

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA INTEGRADA
THAÍS MALHEIROS CHAVES

ANÁLISE DA AÇÃO ANSIOLÍTICA E ANTICONVULSIVANTE DE
***Indigofera suffruticosa* MILL EM ROEDORES.**

Recife – PE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA INTEGRADA
THAÍS MALHEIROS CHAVES

ANÁLISE DA AÇÃO ANSIOLÍTICA E ANTICONVULSIVANTE DE
***Indigofera suffruticosa* MILL EM ROEDORES.**

Dissertação apresentada ao Colegiado da Pós-Graduação em Clínica Odontológica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Rodrigues Almeida.

Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto.

Recife – PE

2010

Chaves, Thaís Malheiros

Análise as ação ansiolítica e anticonvulsivante de
Indigofera suffruticosa MILL em roedores / Thaís
Malheiros Chaves. – Recife: O Autor, 2010.

48 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Odontologia, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. *Indigofera suffruticosa* MILL. 2. Ação
anticonvulsivante. 3. Ação ansiolítica. I. Título.

615.322
615.32

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2010-102

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA INTEGRADA

COLEGIADO

Profa. Dra. Alessandra de Albuquerque T. Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Prof. Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Profa. Dra. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

SECRETARIA

Oziclere de Araújo Sena

ANÁLISE DA AÇÃO ANSIOLÍTICA E ANTICONVULSIVANTE DE
***Indigofera suffruticosa* MILL EM ROEDORES.**

THAÍS MALHEIROS CHAVES

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23/02/2010.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Silvana Maria Orestes Cardoso: _____

Profa. Dra. Silvia Regina Jamelli: _____

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque Tavares Carvalho: _____

Recife – PE

2010

Ata da 93ª Defesa de Dissertação do Curso de Mestrado em Odontologia com área de Concentração em Clínica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 23 de fevereiro de 2010.

Às 09:00(nove horas) do dia 23 (Vinte e três) do mês de fevereiro do ano de dois mil e dez, reuniram-se no auditório do Curso de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, os membros da Banca Examinadora, composta pelos professores: Profa. Dra. SILVANA MARIA ORESTES CARDOSO, atuando como presidente, Profa.Dra. SILVIA REGINA JAMELLI, atuando como primeiro examinador. Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, atuando como segundo examinador, para julgar o trabalho intitulado **“ANÁLISE DA AÇÃO ANSIOLÍTICA E ANTICONVULSIVANTE DE *Indigofera suffruticosa* MILL EM ROEDORES”**, da mestranda THAÍS MALHEIROS CHAVES, candidata ao Grau de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração em CLÍNICA INTEGRADA, sob orientação do Prof.Dr. EDVALDO RODRIGUES DE ALMEIDA, Co-orientação do Prof. Dr. GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO. Dando início aos trabalhos a Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, membro do Programa de Pós Graduação em Odontologia, abriu os trabalhos convidando os senhores membros para compor a Banca Examinadora, foram entregues aos presentes cópias do Regimento Interno do Curso de Mestrado em Odontologia, que trata dos critérios de avaliação para julgamento da Dissertação de Mestrado. A presidente da mesa após tomar posse conferiu os membros, seguindo convidou a CD. THAÍS MALHEIROS CHAVES., para expor sobre o aludido tema, tendo sido concedido trinta minutos. A candidata expôs o trabalho e em seguida colocou-se a disposição dos Examinadores para arguição. Após o término da arguição os Examinadores reuniram-se em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuíram a candidata os seguintes conceitos: Profa. Dra. SILVIA REGINA JAMELLI (**APROVADA**), Profa .Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, (**APROVADA**) Profa. Dra. SILVANA MARIA ORESTES CARDOSO, (**APROVADA**), a candidata recebeu três conceitos (**APROVADA**) é considerada (**APROVADA**), devendo a candidata acatar as sugestões da Banca Examinadora de acordo com o Regimento Interno do Curso, face a aprovação,

fica a candidata, apta a receber o Grau de Mestre em Odontologia, cabendo a Universidade Federal de Pernambuco através de sua Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós Graduação, tomar as providências cabíveis. Nada mais havendo a tratar, A Presidente da Banca Examinadora encerrou a sessão e para constar foi lavrada a presente ata que vai por mim assinada, Oziclere Sena de Araújo e pelos demais componentes da Banca Examinadora e pela recém formada mestre pela UFPE, **THAÍS MALHEIROS CHAVES**.

Oziclere Sena de Araújo

Recife, 23 de fevereiro de 2010.

Profa.Dra. SILVANA MARIA ORESTES CARDOSO

Presidente *[Assinatura]*

Profa. Dra. SILVIA REGINA JAMELLI

1º Examinador *[Assinatura]*

Profa. Dra. *Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho*
ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO

2º Examinador

Dedicatória

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Geraldo Chaves Reinaldo e Arlete Malheiros Chaves, meus primeiros e eternos educadores, que não mediram esforços para tornar possíveis os meus sonhos. Pelo apoio, amor infinito, pelo companheirismo em todos os momentos da minha vida, por confiarem em minhas habilidades. Qualquer palavra é pequena para expressar a gratidão e o amor imenso que sinto por vocês.

Ao meu namorado, Adelmo Cavalcanti Aragão Neto, pela contribuição com a pesquisa, por seu constante apoio, por querer minha excelência pessoal e profissional ao longo desta etapa da minha vida. Pela paciência inesgotável com que sempre estive disposto a escutar minhas alegrias e tristezas, dúvidas e certezas e pelo grande amor com o qual tem me presenteado, obrigada.

Agradecimentos especiais

Ao Prof. Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto, por confiar em mim durante todos esses anos, orientando e corrigindo de forma atenciosa e motivadora. Meu eterno agradecimento pelo carinho, paciência e dedicação.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Edvaldo Rodrigues de Almeida, por ter me proporcionado a oportunidade de um novo aprendizado, novas experiências e conhecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos financeiros disponibilizados.

Ao meu irmão, Gustavo Malheiros Chaves, por todo carinho, companheirismo, pelo apoio e palavras de ânimo e alegria nos momentos difíceis.

Ao amigo Arnôldo Vasconcelos Alencar Filho, pela amizade e dedicação em todos os momentos em que precisei de sua ajuda.

Ao amigo Aluizio Roberto da Silva, por ter estado presente em todos os momentos da pesquisa, sempre disposto a ajudar e contribuir com seus conhecimentos, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Haroudo Xavier, pelo suporte, dedicação e conhecimento oferecidos.

Aos professores do Mestrado em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelas aulas ministradas e conhecimento transmitido.

Aos colegas de turma, por tornarem tudo mais divertido.

A todos os funcionários da UFPE pela colaboração durante o curso.

E a Todos que de alguma forma me ajudaram a concluir mais essa fase da minha vida.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Determinação da DL_{50} através do extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa*. 35

Tabela 2 – Distribuição dos grupos para realização dos modelos experimentais. 35

Tabela 3 – Médias do tempo de latência em segundos $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos grupos em todos os testes anticonvulsivantes analisados. 36

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Tempo de Latência após administração do Pentilenotetrazol.....	37
Figura 2 – Tempo de Latência após administração da Picrotoxina.....	37
Figura 3 – Tempo de Latência após administração da Estrictina.....	38
Figura 4 – Tempo de Latência após administração da Pilocarpina.....	38
Figura 5 – Tempo de Latência após administração da Lidocaína.....	39
Figura 6 – Tempo de Permanência nos braços abertos durante o Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	39
Figura 7 – Número de esferas Escondidas durante o Teste de Esconder as Esferas..	40

LISTA DE ABREVIATURAS

CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
i.p.	Intraperitoneal
DL	Dose Letal
ANOVA	Análise de Variância
EPM	Erro Padrão da Média
EM	Extrato Metanólico
DZP	Diazepam
PTZ	Pentilenotetrazol
PIC	Picrotoxina
GABA	Ácido gama-aminobutírico

RESUMO

Indigofera suffruticosa Mill, conhecida popularmente por Anil do Campo, é utilizada na Medicina tradicional como agente antiespasmódico, sedativo, diurético e antiinflamatório. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação anticonvulsivante e ansiolítica desta planta através do extrato metanólico de suas folhas. Camundongos albinos Swiss foram submetidos às doses de 100, 300 e 500mg/kg do extrato metanólico. Para investigação da ação anticonvulsivante os animais sofreram a ação dos seguintes convulsivantes: Pentilenotetrazol 100mg/kg, Picrotoxina 10mg/kg, Estricnina 2mg/kg, Pilocarpina 600mg/kg e Lidocaína 200mg/kg. Na avaliação da ação ansiolítica da planta, os camundongos foram submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado e ao Teste de Esconder as Esferas. Como droga padrão, utilizou-se em todos os modelos experimentais o Diazepam, nas doses de 2mg/kg para os testes anticonvulsivantes e 1mg/kg para os testes de ansiedade. O extrato metanólico demonstrou ação anticonvulsivante, aumentando o tempo de latência para o início da primeira convulsão em todos os testes realizados, sendo a dose de 300mg/kg considerada ideal. Apesar da comprovação de sua ação anticonvulsivante, e portanto depressora do Sistema Nervoso Central, não foi observada ação ansiolítica em nenhuma das doses testadas. Os resultados desta investigação demonstram que esta é uma planta promissora para estudos futuros no desenvolvimento de novas drogas anticonvulsivantes

Palavras-Chave: Anticonvulsivante, Ansiolítico, Sistema Nervoso Central, Camundongos, *Indigofera suffruticosa*.

ABSTRACT

Indigofera suffruticosa Mill, popularly known in Brazil by Anil do Campo, is used in the traditional Medicine as antispasmodic, sedative, diuretic and antiinflammatory agent. The present study had as objective to evaluate the anticonvulsant and anxiolytic action of this plant through the methanolic extract of its leaves. Swiss albinics mice had been submitted to doses of 100, 300 and 500mg/kg of the methanolic extract. For inquiry of the anticonvulsant action, the animals had suffered the action from the following convulsants: Pentylenetetrazol 100mg/kg, Picrotoxin 10mg/kg, Estricnine 2mg/kg, Pilocarpin 600mg/kg and Lidocain 200mg/kg. In the evaluation of the anxiolytic action of the plant, the mice were submitted to the Elevated Plus Maze and the Test To Hide the Spheres. Diazepam was used in all the experimental models as standard drug, in the doses of 2mg/kg for the anticonvulsant tests and 1mg/kg for the anxiety tests. The methanolic extract demonstrated anticonvulsant action, increasing the time of latency for the beginning of the first convulsion in all the tests. The ideal dose from the methanolic extract was 300mg/kg. Although the evidence of its anticonvulsant action, and therefore depressive action of the Central Nervous System, it was not observed any anxiolytic action in none of the tested doses. The results of this study demonstrate that this is a promising plant for future studies in the development of new anticonvulsants drugs.

Keywords: Anticonvulsant, Anxiolytic, Central Nervous System, Mice, *Indigofera suffruticosa*.

SUMÁRIO

Artigo.....	15
1. Introdução.....	16
2. Materiais e métodos.....	17
3. Resultados.....	22
4. Discussão.....	23
Referências.....	29
Anexos.....	41
Normas do Journal of Ethnopharmacology.....	42
Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	48

Artigo

Análise da Ação Ansiolítica e Anticonvulsivante de *Indigofera suffruticosa* Mill em Roedores.

T.M. Chaves¹, G.B.L. Couto² e E.R. Almeida³

¹ Estudante de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Doutor em Odontopediatria, Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

³ Doutor em Farmacologia, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Autor para correspondência:

Edvaldo Rodrigues de Almeida

Endereço: Departamento de Antibióticos.

Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil. 50670-901.

E-mail: edvaldo.ra@gmail.com

Introdução

Vários estudos farmacológicos têm demonstrado a ação terapêutica de extratos vegetais em diversas patologias induzidas experimentalmente em animais de laboratório. Isso tem aberto perspectivas favoráveis no sentido de se ter nas plantas uma grande fonte de substâncias, que em um futuro próximo, poderão ter emprego na terapêutica convencional (alopatia), através do isolamento e identificação de princípios ativos, para os mais variados males que afligem o homem (Castro e Ferreira, 2001; Coelho de Souza et al., 2004; Salatino et al., 2005).

Um conceito consolidado por grande parte da população consiste no fato de que o consumo de plantas medicinais traz benefício irrestrito, sendo atribuído a esta prática pouco ou nenhum risco. Essa afirmativa deve ser questionada, uma vez que muitos fitoterápicos possuem princípios ativos capazes de modificar funções orgânicas, bem como de interferir na ação dos fármacos administrados simultaneamente, ambos os fenômenos negativos para a resposta terapêutica (Zaroni et al., 2004).

Indigofera suffruticosa Mill (Fabaceae), comum em regiões tropicais e subtropicais, é uma leguminosa utilizada na adubação verde e cobertura dos solos. Essa forrageira anual ou perene é adaptada à região do semi-árido e agreste do estado de Pernambuco. Conhecida popularmente como “Anil do Campo” ou “Anileira”, é encontrada do sudoeste dos Estados Unidos à Argentina (Braga, 1985). É utilizada popularmente como agente antiespasmódico, sedativo, diurético e antiinflamatório (Leite et al., 2003). Efeitos embriotóxicos (Leite et al., 2004) e atividade antimicrobiana (Leite et al., 2006) têm sido relatados. Em uma investigação química de extratos de folhas de *I. suffruticosa* foi revelado a presença de alcalóides, flavonóides, esteróides, proteínas, carboidratos e índigo (NAPRALERT, 2003).

A epilepsia é um distúrbio relativamente comum com prevalência em torno de 1% na população em geral. É um termo usado a um grupo de condições crônicas cuja principal manifestação clínica é a ocorrência de convulsões. Apesar da importância do tratamento com drogas antiepiléticas tradicionais, entre 20-30% dos pacientes não conseguem obter controle adequado das crises convulsivas ou apresentam efeitos colaterais significativos. Portanto, a elevada toxicidade bem como os efeitos colaterais das drogas antiepiléticas tem motivado a contínua busca de alternativas medicamentosas mais atraentes (Paglioli et al., 2004).

Roig e Mesa (1974) reportaram que uma das propriedades da *Indigofera suffruticosa* é sua ação antiepilética; mais tarde sendo confirmado por Alejo et al. (1996) e Alejo et al. (1998). Wong et al. (1999) evidenciaram um efeito protetor sobre a diminuição dos aminoácidos inibitórios taurina e glicina e sobre o aumento do aminoácido excitatório ácido glutâmico.

A depressão e a ansiedade são desordens mentais de grande prevalência na população geral e, na maioria das vezes, coexistem num mesmo paciente. No entanto, somente cerca de 60-70% dos pacientes respondem aos tratamentos atualmente disponíveis, observando-se que nem sempre o resultado é satisfatório. Dessa forma, a busca por tratamentos mais eficazes, com menos efeitos colaterais é justificada (Buller e Legrand, 2001). Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar a ação anticonvulsivante e ansiolítica de *Indigofera suffruticosa* MILL através do extrato metanólico de suas folhas.

2 Materiais e Métodos

2.1 Animais Experimentais

Foram utilizados um total de 320 camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) pesando em média 20 a 25 g, que foram mantidos no biotério do Departamento de Antibióticos/UFPE,

Pernambuco/Brasil, sob temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$ e ciclo claro e escuro de 12 horas (claro das 6 às 18 horas e escuro das 18 às 6 horas). Os camundongos foram alimentados com dietas do biotério (“LABINA” Purina Brasil), sendo essa considerada dieta padrão (com 23% de proteínas). Todos os experimentos foram realizados no período da manhã iniciando às 8 horas. As drogas foram administradas via intraperitoneal (i.p.). Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas (CEEa-UFPE).

*2.2 Preparação do Extrato Metanólico de Folhas de *I. suffruticosa**

Na obtenção do extrato metanólico, foram utilizados 500g do material seco, previamente triturado em máquina forrageira. A extração foi realizada através de solventes de polaridade crescente (hexano, acetato de etila e metanol). Primeiramente utilizou-se o hexano (2 litros) a 40°C por 10 minutos e removeu-se o resíduo sólido por filtração em filtro de papel. Ao material sólido filtrado, foi adicionado o acetato de etila (1litro). Após 24h de repouso o material foi aquecido e novamente filtrado. Ao novo material sólido separado, adicionou-se o último solvente, o metanol. Após 24 horas o metanol foi filtrado e removido em rota-vapor. Em seguida foi realizada a liofilização, resultando em um rendimento de 25g de um material viscoso e escuro, o qual foi cuidadosamente lacrado e estocado a 20°C até o momento dos testes.

2.3 Determinação da dose letal (DL_{50})

Os animais foram divididos em grupos de 8 camundongos (**Tabela 1**). O extrato metanólico foi administrado (i.p.) em doses crescentes até que se obtivesse o valor que determina a DL_{50} (dose responsável por provocar a morte de pelo menos 50% da população em estudo). A dose de 1600 mg/kg provocou a morte de 50% do grupo sendo, portanto, a DL_{50} encontrada.

2.4 Doses teste

Seguindo-se o método de Litchfield e Wilcoxon (1949) em que se deve utilizar como valor máximo a dose de 40% da DL_{50} , encontrou-se como dose máxima 640mg/kg. Realizou-se testes piloto com grupos de 6 animais, onde se obteve resultado positivo a partir de 100mg/kg.

2.5 Grupos

Os animais foram divididos em grupos de 8 camundongos cada, perfazendo um total de 40 animais por teste, de acordo com a **Tabela 2**.

2.6 Drogas

Nos testes de ansiedade foi administrado o Diazepam (Dienpax®, Sanofi-Wintrop, Brasil) na dose de 1mg/kg. Nos testes anticonvulsivantes foram administradas as seguintes drogas: Diazepam 2mg/kg (Dienpax®, Sanofi-Wintrop, Brasil), Pentilenotetrazol 100mg/kg (Sigma, EUA), Picrotoxina 10mg/kg (Sigma, EUA), Estricnina 2mg/kg (Sigma, EUA), Pilocarpina 600mg/kg (Sigma, EUA) e Lidocaína 200mg/kg (Lidoston®). As drogas foram diluídas 30 minutos antes dos experimentos em salina 0,9% e administrados por via intraperitoneal em volume de 1ml.

Todas as doses do extrato metanólico foram preparadas 30 minutos antes dos experimentos, através da diluição do extrato em solução de tween 80 (Merck®, EUA) e salina 0,9% e administrados por via intraperitoneal em volume de 1ml. Cada animal foi utilizado uma única vez. Após os experimentos os animais foram sacrificados com dose excessiva de tiopental e encaminhados para incineração.

2.7 Testes anticonvulsivantes

O grupo controle recebeu salina 0,9%; o grupo padrão recebeu diazepam 2 mg/kg e os grupos teste receberam o extrato em suas respectivas doses (100, 300 ou 500mg/kg). Após 60 minutos foi administrada uma droga convulsivante (i.p.). Os convulsivantes testados foram: Pentilenotetrazol 100mg/kg, Picrotoxina 10mg/kg, Estricnina 2mg/kg, Pilocarpina 600mg/kg ou Lidocaína 200mg/kg. Foi observado o tempo de latência até o início da primeira convulsão (Gupta et al., 1999).

2.8 Testes de Ansiedade

2.8.1 Labirinto em Cruz Elevado

O teste do labirinto em cruz elevado é uma modificação do instrumento validado por Lister (1987) para camundongos e consiste de dois braços abertos (30 x 50,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm) originando-se de um centro comum da plataforma (5 x 5 cm). Os dois pares de braços idênticos são opostos um ao outro, formando uma cruz. O aparato inteiro é elevado a uma altura de 40 cm do chão. No começo da sessão o camundongo é colocado no centro da plataforma com a cabeça olhando para o braço aberto, deixando-se que o animal explore por 5 minutos. Foi marcado o tempo de permanência nos braços abertos. O grupo controle recebeu salina 0,9%, o grupo padrão recebeu diazepam 1 mg/kg, os grupos teste receberam suas respectivas doses de extrato (100, 300 ou 500mg/kg). Este modelo baseia-se no conhecimento de que ratos e outros roedores evitam locais abertos e elevados. Uma maior intensidade de “ansiedade” equivale a uma menor preferência por braços abertos (Morato e Brandão, 1997).

2.8.2 Teste de esconder as esferas

Vinte e cinco esferas de vidro transparente (20 mm de diâmetro) foram usadas para cada teste individual. Foram utilizadas gaiolas opacas de plástico liso (30 x 36 x 13 cm), com teto de vinil contendo buracos de ar e possuindo em seu interior uma camada de serragem de 5cm de altura. Os camundongos foram colocados individualmente nas gaiolas de plástico com serragem por 15 minutos (período de habituação) e depois recolocados em suas gaiolas originais. As esferas de vidro transparente foram colocadas na serragem das gaiolas de habituação. O grupo controle recebeu salina 0,9%, o grupo padrão recebeu diazepam 1mg/kg e os grupos teste receberam suas respectivas doses de extrato (100, 300 ou 500mg/kg). Os camundongos foram reintroduzidos nessas gaiolas (cada camundongo retornou exatamente para mesma gaiola a que já estava habituado). Depois de 15 minutos, o animal foi removido e foram contados o número de esferas de vidro que estavam mais de dois terços cobertas por serragem. O aumento de esferas recobertas é apontado como indicativo de “ansiedade”, já que se supõe representar para o animal o desconhecido, ou seja, um agente estranho cuja presença pode representar ameaça. (Broekkamp et al., 1986).

2.9 Análise Estatística

Os dados foram expressos como as médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos grupos (n=8) e observados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o programa estatístico *GraphPad Prism*, versão 5.00.

3 Resultados

A **Tabela 3** aponta o efeito da administração intraperitoneal de salina (0,9%), diazepam (2mg/kg) e extrato metanólico (100, 300 e 500 mg/kg) obtido de folhas de *Indigofera suffruticosa*, em camundongos submetidos aos vários Testes Anticonvulsivantes. Os resultados representam as médias do tempo de latência em segundos $\pm$ EPM de cada grupo. Observa-se que em todos os testes analisados o grupo padrão (diazepam 2,0mg/kg) e os grupos teste (EM 100, 300 e 500mg/kg) aumentaram significativamente o tempo de latência para o início das convulsões ($p < 0,001$), em relação ao grupo controle que recebeu salina 0,9%, confirmando uma ação anticonvulsivante.

Nos testes onde foram administrados o Pentilenotetrazol (**Fig. 1**), Estricnina (**Fig. 3**) e Pilocarpina (**Fig. 4**) não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos que receberam diazepam e extrato metanólico nas doses de 300mg/kg e 500mg/kg, os quais podem ser considerados semelhantes ao diazepam.

No teste da Picrotoxina (**Fig. 2**), o grupo padrão apresentou melhor resultado que os grupos teste, observando-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) deste em relação aos 3 grupos teste (EM 100, EM 300 e EM 500).

Quando realizada a administração da Lidocaína (**Fig. 5**), o grupo padrão (DZP 2mg/kg) apresentou resultados semelhantes ($p > 0,05$) ao grupo teste de 100mg/kg (EM 100). Os grupos teste de 300mg/kg e 500mg/kg não demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre si e apresentaram resultados superiores ao Diazepam ($p < 0,001$).

Em todos os testes anticonvulsivantes, o grupo teste na dose de 300mg/kg apresentou-se semelhante ($p>0,05$) ao grupo teste de 500mg/kg. As doses de 300mg/kg e 500mg/kg apresentaram resultados superiores à dose de 100mg/kg ($p<0,001$).

No teste do Labirinto em Cruz Elevado (**Fig. 6**), apenas o grupo padrão (DZP 1mg/kg) apresentou resultados superiores ($p<0,001$) ao grupo controle (salina 0,9%), permanecendo mais tempo nos braços abertos. Não houve diferença ($p>0,05$) entre o grupo controle (salina 0,9%) e os grupos teste (EM 100, EM 300 e EM 500), podendo-se afirmar que o extrato metanólico não apresentou ação ansiolítica em nenhuma das doses testadas. As médias do tempo de permanência nos braços abertos foram: controle = $43,12 \pm 28,05s$; padrão = $178,00 \pm 5,90s$; EM100 = $46,75 \pm 29,59s$; EM300 = $54,125 \pm 22,66s$; EM500 = $50,00 \pm 20,96s$.

Também não foi encontrada ação ansiolítica nos grupos teste (EM 100, EM 300 e EM 500) quando submetidos ao teste de Esconder as Esferas (**Fig. 7**). Apenas o grupo padrão (DZP 1mg/kg) escondeu um número de esferas significativamente inferior ($p<0,001$) ao grupo controle (salina 0,9%), demonstrando baixo nível de estresse. As médias do número de esferas escondidas foram: controle = $18,00 \pm 1,82s$; padrão = $2,50 \pm 1,60s$; EM100 = $17,62 \pm 1,92s$; EM300 = $16,50 \pm 3,07s$; EM500 = $18,25 \pm 1,75s$.

4 Discussão

O presente estudo avaliou a ação anticonvulsivante e ansiolítica de *Indigofera suffruticosa* Mill, espécie bastante encontrada na região do Agreste Pernambucano. Para determinação das três doses do extrato metanólico a serem utilizadas no estudo, realizou-se a DL_{50} , onde encontrou-se a dose de 1600mg/kg como responsável por provocar a morte de pelo menos 50% da população em estudo, demonstrando ser uma planta de baixa toxicidade. Resultados diferentes foram encontrados por Leite (2003), que constatou que o extrato aquoso de *I. suffruticosa* pode

ser considerado atóxico pois não apresentou índice de mortalidade em camundongos albinos suíços nas diferentes doses de 50 a 2000mg/kg.

A ação anticonvulsivante de *I. suffruticosa* foi pouquíssimo estudada, sendo que os estudos de Alejo et al., 1996; Wong et al., 1999 e Alejo et al., 1998, são os únicos trabalhos encontrados na literatura. Todos os estudos foram realizados em Cuba, testaram uma única dose (60mg/kg), e utilizaram apenas um teste químico (Picrotoxina).

No presente trabalho, utilizou-se inicialmente o modelo animal clássico das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ), pois se sabe que o bloqueio das convulsões neste modelo em camundongos é característica de algumas drogas depressoras do Sistema Nervoso Central pertencentes à classe dos anticonvulsivantes (Andre et al., 2000; Duveau et al., 2005; Tanay et al., 2006). O PTZ promove convulsões por inibir canais de cloreto associados com receptores GABA_A, reduzindo assim a neurotransmissão inibitória (Rubaj et al., 2000; Rejdak et al., 2000; Zhang et al., 2002). Dessa forma, diante dos resultados encontrados neste estudo pela ação do extrato metanólico quando submetido ao pentilenotetrazol, especialmente nas doses de 300 e 500mg/kg as quais apresentaram resultados semelhantes ao Diazepam 2mg/kg, pode-se sugerir que o extrato metanólico de *I. suffruticosa* parece atuar promovendo a potencialização da inibição sináptica mediada pelo GABA, reduzindo a excitabilidade neuronal e aumentando o limiar convulsivante.

O modelo da Picrotoxina é um modelo de epilepsia focal recorrente, para crises do tipo pequeno mal, ou de crises de ausência. A picrotoxina (PIC) é um poderoso estimulante do Sistema Nervoso Central sendo utilizada na indução química de convulsões através do antagonismo aos receptores GABAérgicos (Zivanovic et al., 2005; Smith et al., 2007; Meldrum e Rogawski, 2007). Seu mecanismo de ação é semelhante ao do Pentilenotetrazol, impedindo a

abertura dos canais de cloro, mesmo que o GABA se ligue ao seu receptor (Jung et al., 2002; Slaght, 2002).

Nas investigações para determinar a ação anticonvulsivante do extrato metanólico na presença de picrotoxina, encontrou-se um resultado favorável, com um significativo aumento do tempo de latência para o início das convulsões em relação ao grupo controle (salina 0,9%). A reversão da estimulação induzida por picrotoxina pelo extrato metanólico é considerado um parâmetro eficaz no estudo de drogas da classe dos anticonvulsivantes que atuam em mecanismos que envolvem o sistema GABAérgico. Os resultados deste estudo concordam com os de Alejo; Rodríguez; Flores, 1998, que através de um extrato de acetato de etila preparado a partir de folhas, frutos e caule de *I. suffruticosa* na dose de 60mg/kg confirmaram a ação anticonvulsivante da planta quando submetida a picrotoxina.

Diferentes resultados foram encontrados por Alejo et al., 1996, que testaram a ação anticonvulsivante do extrato aquoso de *Indigofera suffruticosa* na dose de 60mg/kg através do modelo de indução de convulsões tônico-clônicas por picrotoxina, não encontrando ação protetora no extrato utilizado. Os autores obtiveram resultados positivos apenas quando os animais foram submetidos ao Teste do Eletrochoque Máximo.

A discrepância nos resultados observados pode ser atribuída aos diferentes solventes utilizados na preparação dos extratos. Nesse sentido, Dhawan et al. (2002) afirmam que a diferença das respostas biológicas pode ser consequência da variabilidade química do conjunto das substâncias presentes num extrato, o que é inerente à complexidade da matéria-prima viva e também produto do processo extrativo ao qual a planta foi submetida.

As convulsões induzidas pela administração sistêmica da estriçnina consistem apenas de extensões tônicas. A estriçnina é um potente convulsivante e atua, principalmente, como antagonista competitivo seletivo da inibição pós-sináptica mediada pela glicina. Sua principal

ação é o aumento da excitabilidade reflexa da medula (Engel, 2001; Berg et al., 2003; Gilman, 2003). Quando os animais foram submetidos à estriçnina, o extrato metanólico analisado nesse estudo apresentou atividade anticonvulsivante em todas as doses testadas, sendo as doses de 300 e 500mg/kg semelhantes ao diazepam. Dessa forma, pode se sugerir que o extrato metanólico de *I. suffruticosa* comportou-se de forma eficaz reduzindo o bloqueio dos receptores de glicina a nível medular.

A convulsão induzida por pilocarpina também pode ser útil para caracterizar os mecanismos de ação de drogas anticonvulsivantes para o tratamento da epilepsia. O modelo de convulsão induzido por pilocarpina em animais é bastante utilizado para estudar a fisiopatologia do processo convulsivo, uma vez que reproduz as alterações comportamentais e eletroencefalográficas que são semelhantes à epilepsia do lobo temporal de humanos (Mathern et al., 2002; Buckmaster et al., 2002; Cavazos et al., 2003). Todas as doses do extrato metanólico testadas nesse estudo apresentaram resultados positivos, aumentando o tempo de latência para o início da primeira convulsão, sendo que as doses de 300 e 500mg apresentaram resultados equivalentes ao diazepam 2mg/kg. Sendo assim, é possível afirmar que o extrato tem mecanismo de ação eficaz nas crises convulsivas parciais, as quais estão localizadas no lobo temporal.

O efeito estimulatório dos anestésicos locais no Sistema Nervoso Central é o resultado indireto de uma depressão de centros inibitórios cerebrais. Se os níveis séricos de lidocaína alcançarem 7.5 a 10 mcg/ml, ocorrerão convulsões tônico-clônicas generalizadas (D'eraimo et al., 2003; Chiu et al., 2004). As convulsões são tipicamente de duração curta e auto-limitadas; entretanto, a parada respiratória é comum por causa da depressão do centro respiratório que acompanha a convulsão. A progressão do quadro com hipóxia, cianose e parada cardíaca é facilitada pela combinação deletéria de consumo aumentado de oxigênio, causado pelos

movimentos convulsivos, e diminuição da oferta (depressão respiratória). Neste estudo observou-se um aumento do tempo de latência para o início das convulsões tônico-clônicas em todas as doses testadas do extrato metanólico quando os animais foram submetidos à lidocaína 200mg/kg (i.p). A dose de 100mg/kg apresentou-se semelhante ao diazepam, enquanto que as doses de 300 e 500mg/kg apresentaram resultados superiores.

Não há, até o momento, nenhum estudo publicado com a avaliação da atividade ansiolítica de *Indigofera suffruticosa*. No Teste do Labirinto em Cruz Elevado realizado neste estudo, o tratamento com o diazepam, uma droga benzodiazepínica, levou a um significativo aumento no tempo de permanência nos braços abertos. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que mostraram que o diazepam produz efeito ansiolítico tanto experimental quanto clinicamente (De-Paris et al., 2002; Dhawan et al., 2002; Mora et al., 2005, Agra et al., 2007). A administração do extrato metanólico, no entanto, resultou em comportamento similar aos animais que receberam salina 0,9%.

Também no Teste de Esconder as esferas, os animais tratados com o extrato metanólico não apresentaram ação ansiolítica, sendo apenas o grupo padrão (diazepam 1mg/kg) responsável por alterações comportamentais que confirmam um perfil ansiolítico, demonstrado por um menor número de esferas escondidas. A administração do diazepam reduziu esse comportamento de recobrir as esferas de vidro em vários outros estudos encontrados na literatura (Coleta et al., 2006; Aguirre-Hernández et al., 2007; Barbosa et al., 2008).

O presente estudo fornece evidências de que o extrato metanólico das folhas de *Indigofera suffruticosa* Mill nas doses de 100, 300 e 500mg/kg possuem efeito anticonvulsivante quando administrados por via intraperitoneal em camundongos. No entanto, estudos subseqüentes são necessários para verificar os mecanismos de ação do extrato e para elucidar quais princípios

ativos estão envolvidos nessa atividade central. Os resultados deste estudo indicam que a atividade anticonvulsivante de *I. suffruticosa* apresentou-se eficaz nos vários mecanismos de indução de convulsão testados, podendo-se sugerir que o extrato atua promovendo a potencialização da inibição sináptica mediada pelo GABA; reduzindo o bloqueio dos receptores de glicina a nível medular; além de se apresentar efetivo em crises convulsivas parciais, localizadas no lobo temporal. Pode-se sugerir como ideal, a dose de 300mg/kg, que se apresentou de superior à dose de 100mg/kg e semelhante à dose de 500mg/kg em todos os testes anticonvulsivantes realizados. Apesar de sua ação anticonvulsivante, e portanto depressora do Sistema Nervoso Central, não foi observada ação ansiolítica no extrato metanólico de *I. suffruticosa*. Os resultados desta investigação podem aumentar nosso entendimento no uso desta planta como um meio terapêutico anticonvulsivante. Esta é uma planta promissora para estudos futuros no desenvolvimento de novas drogas anticonvulsivantes.

Referências

1. Agra, M.F., França, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17, 114-140.
2. Aguirre-Hernández, E., Martínez, A.L., González-Trujano, M.E., Moreno, J., Vibrans, H., Soto-Hernández, M., 2007. Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice. *J Ethnopharmacol* 109, 140-145
3. Alejo, J.P.L. de, Miranda, R., Rodríguez, G., 1996. Actividad Anticonvulsivante (Antiepileptica) del extracto fluido de *Indigofera suffruticosa* (Anil Cimarro'n). *Rev Cubana Plant Med* 1, 7-10.
4. Alejo, J.L.P.de, Rodríguez, G., Flores, R.M., 1998. Actividad Anticonvulsivante de lãs Fracciones Butanólica e Acetato de Etilo de La *Indigofera suffruticosa* Mill (Anil Cimarrón). *Rev Cubana Plant Med* 3, 7-11.
5. Andre, V., Ferrandon, A., Marescaux, C., Nehlig, A., 2009. The lesional and epileptogenic consequences of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus are affected by previous exposure to isolated seizures: effects of amygdala kindling and maximal electroshocks. *Neuroscience* 99, 469-81.
6. Barbosa, P.R., Valvassori, S.S., Bordignon, C.L. Jr., Kappel, V.D., Martins, M.R., Gavioli, E.C., Quevedo, J., Reginatto, F.H., 2008. The aqueous extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. *J Med Food* 11, 282-288.
7. Berg, A.T., Langfitt, J., Shinnar, S., Vickrey, B.G., Sperling, M.R., Walczak, T., Bazil, C., Pacia, S.V., Spencer, S.S., 2003. How long does it take for partial epilepsy to become intractable? *Neurology* 60,186-90.

8. Braga, R., 1985. Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceara. 4. ed. Natal: Editora Universitária da UFRN, 41-43.
9. Broekkamp, C.L., Rijik, H.W., Joly-Geloind, Loyd, K.L., 1986. Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swiminduced grooming in the mice. *European Journal of Pharmacogy* 126, 223-9.
10. Buckmaster, P.S., Zhang, G.F., Yamawaki, R., 2002. Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit. *J Neurosci* 22, 6650-8.
11. Buller, R., Legrand, V., 2001. Novel treatments for anxiety and depression: hurdles in bringing them to the market. *Drug Discov. Today, Kidlington*, v. 6, n. 23, p. 1220-1230.
12. Castro, H.G., Ferreira, F.A., 2001. A Dialética do conhecimento no uso das Plantas Medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 3, 19-21.
13. Cavazos, J.E., Zhang, P., Qazi, R., Sutula, T.P., 2003. Ultrastructural features of sprouted mossy fiber synapses in kindled and kainic acid-treated rats. *J Comp Neurol* 458, 272-92.
14. Chiu, C.Y., Lin, T.Y., Hsia, S.H., Lai, S.H., Wong, K.S., 2004. Systemic anaphylaxis following local lidocaine administration during a dental procedure. *Pediatr Emerg Care* 20, 178-80.
15. Coelho de Souza, G., Haas, A.P.S., Von Poser, G.L., Schapoval, E.E.S., Elizabetsky, E., 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol* 90, 135-43.
16. Coleta, M., Batista, M.T., Campos, M.G., Carvalho, R., Cotrim, M.D., Lima, T.C., Cunha, A.P., 2006. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. *Phytother Res* 20, 1067-1073.

17. De-Paris, F. et al., 2002. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. *Acta Farm. Bon.*, Buenos Aires 21, 5-8.
18. D'eramo, E.M., Bookless, S.J., Howard, J.B., 2003. Adverse events with outpatient anesthesia in Massachusetts. *J Oral Maxillofac Surg* 61, 793-800.
19. Dhawan, K. et al., 2002. Comparative anxiolytic activity profile of various preparations of *Passiflora incarnata* Linneaus: a comment on medicinal plants' standardization. *J. Altern. Complement. Med.*, New York, 8, 83-291.
20. Duveau, V., Arthaud, S., Serre, H., Rougier, A., Le Gal La Salle, G., 2005. Transient hyperthermia protects against subsequent seizures and epilepsy-induced cell damage in the rat. *Neurobiol Disc* 19,142-9.
21. Engel, Jr. J., 2001. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report of the ilae task force on classification and terminology. *Epilepsia* 42, 796-803.
22. Gupta, M., Mazumnmdr, U.K., Chakrabarti, S., 1999. *Fitoterapia*. 70, 244.
23. Jung, M.E., Lal, H., Gatch, M.B., 2002. The discriminative stimulus effects of pentylenetetrazole as a model of anxiety: recent developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 26, 429- 439.
24. Leite, S.P., Medeiros, P.L., Silva, E.C., Maia, M.B.S., Lima, V.L.M., Saul, D.E., 2004. Embryotoxicity *in vitro* with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. *Reproductive Toxicology* 18, 701-705.
25. Leite, S.P., Silva, L.L.S., Catanho, M.T.J.A., Lima, E.O., Lima, V.L.M., 2003. Antiinflammatory activity of *Indigofera suffruticosa* extract. *Rebrasa* 7, 47–52.

26. Leite, S.P., Vieira J.R.C., Medeiros, P.L., Leite, R.M.P., Lima, V.L.M., Xavier, H.S., 2006. Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. *Evid Based Complement Alternat Med* 3, 261–5.
27. Lister, R.G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacol* 92, 180-185.
28. Litchfield, J.T., Wilcoxon, F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 96, 99–113.
29. Mathern, G.W., Adelson, P.D., Cahan, L.D., Leite, J.P., 2002. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyers hypothesis revisited. *Prog Brain Res* 135,237-51.
30. Meldrum, B.S., Rogawski, M.A., 2007. Molecular Targets for Antiepileptic Drug Development. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental* 4,18.61.
31. Mora, S. et al., 2005. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav* 82, 373-378.
32. Morato, S., Brandão, M. L., 1997. Paradoxal increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed to two kinds of aversive stimuli. *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research* 30, 1113-20.
33. Napralert. Natural Products Alert, 2003. Illinois University, Chicago.
<http://www.uic.edu/pharmacy/depts/PCRPS/NAPRALERT.htm>
34. Paglioli, E., Palmini, A., Paglioli, E., Costa, J.C., Portuguese, M., Martinez, J.V., Calcagnotto, M.E., Hoefel, J.R., Raupp, S., Coutinho, L.B., 2004. Survival analysis of the surgical outcome of temporal lobe epilepsy due to hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 45, 1383-91.

35. Rejdak, K., Rejdak, R., Kleinrok, Z., Sieklucka-Dziuba, M., 2000 The influence of MK-801 on bicuculline evoked seizures in adult mice exposed to transient episode of brain ischemia. *J Neural Transm* 107, 947-57.
36. Roig, T., Mesa, J.T., 1974. *Plantas Medicinales Aromáticas y Venenosas de Cuba*. La Habana Cuba: Editorial Ciencia y Técnica Instituto del Libro, 315–16.
37. Rubaj, A., Gustaw, K., Zgodzinski, W., Kleinrok, Z., Sieklucka-Dziuba, M., 2000. The role of opioid receptors in hypoxic preconditioning against seizures in brain, *Pharmacol Biochem Behav* 67, 65-70.
38. Salatino, A., Teixeira, E.W., Negri, G., Message, D., 2005. Origin and chemical variation of Brazilian Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2, 33–38.
39. Smith, M., Wilcox, K.S., White, H.S., 2007. Discovery of antiepileptic drugs. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 4, 12-17.
40. Slaght, S.J., 2002. Activity of thalamic reticular neurons during spontaneous genetically determined spike and wave discharges. *Journal of Neuroscience* 22, 2323-2334.
41. Tanay, E., Mundel, P., Sommer, C., 2006. Short-term ischemia usually used for ischemic preconditioning causes loss of dendritic integrity after long-term survival in the gerbil hippocampus. *Brain Res* 1112, 222-6.
42. WHO - World Health Organization. Factsheet – Depression, 2005. Disponível em: http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en. Acesso em: 28 dez. 2009.
43. Wong, B.M., Rodriguez, S.N., Alejo, P.L.J., Perez, F.M., 1999. Actividad de la *Indigofera suffruticosa* Mill en la epilepsia crônica experimental y su relación con aminoácidos neurotransmissores. *Rev Cubana Plant Med* 1, 18–21.

44. Zaroni, M., Pontarolo, R., Abrahão, W.S.M., Fávero, M.L.D., Correia, C.J., Stremel, D.P., 2004. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. *Rev Bras Farmacogn* 14, 29-39.
45. Zhang, X., Cui, S.S., Wallace, A.E., Hannesson, D.K., Schmued, L.C., Saucier, D.M., Honer, W.G., Corcoran, M.E., 2002. Relations between brain pathology and temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 22, 6052-61.
46. Zivanovic, D., Stanojlovic, O., Mirkovic, S., Susic, V.. 2005 Ontogenetic study of metaphitinduced audiogenic seizures in rats. *Developmental Brain Research* 155, 42. 48.

TABELAS

Tabela 1 - Determinação da DL₅₀ através do extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa*.

Grupo	Dose (mg/kg)	Número de animais	Número de mortes
Grupo 1	100	8	0
Grupo 2	200	8	0
Grupo 3	400	8	0
Grupo 4	800	8	1
Grupo 5	1600	8	4

Tabela 2 – Distribuição dos grupos para realização dos modelos experimentais.

Grupos	Número de animais	Tratamento
Grupo controle	8	Salina 0,9%
Grupo padrão	8	Diazepam
Grupo teste 1	8	Extrato metanólico 100mg/kg
Grupo teste 2	8	Extrato metanólico 300mg/kg
Grupo teste 3	8	Extrato metanólico 500mg/kg

Tabela 3 – Médias do tempo de latência em segundos $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos grupos em todos os testes anticonvulsivantes analisados.

	Salina 0,9%	Diazepam 2mg/kg	Extrato Metanólico 100mg/kg	Extrato Metanólico 300mg/kg	Extrato Metanólico 500mg/kg
Pentilenotetrazol	89,50 $\pm$ 5,47	150,00 $\pm$ 10,15*	113,00 $\pm$ 5,68*	147,13 $\pm$ 7,64*	146,25 $\pm$ 7,45*
Picrotoxina	360,00 $\pm$ 3,92	527,75 $\pm$ 9,22*	434,13 $\pm$ 7,25*	505,13 $\pm$ 10,81*	496,00 $\pm$ 7,05*
Estricnina	118,88 $\pm$ 1,88	392,63 $\pm$ 9,14*	295,63 $\pm$ 9,47*	392,38 $\pm$ 12,59*	393,50 $\pm$ 9,41*
Pilocarpina	356,63 $\pm$ 6,52	491,75 $\pm$ 5,54*	394,63 $\pm$ 7,78*	494,63 $\pm$ 5,34*	493,63 $\pm$ 3,92*
Lidocaína	100,75 $\pm$ 4,80	153,38 $\pm$ 5,80*	151,88 $\pm$ 6,72*	299,38 $\pm$ 7,50*	297,50 $\pm$ 9,15*

Tabela 3. Efeito da administração intraperitoneal de salina (Sal 0,9%), diazepam (DZP 2 mg kg) e extrato metanólico (EM 100, 300 e 500 mg/kg) obtido de folhas de *Indigofera suffruticosa*, em camundongos submetidos aos vários Testes Anticonvulsivantes. Os tratamentos foram administrados 60 minutos antes do teste. Os resultados representam as médias $\pm$ EPM de cada grupo (n=8). *p<0,001 comparado com salina pela Anova seguida do teste de Tukey.

ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Tempo de Latência após administração do Pentilenotetrazol.

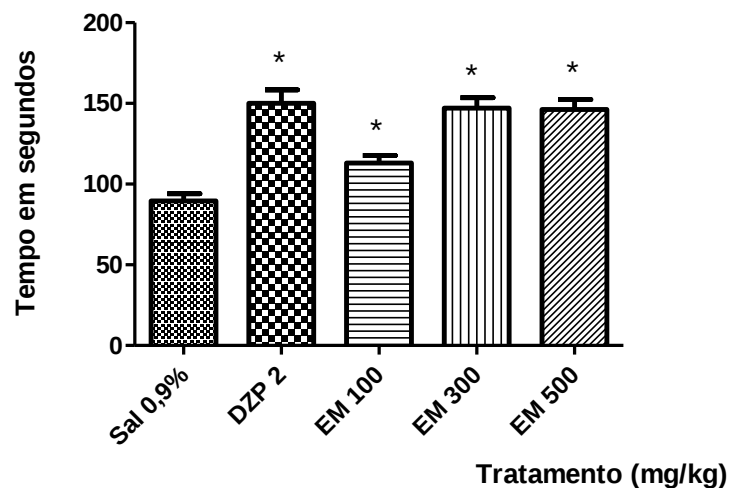


Figura 1. Efeito da administração intraperitoneal de salina (Sal 0,9%), diazepam (DZP 2 mg/kg) e extrato metanólico (EM 100, 300 e 500 mg/kg) obtido de folhas de *Indigofera suffruticosa*, em camundongos submetidos ao pentilenotetrazol na dose de 100mg/kg. Os tratamentos foram administrados 60 minutos antes do teste. As barras verticais representam as médias $\pm$ EPM de cada grupo (n=8). * $p < 0,001$ comparado com salina pela Anova seguida do teste de Tukey.

Figura 2 – Tempo de Latência após administração da Picrotoxina.

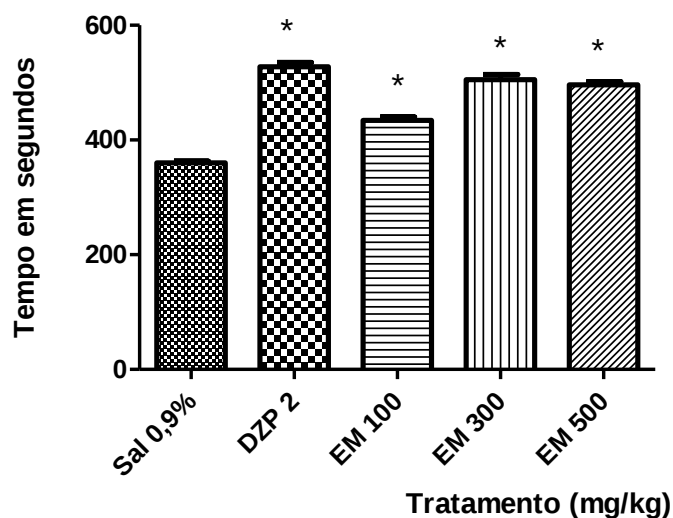


Figura 2. Efeito da administração intraperitoneal de salina (Sal 0,9%), diazepam (DZP 2 mg/kg) e extrato metanólico (EM 100, 300 e 500 mg/kg) obtido de folhas de *Indigofera suffruticosa*, em camundongos submetidos à picrotoxina na dose de 10mg/kg. Os tratamentos foram administrados 60 minutos antes do teste. As barras verticais representam as médias $\pm$ EPM de cada grupo (n=8). * $p < 0,001$ comparado com salina pela Anova seguida do teste de Tukey.

Figura 3 – Tempo de Latência após administração da Estricnina.

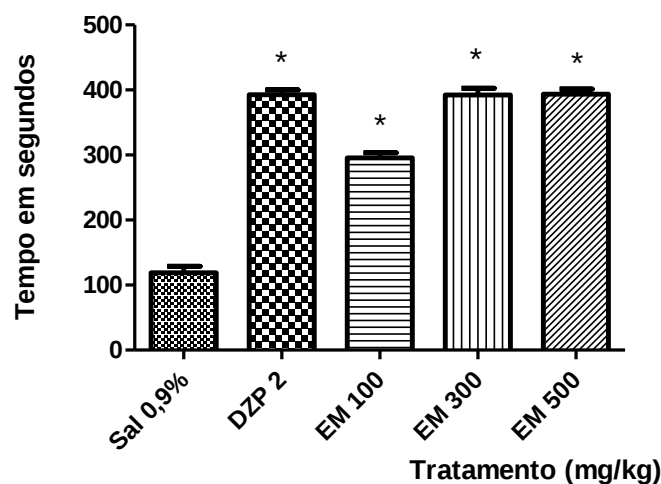


Figura 3. Efeito da administração intraperitoneal de salina (Sal 0,9%), diazepam (DZP 2 mg/kg) e extrato metanólico (EM 100, 300 e 500 mg/kg) obtido de folhas de *Indigofera suffruticosa*, em camundongos submetidos à estricnina na dose de 10mg/kg. Os tratamentos foram administrados 60 minutos antes do teste. As barras verticais representam as médias $\pm$ EPM de cada grupo (n=8). * $p < 0,001$ comparado com salina pela Anova seguida do teste de Tukey.

Figura 4 – Tempo de Latência após administração da Pilocarpina.

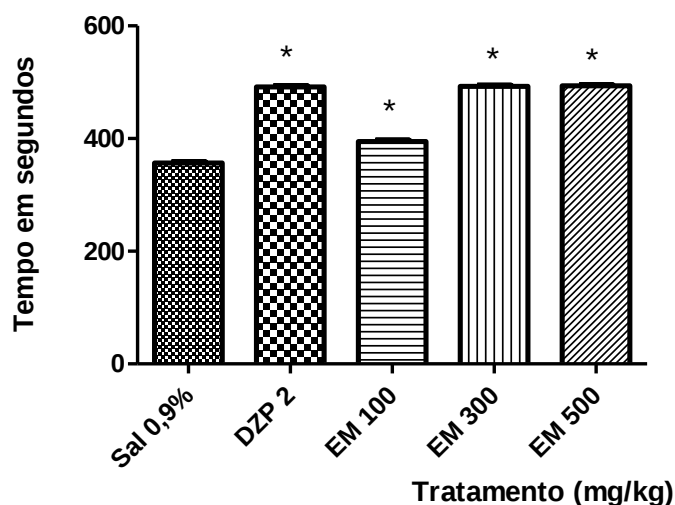


Figura 4. Efeito da administração intraperitoneal de salina (Sal 0,9%), diazepam (DZP 2 mg/kg) e extrato metanólico (EM 100, 300 e 500 mg/kg) obtido de folhas de *Indigofera suffruticosa*, em camundongos submetidos à pilocarpina na dose de 600mg/kg. Os tratamentos foram administrados 60 minutos antes do teste. As barras verticais representam as médias $\pm$ EPM de cada grupo (n=8). * $p < 0,001$ comparado com salina pela Anova seguida do teste de Tukey.

Figura 5 – Tempo de Latência após administração da Lidocaína.

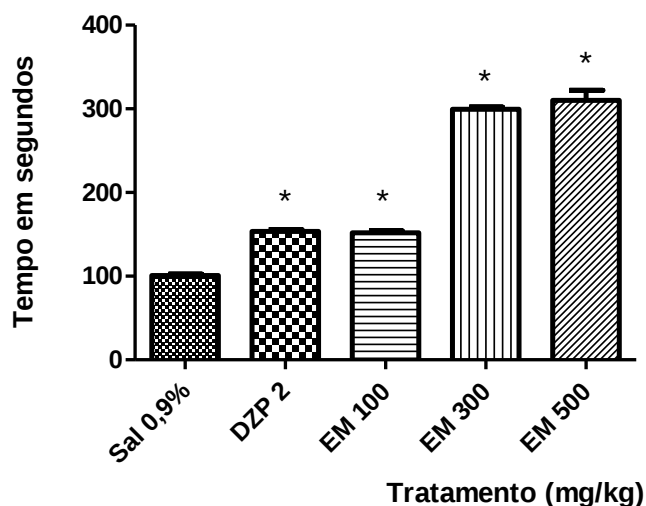


Figura 5. Efeito da administração intraperitoneal de salina (Sal 0,9%), diazepam (DZP 2 mg/kg) e extrato metanólico (EM 100, 300 e 500 mg/kg) obtido de folhas de *Indigofera suffruticosa*, em camundongos submetidos à lidocaína na dose de 200mg/kg. Os tratamentos foram administrados 60 minutos antes do teste. As barras verticais representam as médias ± EPM de cada grupo (n=8). * $p < 0,001$ comparado com salina pela Anova seguida do teste de Tukey.

Figura 6 – Tempo de Permanência nos braços abertos durante o Teste do Labirinto em Cruz Elevado.

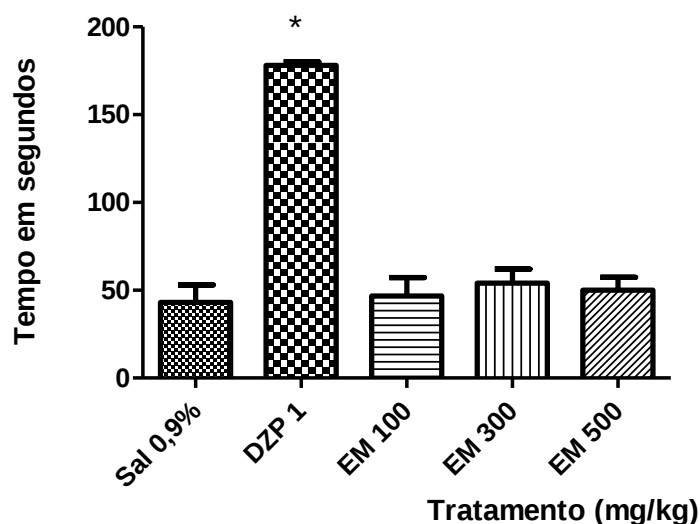


Figura 6. Efeito da administração intraperitoneal de salina (Sal 0,9%), diazepam (DZP 1 mg/kg) e extrato metanólico (EM 100, 300 e 500 mg/kg) obtido de folhas de *Indigofera suffruticosa*, em camundongos submetidos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado. Os tratamentos foram administrados 60 minutos antes do teste. As barras verticais representam as médias ± EPM de cada grupo (n=8). * $p < 0,001$ comparado com salina pela Anova seguida do teste de Tukey.

Figura 7 – Número de esferas Escondidas durante o Teste de Esconder as Esferas.

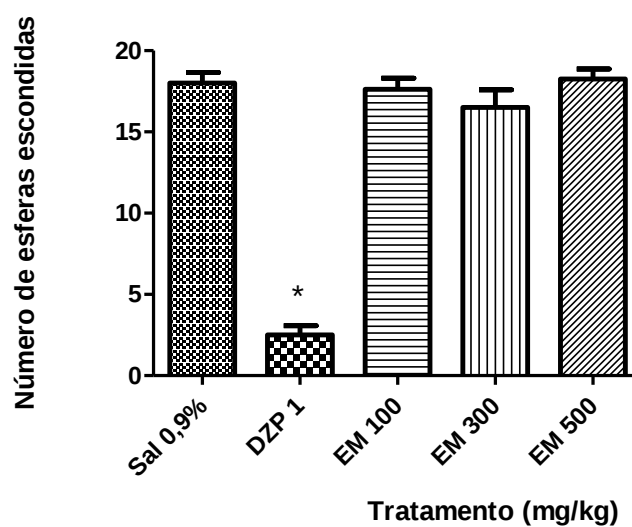


Figura 7. Efeito da administração intraperitoneal de salina (Sal 0,9%), diazepam (DZP 1 mg/kg) e extrato metanólico (EM 100, 300 e 500 mg/kg) obtido de folhas de *Indigofera suffruticosa*, em camundongos submetidos ao teste de Esconder as Esferas. Os tratamentos foram administrados 60 minutos antes do teste. As barras verticais representam as médias $\pm$ EPM de cada grupo (n=8). * $p < 0,001$ comparado com salina pela Anova seguida do teste de Tukey.

Journal of Ethnopharmacology

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs

ISSN: 0378-8741

Imprint: ELSEVIER

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs

The Official Journal of the [International Society for Ethnopharmacology](#)

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

The "rules of 5"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. [Click here.](#)

Types of paper

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.
2. Ethnopharmacological communications (formerly Short Communications) - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.
3. Letters to the Editors.
4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome.
5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.
6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk with an outline.
7. Conference announcements and news.

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication

see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

Animal and clinical studies - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

Biodiversity rights - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <https://languageediting.elsevier.com> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Additional information

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

In addition, you are recommended to adhere to the research standards described in the following articles:

Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, et al. *Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'*. J Ethnopharmacol 2006, 106: 290-302. [Click here.](#)

Matteucci, E., Giampietro, O. *Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research*. J Ethnopharmacol 2008, 115: 163-172. [Click here.](#)

T.SA. Froede and Y.S. Medeiros *Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity*. J Ethnopharmacol 2008, 115: 173-183. [Click here.](#)

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The author should divide the abstract with the headings *Aim of the study*, *Materials and Methods*, *Results*, and *Conclusions*.

Graphical abstract

Authors must supply a graphical abstract for all types of articles at the time the paper is submitted. The abstract should summarize the contents of the paper in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership and for compilation of databases. Carefully drawn figures that serve to illustrate the theme of the paper are desired. The content of the graphical abstract will be typeset and should have the dimensions 5 cm by 17 cm. Authors must supply the graphic separately as an electronic file. For examples of graphical abstracts, please visit the home page of *Fitoterapia* at  <http://www.sciencedirect.com/science/journal/0367326X>.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

➡ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of

electronic artwork, please see ➡ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author*: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors*: both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors*: first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication. Please use full journal names.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communication*. 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Supplementary and multimedia data

Elsevier accepts electronic supplementary and multimedia data to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>.

In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free

from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe

site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at  <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
 fax: (55 81) 2126 8350
 www.ccb.ufpe.br



Recife, 05 de março de 2009

Ofício nº 114/09

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE
 Para: **Prof. Edvaldo Rodrigues de Almeida**
 Departamento de Antibióticos - CCB
 Processo nº 23076.006792/2008-11

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado *“Avaliação do perfil psicofarmacológico de Indigofera suffruticosa Mill em roedores: análise de sua ação ansiolítica e anticonvulsivante.”*

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEAA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Maia Teresa Jansen
 Prof.ª Maria Teresa Jansen
 Presidente da CEEAA



Observação:

Origem dos animais: Biotério convencional; Animal;
 Camundongos albinos Swiss (Mus musculus); Sexo: Machos;
 Idade: 02 meses; Número de animais previsto no protocolo:
 330 animais.

