

UNIVERSIDADE DE MARÍLIA

AIRTON JOSÉ MENDES

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO EXTRATO DE *PASSIFLORA ALATA*
EM RATOS Wistar MACHOS SUBMETIDOS A ESTRESSE NO MODELO
MODIFICADO DE NATAÇÃO FORÇADA**

MARILIA

2020

AIRTON JOSÉ MENDES

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO EXTRATO DE *PASSIFLORA ALATA*
EM RATOS WISTAR MACHOS SUBMETIDOS A ESTRESSE NO MODELO
MODIFICADO DE NATAÇÃO FORÇADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação da Universidade de Marília para obtenção do título de Mestre em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação, na área de concentração Bases Estruturais e Funcionais da Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Cressoni Araujo
Coorientadora: Profa. Dra. Elen Landgraf Guiguer

MARÍLIA

2020

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura: Airton José Mendes

Data: 12 / 02 / 2021

Comitê de Ética em Uso Animal

Protocolo nº.: 018/2019

Data: 26/06/2019

Mendes, Airton José

Efeitos da administração aguda do extrato de *Passiflora Alata* em ratos Wistar machos submetidos a estresse no modelo modificado de natação forçada / Airton José Mendes. - Marília: UNIMAR, 2021.

43f.

Dissertação (Mestrado Interdisciplinar em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação – Arquitetura, Estrutura e suas Relações com a Reabilitação Funcional) – Universidade de Marília, Marília, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Adriano Cressoni Araujo

1. Ansiedade 2. Modelos Animais 3. *Passiflora Alata* 4. Ratos Wistar I. Mendes, Airton José

CDD – 616.8914

FOLHA DE APROVAÇÃO

AIRTON JOSÉ MENDES

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO EXTRATO DE *PASSIFLORA ALATA* EM RATOS Wistar MACHOS SUBMETIDOS A ESTRESSE NO MODELO MODIFICADO DE NATAÇÃO FORÇADA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação da Universidade de Marília para obtenção do título de Mestre em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação, na área de concentração Bases Estruturais e Funcionais da Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Cressoni Araujo

Aprovado em: ____/____/____

Coordenação do Programa de Mestrado em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação

Considerações: _____

DEDICATÓRIA

Dedico à minha esposa Mara Alessandra Ribeiro Martins e à minha filha Maria Clara Mendes, pelo suporte de vida que me oferecem, por serem o meu porto seguro e também o motivo do porquê seguir em frente. Pelas inúmeras ausências e momentos dispersados do nosso convívio de família para que este trabalho fosse concluído.

Aos meus pais José Airton Mendes (“in memoriam”) e Maria Luiza Camargo Mendes pelo amor recebido durante toda a vida, pelos valores positivos de caráter que sempre cultivaram em nossa família e que culminaram no senso de dignidade, e pendor ao arrebatamento de buscar sempre o crescimento espiritual, emocional, pessoal e profissional.

Ao novo amigo Adriano Cressoni Araújo, cujas virtudes, indescritíveis com palavras, são o motivo de perpetuar essa amizade muito além da inestimável orientação do trabalho, não obstante, ser uma pessoa que estará sempre presente na minha forma de tratar o próximo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é o fundamento de tudo que existe e que há no universo, Senhor de todo conhecimento e sabedoria.

Agradeço, com especial reverência, ao meu orientador Prof. Dr. Adriano Cressoni Araújo, cujas atitudes foram muito além do papel de orientar, sendo um exemplo de caráter, gentileza, talento, habilidade a quem me afeiçoei como grande amigo e cuja amizade foi o maior valor que capitalizei nesta jornada.

À minha coorientadora Prof. Dra. Elen Landgraf Guiguer, por compartilhar seu conhecimento e domínio, agregando imenso valor acadêmico ao trabalho, e porque não dizer valor humano considerando sua presença de espírito ímpar.

Às Prof. Dra. Sandra Maria Barbalho e Profa Dra. Maricelma da Silva Soares de Souza que se dedicaram com carinho e atenção, trazendo contribuições irrefutáveis a minha formação.

Ao Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim, coordenador do Programa de Mestrado Interdisciplinar em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação, pela abnegação e desapego da vida particular, em nome da boa performance do Programa de Mestrado, e pelo carisma que é peculiar e inseparável do seu semblante e que trouxeram status de excelência ao curso.

Ao amigo e parceiro de trabalho Renan Santiago, pelo compartilhamento de informações e conteúdos na pesquisa, bem como pelo suporte emocional de uma amizade espontânea e íntegra.

Aos demais professores do Programa de mestrado pelos ensinamentos essenciais, valiosos e impagáveis que inculcaram em nossa mente.

À Acadêmica Annik Ianara de Souza Greco pelo interesse, bom ânimo, e dedicação na colaboração da pesquisa.

À Universidade de Marília, pelo acolhimento no Programa de Mestrado Interdisciplinar em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação, e por caucionar parcela da minha evolução profissional, seja através do mestrado como também pela incrível experiência como docente nesta dignificante Instituição de Ensino e Pesquisa.

À Profa. Dra. Patricia Cincotto dos Santos Bueno, coordenadora do Biotério da Universidade de Marília, e ao funcionário Roberto Carlos Teles pela cooperação e parceria no ambiente de pesquisa com os animais.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Dr. Márcio Mesquita Serva, Magnífico Reitor da Universidade de Marília;

A Profa. Regina Lúcia Ottaiano Losasso Serva, Magnífica Vice-reitora da Universidade de Marília;

A Profa. Dra. Fernanda Mesquita Serva, Digníssima Pró-reitora de Pesquisa, Pós-graduação e Ação Comunitária da Universidade de Marília;

Ao Sr. Marco Antonio Teixeira, Digníssimo Pró-reitor Administrativo da Universidade de Marília;

Ao Prof. José Roberto Marques de Castro, Digníssimo Pró-reitor de Graduação da Universidade de Marília;

A Dra. Márcia Mesquita Serva Reis, Diretora Superintendente do Hospital Beneficente UNIMAR;

Ao Dr. Carlos Henrique Bertoni Reis, Diretor técnico do Hospital Beneficente UNIMAR;

A Profa. Dra. Maria Elizabeth da Silva Hernandes Correa, Diretora de Ensino e Pesquisa do Hospital Beneficente UNIMAR;

Ao Prof. Dr. José Pedro Trevisan Novaretti, Diretor Clínico do Hospital Beneficente UNIMAR;

Aos docentes do Programa de Mestrado em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação;

As secretárias da Pós-graduação Thaís Helena Camprubi Brunetti e Andréa dos Santos Infante Hermínio;

a todos meus sinceros agradecimentos!

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO EXTRATO DE *PASSIFLORA ALATA*
EM RATOS WISTAR MACHOS SUBMETIDOS A ESTRESSE NO MODELO
MODIFICADO DE NATAÇÃO FORÇADA

RESUMO: Ansiedade e medo são sintomas presentes em diversos transtornos com destaque para os transtornos de ansiedade e o transtorno do estresse pós-traumático. Esses sintomas, apesar de terem importância do ponto de vista evolutivo, quando presentes de modo exacerbado podem ocasionar prejuízo na qualidade de vida do paciente. O tratamento farmacológico desses transtornos, bem como do componente de ansiedade neles presente tem algumas limitações, especialmente devido a ocorrência de efeitos indesejáveis e pela presença de comorbidades. Dessa forma, existe uma busca constante por novas abordagens terapêuticas, dentre as quais as plantas medicinais. As plantas do gênero *Passiflora* são há muito estudadas devido aos seus efeitos, com possibilidade de uso inclusive para transtornos como insônia e ansiedade. O presente projeto teve por objetivo avaliar os efeitos comportamentais da administração aguda do extrato seco de *Passiflora alata* (*P. alata*) em ratos machos Wistar machos submetidos a natação forçada. Para tal, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=8), denominados G1, G2, G3 e G4. Após um período de aclimação, todos os grupos exceto G1 foram submetidos a estresse através de 15 minutos de natação. Vinte e três horas após a natação, todos os grupos foram tratados via gavagem sendo: G1 – tratado com solução salina 0,9%; G2 – tratado com solução salina a 0,9%; G3 e G4 – tratados respectivamente com 22 mg/Kg e 66mg/Kg de extrato seco de das folhas de *P. alata*. Após 1 hora da administração, os grupos G2, G3 e G4 foram novamente submetidos a natação por 5 minutos, sendo avaliados os parâmetros comportamentais: tempos de imobilidade e de natação. Adicionalmente, ao final todos os grupos foram submetidos ao modelo de labirinto em cruz elevado (LCE), onde foram avaliadas a frequência de entradas e o tempo de permanência dos braços abertos e fechados. Quando avaliados no modelo de LCE, todos os animais submetidos a natação (G2, G3 e G4) permaneceram menos tempo nos braços abertos quando comparados ao grupo controle (G1 - não submetido a natação), indicando comportamento de ansiedade. Esses resultados demonstram que o modelo de natação foi adequado para induzir ansiedade nos animais. Porém, ao avaliarmos os tempos de movimentação e imobilidade (no modelo de natação) bem como o tempo de permanência nos braços abertos no modelo de LCE, não foram observadas diferenças significativas entre os animais tratados com solução salina e com *P. alata*, o que indica que, no modelo e nas doses utilizadas a administração do extrato não diminuiu o nível de ansiedade nos animais.

Palavras chave: Ansiedade. *Passiflora alata*. Ratos Wistar. Modelos animais.

EFFECTS OF ACUTE ADMINISTRATION OF *PASSIFLORA ALATA* EXTRACT IN
WISTAR MALES SUBMITTED TO STRESS IN THE MODIFIED FORCED
SWIMMING MODEL

ABSTRACT: Anxiety and fear are symptoms present in several disorders with emphasis on anxiety disorders and post-traumatic stress disorder. Although of importance from an evolutionary point of view, these symptoms, when present in an exacerbated way can cause damage to the patient's quality of life. The pharmacological treatment of these disorders, as well as the anxiety component present in them, has some limitations, especially due to the occurrence of undesirable effects and the presence of comorbidities. Thus, there is a constant search for new therapeutic approaches, including medicinal plants. The genus *Passiflora* has been widely studied due to its effects, with the possibility of use even for disorders such as insomnia and anxiety. This project aimed to evaluate the behavioral effects of the acute administration of *Passiflora alata* (*P. alata*) dry extract in male Wistar rats submitted to forced swimming. The animals were randomly divided into 4 groups (n = 8), named G1, G2, G3 and G4. After a period of acclimatization, all groups except G1 were submitted to stress through 15 minutes of swimming. Twenty-three hours after swimming, all groups were treated via gavage, according to: G1 - treated with 0.9% saline solution; G2 - treated with 0.9% saline solution; G3 and G4 - treated with 22 mg/kg and 66 mg/kg of dry extract of *P. alata* leaves, respectively. After one hour of administration, groups G2, G3 and G4 were again submitted to swimming for 5 minutes, and behavioral parameters such as immobility and swimming times were evaluated. Furthermore, at the end, all groups were submitted to the elevated plus-maze (EPM) model, where the frequency of entries and the length of stay in the open and closed arms were evaluated. When evaluated in the EPM model, all animals submitted to swimming (G2, G3 and G4) remained less time in the open arms when compared to the control group (group not submitted to swimming), indicating anxiety behavior. These results demonstrate that the swimming model was adequate to induce anxiety in animals. However, when evaluating the movement and immobility times (in the swimming model), as well as the time spent in the open arms in the EPM model, no significant differences were observed between animals treated with saline solution and with *P. alata* indicating that, in the model and doses used, the administration of the extract did not decrease the level of anxiety in the animals.

Keywords: Anxiety. *Passiflora alata*. Wistar rats. Animal models.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aparato para o modelo de labirinto em cruz elevado.....21
- Figura 2.** Efeito da administração aguda do extrato de *P. alata* sobre o tempo de movimentação no modelo de natação forçada.....24
- Figura 3.** Efeito da administração aguda do extrato de *P. alata* sobre o tempo de imobilidade no modelo de natação forçada.....24
- Figura 4.** Efeitos da natação e da administração aguda do extrato de *P. alata* nos tempos de permanência nos braços abertos e fechados no modelo de labirinto em cruz elevado.....25
- Figura 5.** Efeitos da natação e da administração aguda do extrato de *P. alata* sobre as porcentagens de tempo nos braços abertos e fechados no modelo de labirinto em cruz elevado.....26
- Figura 6.** Efeitos da natação e da administração aguda do extrato de *P. alata* sobre a locomoção no teste de labirinto em cruz elevado.....26
- Figura 7.** Efeitos da natação e da administração aguda do extrato de *P. alata* sobre o índice de ansiedade avaliado no modelo de labirinto em cruz elevado.....27
-

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 – Material vegetal	20
3.2 – Animais	20
3.3 – Modelo de natação forçada modificado	20
3.4 – Teste de labirinto em cruz elevado (LCE)	21
3.5 – Protocolo experimental	22
3.6 – Tratamento estatístico	22
3.7 – Aspectos éticos e legais	22
4. RESULTADOS	24
4.1 Análise do comportamento dos animais no modelo modificado de natação forçada	24
4.2 Análise do comportamento dos animais no modelo de labirinto em cruz elevado.	25
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	37
ANEXOS	43



1. INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

Dados da Organização Mundial de Saúde estimam a prevalência dos transtornos de ansiedade em 3,5%. No continente americano esse transtorno mental alcança maiores proporções e atinge 5,6% da população, com destaque para o Brasil, estando presente em 9,3% da população (OMS, 2017). Esses transtornos estão associados a comorbidades físicas, aumento na utilização dos serviços de saúde e diminuição na produtividade no trabalho, com custos sociais significativos (PEREIRA, LOUREIRO e CRIPPA, 2016; REMES et al., 2016).

Até sua quarta edição, o Manual Diagnóstico e Estatístico dos transtornos Mentais (DSM-4) da Associação Americana de Psiquiatria (APA, 2000) incluía nos transtornos de ansiedade o transtorno do pânico, fobia social, transtorno de ansiedade generalizada, agorafobia e transtorno de estresse pós-traumático (TEPT). Porém, em sua quinta edição (DSM-5) o TEPT foi colocado em uma categoria separada, um novo capítulo junto aos transtornos relacionados a agentes estressores, apesar de apresentar muitas semelhanças com os transtornos de ansiedade (APA, 2013).

Nesse sentido, segundo KILPATRICK et al., 2013, entre 80 e 90% da população em geral já experimentou algum evento traumático sendo que a prevalência do TEPT é estimada entre 3-8%, com maior percentual em determinadas populações como veteranos de guerra (30%) e vítimas de abuso sexual (50%) (BISSON et al., 2015; KESLLER et al., 2005). Segundo a Associação Americana de Psiquiatria, o TEPT é uma importante causa de prejuízos nas esferas social, ocupacional e de aprendizagem (APA, 2013).

Transtornos de ansiedade e TEPT apresentam alguns aspectos semelhantes visto que, segundo o DSM-5 (APA, 2013), compartilham características clínicas comuns pois a exposição a eventos traumáticos pode desencadear comportamentos de medo e ansiedade excessivos, que por vezes implicam em sofrimento psicológico associado a prejuízo social, profissional e em outras áreas importantes da vida do indivíduo.

Nesse contexto, medo e ansiedade podem estar presentes nos transtornos de ansiedade e no TEPT (LIU et al. 2015). Os mesmos são respostas importantes na medida em que podem evitar uma situação de perigo (TAKAGI et al., 2018) mas quando excessivos passam a ser expressos através de sintomas como pensamentos

baseados em ameaças, reatividade fisiológica aberrante, emoção negativa aumentada e comportamento “evitativo” (HYDE, RYAN e WATERS, 2019).

O tratamento desses transtornos, incluindo o estresse pós-traumático e os transtornos de ansiedade pode ser realizado com o uso de benzodiazepínicos, antipsicóticos e antidepressivos, dentre outros (AKINNUSI e EL SOLH, 2019; da FONSECA et al., 2020; LIU et al., 2015). Porém, o uso de benzodiazepínicos está relacionado a potencial para abuso, dependência e abstinência e antidepressivos e antipsicóticos podem provocar efeitos indesejáveis como hipotensão postural, potencial para arritmias, constipação intestinal e retenção urinária dentre outros (AKINNUSI e EL SOLH, 2019; LIU et al., 2015). Adicionalmente, a complexidade dos transtornos mentais e o fato dos mesmos coexistirem em um mesmo paciente pode dificultar o tratamento (LIU et al., 2015).

Dessa forma a busca por novas alternativas terapêuticas se torna importante e, nesse contexto, a prospecção e o desenvolvimento de novos compostos com possibilidade de uso terapêutico pode ser feita por vários métodos como triagem empírica, triagem empírica direcionada, descoberta ao acaso, através de produtos naturais ou por planejamento racional. Desde épocas ancestrais da humanidade, as plantas medicinais têm sido bastante utilizadas pelo homem e frequentemente auxiliam ou substituem as terapias convencionais (OLIVEIRA et al., 2008). O interesse por plantas utilizadas terapeuticamente aumentou no final do século 20 e as investigações sobre a terapia baseada no uso de plantas cresceu também nos países desenvolvidos (HOU et al., 2020; KIM e SONG, 2012; KIM et al., 2017; RAHBARDAR e HOSSEINZADEH, 2020).

Com relação aos transtornos psiquiátricos, o papel das plantas medicinais no tratamento está bem estabelecido, com evidências consistentes da efetividade de diversos fitoterápicos (SARRIS, 2018) e, nos últimos anos as investigações sobre as ações psicofarmacológicas das plantas medicinais tem aumentado (LIU et al., 2015), com destaque para a *Piper methysticum* (Kava), *Hypericum perforatum* (erva de São João) (SARRIS, 2018), *Valeriana officinalis* (THOMAS et al., 2016) e plantas do gênero *Passiflora* (AMAN et al., 2016; da CUNHA et al., 2020; DANTAS et al., 2017, da FONSECA, et al. 2020; GIOVANNINI et al., 2017; KIM et al., 2019).

O gênero *Passiflora* compreende aproximadamente 500 espécies pertencentes à família Passifloraceae, sendo a maioria encontrada nas américas Central e do Sul. As plantas desse gênero, especialmente a *Passiflora incarnata* são utilizadas

popularmente há muito tempo devido aos efeitos antiespasmódico, antiasmático, antitussígeno, analgésico e para transtornos do sistema nervoso central como insônia e ansiedade (KIM et al., 2017; KIM et al., 2019; MIRRODI et al., 2013; PATEL et al., 2009).

Quimicamente, a *Passiflora incarnata* apresenta em sua constituição saponinas, alcaloides e flavonoides sendo possível que esses últimos sejam responsáveis pelos efeitos centrais (AMAN et al., 2016; da FONSECA et al.; 2020).

Apesar da *Passiflora incarnata* ser a mais descrita em todo o mundo, no Brasil as espécies *Passiflora edulis* e *Passiflora alata*, conhecida como maracujá doce são mais comuns e tem sido popularmente empregadas como ansiolíticas (BARBOSA et al., 2008).

Para avaliação do efeito de fármacos ou plantas em doenças que envolvam o sistema nervoso central, são necessários modelos animais capazes de reproduzir os sintomas, tanto biológicos quanto comportamentais observados em humanos (LIBERSON et al., 2005).

Esses modelos se valem da observação inicial de Charles Darwin de que a expressão de emoção em humanos e outros mamíferos foi filogeneticamente preservada ("... os jovens e os idosos de raças amplamente diferentes, tanto no homem quanto nos animais, expressam o mesmo estado de espírito pelos mesmos movimentos ...", Charles Darwin, 1872). Com base nessa premissa, modelos de distúrbios emocionais tentam reproduzir características de distúrbios psiquiátricos humanos em animais de laboratório, correlacionando as alterações fisiológicas e comportamentais associadas a alterações específicas (CAMPOS et al., 2013).

Para indução de situações estressoras/traumáticas que levem a comportamentos de medo/ansiedade os modelos animais se valem de estressores físicos como choque elétrico, trauma subaquático e contensão física ou ainda estressores sociais como instabilidade da "habitação", estresse precoce (retirada materna precoce) ou ainda estressores psicológicos como a exposição ao predador ou ao seu odor (WHITAKER, GILPIN e EDWARDS, 2014).

Para avaliação comportamental de animais, alguns modelos tem sido propostos. Um desses modelos é o labirinto em cruz elevado (LCE), realizado em um aparato com dois braços abertos opostos perpendicularmente a braços fechados (ARANTES et al., 2013; CAMPOS et al., 2013; MORATO, 2006).

Conforme descrito acima, plantas do gênero *Passiflora*, especialmente a *Passiflora incarnata* tem demonstrado utilidade em situações nas quais a ansiedade esteja implicada. Porém, poucos estudos avaliaram os efeitos da *P. alata* em modelos de ansiedade. Assim, o estudo dos efeitos comportamentais dessa espécie pode ser interessante para uma melhor compreensão de sua utilidade como ansiolítico.



2. OBJETIVO



2. OBJETIVO

Avaliar os efeitos comportamentais da administração aguda do extrato das folhas de *P. alata* em ratos Wistar machos submetidos a estresse no modelo modificado de natação forçada.



3. MATERIAL E MÉTODO



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material vegetal

O material vegetal (extrato seco das folhas de *P. alata*) foi adquirido em estabelecimento comercial no município de Marília/SP.

Para administração, o extrato seco foi preparado nas concentrações de 22mg/mL e 66 mg/mL, diluído em solução salina 0,9%.

3.2 – Animais

Foram utilizados 32 ratos albinos Wistar machos, pesando entre 180 - 220g, provenientes do Biotério Central da Universidade de Marília (UNIMAR).

Durante toda a execução do protocolo experimental, os animais receberam água e ração *ad libitum*.

3.3 – Modelo de natação forçada modificado

O teste de natação forçada foi realizado segundo o modelo de Porsolt (PORSOLT et al., 1978), no qual é feito um pré-teste onde os animais são submetidos a natação por 15 minutos em recipientes cilíndricos (50cm de altura por 30 cm de diâmetro) com água na altura de 15 cm e temperatura entre 25-27°C, sendo esse o primeiro contato do animal com a situação estressora. No presente estudo, foi feita uma modificação na coluna de água, que passou a ter 30 cm.

Após 23 horas do pré-teste, os animais receberam os respectivos tratamentos (conforme protocolo experimental descrito no item 3.5) e, 60 minutos após, foram submetidos novamente a natação nas mesmas condições anteriores, mas por um período de 5 minutos. O segundo período de natação foi filmado para avaliação das variáveis comportamentais tempo de natação (movimentação) e tempo de imobilidade (ausência de movimento adicional àqueles necessários para manter a cabeça do animal fora da água).

3.4 – Teste de labirinto em cruz elevado (LCE)

Após o segundo período de natação, o comportamento foi adicionalmente avaliado utilizando-se o modelo de LCE. Conforme Figura 1, o modelo consiste de um aparato formado por dois braços abertos opostos, medindo 50cm de comprimento por 10cm de largura cada um, perpendiculares a dois braços fechados, também opostos e com as mesmas dimensões. Os braços abertos e fechados cruzam-se perpendicularmente, delimitando uma área central de 10 cm². Todo o aparato fica a uma distância de 100cm do solo. Os testes foram realizados em uma sala isolada com som atenuado, controle de temperatura e luminosidade e exaustão de ar, na qual nenhuma outra atividade foi realizada no momento do experimento. As sessões experimentais foram realizadas todas no período diurno para evitar variações devido ao ciclo circadiano. Os animais foram filmados por 5 minutos para avaliação da frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados e no meio do labirinto. Adicionalmente, com base nesses parâmetros foi calculado o índice de ansiedade:

1 - [(tempo no braço aberto/300) + (entradas no braço aberto/total de entradas/2)], conforme descrito por HUYNTH et al., 2011.

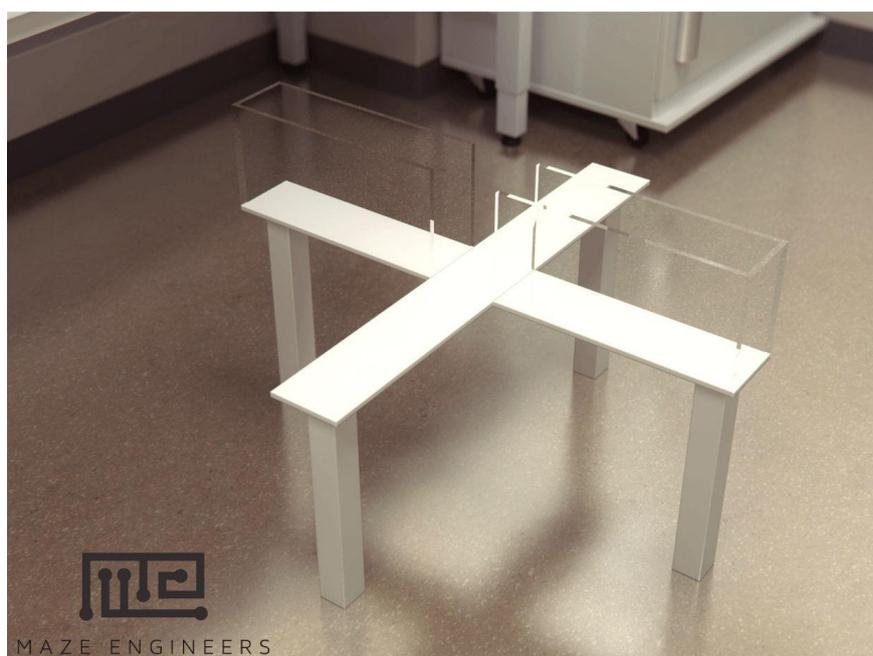


Figura 1: Aparato para o modelo de labirinto em cruz elevado. Disponível em: <https://www.medicaexpo.com/pt/prod/mazeengineers/product-125279-908437.html>

3.5 – Protocolo experimental

Previamente à experimentação, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=8), acondicionados em caixas plásticas (40x30x17cm), 4 animais por caixa e em seguida aclimatados por um período de dez dias às condições do laboratório em sala com temperatura (20°C - 25°C) e ciclo de claro/escuro (12/12 horas) controlados.

Os grupos G2, G3 e G4 foram submetidos a natação por 15 minutos segundo o modelo descrito no item 3.3. Vinte e três horas após, todos os grupos receberam tratamento via gavagem conforme abaixo:

G1: solução salina na dose de 1mL/Kg – não submetido a natação;

G2: solução salina na dose de 1mL/Kg;

G3: 22 mg/Kg do extrato de *Passiflora alata*;

G4: 66 mg/Kg do extrato de *Passiflora alata* e

Sessenta minutos após o tratamento, o grupo G1 foi avaliado no modelo de LCE (item 3.4) e os grupos G2, G3 e G4 foram submetidos a um novo período de natação por 5 minutos (item 3.3). Imediatamente após a natação, os animais foram secos e avaliados no modelo do Labirinto em Cruz Elevado (item 3.4)

3.6 – Tratamento estatístico

Para avaliação estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0. As variáveis avaliadas na natação e no Labirinto em Cruz foram expressas em média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e posteriormente a análise de variância complementada pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

3.7 – Aspectos éticos e legais

O presente projeto de pesquisa teve início após aprovação do Comitê de Ética em uso Animal (CEUA) da UNIMAR – protocolo 018/2019.



4. RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1 Análise do comportamento dos animais no modelo modificado de natação forçada.

As Figuras 2 e 3 mostram o efeito da administração aguda do extrato de *P. alata* respectivamente sobre os tempos de movimentação e imobilidade. Nas doses utilizadas não houve diferença significativa entre os grupos.

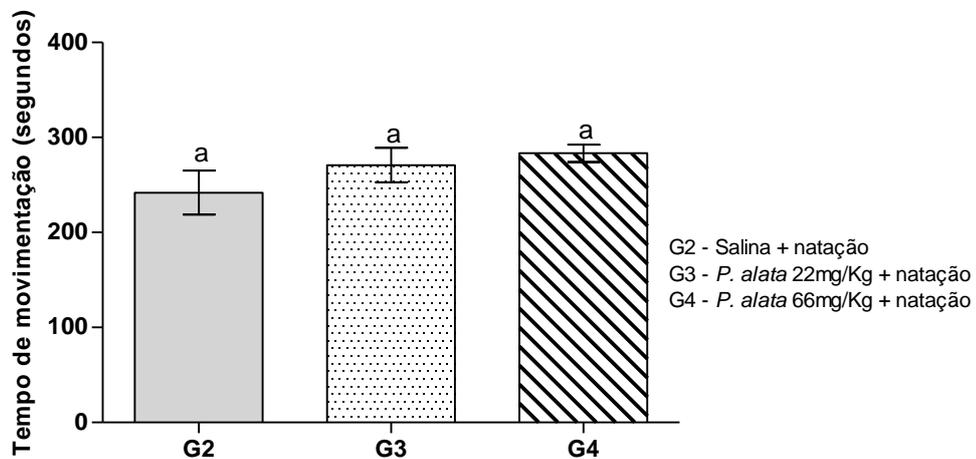


Figura 2. Efeito da administração aguda do extrato de *P. alata* sobre o tempo de movimentação no modelo de natação forçada. Resultados expressos em média \pm EPM. Não houve diferença estatisticamente significativa segundo o teste de Tukey ($p > 0,05$).

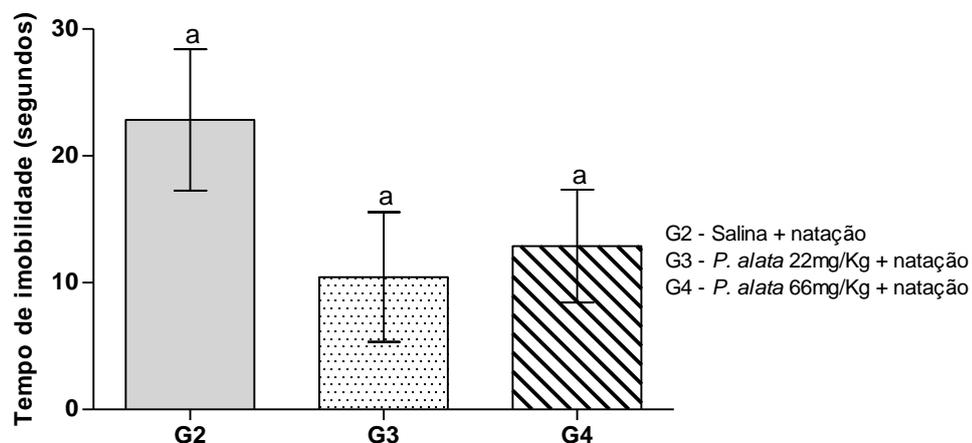


Figura 3. Efeito da administração aguda do extrato de *P. alata* sobre o tempo de imobilidade no modelo de natação forçada. Resultados expressos em média \pm EPM. Não houve diferença estatisticamente significativa segundo o teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.2 Análise do comportamento dos animais no modelo de labirinto em cruz elevado.

As Figuras 4 e 5 mostram os efeitos da natação e da administração aguda do extrato de *P. alata* sobre o tempo de permanência nos braços abertos e fechados, respectivamente em números absolutos e percentuais. Observa-se que o grupo que não foi submetido a natação (G1), em comparação aos demais (G2, G3 e G4) permaneceu mais tempo nos braços abertos. Por outro lado, os grupos submetidos a natação permaneceram mais tempo nos braços fechados. Nas doses utilizadas, o extrato de *P. alata* não alterou significativamente o tempo de permanência dos animais nos braços do LCE.

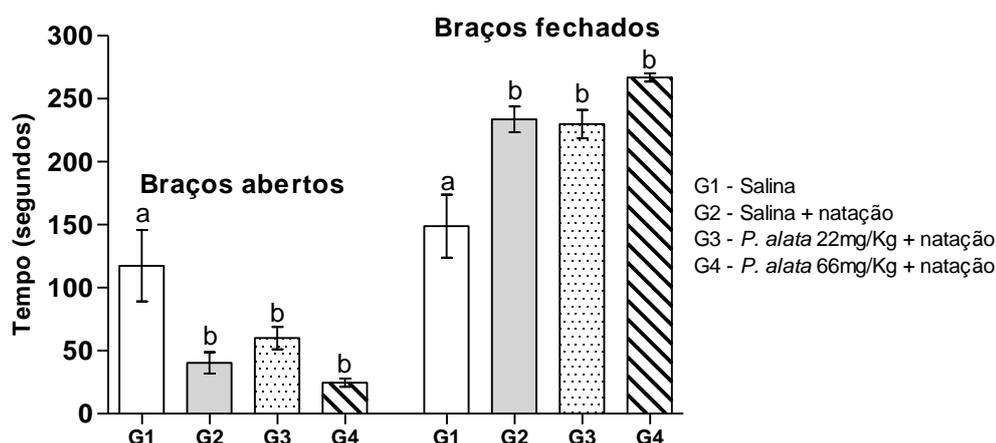


Figura 4. Efeitos da natação e da administração aguda do extrato de *P. alata* nos tempos de permanência nos braços abertos e fechados no modelo de labirinto em cruz elevado. Resultados expressos em média \pm EPM. Letras diferentes para grupos estatisticamente diferentes segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

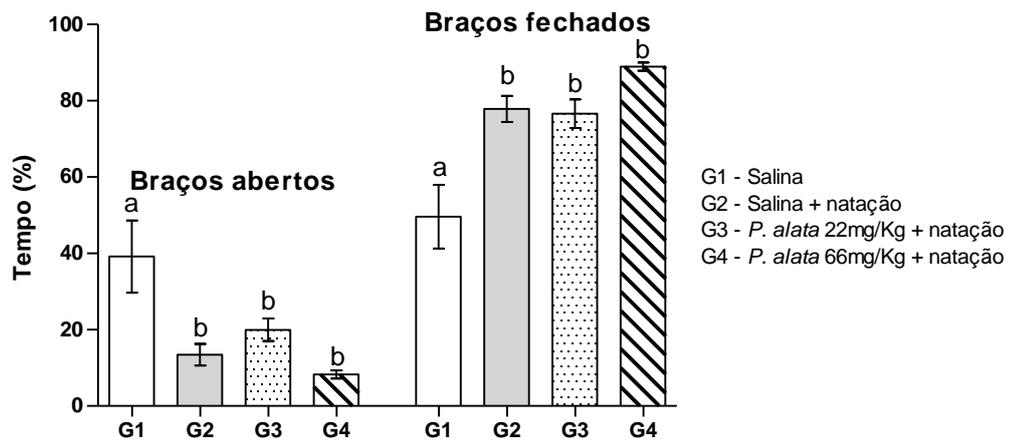


Figura 5. Efeitos da natação e da administração aguda do extrato de *P. alata* sobre as porcentagens de tempo nos braços abertos e fechados no modelo de labirinto em cruz elevado. Resultados expressos em média \pm EPM. Letras diferentes para grupos estatisticamente diferentes segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

A Figura 6 mostra os efeitos da natação e da administração aguda do extrato de *P. alata* sobre a locomoção, avaliada através do número de passagens pelo centro e número total de entradas nos braços do LCE. Observa-se que os animais submetidos a natação apresentaram menor locomoção em comparação aos animais que não foram submetidos a natação. Adicionalmente, pode-se observar que a administração do extrato de *P. alata* não alterou significativamente a movimentação dos animais.

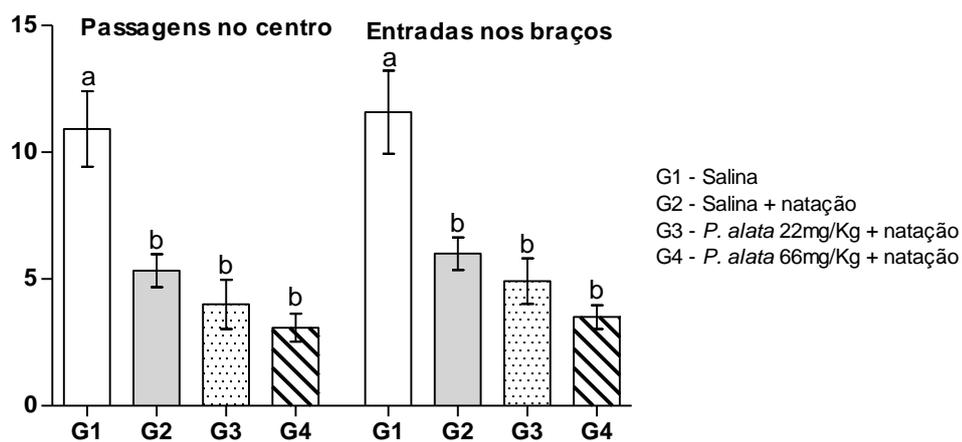


Figura 6. Efeitos da natação e da administração aguda do extrato de *P. alata* sobre a locomoção no teste de labirinto em cruz elevado, avaliada através do número de passagens pelo centro e número total de entradas nos braços abertos e fechados. Resultados expressos em média \pm EPM. Letras diferentes para grupos estatisticamente diferentes segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os efeitos da natação e da administração aguda do extrato de *P. alata* sobre o índice de ansiedade está demonstrado na Figura 7. Observa-se que o índice de ansiedade foi maior nos animais submetidos a natação. Não foram observadas diferenças significativas no índice de ansiedade entre os animais que receberam solução salina e extrato de *P. alata*.

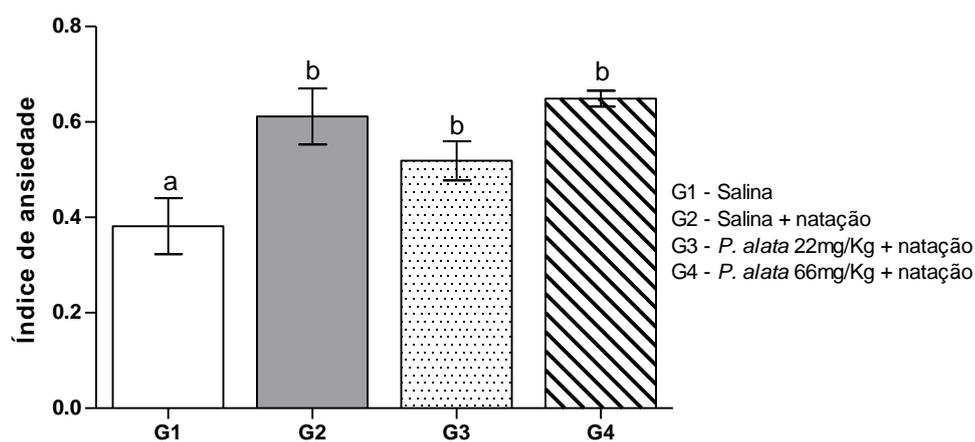


Figura 7. Efeitos da natação e da administração aguda do extrato de *P. alata* sobre o índice de ansiedade avaliado no modelo de labirinto em cruz elevado. Resultados expressos em média ± EPM. Letras diferentes para grupos estatisticamente diferentes segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).



5. DISCUSSÃO



5. DISCUSSÃO

Devido ao efeito ansiolítico, plantas do gênero *Passiflora* tem sido avaliadas para o tratamento da ansiedade, presente na depressão, transtornos de ansiedade e de estresse pós traumático (AMAN et al., 2016; KIM et al., 2017).

Estudo em animais podem ser úteis para elucidar o efeito de plantas (ARANTES et al., 2013; CAMPOS et al., 2013) e, nesse sentido a indução de medo e ansiedade pode ser feita por meio da exposição do animal a situações estressoras ou traumáticas através de estressores físicos (trauma subaquático, choque elétrico e contenção física), estressores sociais como instabilidade da “habitação) ou ainda estressores psicológicos como exposição ao predador ou ao seu odor ou ainda a retirada materna precoce (WHITAKER, GILPIN e EDWARDS, 2014). As referidas abordagens para indução de estados de ansiedade não buscam gerar transtornos de ansiedade, mas sim um estado de ansiedade presente nas diversas doenças (CAMPOS et al., 2013; KRAEUTER, GUEST e SARNYAI, 2019). O presente trabalho promoveu a indução de ansiedade através de uma modificação no modelo de natação descrito por PORSOLT et al. (1978), no qual o animal era exposto a natação em uma coluna de água de 15 cm. Segundo CALIL et al. (2002), nesse modelo a imobilidade do animal é normalmente interpretada como um desamparo, podendo ser utilizado para avaliação do efeito de fármacos antidepressivos. Porém, no presente estudo o modelo de PORSOLT foi modificado visto que os animais foram expostos a uma coluna de água de 30 cm. Como o exercício físico (gerado pela altura da coluna de água), a impossibilidade de fuga e a situação nova geradas pela natação envolvem um componente emocional, a mesma pode ser utilizada como agente estressor, estando o tempo de imobilidade relacionado com o nível de ansiedade visto que a imobilidade representaria uma melhor resposta adaptativa do animal a uma situação estressante (CALIL et al., 2002).

Os resultados do presente estudo mostraram que a administração do extrato de *P. alata* não promoveu efeito significativo sobre os tempos de movimentação (Figura 2) e de imobilidade (Figura 3) nos animais quando expostos a natação, o que sugere ausência de efeito ansiolítico.

Além da avaliação do comportamento no modelo de natação, o presente trabalho avaliou o comportamento dos animais no modelo de LCE.

O referido modelo, frequentemente utilizado para o estudo da ansiedade, se baseia na premissa de que a presença de um ambiente ou situação novos pode provocar reações conflitantes entre a ansiedade e a curiosidade/comportamento exploratório. Assim, ao estar exposto a uma nova situação, um roedor teria a tendência de explorar novos ambientes conflitando com o medo da altura e aversão ao braço fechado. Dessa forma, a evitação do braço aberto seria indicativa de ansiedade (ARANTES et al., 2013; CAMPOS et al., 2013; MORATO, 2006; PADURARIU et al., 2017; RICO et al., 2019; VERBITSKY, DOPFEL e ZHANG, 2020).

No presente trabalho, ao compararmos os grupos submetido (G1) e não submetido a natação (G2) é possível observar que a natação aumentou significativamente o tempo de permanência nos braços fechados e diminuiu o tempo nos braços abertos (Figuras 4 e 5), o que indica que foi efetiva para induzir um comportamento de ansiedade nos animais.

De acordo com STURMAN, GERMAIN e BOHACEK (2018), animais menos ansiosos tendem a explorar mais o ambiente. O presente estudo avaliou a locomoção no LCE através do número total de entradas nos braços e do número de passagens pelo centro (Figura 6). Os resultados demonstram que os animais submetidos a natação apresentaram menor locomoção, que associada a um menor número de entradas nos braços abertos, indica menor comportamento exploratório, sugerindo mais uma vez que os animais submetidos a natação apresentaram maior nível de ansiedade. De fato, o índice de ansiedade (Figura 7) foi maior no grupo G2 em comparação a G1.

Ao compararmos os grupos G2, G3 e G4, pode-se observar que não houve diferença significativa nos tempos de permanência (absoluto e em porcentagem) nos braços abertos e fechados (Figuras 4 e 5). Além disso, a atividade locomotora exploratória dos animais (Figura 6) não mostrou diferença entre os grupos, o que indica que a administração do extrato de *P. alata*, nas doses utilizadas não foi efetiva para diminuir o estado de ansiedade gerado pela natação, fato corroborado pelo índice de ansiedade, que não mostrou diferença significativa entre grupos submetidos a natação, independente do tratamento (Figura 7).

SOULIMANI et al. (1997) avaliaram o efeito da administração intraperitoneal do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Passiflora incarnata* na dose de 400mg/Kg em camundongos, no modelo de transição claro/escuro. O extrato foi capaz de

aumentar o tempo de locomoção e o tempo de permanência dos animais no lado claro do aparato, mostrando efeito ansiolítico.

Utilizando o modelo de LCE, DHAWAN et al. (2001) observaram que a fração metanólica do extrato das partes aéreas de *Passiflora incarnata* produziu efeito ansiolítico na dose de 10mg/Kg administrados por via oral em camundongos.

De modo semelhante, PETRY et al. (2001) utilizaram o modelo de LCE para avaliar o efeito ansiolítico do extrato hidroalcoólico das folhas de duas espécies do gênero *Passiflora* (*Passiflora edulis* e *Passiflora alata*), administradas por via intraperitoneal em fêmeas de ratos Wistar nas doses de 25, 50, 100 e 150mg/Kg. Os autores observaram que os animais que receberam o extrato de *Passiflora alata* nas doses de 100 e 150 mg/Kg e de *Passiflora edulis* nas doses de 50, 100 e 150mg/Kg permaneceram mais tempo nos braços abertos e menos tempo nos braços fechados, evidenciando dessa forma um efeito ansiolítico. Adicionalmente, os autores realizaram a caracterização fitoquímica dos extratos e determinaram a presença de flavonoides nas duas espécies e de triterpenos somente no extrato de *Passiflora alata*.

Em um estudo que avaliou em camundongos o efeito da administração aguda do extrato OTIFY et al., 2015 demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *Passiflora edulis* bem como algumas de suas frações, todos administrados pela via oral nas doses de 200mg/Kg aumentaram o tempo de permanência dos animais no braço aberto, sugerindo efeito ansiolítico. Adicionalmente, o extrato hidroalcoólico na dose de 400mg/Kg promoveu efeito sedativo.

JAWNA-ZBOINSKA et al. (2016) avaliaram os efeitos de um extrato padronizado de *Passiflora incarnata*, utilizando ratos Wistar machos e demonstraram que doses diárias do extrato de 30, 100 e 300 mg/Kg, administradas por via oral por um período de quatro semanas promoveu uma diminuição dose dependente na ansiedade. Adicionalmente, observaram uma depleção nos níveis de ácido glutâmico no hipocampo, paralelo a um aumento nos seus metabólitos, sugerindo um efeito relacionado ao GABA.

BARBOSA et al. (2008), utilizando o modelo de LCE demonstraram que a administração do extrato de *P. alata* por via intraperitoneal nas doses de 100 e 150mg/Kg em ratos Wistar machos proporcionaram efeito ansiolítico. Os autores determinaram que o conteúdo de flavonoides do extrato foi de 2,1%.

Além de estudos com a utilização em animais, os efeitos da *Passiflora incarnata* tem sido investigado em ensaios clínicos. DANTAS et al. (2017), avaliaram em um

ensaio clínico randomizado e duplo cego o efeito ansiolítico da administração oral de *Passiflora incarnata* na dose de 260mg, em pacientes submetidos a extração dentária. O efeito ansiolítico da *Passiflora* foi semelhante ao do midazolam.

Plantas do gênero *Passiflora*, especialmente a *Passiflora incarnata* apresenta diversos compostos em sua constituição com destaque para flavonóides como a crisina, isovitexina, orientina e vitexina. Outros compostos como alcalóides (harmina), aminoácidos e óleos essenciais também estão presentes (LANS, 2019; SAVAGE et al., 2018). O efeito ansiolítico parece ser devido a uma ação sobre o sistema gabaérgico (JAWNA-ZBOINSKA et al., 2016). Esses compostos estão presentes também na *P. alata*. De fato, os flavonoides presentes no gênero *Passiflora* exibem atividade semelhante ao GABA (FIEBICH et al., 2011; OTIFY et al., 2015). Essa atividade ansiolítica inerente ao sistema gabaérgico parece ser similar aos efeitos do diazepam e pode estar relacionada a afinidade dos compostos pelos receptores gabaérgicos, inibição da recaptção ou ainda modulação alostérica positiva dos receptores gabaérgicos subtipo A, que podem ocorrer através dos mesmos locais de ligação dos benzodiazepínicos (LANS, 2019; SAVAGE et al., 2018)

Baseado nos estudos citados acima, existem evidências de que as plantas do gênero *Passiflora* apresentam atividade ansiolítica comprovada em diversos modelos animais e até em ensaios clínicos.

Estudos prévios conduzidos por RIZZI et al. (2014) demonstraram a administração de 22mg/Kg de peso do extrato seco de *Passiflora* spp pela via intraperitoneal diminuiu os níveis de ansiedade avaliados no modelo de campo aberto.

Baseado nesse estudo, o presente trabalho avaliou o efeito da administração oral de doses de 22 e 66mg/Kg do extrato seco das folhas de *P. alata* e, tanto no modelo de natação quanto no modelo de LCE, a administração aguda desse extrato por via oral não foi capaz de diminuir os níveis de ansiedade. É importante destacar que as doses utilizadas foram menores que aquelas que efetivamente demonstraram efeito ansiolítico nos trabalhos acima descritos.

Adicionalmente, a maioria dos estudos descritos acima avaliou o extrato de *Passiflora incarnata*, descrita em alguns trabalhos como a espécie com maior atividade ansiolítica, alguns deles utilizaram vias diferentes da via oral e nenhum utilizou a natação como agente estressor.

Com relação aos ensaios clínicos, muitos não detalham a espécie avaliada, o preparo do extrato, o número de pacientes normalmente é pequeno e a descrição da randomização não é muito clara.

O presente estudo apresenta algumas limitações, especialmente por não utilizar uma droga ansiolítica de referência e pelo não conhecimento da composição fitoquímica do extrato utilizado. No modelo e nas doses utilizadas, não foi observado efeito ansiolítico. Porém o mesmo não deve ser descartado visto que diversos trabalhos tem demonstrado o potencial de espécies do gênero *Passiflora* para o tratamento de transtornos nos quais a ansiedade está presente.

Dessa forma, mais estudos são necessários para uma melhor avaliação dos efeitos da *P. alata* em modelos que utilizem a natação para indução de estresse e ansiedade.



6. CONCLUSÃO



6. CONCLUSÃO

- O modelo modificado de natação forçada foi efetivo para induzir um comportamento de ansiedade nos animais e
 - Nas condições experimentais utilizadas, a administração aguda do extrato seco das folhas de *P. alata* não diminuiu os níveis de ansiedade dos animais.
-



REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

AKINNUSI, M.; EL SOLH, A.A. Drug treatment strategies for insomnia in patients with post-traumatic stress disorder. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2019. DOI: 10.1080/14656566.2019.1574745

AMAN, U. et al. Attenuation of neuropathic allodynia and vulvodinia apropos GABA-ergic and opioidergic antinociceptive and behavioural mechanisms. *BMC Complement Altern Med.*, v.16, p.1-17, 2016. doi: 10.1186/s12906-016-1048-6

APA - American Psychiatry Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-4R. 4th.ed. Washington: American Psychiatric Association, 2000.

APA - American Psychiatry Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-5. 5th.ed. Washington: American Psychiatric Association, 2013.

ARANTES, R. et al. Mathematical methods to model rodent behavior in the elevated plus-maze. *J Neurosci Methods*, v. 220, n. 2, p. 141-148, 2013. doi: 10.1016/j.jneumeth.2013.04.022.

BARBOSA, P.R. et al. The Aqueous Extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* Reduce Anxiety-Related Behaviors Without Affecting Memory Process in Rats. *J Med Food.*, v. 11, n. 2, p. 282-288, 2008.

BISSON, J.I. et al. Post-traumatic stress disorder. *BMJ*, v. 26, p. 1-7, 2015. doi: 10.1136/bmj.h6161

CALIL, C.M. et al. Análise do significado do tempo de imobilidade em modelos experimentais de natação. *Braz J Pharm Sci.*, v. 38, n. 4, p. 479-485, 2002

CAMPOS, A.C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev. Bras. Psiquiatria*, v. 35, S101–S111. 2013. doi:10.1590/1516-4446-2013-1139

da CUNHA, R.S. et al., Herbal medicines as anxiolytics prior to third molar surgical extraction. A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig.*, sep 19, 2020. doi: 10.1007/s00784-020-03468-1

da FONSECA et al. Herbal Medicinal Products from *Passiflora* for Anxiety: An Unexploited Potential. *Sci World J.*, julho 20, 2020. doi: 10.1155/2020/6598434

DANTAS, L.P. et al. Effects of passiflora incarnata and midazolam for control of anxiety in patients undergoing dental extraction. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 22, n. 1, p. e95-e101, 2017.

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

FIEBICH, B. et al. Pharmacological studies in an herbal drug combination of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) and passion flower (*Passiflora incarnata*): In vitro and in vivo evidence of synergy between *Hypericum* and *Passiflora* in antidepressant pharmacological models. *Fitoterapia*, v. 82, n. 3, p. 474-480, 2011

GIOVANNINI, P.; HOWES, M.R. Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. *J Ethnopharmacol.*, v. 4. pii: S0378-8741(16)31264-8, 2017. doi:10.1016/j.jep.2017.02.011

HOU, W. et al. Effects of Ginseng on Neurological Disorders. *Front Cell Neurosci.*, v. 14, 2020. doi:10.3389/fncel.2020.00055

HUYNH, T.N. et al. Sex differences and phase of light cycle modify chronic stress effects on anxiety and depressive-like behavior. *Behavioural Brain Research*, v. 222, p. 212-222, 2011. doi:10.1016/j.bbr.2011.03.038

HYDE, H.; RYAN, K.M.; WATERS, A.M. Psychophysiological Markers of Fear and Anxiety. *Current Psychiatry Reports*, v. 21, n. 56, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11920-019-1036-x>

JAWNA-ZBOINSKA, K. et al. *Passiflora incarnata* L. Improves Spatial Memory, Reduces Stress, and Affects Neurotransmission in Rats. *Phytother Res.*, v. 30, p. 781–789, 2016.

KESSLER, R.C. et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, v. 62, n. 6, p. 593-602, 2005.

KILPATRICK, D.G. et al. National estimates of exposure to traumatic events and PTSD prevalence using DSM-IV and DSM-5 criteria. *Journal of Traumatic Stress*, v. 26, p. 537–547, 2013. <https://doi.org/10.1002/jts.21848>

KIM, H.; SONG, M.J. Traditional Plant-Based Therapies for Respiratory Diseases Found in North Jeolla Province, Korea. *Journal of alternative and complementary medicine*, v. 18, n. 3, p. 1-7, 2012. doi:10.1089/acm.2010.0848

KIM, M. et al. Role Identification of *Passiflora Incarnata* Linnaeus: A Mini Review. *Journal of Menopausal Medicine*, v. 23, p. 156-159, 2017. <https://doi.org/10.6118/jmm.2017.23.3.156>

KIM, G.H. et al. Improvement in neurogenesis and memory function by administration of *Passiflora incarnata* L. extract applied to sleep disorder in rodent models. *J Chem Neuroanat.*, v. 87, p. 27-40, 2019. doi: 10.1016/j.jchemneu.2019.03.005

KRAEUTER, A.K.; GUEST, P.C.; SARNYAI, Z. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods Mol Biol.* v. 1916, p. 105-111, 2019. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_10

LANS, C. Do recent research studies validate the medicinal plants used in British Columbia, Canada for pet diseases and wild animals taken into temporary care? *J ethnopharmacol.* v. 236, p. 366-392, 2019.

LIBERZON I.; KHAN, S.; YOUNG, E.A. Animal models of posttraumatic stress disorder. *Handb Stress Brain*, v. 15, p. 231–250, 2005.

LIU, L. et al. Herbal Medicine for Anxiety, Depression and Insomnia. *Current Neuropharmacology*, v. 13, p. 481-493, 2015. doi: 10.2174/1570159X1304150831122734

MIRODDI, M. et al. *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 150, p. 791–804, 2013

MORATO, S. O papel d visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. *Psicologia USP*, v. 17, n. 4, p. 159-174, 2006.

OLIVEIRA, R.B. et al. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium mbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, n. 3, p. 485-491, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. Depression and other common mental disorders: global health estimates [Internet]. Geneva: WHO; 2017[cited 2017 Nov 04]. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254610/1/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>

OTIFY, A. et al. Mechanistic evidence of *Passiflora edulis* (Passifloraceae) anxiolytic activity in relation to its metabolite fingerprint as revealed via LC-MS and chemometrics. *Food Funct.*, n. 6, v. 12, p. 3807-3817.

PANDURARIU, M. et al. Describing some behavioural animal models of anxiety and their mechanistics with special reference to oxidative stress and oxytocin relevance. *Int J Veterinary Sci and Med.*, v. 5, p. 98-104, 2017.

PATEL, S.S. et al. *Passiflora incarnata* Linn: A phytopharmacological review. *International Journal of Green Pharmacy*, oct/dec, p. 277-281, 2009. DOI: 10.4103/0973-8258.59731

PEREIRA-LIMA, K.; LOUREIRO, S.R.; CRIPPA, J.A. Mental health in medical residents: relationship with personal, work-related, and sociodemographic variables. *Rev Bras Psiquiatr.*, v. 38, p. 318-324, 2016. doi:10.1590/1516-4446-2015-1882

PETRY, R.D. et al. Comparative Pharmacological Study of Hydroethanol Extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* Leaves. *Phytother. Res.*, v. 15, p. 162–164, 2001.

PORSOLT, R.D. et al. Behavior al despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.*, v. 47, n. 4, p. 379-391, 1978.

RAHBARDAR, M.G.; HOSSEINZADEH, H. Effects of rosmarinic acid on nervous system disorders: an updated review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, n. 393, p. 1779-1795, 2020.

REMES, O. et al. A systematic review of reviews on the prevalence of anxiety disorders in adult populations. *Brain and Behavior*, v. 6, n. 7, p. 1-33, 2016. doi: 10.1002/brb3.497.

RICO, J.L.; BONUTI, R.; MORATO, S. The elevated gradient of aversion: a new apparatus to study the rat behavior dimensions of anxiety, fear, and impulsivity. *Braz J Med Biol Res.*, n. 52, v. 11, e8899, 2019.

RIZZI, G. et al. Effects of valeriana officinalis and passiflora sp on the behavior of wistar rats. *Int J Dev Res.*, v. 7, n. 9, p. 15012-15015, 2017.

SARRIS J. Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: 10-year updated review. *Phytotherapy Research*, p. 1-16, 2018. doi: 10.1002 / ptr.6055

SAVAGE, K. et al. K. GABA-modulating phytomedicines for anxiety: A systematic review of preclinical and clinical evidence. *Phytother. Res.*, v. 32, p. 3-18, 2018. doi: 10.1002/ptr.5940

SOULIMANI, R. et al. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. *J Ethnopharmacol.*, v. 57, p. 11-20, 1997.

STURMAN, O.; GERMAIN, P-C; BOHACEK, J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress.*, v. 21, n. 5, p. 443-452, 2018.

TAKAGI, Y. et al. A common brain network among state, trait, and pathological anxiety from whole-brain functional connectivity. *NeuroImage*, v. 172, p. 506–516, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.01.080>.

THOMAS, K. et al. Effects of valerian on subjective sedation, field sobriety testing and driving simulator performance. *Accid Anal Prev.*, v. 92, p. 240-244, 2016. doi: 10.1016/j.aap.2016.01.019

VERBITSKY, A.; DOPFEL, D.; ZHANG, N. Rodent models of post-traumatic stress disorder: behavioral assessment. *Transl Psychiatry*, v. 10, n. 1, p.132, 2020. doi: 10.1038/s41398-020-0806-x

WHITAKER, A.M.; GILPIN, N.W.; EDWARDS, S. Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder and Recent Neurobiological Insights. *Behav Pharmacol.*, v. 25, p. 398-409, 2014. doi:10.1097/FBP.000000000000069.



ANEXOS



UNIVERSIDADE DE MARÍLIA



CEUA – Comitê de Ética em uso Animal

CERTIFICADO

CIAEP-01.0218.2014

Certificamos que o projeto intitulado “EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA E CRÔNICA DO EXTRATO DE *PASSIFLORA SPP* EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A ESTRESSE NO MODELO DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO” (Protocolo 018/2019) que envolve produção, manutenção e /ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL (CEUA) DA UNIVERSIDADE DE MARÍLIA.

Vigência do projeto	Abril 2019 a agosto 2020
Espécie/linhagem	Ratos Wistar
Número de animais	32
Peso / Idade	180-220g
Sexo	Machos

Marília, 26 de junho de 2019,

Prof. Dra. Daniela Vieira Buchaim
Coordenadora do CEUA