos ganham espaço. **Revista Guia de Farmácia**, São Paulo, p. 36, 2016.

WANG, F. *et. al.* Neuroactive flavonoids interacting with GABAA receptor complex. Current drug targets. **CNS and neurological disorders**, Netherlands, v. 4, n. 5, p. 575-585, Oct. 2005. DOI: <https://doi.org/10.2174/156800705774322030>.

WASOWSKI, C.; MARDER, M. Flavonoids as GABAA receptor ligands: the whole story? **Journal of experimental pharmacology**, New Zealand, v. 4, p. 9-24, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2147/JEP.S23105>.

WHO. **Monographs on selected medicinal plants**: v. 1. Geneva, 2013.

WOLGENSINGER, L. Cognitive behavioral group therapy for anxiety: recent developments. **Dialogues in clinical neuroscience**, England, v. 17, n. 3, p. 347-351, Sep. 2015. DOI: <https://doi.org/10.31887/DCNS.2015.17.3/wolgensinger>.

YI, H. Y.; LEE, J. Y. Poisoning due to consumption of horse chestnut seed. **Clinical and experimental emergency medicine**, Korea (South), v. 8, n. 4, p. 333-335, Dec. 2021. DOI: <https://doi.org/10.15441/ceem.20.004>.

ZERAIK, M. L. *et. al.* Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2010000300026>.

VON BOHLEN UND HALBACH, O; VON BOHLEN UND HALBACH, V. BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function. **Cell Tissue Res.**, v. 373, n. 3, p. 729-741, 2018. DOI: 10.1007/s00441-017-2782-x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29450725/>. Acesso em: 10 ago. 2023.