



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA  
“PROF. DELBY FERNANDES MEDEIROS”  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E  
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**Contribuição ao Conhecimento de *Erythrina velutina* Willd.  
(Fabaceae-Faboideae): Uma abordagem Farmacobotânica,  
Química e Farmacológica**

**INGRID CHRISTIE ALEXANDRINO RIBEIRO DE MELO**

João Pessoa - PB  
2011

**INGRID CHRISTIE ALEXANDRINO RIBEIRO DE MELO**

**Contribuição ao Conhecimento de *Erythrina velutina* Willd.  
(Fabaceae-Faboideae): Uma abordagem Farmacobotânica,  
Química e Farmacológica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: Farmacoquímica.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Agra**  
**Co-Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira**

João Pessoa - PB  
2011

**INGRID CHRISTIE ALEXANDRINO RIBEIRO DE MELO**

**Contribuição ao Conhecimento de *Erythrina velutina* Willd.  
(Fabaceae-Faboideae): Uma abordagem Farmacobotânica,  
Química e Farmacológica**

Dissertação aprovada em 25 de Fevereiro de 2011

COMISSÃO EXAMINADORA:

---

Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Maria de Fátima Agra  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Orientadora

---

Prof.Dr. Rivete Silva de Lima  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador Externo

---

Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Márcia Regina Piuvezam  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador Interno

*Á minha família, especialmente aos meus pais  
Maria José e Cristóvão, pelo apoio e motivação  
e ao meu namorado Leonardo Antunes Trindade,  
por sua paciência e dedicação.*

## AGRADECIMENTOS

Á **Deus** pelo dom da vida, por ser a luz em minha caminhada, nunca permitindo que eu andasse sozinha. Por sua constante proteção, que é fonte de fé e coragem para seguir em busca dos meus sonhos.

Aos meus pais **Maria José e Cristóvão**, pelo amor incondicional, pelos muitos momentos de suas vidas dedicados a mim, por serem a base e a essência do que eu sou, pelo apoio que me motivou a alcançar mais um dos meus objetivos.

Ao meu amor **Leonardo Antunes Trindade**, namorado, amigo e companheiro de todas as horas, por seu amor, carinho, paciência e atenção que foram fundamentais ao meu equilíbrio.

As minhas irmãs **Ivna e Irlen**, para as quais espero ser sempre um bom exemplo, obrigada pelo carinho e afeto.

Aos meus avós **Henrique Alexandrino, Clóvis Ribeiro e Domerina Ribeiro** (*in memoriam*) por terem sido exemplos de moral, dignidade e humildade. A minha querida avó **Maria das Dores Melo** que sempre esteve presente em minha vida e a quem também devo a minha formação.

Á minha tia **Fátima Melo** e aos meus **primos-irmãos Gibran e Júnior** por terem me ajudado e acolhido de tal forma, que sempre me senti em casa.

Á minha orientadora **Profa. Dra. Maria de Fátima Agra** e ao **Co-orientador Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira**, pela oportunidade e confiança que me foi concedida, além dos muitos ensinamentos transmitidos.

Á **Prof<sup>a</sup>. Dra. Bárbara Viviane** e a sua aluna de doutorado **Daysianne Pereira de Lira** pela amizade e grande contribuição científica para a realização desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida** por ter aberto as portas do Laboratório de Psicofarmacologia, a **Fabíola Lélis e Diogo Vilar** pela imensa ajuda durante os experimentos e aos funcionários do Biotério Prof. Dr. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pelo fornecimento dos animais.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica por terem me auxiliado por diversas vezes, especialmente **Raimundo Nonato, Ataíde, Vicente Carlos, Crispim, Dulce, Manuel**.

Aos amigos da botânica: **Kiriaki, Ionaldo, Géssica, Fernanda, Niara, Rafael, Natália, Sarah e Tarliane**. Aos amigos da química: **Daysianne, Jaqueline, Lázaro, Daniele, Fábio, Manuela, Ana Sílvia, Ísis, Augusto, Paula, Denise, Antonilene, Alexsandro, Severino**. Aos amigos da farmacologia: **Fabíola, Diogo, Corrinha**.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido.

Aos amigos e companheiros de laboratório que de forma direta ou indireta contribuíram com esse trabalho, aqueles que foram nomeados ou não, mas que muitas vezes e em poucas palavras me apoiaram nesta caminhada.

A todos, o meu muito obrigada!

## RESUMO

MELO, I. C. A. R. **Contribuição ao Conhecimento de *Erythrina velutina* Willd. (Fabaceae-Faboideae): Uma abordagem Farmacobotânica, Química e Farmacológica.** 99 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes Medeiros”. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2011.

*Erythrina velutina* Willd., é uma planta nativa da caatinga do nordeste brasileiro, conhecida pela sinonímia popular de “mulungu”. Destaca-se por uso das folhas, cascas e frutos na medicina popular, na qual é indicada como ansiolítica e sedativa. Este trabalho teve como objetivo realizar um estudo interdisciplinar farmacobotânico, químico e farmacológico, como uma contribuição ao maior conhecimento desta espécie de importância etnomedicinal. Estudos morfológicos foram realizados para sua identificação e morfodiagnoses. Para a caracterização anatômica realizou-se secções transversais (lâmina, pecíolo e peciólulo) e paradérmicas em ambas as faces das lâminas folíolares. As secções foram clarificadas, coradas com safranina e/ou safrablue, observadas e fotografadas ao microscópio óptico. O estudo farmacológico compreendeu a seleção dos extratos das cascas e folhas com melhor perfil farmacológico, a partir de uma triagem comportamental e em seguida, a realização de testes específicos com ênfase na avaliação da atividade ansiolítica/sedativa. Para caracterizar quimicamente a Fração Metanólica (FR. MeOH) obtida do extrato aquoso das folhas utilizando Amberlite XAD-2®, realizou-se o isolamento dos constituintes por CLAE e análises espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . O estudo farmacobotânico evidenciou a presença de parâmetros distintivos para *Erythrina velutina*, facilmente identificáveis, e de grande importância ao seu controle de qualidade. A Fração Metanólica apresentou características de droga sedativa e o seu estudo químico, apontou a presença de alcalóides que provavelmente são os responsáveis pelo efeito sedativo observado nos testes farmacológicos do presente estudo.

**Palavras-chave:** *Erythrina velutina*, “mulungu”, ansiedade, sedação, alcalóides.

**ABSTRACT**

MELO, I. C. A. R. **Contribuição ao Conhecimento de *Erythrina velutina* Willd. (Fabaceae-Faboideae): Uma abordagem Farmacobotânica, Química e Farmacológica.** 99 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes Medeiros”. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2011

*Erythrina velutina* Willd., is a plant species native to the caatinga of northeastern Brazil, known popularly as “mulungu”. Its leaves are used as a decoction in folk medicine as a remedy for anxiety and as a sedative. The aim of this work was to perform an interdisciplinary study of the species, combining a pharmacobotanical, chemical and pharmacological approach to investigate the basis of its popular use in folk medicine. Morphological and morphodiagnosis studies were performed to establish the identity of the species. For anatomical characterization cross section preparations of the blade, petiole and petiolule were performed as well as paradermic preparations on both sides of the blade leaflets. The sections were cleared, stained with safranin and/or safrablue, observed and photographed under an optical microscope. The pharmacological study involved the selection of extracts from the bark and leaves with CNS depressant pharmacological profile using a behavioural screening and further pharmacological tests with emphasis on evaluation of the anxiolytic/sedative activity. To chemically characterize the active methanolic fraction (Fr.MeOH) obtained from the aqueous extract of the leaves, the using Amberlite XAD-2<sup>®</sup> further fractionation and preparative purification was done using HPLC and spectroscopic analysis by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR. The pharmacobotanical study showed the presence of distinctive parameters for *Erythrina velutina*, easily identifiable, and of great importance to its quality control. The pharmacological profile of Fr.MeOH is characteristic of drugs sedative and its chemical characterization revealed the presence of alkaloids that are probably responsible for the sedative effects observed in pharmacological tests of this study.

**Keywords:** *Erythrina velutina*, "Mulungu", anxiety, sedation, alkaloids.

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1. Esqueleto típico de alcalóides de <i>Erythrina</i> .....	20
FIGURA 2. Folha trifoliolada de <i>Erythrina velutina</i> .....	27
FIGURA 3. Camundongos Swiss utilizado nos testes comportamentais <i>in vivo</i> .....	29
FIGURA 4. Esquema representativo da seleção do extrato/fração com melhor perfil sugestivo de droga depressora do SNC.....	31
FIGURA 5. Aparato utilizado no Modelo do Campo Aberto.....	31
FIGURA 6. Aparato utilizado no modelo do Labirinto em Cruz Elevado.....	32
FIGURA 7. Aparato utilizado no modelo da Placa Perfurada.....	33
FIGURA 8. Liofilizador Terroni LS.....	35
FIGURA 9. Estrutura hidrofóbica macroreticular da resina Amberlite® XAD -2.....	36
FIGURA 10. Estrutura do poliestireno.....	36
FIGURA 11. Fracionamento do Extrato Aquoso das folhas utilizando resina Amberlite XAD2.....	38
FIGURA 12. Caule e ramos de <i>Erythrina velutina Willd.</i> .....	44
FIGURA 13. Órgãos Vegetativos e Reprodutivos de <i>Erythrina velutina Willd.</i> .....	45
FIGURA 14. <i>Erythrina velutina Willd.</i> A-B.Epiderme; C.Mesofilo; D.Bordo.....	48
FIGURA 15. <i>Erythrina velutina Willd.</i> A-B.Nervura Principal; C-D.Pecíolo; E-F. Pecíólulo.....	49
FIGURA 16. <i>Erythrina velutina Willd.</i> Testes histoquímicos.....	50
FIGURA 17. Expansão (de 0 a 22,0 min.) do cromatograma obtido por CLAE, da Fração Aquosa Ácida do extrato aquoso das folhas de <i>Erythrina velutina</i> .....	62
FIGURA 18. Expansão (de 0 a 18,0 min.) do cromatograma obtido por CLAE, da Fração Aquosa do extrato aquoso das folhas de <i>Erythrina</i>	

<i>velutina</i> .....	63
FIGURA 19. Cromatograma obtido por CLAE, da Fração Metanólica do extrato aquoso das folhas de <i>Erythrina velutina</i> .....	63
FIGURA 20. Expansão (de 13,5 a 18,0 min.) do cromatograma obtido por CLAE, da Fração Metanólica do extrato aquoso das folhas de <i>Erythrina velutina</i> .....	64
FIGURA 21. Esqueleto típico de alcalóides de <i>Erythrina</i> .....	65
FIGURA 22. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de Ev-2 (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz).....	66
FIGURA 23. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de Ev-2 (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	66
FIGURA 24. Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de Ev-2 na região de 3,3 a 3,9 ppm (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	67
FIGURA 25. Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de Ev-2 na região de 5,8 a 7,0 ppm (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	67
FIGURA 26. Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de Ev-2 na região de 3,9 a 4,6 ppm (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	68
FIGURA 27. Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de Ev-2 na região de 3,6 a 3,8 ppm (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	68
FIGURA 28. Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de Ev-2 na região de 2,7 a 3,1 ppm (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	69
FIGURA 29. Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de Ev-2 na região de 1,2 a 2,1 ppm (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	69
FIGURA 30. Estrutura da Erisovina.....	70

**LISTA DE GRÁFICOS**

- GRÁFICO 1.** Efeito da fração metanólica (FrMeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p), sobre a ambulação no teste do Campo Aberto em camundongos.....53
- GRÁFICO 2.** Efeito da fração metanólica (FrMeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p), sobre o comportamento de levantar (Rearing) no teste do Campo Aberto em camundongos.....54
- GRÁFICO 3.** Efeito da fração metanólica (FrMeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p), sobre a variação da auto-limpeza (tempo, em segundos) (Grooming) no teste do Campo Aberto em camundongos.....54
- GRÁFICO 4.** Efeito da fração metanólica (FrMeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p), sobre a defecação no teste do Campo Aberto em camundongos.....55
- GRÁFICO 5.** Efeito da fração metanólica (FrMeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p), em camundongos, no teste do Labirinto em Cruz Elevado.. A. Número de entradas nos braços abertos. B. Tempo de Permanência.....56
- GRÁFICO 6.** Efeito da fração metanólica (FrMeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p), em camundongos, no teste do Labirinto em Cruz Elevado. A. Número de entradas nos braços fechados. B. Tempo de Permanência.....57
- GRÁFICO 7.** Efeito da fração metanólica (FrMeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p) sobre o número de mergulhos no teste da Placa Perfurada, em camundongos.....58
- GRÁFICO 8.** Efeito da fração metanólica (FrMeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p) sobre o tempo de latência (s) para o primeiro mergulho no teste da Placa Perfurada, em camundongos.....59
- GRÁFICO 9.** Efeito da fração metanólica (FrMeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p) sobre a ambulação no teste da Placa Perfurada, em camundongos.....60
- GRÁFICO 10.** Efeito da fração metanólica (FrMeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p) sobre o tempo de imobilidade (s) no teste da Placa Perfurada, em camundongos.....60

**LISTA DE QUADROS**

**QUADRO 1.** Dados referentes à triagem farmacológica realizada com os extratos obtidos de cascas e folhas de *Erythrina velutina* Willd: Fração Metanólica das Folhas (Fr.MeOH), Extrato Aquoso das Folhas (Eaf), Extrato Aquoso das Cascas (EAc) e Extrato Etanólico Bruto das Cascas (EEBc).....52

**QUADRO 2.** Dados referentes à triagem fitoquímica realizada com os extratos obtidos de cascas e folhas de *Erythrina velutina* Willd: Extrato Aquoso das Folhas (Eaf), Fração Metanólica das Folhas (Fr.MeOH), Extrato Aquoso das Cascas (EAc) e Extrato Etanólico Bruto das Cascas (EEBc).....61

**SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1 Estudo Farmacobotânico de <i>Erythrina velutina</i> Willd.....	26
3.1.1 Coletas e Identificação botânica.....	26
3.1.2 Estudo Morfológico.....	26
3.1.3 Estudos Anatômicos.....	27
3.1.4 Estudo Histoquímico.....	28
3.2 Estudo Farmacológico de <i>Erythrina velutina</i> Willd.....	28
3.2.1 Animais.....	28
3.2.2 Substâncias.....	29
2.2.3 Triagem Farmacológica Comportamental ( <i>Screening</i> ) e Determinação da Dose Letal 50% (DL <sub>50</sub> ).....	29
3.2.4 Seleção do Extrato/Fração.....	30
3.2.5 Avaliação da Atividade Ansiolítica.....	30
3.2.6 Modelo do Campo Aberto (Open-Field).....	30
3.2.7 Modelo do Labirinto em Cruz Elevado (Pluz-maze).....	32
3.2.8 Modelo da Placa Perfurada (Hole Board).....	33
3.2.9 Análise Estatística.....	33
3.3 Estudo Químico de <i>Erythrina velutina</i> Willd.....	34
3.3.1 Processamento do Material Vegetal.....	34
3.3.2 Preparação dos Extratos.....	34
3.3.3 Fracionamento do Extrato Aquoso das Folhas.....	35

3.3.4 Avaliação Fitoquímica Preliminar.....	37
3.3.5 Avaliação do Perfil Cromatográfico.....	39
3.3.6 Isolamento dos Constituintes Químicos.....	39
3.3.7 Purificação de EV-2.....	40
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 Estudo Botânico e Farmacobotânico.....	42
4.1.1 Nome aceito e sinônimos.....	42
4.1.2 Morfodiagnoses Macroscópicas de Órgãos Vegetativos e Reprodutivos.....	42
4.1.3 Morfodiagnoses Microscópicas da Folha.....	43
4.1.3.1 Epiderme Foliolar.....	43
4.1.3.2 Mesofilo Foliolar.....	43
4.1.3.3 Bordo Foliolar.....	46
4.1.3.4 Nervura Principal do Folíolo.....	46
4.1.3.5 Pecíolo.....	46
4.1.3.6 Pecíólulo.....	47
4.1.3.7 Testes Histoquímicos.....	47
4.2 Estudo Farmacológico.....	51
4.2.1 Triagem Farmacológica Comportamental e Determinação DL <sub>50</sub> .....	51
4.2.2 Avaliação da Atividade Ansiolítica.....	52
4.2.2.1 Modelo do Campo Aberto (Open-Field).....	52
4.2.2.2 Modelo do Labirinto em Cruz Elevado (Pluz-maze).....	55
4.2.2.3 Modelo da Placa Perfurada (Hole Board).....	58
4.3 Estudo Químico.....	61
4.3.1 Triagem Fitoquímica Preliminar.....	61
4.3.2 Perfil Cromatográfico.....	62
4.3.3 Isolamento dos Constituintes.....	64

<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>82</b>
<b>7 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>99</b>

# Introdução

## 1 INTRODUÇÃO

O uso dos produtos naturais iniciou-se há muitos anos por populações de vários países, sendo utilizados de forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos. As plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial e apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, continuam sendo utilizadas e, estima-se que cerca de 25 a 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR, 2008). O estudo sobre plantas medicinais, certamente é uma das estratégias mais bem sucedidas na descoberta de novos fármacos, dado comprovado pela maioria das inovações produzidas pelas grandes indústrias farmacêuticas transnacionais nos últimos cinquenta anos (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Os países latino-americanos possuem grande parte da biodiversidade do mundo. O Brasil, possui cerca de 20 a 22% de todas as plantas e micro-organismos existentes, além de cinco principais Biomas, designados como Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Caatinga. Aliada a grande biodiversidade brasileira, existe também uma rica diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, possuindo potencial para o desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas. No entanto, esse potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas é pouco explorado, contrastando com o que ocorre em países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá (CALIXTO, 2000; 2005; RATES, 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008; REDESFITO, 2009).

Um avanço importante neste contexto foi a promulgação, pelo do decreto 5.813 de 22 de Junho de 2006, da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Entre os objetivos desta política ambiciosa estão promover o uso sustentável da biodiversidade brasileira, ampliar as opções terapêuticas aos usuários do Sistema único de Saúde, e fortalecer as cadeias produtivas locais para a produção de plantas medicinais, com particular atenção ao fortalecimento da agricultura familiar.

É importante ressaltar que o uso de produtos naturais como ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos oferece uma série de vantagens, entre elas, a riqueza na variedade de estruturas químicas, oportunizando o uso destes produtos como matéria-prima na síntese de candidatos a protótipos de novos fármacos. Como exemplo, podemos citar a morfina, emetina, vincristina, colchicina, rutina, entre outros princípios

ativos que têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de medicamentos amplamente utilizados na clínica (BRESOLIN; CECHINEL-FILHO, 2003; NEWMAN; CRAGG, 2007).

O interesse pelas plantas medicinais e pelos produtos naturais aumenta ao consideramos a problemática para os tratamentos atuais de várias patologias. As drogas ansiolíticas, por exemplo, podem apresentar risco de dependência e síndrome de abstinência, retardo para o início do efeito ou ainda efetividade duvidosa (ANDREATINI *et al.*, 2001). Neste contexto, existe a necessidade de investigação e pesquisa de novas drogas que possam diminuir tais efeitos colaterais e buscar tratamento efetivo e seguro para estas desordens, seja por meio de extratos brutos ou compostos isolados.

O estudo de plantas medicinais exige uma grande interface entre a botânica, química e a farmacologia, e quanto mais estreita for esta relação, mais rápida e consistente serão alcançados os objetivos almejados.

Quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos que deve ser observado consiste nas informações etnofarmacológicas (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998). Dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso (UNANDER; WEBSTER; BLUMBERG, 1995).

Outro aspecto importante são as informações botânicas, caracterizações morfológicas e anatômicas que permitem a identificação das espécies. Os nomes vernaculares são muitas vezes utilizados como identificação das espécies vegetais, fato que omite a verdadeira identidade da planta, pois existe grande variação destes nomes associados a diferentes espécies e que mudam conforme a região, a cultura ou uso, podendo ocasionar equívocos que impedem a identificação correta da espécie desejada e comprometem a qualidade da droga vegetal (MARTINS-DA-SILVA, 2002). Um exemplo, seria a confusão que existe entre a *Erythrina velutina* Willd, espécie que será estudada neste trabalho, e a *Erythrina verna* Vell., (= *Erythrina mulungu* Mart.), ambas são semelhantes e apresentam a mesma indicação popular, mas ocorrem em diferentes regiões brasileiras. Vale ressaltar que a espécie *Erythrina verna* Vell., (= *Erythrina mulungu* Mart.) está incluída na Relação Nacional de Plantas de Interesse do SUS (RENISUS), mas não a *Erythrina velutina* Willd., espécie relacionada e objeto deste trabalho.

A necessidade de isolar os compostos puros responsáveis pelos efeitos biológicos apresentados nos extratos conduz a uma obrigatória interação entre a química e a farmacologia. Este elo pode levar à obtenção de substâncias naturais ou sintéticas e os estudos

farmacológicos pré-clínicos e clínicos ao comprovarem a eficácia terapêutica, proporcionam aos fitofármacos um maior nível de aceitação pela comunidade médica e usuários (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998).

Os avanços das técnicas analíticas, sobretudo as técnicas hífenadas, tem proporcionado a elucidação de composições químicas complexas dos produtos de origem vegetal, com alto nível de sensibilidade e seletividade (RODRIGUES *et al.*, 2006). Segundo Niero *et al.*, (2003), uma das técnicas mais vantajosas em termos de caracterização, detecção e subsequente separação, bem como controle final de pureza do composto isolado, é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC- High Performance Liquid Chromatography) que oferece a possibilidade de separação de compostos em baixas concentrações na planta, em tempo curto de análise, dentre outras vantagens.

O gênero *Erythrina* possui cerca de 120 espécies com distribuição principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Na América do Sul, ocorre na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai, Guianas, Colômbia, Panamá e Peru (HICKEY; KING, 1981; SCHRIRE, 2005b). No Brasil, sua ocorrência abrange vários Biomas: Mata Atlântica, Cerrado, Floresta Amazônica e Caatinga. No Brasil são catalogadas cerca de doze espécies de *Erythrina* (EPAMIG, 1993), sendo as duas principais *E. velutina*, no nordeste e *E. verna*, no sudeste (NEILL, 1988).

*Erythrina velutina* é a única espécie do gênero ocorrente no Bioma Caatinga. Possui distribuição ampla, em áreas secas e semi-áridas da América do Sul, encontrada no Peru, Equador, Brasil e Caribe. No Brasil, ocorre na região Nordeste e ao norte de Minas Gerais, exceto no estado do Maranhão, não sendo encontrada sobre solos arenosos (QUEIROZ, 2009).

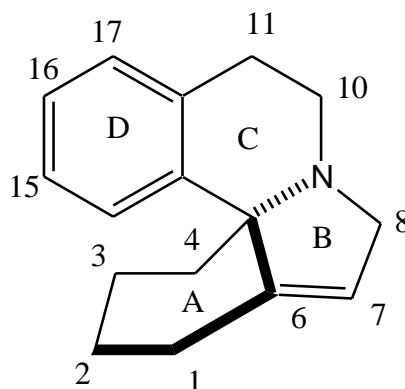
A origem etimológica do gênero, provem da palavra grega “erythros”, que significa vermelho, a cor de suas flores, que aparecem a partir de outubro, permanecendo até dezembro nas copas despidas de folhas. O epíteto específico *velutina* vem do latim, devido ao fato da folha apresentar indumentos delicados e pêlos macios (CARVALHO, 2008).

*Erythrina velutina* é conhecida por seus nomes vernaculares: Mulungu, suinã, canivete, corticeira (LORENZI, 1992) e se destaca por uso das cascas, folhas e frutos na medicina popular. As folhas são utilizadas em infusos ou decoctos como tranqüilizantes e também indicadas no tratamento de sonolências e convulsões (VASCONCELOS *et al.*, 2003). O infuso da casca é empregado como sudorípara (DA-CUNHA *et al.*, 1996) , sedativa e calmante de tosses e bronquites, bem como no tratamento de verminoses e hemorróidas

(AGRA *et al.*, 1996; LORENZI; MATTOS, 2002). O decocto da casca é utilizado para acelerar a maturação de abscessos gengivais (LORENZE; MATTOS, 2002; RAUPP, 2006). Ao fruto seco, atribui-se ação anestésica local, utilizada na forma de cigarro (EMPERAIRE, 1983).

Espécies de *Erythrina* são consideradas a principal fonte de alcalóides tetracíclicos, do tipo eritrina (Figura 1), como erisotrina, erisodina, erisovina, eritralina, erisopina, erisonina, erisopitina, eritratina, hipaforina, sendo que erisodina e erisopina são os mais amplamente distribuídos (SOTO-HERNANDEZ; JACKSON, 1993). No entanto, espécies de *Cocculus* da família Menispermaceae também produzem alcalóides tetracíclicos eritrínicos, diferindo somente no padrão de oxigenação (AMER; SHAMMA; FREYER, 1991).

Alcalóides do tipo eritrina foram identificados inicialmente em 1937 por Folkers e Major, por meio da investigação química das sementes da *Erythrina americana* Mill, da qual isolaram a eritroidina, que apresentou atividade paralisante semelhante à *d*-tubocurarina (NKENGFAK *et al.*, 1994).



**Figura 1:** Esqueleto típico de alcalóides de *Erythrina*.

Também foram isolados de espécies de *Erythrina* alguns alcalóides que não apresentam o esqueleto eritrínico: orientalina, *N*-noorientalina, protosinomenina, *N*-norprotosinomenina, isoboldina, eribidina, scourelina, coreximina, hipaforina, colina (FLAUSINO-JUNIOR, 2007).

Espécies de *Erythrina* também são ricas em flavonóides, de acordo com Deshpande *et al.* (1977), que reportaram três novas isoflavonas isoladas da *E. variegata*: eritrininas A, B e C. Telikepalli *et al.*, (1990) isolaram dessa mesma espécie outras isoflavonas: osajina, alpinum isoflavona, oxiresveratrol estireno e diidroestilbenodiidroxi-resveratrol, warangalona, 5,7,4"-triidroxí-6,8-diprenilisoflavona; quatro pterocarpanos já conhecidos (ericristagalina,

eritrabissina II, faseolina e faseolidina), uma flavanona (isobavaquina) e um cinamilfenol (erivariestireno). Da *E. indica* foram isoladas isoflavonas como daidzeina e 8-prenildaidzeina (NKENGFAK *et al.*, 2000). Três isoflavonas preniladas foram isoladas da *E. vogelii*: vogelin A, vogelin B e vogelin C (ATINDEHOU *et al.*, 2002). Da *Erythrina velutina* foram isolados o isoflavonóide erivelutinona (DA-CUNHA *et al.*, 1996), a flavona homohesperetina (RABELO *et al.*, 2001) e o flavonóide glicosilado, 5,7,4'-trihidroxiisoflavona-7-O-[ $\alpha$ -ramnopiranosil- $\beta$ -glicopiranosídeo], sendo este composto inédito no gênero *Erythrina* (CABRAL, 2009).

Cumarinas foram isoladas de *Erythrina*, sendo o primeiro relato para *E. stricta* (SINGH *et al.*, 1981), seguido de *E. indica*, com o isolamento das seguintes fenilcumarinas por Nkengfack *et al.* (2000): indicanina A e a fenilcumarina, ácido robústico.

O gênero tem provado ser uma fonte de espécies contendo agentes antimicrobianos que pertencem a várias classes estruturais de flavonóides, como por exemplo, *E. variegata* cuja atividade do extrato bruto das raízes foi demonstrada para *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis* (TELIKEPALLI *et al.*, 1990). O extrato da planta africana *E. abyssinica* demonstrou atividade contra leveduras e fungos sendo que a eritroabissina-I e faseolina tiveram atividade antilevedura contra *Sacharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* com CIM (Concentração Inibitória Mínima) entre 25-50  $\mu\text{g/mL}$  e atividade antifúngica contra *Sclerotinia lebertiana*, *Mucor mucedo*, *Rhizopus chinensis* com CIM entre 6 -25  $\mu\text{g/mL}$  (NAKANISHI, 1982). Já o extrato etanólico bruto das cascas de *Erythrina velutina*, demonstrou atividade contra o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (VIRTUOSO, *et al.*, 2005).

Roger *et al.*, (2001), em um estudo com o extrato bruto de *Erythrina vespertilio*, mostraram sua atividade sobre o sistema serotoninérgico inibindo a liberação cálcio-dependente de serotonina plaquetária, uma das principais atividades dos antagonistas de receptores 5-HT<sub>3</sub>.

Em estudo realizado por Estrada *et al.*, (2009), constataram que a erisovina isolada de sementes de *E. americana*, apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de fungos *A. solani*, *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *Penicillium sp.* e *T. harzianum*. No entanto, *Penicillium sp.* foi a espécie em que a erisovina mostrou menor efeito. A dose de 8 mg mL<sup>-1</sup> foi a que demonstrou melhor atividade antifúngica. Os autores sugerem mais estudos utilizando a erisovina contra outros tipos de microorganismos, incluindo parasitas de seres humanos. Cornelius *et al.*, (2009), sugere um potencial efeito inseticida dos alcalóides eritrínicos isolado de sementes e flores de *E. latíssima*.

Este trabalho realizou um estudo interdisciplinar farmacobotânico, químico e farmacológico de *Erythrina velutina* Willd., como uma contribuição ao maior conhecimento desta espécie de importância etnomedicinal, característica do Bioma Caatinga, e que, assim como a sua espécie relacionada, *Erythrina verna* Vell., possui grande potencial fitoterápico.

# Objetivos

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Contribuir para o conhecimento de *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae), enfatizando os aspectos farmacobotânicos, químicos e farmacológicos da espécie.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar um estudo farmacobotânico de *Erythrina velutina* Willd., por meio da avaliação morfológica das folhas, frutos e sementes, e da análise anatômica das folhas para a obtenção de dados que possibilitem a identificação do vegetal frente a outras espécies do gênero *Erythrina* e da família Fabaceae;
- Selecionar o extrato com melhor efeito depressor do SNC e com base nestes resultados, dar continuidade a investigação por meio de testes específicos que avaliam a ansiedade e sedação;
- Traçar um perfil químico da espécie, bem como, sugerir o constituinte ativo da planta responsável pelo efeito psicofarmacológico.

# Material e Métodos

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Estudo Farmacobotânico de *Erythrina velutina* Willd.**

##### **3.1.1 Coletas e Identificação botânica**

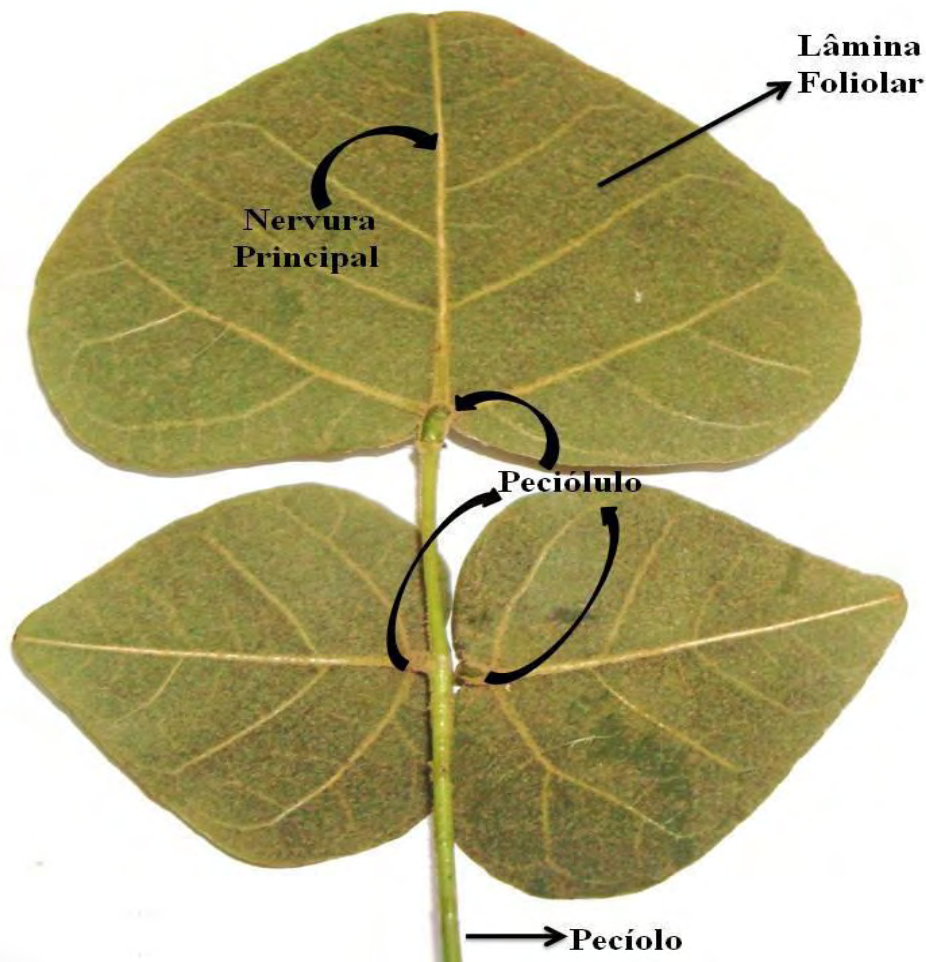
O material botânico foi coletado no município de Lagoa de Dentro, Paraíba, Brasil, no período de Junho a Setembro de 2009. Foram coletadas amostras de cinco indivíduos, sendo este o material utilizado para as identificações botânicas, estudos anatômicos e histoquímicos. Parte do material coletado foi fixado em Formaldeído, Ácido Acético Glacial, Etanol 50 % (FAA<sub>50</sub>) por 48 horas e, posteriormente, conservado em Álcool Etílico 70° G. L (JOHANSEN, 1940), para utilização nos estudos morfológicos e anatômicos. O restante do material foi herborizado, seguindo-se a metodologia descrita por Forman e Bridson (1989), e posteriormente as exsicatas foram depositadas no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) com os registros AGRA; MELO (7244, 7245, 7246, 7247 e 7248) com duplicatas na coleção de referência do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF). As morfodiagnoses macroscópicas foram realizadas à vista desarmada ou com auxílio de estereomicroscópio binocular com câmara-clara. As abreviaturas dos autores dos táxons estão de acordo com Brummitt e Powell (1992).

##### **3.1.2 Estudo Morfológico**

Realizou-se um estudo morfológico das folhas, frutos, sementes, inflorescência e caule, à vista desarmada e com o auxílio de um estereomicroscópio binocular. As folhas foram provenientes do quarto ou quinto nó e os caules a partir de cinco centímetros do ápice dos ramos.

### 3.1.3 Estudos Anatômicos

Seções transversais (lâmina foliar, pecíolo e peciólulo) e paradérmicas (adaxial e abaxial) (Figura 2) foram realizadas à mão livre, com lâmina cortante tendo como suporte medula de pecíolo de *Cecropia* sp., seguindo-se a metodologia usual, em folhas adultas, coletadas no 5º nó. Posteriormente, foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 1%, neutralizadas com água acética (0,1%), lavadas em água destilada, coradas com uma solução de safranina para as seções paradérmicas e com uma solução de Safrablue (mistura de safranina e azul de Astra) para as seções transversais, e montadas entre lâmina e lamínula com glicerina a 50%, e analisadas e fotografadas ao microscópio óptico Olympus modelo CX31, com câmara fotográfica Olympus PM –BP35. As caracterizações das paredes celulares da epiderme e do mesofilo basearam-se em Metcalfe e Chalk (1979), e a classificação dos estômatos seguiu Wilkinson (1979).



**Figura 2:** Folha trifoliolada de *Erythrina velutina*.

### 3.1.4 Estudo Histoquímico

Para os testes histoquímicos, secções transversais da nervura principal, do pecíolo e pecíolulo da folha, foram submetidas aos seguintes reagentes específicos: Sudan III (JENSEN, 1962) para evidenciação de estruturas lipídicas; floroglucinol acidificado (JOHANSEN, 1940) para elementos lignificados; reagente de lugol para localização de grãos de amido (BERLYN; MIKSCH 1976); reagente de Dragendorff (SVENDSEN; VERPOORTE, 1983), para detecção e localização de alcalóides. As estruturas foram observadas e fotomicrografadas ao microscópio óptico.

## 3.2 Estudo Farmacológico de *Erythrina velutina* Willd.

### 3.2.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Mus musculus* Swiss, machos (Figura 3), albinos pesando entre 25-35g com aproximadamente três meses de idade. Todos os animais foram provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, sob nº 0204/10.

No biotério os animais são sempre alojados em gaiolas de polietileno, contendo 20 camundongos cada, mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a  $27 \pm 2$  ° C, com livre acesso a uma dieta controlada, a base de ração tipo *pellets* (Purina®) e água, disponível em garrafas de polietileno com bico de inox. Os animais são mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6:00 às 18:00 horas e a fase escura de 18:00 às 6:00 horas.

Antes de cada teste, os animais foram pesados para realização do cálculo do volume a ser administrado, e em seguida transferidos para a sala de experimentos, sem acesso a água e alimento, visando minimizar as possíveis alterações comportamentais do animal bem como permitir uma adaptação ao novo ambiente. Os experimentos foram realizados nos horários compreendidos entre 8:00 e 16:00 horas.



**Figura 3:** Camundongos Swiss (*Mus musculus*) utilizado nos testes comportamentais *in vivo*.

### 3.2.2 Substâncias

Como droga padrão foi utilizado o Diazepam (DZP) em dose de 0,5 mg/kg por via intraperitoneal (i.p). As soluções testes, padrão e controle foram preparadas no dia do experimento com água destilada e Tween-80.

### 3.2.3 Triagem Farmacológica Comportamental (*Screening*) e Determinação da Dose Letal 50% (DL<sub>50</sub>)

Os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo experimental (em anexo) descrito por Almeida & Oliveira (2006). Os animais foram divididos em 6 grupos (n=8) e tratados por via intraperitoneal com veículo (grupo controle) ou extrato/fração em diferentes doses (125, 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg) e observados aos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após os respectivos tratamentos. Estas doses foram escolhidas com base na literatura (ONUSIC *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Os efeitos observados em cada período de tempo eram registrados como presente ou ausente. Caso o efeito estivesse presente, um escore de intensidade era marcado com o símbolo + (efeito presente) ou ++ (efeito intenso). Caso o efeito estivesse reduzido ou ausente, seria registrado com o símbolo – (efeito diminuído) ou 0 (efeito ausente) respectivamente.

Os mesmos grupos de animais foram ainda observados a cada 24 horas até que se completasse um período de 72 horas, mantidos em suas respectivas gaiolas, com livre acesso a água e ração, com o objetivo de registrar as possíveis mortes e determinar a DL50.

### **3.2.4 Seleção do Extrato/Fração**

Os resultados da triagem farmacológica, descrita no item anterior, dos extratos/fração derivados de folhas e cascas de *Erythrina velutina* foram utilizados para selecionar o extrato/fração com melhor perfil sugestivo de droga depressora do SNC (Figura 4). A preparação dos extratos/fração serão vistas mais adiante.

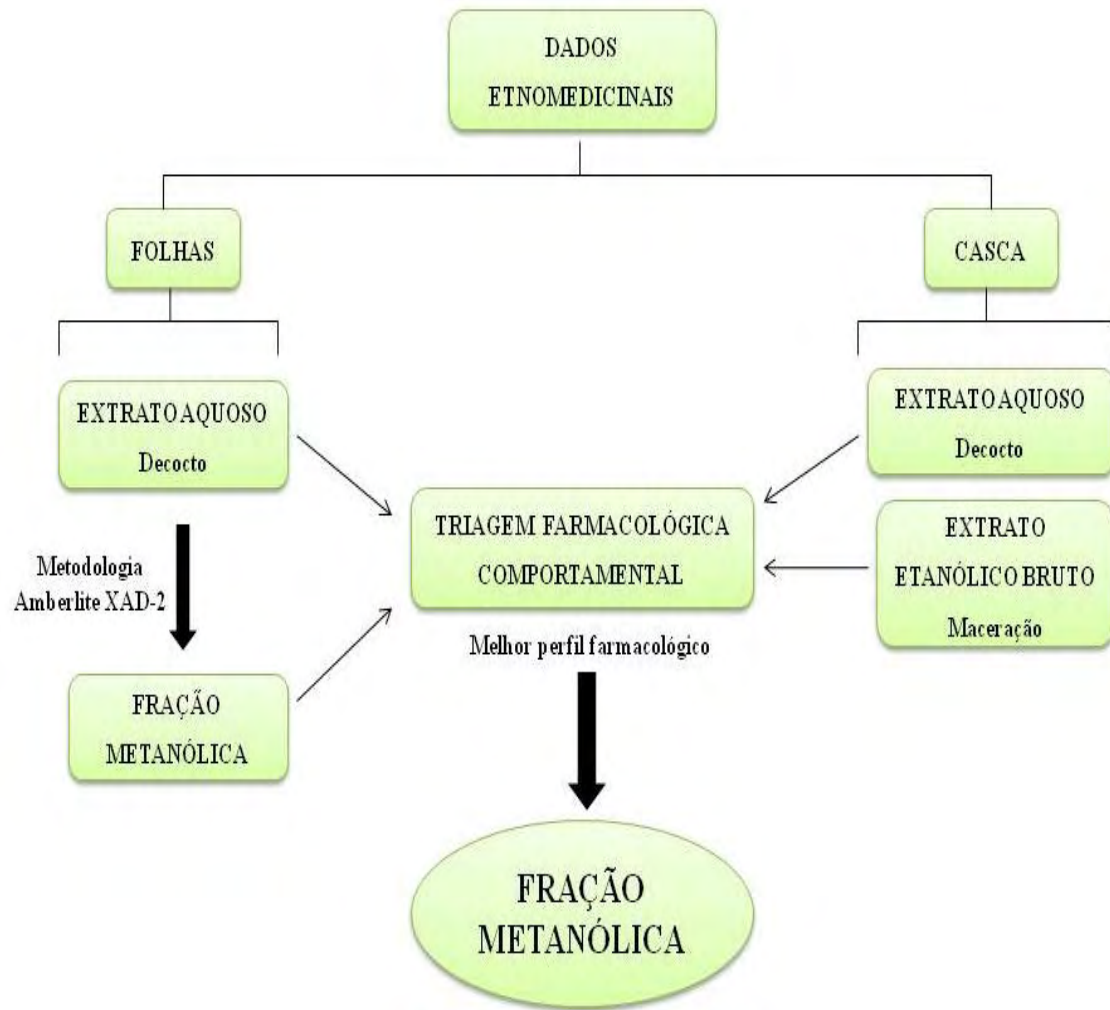
### **3.2.5 Avaliação da Atividade Ansiolítica**

Foram utilizados em cada experimento, de acordo com os modelos descritos a seguir, cinco grupos de oito camundongos: três grupos tratados com a Fração Metanólica das folhas (Fr.MeOH) nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, um grupo controle tratado com o veículo e um grupo padrão com o diazepam, na dose de 0,5 mg/kg.

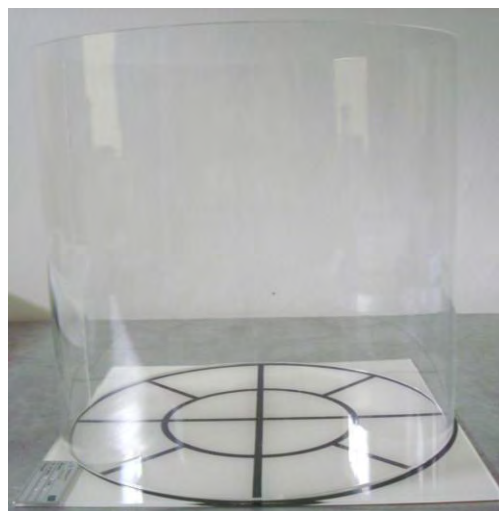
### **3.2.6 Modelo do Campo Aberto (Open-Field)**

O aparato utilizado consistiu de uma arena circular com 40 cm de diâmetro e paredes transparentes de acrílico com 40 cm de altura. O piso da arena possui divisões consistindo de dois círculos concêntricos, que por sua vez, são subdivididos em um total de 12 segmentos (Ver Figura 5).

Neste experimento, observou-se a defecação do animal, como índice de emocionalidade; a movimentação espontânea entre as divisões, no centro e na periferia do campo, indicando atividades exploratórias, sedativas e ansiolíticas; o número de vezes que o animal levantou (*rearing*) e o tempo de auto-limpeza (*grooming*) registrados durante cinco minutos (MONTGOMERY, 1955).



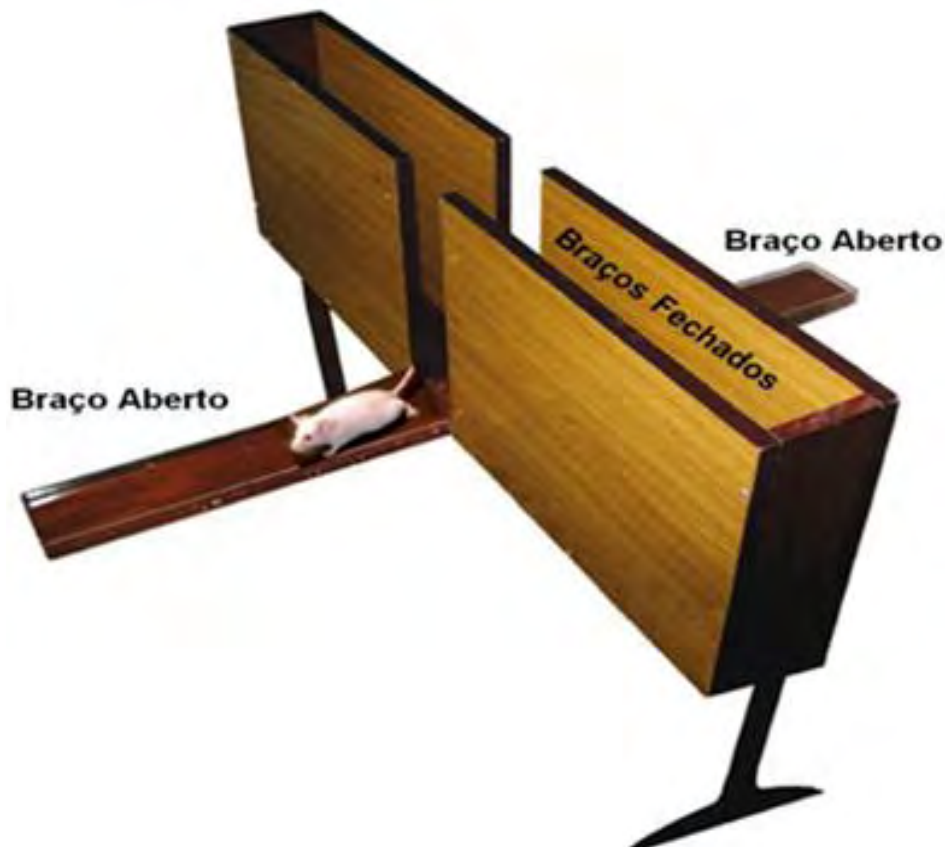
**Figura 4:** Esquema representativo da seleção do extrato/fração com melhor perfil sugestivo de droga depressora do SNC.



**Figura 5:** Aparato utilizado no Modelo do Campo Aberto.

### 3.2.7 Modelo do Labirinto em Cruz Elevado (Pluz-maze)

O labirinto consiste de quatro braços em forma de cruz grega, sendo dois braços com paredes laterais e sem cobertura (braços fechados), medindo 30 cm de comprimento por 6 cm de largura e 16 cm de altura, colocados perpendicularmente a dois braços desprovidos de paredes laterais (braços abertos) com as mesmas medidas. Cada braço é posicionado a 90° do braço adjacente e cruza-se numa área central, o labirinto é apoiado sob um suporte com 25 cm elevado em relação ao solo (Figura 6). O animal foi colocado na área central voltado para um dos braços fechados e observado durante cinco minutos, após 30 minutos da administração do tratamento. Os parâmetros comportamentais analisados foram o tempo de permanência nos braços abertos e fechados e a frequência de entradas em ambos os braços.



**Figura 6:** Aparato utilizado no modelo do Labirinto em Cruz Elevado.

Adaptado de: [http://www.inecusp.org/cursos/cursoII/modelos\\_animais\\_ansiedade.htm](http://www.inecusp.org/cursos/cursoII/modelos_animais_ansiedade.htm).

### 3.2.8 Modelo da Placa Perfurada (Hole Board)

Para avaliar a atividade exploratória utilizou-se o teste da placa perfurada que consiste em um aparelho (30x30x15), a 10 cm de altura, com orifícios de 2 cm de diâmetro, equidistantes entre si (Figura 7). Os efeitos de tratamentos com agentes ansiolíticos são mensurados através do número de espreitamento nos orifícios pelos animais, atividade locomotora e tempo de latência (TAKEDA *et al.*, 1998). O número de cruzamentos que o animal faz entre as áreas demarcadas do equipamento durante cinco minutos representa a atividade locomotora.



**Figura 7:** Aparato utilizado no modelo da Placa Perfurada.

### 3.2.9 Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o Teste de Mann –Whitney para dados não paramétricos e o Teste “t” de Student não pareado para dados paramétricos através do programa Graph Pad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA). Os valores obtidos para cada grupo foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. e foram considerados significativos quando apresentaram um valor de  $p < 0,05$ .

### 3.3 Estudo Químico de *Erythrina velutina* Willd

#### 3.3.1 Processamento do Material Vegetal

As cascas do caule e folhas de *Erythrina velutina* Willd., foram secas em estufa com ar circulante à temperatura média de 45 °C durante 1 semana. Após a secagem, o material vegetal foi submetido ao processo de pulverização em moinho mecânico tipo Harley, obtendo-se 900 g de pó seco da casca e 360 g de pó seco de folhas.

#### 3.3.2 Preparação dos Extratos

- Obtenção do Extrato Etanólico Bruto das Cascas (EEBc):

As cascas secas e pulverizadas (450 g) foram submetidas à maceração exaustiva com etanol (EtOH) a 95 %, em um recipiente de aço inoxidável. Foram feitos três processos de extração num intervalo de 72 horas entre eles, para garantir uma máxima extração dos constituintes químicos. A solução etanólica obtida foi filtrada, fazendo-se, em seguida, a evaporação do solvente com o auxílio de um evaporador rotatório a uma temperatura média de 50 °C. Após esse processo de evaporação do solvente, obteve-se o EEBc, que pesou 23,19 g, correspondendo a 5,15 % do peso seco da planta.

- Obtenção do Extrato Aquoso das cascas (EAc):

As cascas secas e pulverizadas (450 g) foram submetidas à decocção com água destilada a uma temperatura média de 80°C por 30 minutos, repetindo-se o processo. O decocto obtido foi filtrado à vácuo, e em seguida liofilizado a -45°C por um período de 24 horas em liofilizador Terroni série LS3000 (Figura 8). Ao fim do processo, obteve-se 24,84 g do EAc com um rendimento de 5,52%.

- Obtenção do Extrato Aquoso das folhas (EAF):

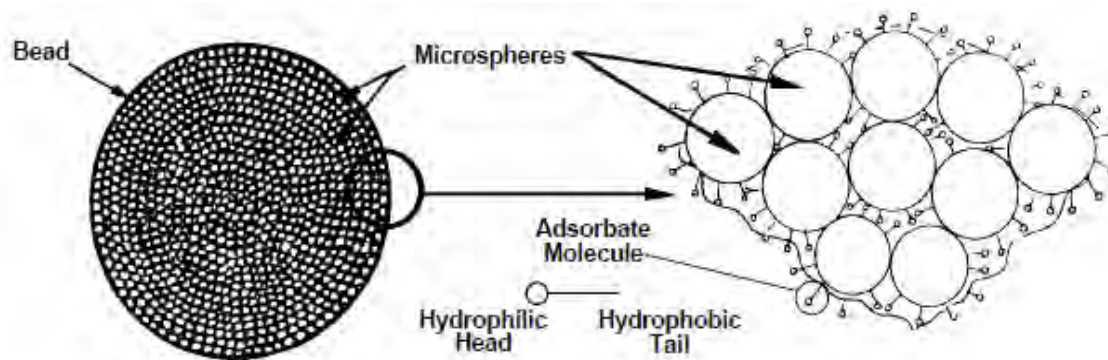
As folhas secas e pulverizadas (314 g) foram submetidas à decoção e liofilização, seguindo os mesmos parâmetros utilizados para decoção das cascas. Ao fim do processo, obteve-se 42,27 g do EAF com um rendimento de 13,46 %.



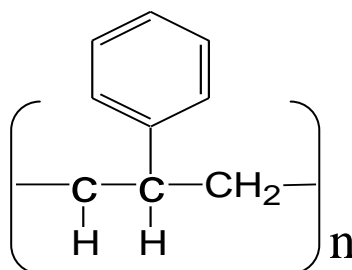
**Figura 8:** Liofilizador Terroni LS (Fonte:<http://terroni.com.br>).

### 3.3.3 Fracionamento do Extrato Aquoso das Folhas

Para o fracionamento do extrato aquoso, foi utilizado Amberlite® XAD® -2 (poros 9 nm e partícula de 0,3-1,2 mm), um adsorvente polimérico hidrofóbico, fornecido como grânulos brancos insolúveis (Figura 9) e formado por resina de copolímero reticulado de poliestireno (Figura 10).



**Figura 9:** Estrutura hidrofóbica macrorreticular da resina Amberlite® XAD® -2. A estrutura porosa da resina, permite que a água penetre nos poros facilmente. Fonte: ROHM & HAAS, 1997.



**Figura 10:** Estrutura do poliestireno

Foi realizada a ativação e a limpeza prévia da resina, submetendo-a ao refluxo de solventes em aparelho de Soxhlet (acetona por cerca de 4h e metanol também por 4h). Logo após, a resina foi colocada em banho-maria com metanol e agitação magnética por aproximadamente 10 minutos e a seguir filtrada à vácuo, repetindo-se todo o procedimento por cinco vezes. Esta técnica constitui uma etapa de purificação que visa eliminar possíveis interferentes e/ou contaminantes presentes na resina, assim como garantir que os sítios ativos estejam livres para que ocorra o processo de adsorção.

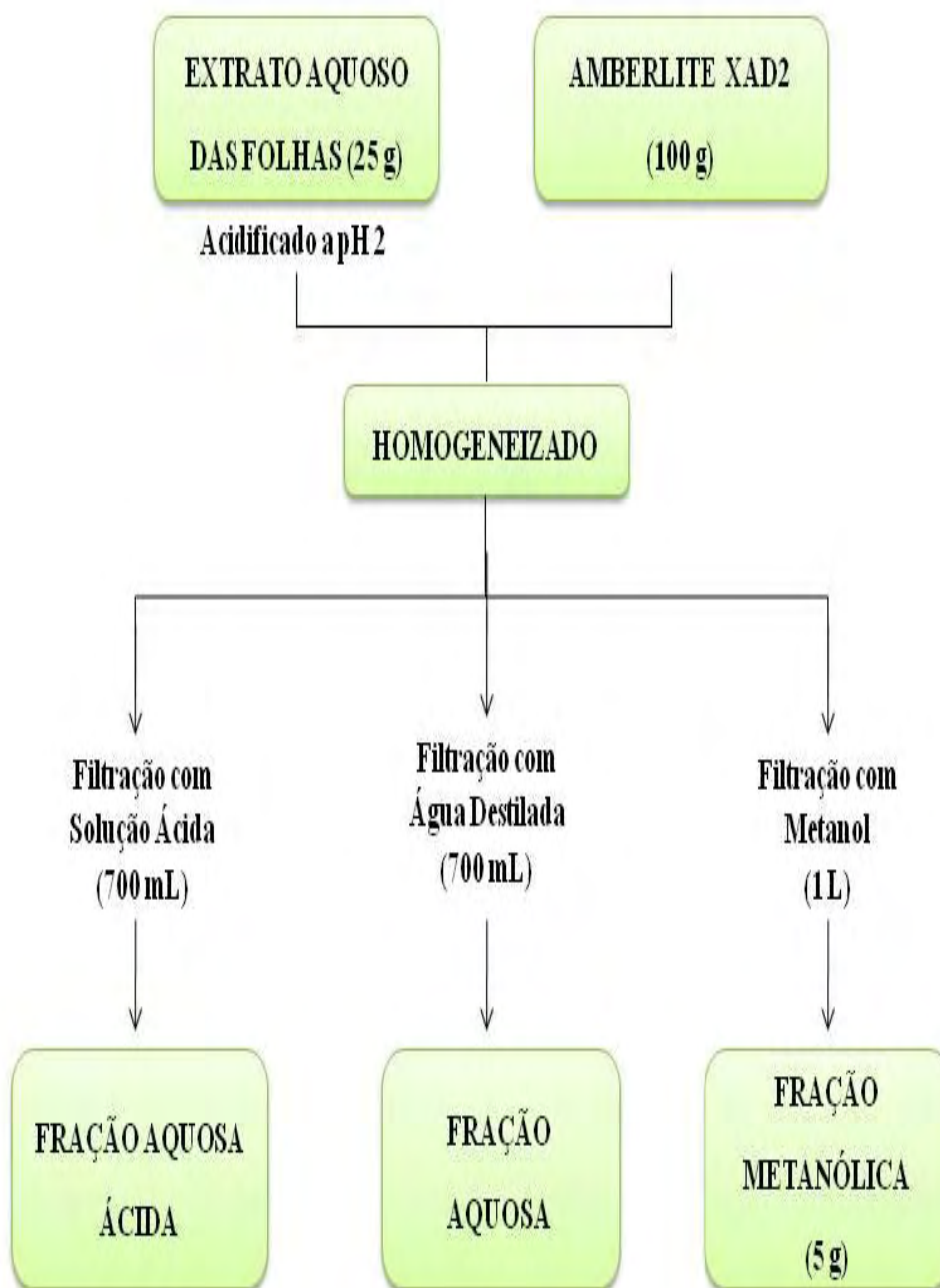
O extrato aquoso (25g) foi acidificado a pH 2 e misturado com 100 g de resina Amberlite XAD2 (D'ARCY, 2005). Em seguida a mistura foi homogeneizada durante 2 horas com auxílio de um agitador magnético. A mistura foi então filtrada à vácuo com 700 mL de solução ácida (HCl, pH = 2), subsequentemente, com 700 mL de água destilada para remover os açúcares e outras substâncias polares, e por último 1L de metanol, para extrair as substâncias de interesse, especialmente os compostos fenólicos.

Os filtrados com solução ácida e água destilada foram submetidos á liofilização e originaram respectivamente a Fração Aquosa Ácida e a Fração Aquosa. O filtrado com metanol foi concentrado em evaporador rotatório a 40°C, obtendo-se 5g da Fração Metanólica, com um rendimento de 20 %. A metodologia utilizada foi baseada em metodologia previamente descrita na literatura e encontra-se esquematizada na Figura 11 (TOMÁS-BARBERÁN, 1992; FERRERES *et al.*, 1992; MARTOS *et al.*, 1997; LIANDA; CASTRO, 2008).

### 3.3.4 Avaliação Fitoquímica Preliminar

A prospecção fitoquímica buscou sistematizar ou rastrear os principais grupos de constituintes químicos que compõem os extratos vegetais, através de um exame qualitativo rápido, no qual se utilizou reagentes de coloração ou precipitação. A triagem foi realizada seguindo a metodologia descrita por Matos (1997) e seus resultados encontram-se sumarizados no Quadro 1. A seguir encontra-se a composição dos reagentes utilizados:

- Reagente Dragendorff:  
Sol. A  
0,85 g de subnitrato de bismuto  
40 mL de água destilada  
10 mL de ácido acético glacial  
Sol. B  
8,0 g de iodeto de potássio  
20 mL de água destilada
- FeCl<sub>3</sub> a 2%
- Reagente Liebermann- Burchard  
1,0 mL de anidrido acético  
2,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



**Figura 11:** Fracionamento do Extrato Aquoso das folhas utilizando resina Amberlite XAD2.

### 3.3.5 Avaliação do Perfil Cromatográfico

Para a análise do perfil cromatográfico da Fração Metanólica foi utilizada Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC - High Performance Liquid Chromatography) com detector de arranjo de diodos, nas seguintes condições experimentais: concentração da amostra de 2,5 mg/mL; fase móvel Acetonitrila (ACN): H<sub>2</sub>O: Trietilamina 0,1%, em modo gradiente de 5 a 95% de ACN em 35 min, coluna cromatográfica de fase reversa analítica (Luna Phenomenex 250 x 4,60 mm, 5 µm) operada a um fluxo de 1mL/min e injetado um volume de 20 µL.

Com o intuito de comparar os perfis cromatográficos das frações e verificar a eficiência do método de separação descrito no item 2.3.3, e partindo do pressuposto que os constituintes eluídos nestas frações, são de caráter polar, obteve-se também os cromatogramas das Frações Aquosa e Aquosa Ácida na concentração de 1 mg/mL, utilizando-se fase móvel ACN: H<sub>2</sub>O: Trietilamina (10: 90: 0,1) em 35 min, modo isocrático, coluna cromatográfica de fase reversa analítica (Luna Phenomenex 250 x 4,60 mm, 5 µm) operando a um fluxo de 1mL/min e injetado um volume de 20 µL.

### 3.3.6 Isolamento dos Constituintes Químicos

O processo de isolamento das substâncias codificadas: EV-1, EV-2 e EV-3 da Fr.MeOH, foi realizado por CLAE com detector de arranjo de diodo em coluna cromatográfica de fase reversa semi-preparativa (Luna Phenomenex 250 x 10,0 mm, 10 µm). A amostra foi preparada a uma concentração de 20 mg/mL; o sistema de eluição foi por gradiente, iniciando com 5 % de ACN e 95% de fase aquosa com 0,1% Trietilamina, passando para 10% de ACN em 10 min, chegando em 30 min. com 95% de ACN e 5% de fase aquosa com 0,1% Trietilamina. A vazão foi mantida a 5mL/min e injetado um volume de 800 µL.

Após a cromatografia preparativa, EV-1, EV-2 e EV-3 foram submetidas ao teste de Dragendorff para detecção de alcalóides. Em seguida, foram obtidos os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H (RMN de <sup>1</sup>H) e Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C (RMN de <sup>13</sup>C) unidimensionais das substâncias, em espectrômetro de marca MERCURY-VARIAN (LTF/UFPB) operando a 500 MHz (<sup>1</sup>H) e a 125 MHz (<sup>13</sup>C). As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se em metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD) da Cambridge

Isotope Laboratories. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados para RMN de  $^1\text{H}$  pelos picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas deste solvente: metanol ( $\delta\text{H}$  3,30 ppm). Para os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , estes mesmos parâmetros foram utilizados: metanol ( $\delta\text{C}$  49,00 ppm).

As multiplicidades no espectro de RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo as convenções: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), m (multiplete).

### 3.3.7 Purificação de EV-2

A substância EV-2 apresentou um maior grau de pureza em relação à EV-1 e EV-3, portanto foi a primeira a ser submetida a uma nova cromatografia semi-preparativa por CLAE a fim de purificá-la, para tanto foram utilizadas as seguintes condições experimentais: concentração da amostra de 4 mg/mL; fase móvel ACN:  $\text{H}_2\text{O}$ : Trietilamina (25:75:0,1) por 10 min, em modo isocrático, coluna cromatográfica de fase reversa semi-preparativa (Luna Phenomenex 250 x 10,0 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) operada a um fluxo de 5mL/min e injetado um volume de 800  $\mu\text{L}$ . Obtendo-se um rendimento de 75 %.

Em seguida, foram obtidos novos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . As demais substâncias estão em fase de isolamento e posterior identificação estrutural.

# Resultados

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ESTUDO BOTÂNICO E FARMACOBOTÂNICO

#### 4.1.1 Nome aceito e sinônimos

*Erythrina velutina* Willd. in Gest. At Freunde Berlin Neue Schr. 3: 426. 1801.

=*Erythrina aculeatissima* Desf., in Tableau de l'École de Botanique 191. 1804.

=*Erythrina velutina* Jacq., in Pl. Hort. Schoenbr. 4: pl. 466. 1804.

=*Chirocalix velutinum* Walp., in Flora 36: 148. 1853.

=*Corallodendron velutinum* Willd., in Revisio Generum Plantarum 1: 173. 1891.

=*Erythrina splendida* Diels., in Bibliotheca Botanica 116: 96. 1937.

=*Erythrina velutina* fo. *aurantiaca* Ridl., in Brittonia 3(2): 329. 1939

#### 4.1.2 Morfodiagnoses Macroscópicas de Órgãos Vegetativos e Reprodutivos

*Erythrina velutina* é uma espécie de hábito arbóreo, com 4 a 15 m de altura, apresenta caule suberoso de coloração cinzenta (Figura 12 A e B), com presença de lenticelas. As extremidades dos ramos, bem como a planta jovem possuem casca com muitos acúleos, rígidos de 1,3 - 1,5 cm de diâmetro (Figura 12 C e D). A casca possui até 25 mm de espessura, região externa de consistência dura e interna de aparência porosa. Observou-se entre as fendas do súber a presença de líquens e musgos (Figura 12 C).

As folhas são alternas, trifolioladas, o pecíolo cilíndrico, 6-14 cm de comprimento, com estípulas; peciólulo curto; folíolos sub-deltóides, cartáceos, ápice retuso, base cordada, margem inteira, decíduos na floração (Figura 13 A).

Inflorescências em panículas racemosas, densas, flores bissexuadas, cálice espatáceo, sépalas-5; corola papilionácea, pétalas-5, livres, de cor vermelho-alaranjado. Estames-10, diadelfos, anteras rimosas, dorsifixas. Ovário súpero, unicarpelar, pluriiovular, placentação marginal, estilete filiforme, estigma globoso (Figura 13 B).

O fruto é do tipo legume, deiscente, glabro, 3-8 cm de comprimento, de coloração marrom a preta, polispérmico, com 1 a 3 sementes (Figura 13 C).

As sementes apresentam formato alongado, reniformes, 1,0-2,0 x 0,8-1,0 cm, ápice arredondado e base arredondada-truncada, hilo desenvolvido de formato oblongo, sem pleurograma, com testa vermelho-alaranjado, superfície brilhante e lisa, duras, vernicosas (Figura 13 D).

### **4.1.3 Morfodiagnoses Microscópicas da Folha**

#### **4.1.3.1 Epiderme Foliolar**

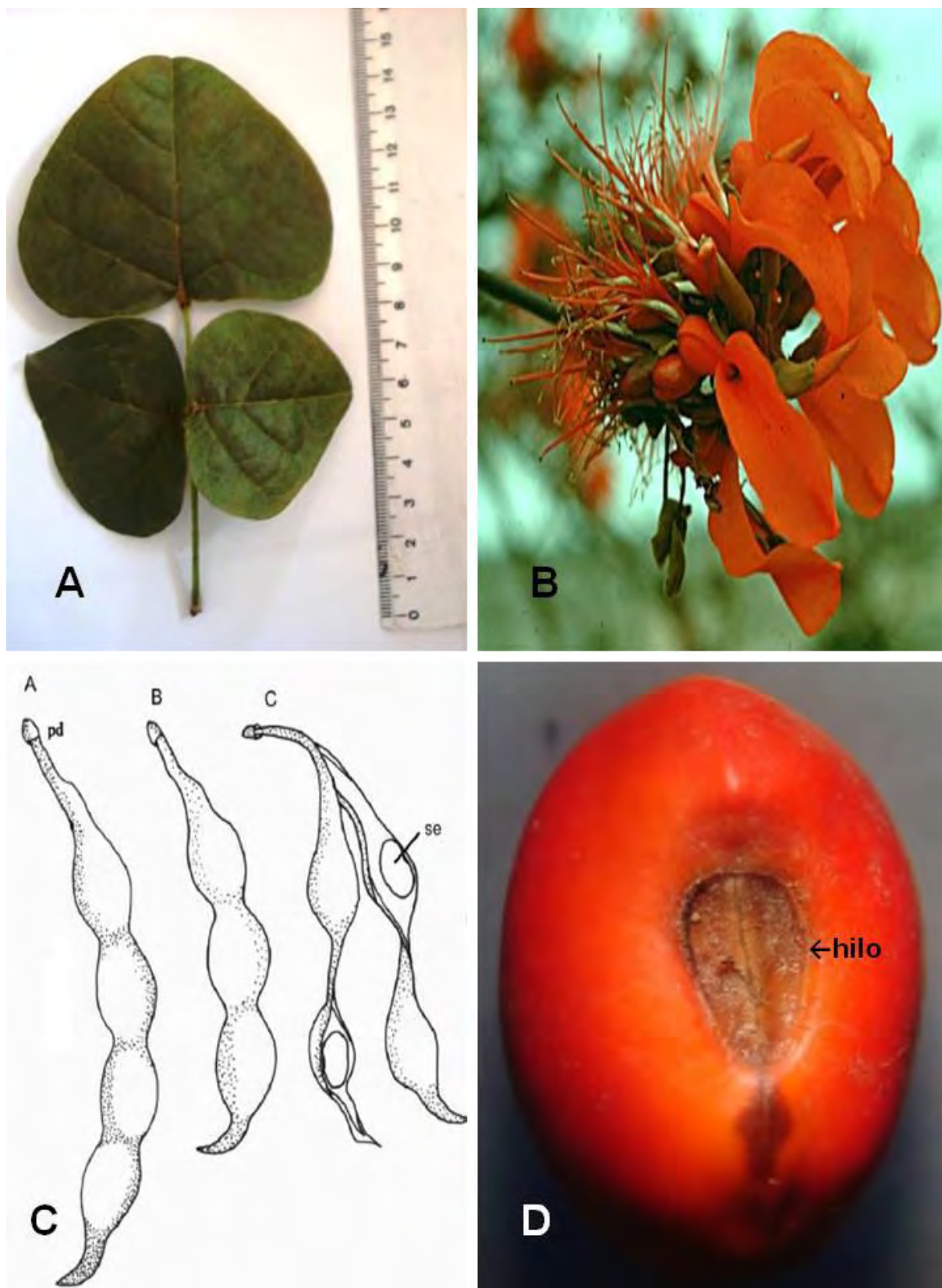
A epiderme da lâmina foliolar de *Erythrina velutina*, em vista frontal, apresenta-se anfiestomática, com estômatos do tipo paracítico (Figura 14 A) e ocasionalmente anisocíticos, sendo escassos na face adaxial e abundantes na face abaxial (Figura 14 B). As células epidérmicas possuem paredes anticlinais sinuosas em ambas as faces. Os tricomas são escassos na face adaxial e numerosos na face abaxial. Foram identificados tricomas do tipo glandular claviforme (Figura 14 B), ramificado unisseriado ou multisseriado, tector constituído por uma célula basal, acompanhada de célula terminal alongada. Em seção transversal, a epiderme apresenta-se unisseriada, com parede periclinal externa plana a convexa e revestida por uma camada de cutícula lisa e espessa. Os estômatos encontram-se inseridos ao nível ou ligeiramente abaixo do nível das demais células epidérmicas (Figura 14 C).

#### **4.1.3.2 Mesofilo Foliolar**

O mesofilo possui organização dorsiventral, com parênquima paliçádico 3-4-estratificado e esponjoso com 2-3-estratos de células alongadas, semelhantes à paliças, com espaço intercelular. Observou-se pequenos feixes vasculares colaterais que se distribuem ao longo da lâmina foliolar. Entre o parênquima paliçádico e o lacunoso nota-se a presença de um estrato de parênquima paravenal, o qual se estende entre as nervuras (Figura 14 C).



**Figura 12.** Caule e ramos de *Erythrina velutina* Willd. **A.** Planta jovem; **B.** Planta adulta, em estágio de floração e frutificação; **C.** Detalhe do caule aculeado, casca com líquens e musgos; **D.** Caule e ramos aculeados.



**Figura 13.** A. Folha trifoliolada, folíolos sub-deltóides; B. Inflorescência em panícula racemosa, corola papilionácea; C. Fruto legume deiscente (SILVA *et al.*, 2008); D. Semente reniforme, hilo desenvolvido. Legenda: pd=pedicelo, se=semente.

#### 4.1.3.3 Bordo Foliolar

O bordo foliolar, em secção transversal, apresenta-se arredondado, levemente voltado para a face abaxial, com a epiderme uniestratificada, seguida de células lignificadas (Figura 14 D).

#### 4.1.3.4 Nervura Principal do Folíolo

A nervura principal, em secção transversal, exibe contorno biconvexo, sendo mais amplo e proeminente na face abaxial. Adjacente à epiderme, evidencia-se o colênquima do tipo angular, descontínuo, 4-6-estratificado, voltado para ambas às faces (Figura 15 A). Idioblastos contendo cristais estilóides foram observados na região do colênquima e floema. O sistema vascular é formado por seis a doze feixes colaterais, em forma de semicírculo, envolvendo uma região central de parênquima medular. Bainha de fibras esclerenquimáticas delimita externamente o floema, voltado para a periferia; câmbio vascular formado por 2-3-estratos de células separam o floema do xilema, este formado por elementos de vasos, dispostos radialmente, separados por parênquima xilemático (Figura 15 B).

#### 4.1.3.5 Pecíolo

O pecíolo, em seção transversal, apresenta contorno circular a semicircular, com epiderme uni-estratificada, revestida por uma camada de cutícula lisa e espessa, seguida de colênquima angular 2-3-estratificado, e parênquima cortical com 2-3-estratos de células isodiamétricas (Figura 15 C). Observou-se a presença de idioblastos com cristais prismáticos e estilóides (Figura 15 D) na região do colênquima e parênquima fundamental, similares aos encontrados na nervura principal. Calotas de fibras de origem esclerenquimáticas se dispõem adjacente ao floema e externamente aos feixes vasculares; células parenquimáticas lignificadas localizam-se entre os feixes vasculares, internamente ao xilema e delimitam um parênquima medular, composto de células de paredes delgadas maiores que as do parênquima fundamental. Tricomas semelhantes aos da lâmina foliar, distribuem-se ao longo do pecíolo. O sistema vascular é formado por 10 a 12 feixes colaterais de tamanhos irregulares, separados e dispostos em círculo, e a região proximal disposta em um único feixe colateral circular. O floema encontra-se separado por células parenquimáticas e seguido do câmbio vascular com

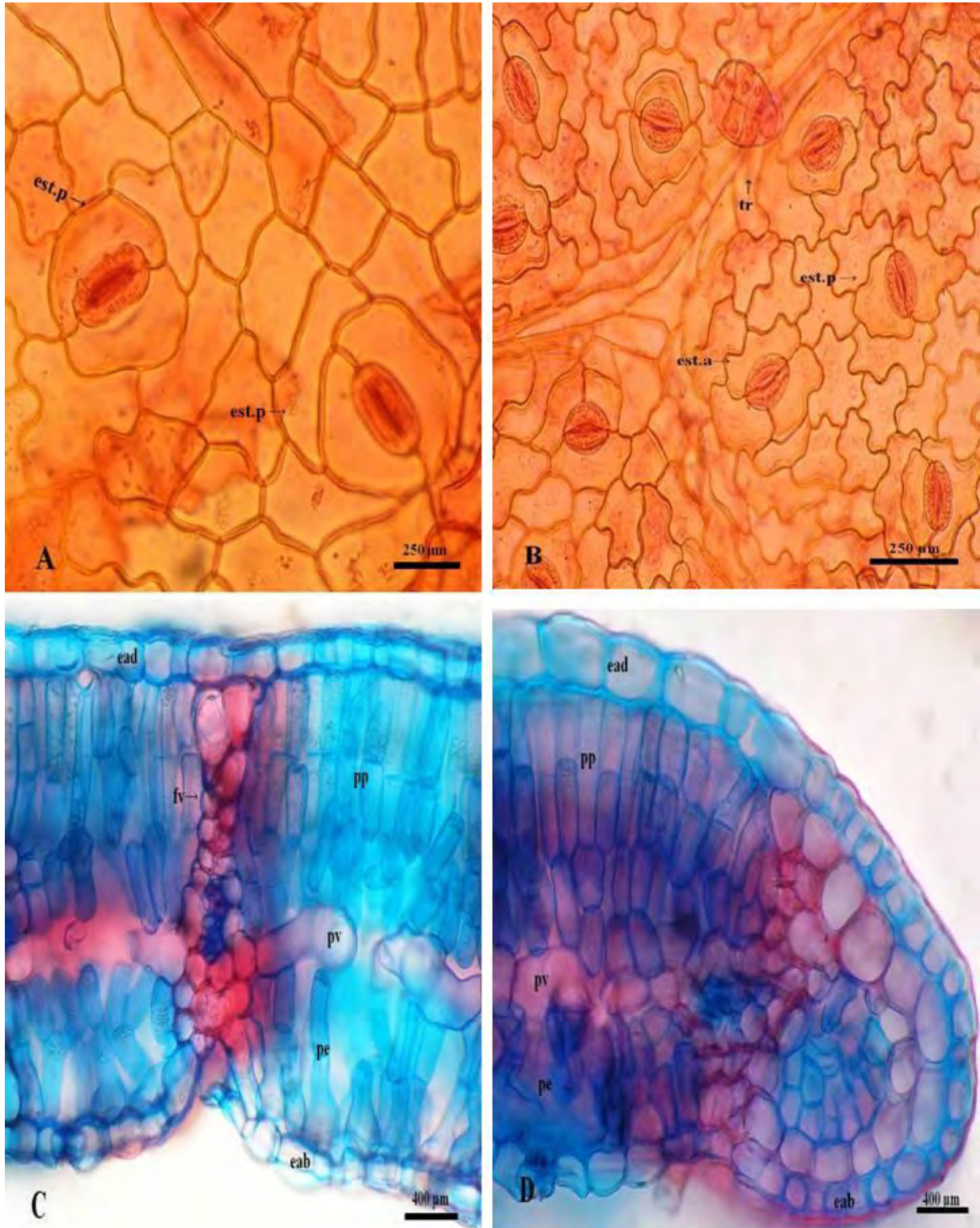
2-3-estratos e do xilema, formado por 3-4-elementos de vasos dispostos radialmente (Figura 15 D).

#### 4.1.3.6 Peciólulo

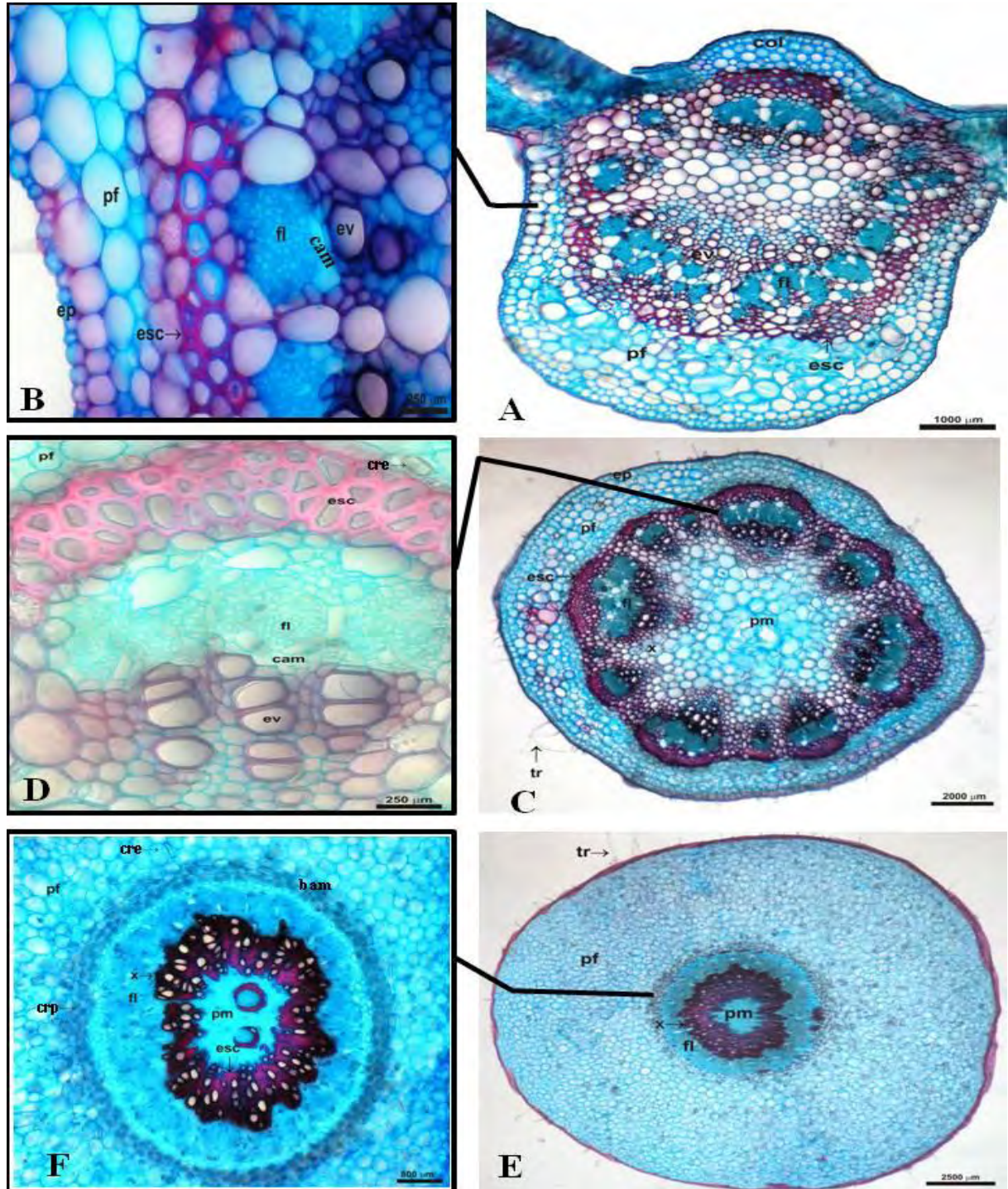
Em seção transversal, exhibe contorno circular a semicircular. Assim como nos folíolos, a espécie possui epiderme uni-estratificada, revestida por uma cutícula lisa e espessa sobre as paredes periclinais externas (Figura 15 E). O parênquima fundamental compreende uma extensa área da estrutura, sendo formado por células de contorno arredondado, além de células contendo grãos de amido formando uma bainha amilífera, delimitando externamente um floema compacto; inúmeros idioblastos cristalíferos contendo cristais estilóides foram observados envolvendo a bainha amilífera. O sistema vascular é formado por um único feixe colateral disposto em círculo, envolvendo o parênquima medular, no qual se observa formações xilemáticas. O câmbio vascular, 2-3-estratos, separa o floema do xilema, formado por 3-4-elementos de vasos xilemáticos (Figura 15 F).

#### 4.1.3.7 Testes Histoquímicos

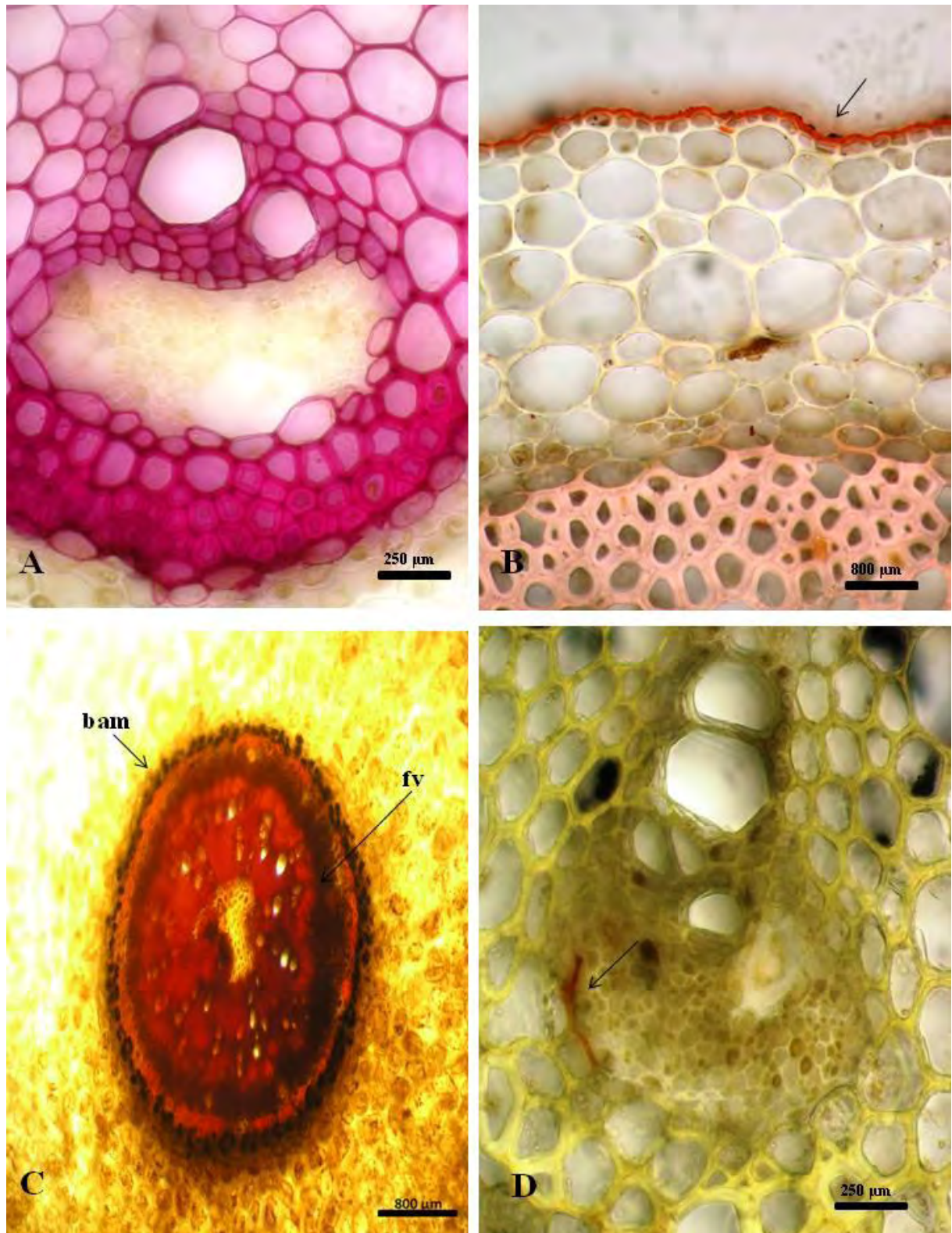
Teste com floroglucinol acidificado em seções da nervura principal e do pecíolo de *E. velutina*, evidenciaram xilema e esclerênquima lignificados, confirmando a disposição dos feixes vasculares (Figura 16 A). Cutícula espessa revestindo as epidermes da nervura foliolar, pecíolo e peciólulo foram evidenciadas pelo reagente Sudam III (Figura 16 B). A presença de grãos de amido no parênquima fundamental da nervura principal, do pecíolo e região pericíclica do peciólulo, foram caracterizadas em seções transversais tratadas com uma solução de lugol (Figura 16 C). A positividade para o teste de Dragendorff sugeriu a presença de alcalóides no floema e parênquima fundamental (Figura 16 D).



**Figura 14.** *Erythrina velutina* Willd. Epiderme, em vista frontal: **A.** face adaxial, estômatos paracíticos; **B.** face abaxial, tricoma glandular claviforme estipitado. Lâmina foliar em secção transversal: **C.** mesofilo dorsiventral; **D.** bordo foliolar. Legendas: tr= tricoma; ead=epiderme na face adaxial; eab=epiderme na face abaxial; est.p=estômato paracítico; est.a=estômato anisocítico; pp=parênquima paliçádico; pv=parênquima paravenal; pe=parênquima esponjoso; fv=feixe vascular.



**Figura 15.** *Erythrina velutina* Willd. Secção transversal: **A.** Nervura principal com feixes vasculares colaterais, em semicírculo; **B.** Detalhe do sistema vascular, evidenciando floema, xilema e câmbio vascular. Pecíolo em secção transversal: **C.** Porção mediana do pecíolo; **D.** Detalhe do pecíolo, evidenciando feixes vasculares colaterais. Pecíólulo em secção transversal: **E.** Porção proximal do pecíólulo; **F.** Detalhe do pecíólulo evidenciando feixe vascular. Legendas: ep=epiderme; pf=parênquima fundamental; pm=parênquima medular; col=colênquima; fv=feixe vascular; fl=floema; ev=elementos de vasos; cam=câmbio; esc=esclerênquima; tric=tricoma; bam=bainha amilífera; crp=cristais prismáticos; cre=cristais estilóides.



**Figura 16.** *Erythrina velutina* Willd. Testes histoquímicos. **A.** Xilema e esclerênquima lignificados, evidenciados pelo floroglucinol acidificado, em seção transversal do pecíolo (rosa); **B.** Cutina (seta) revestindo a epiderme do pecíolo, evidenciada pelo sudam; **C.** Bainha amilífera envolvendo feixe vascular do peciólulo, evidenciado pelo lugol; **D.** Feixe vascular do pecíolo, evidenciando alcalóide na região do floema (seta). Legenda: bam=bainha amilífera; fv=feixe vascular.

## 4.2 ESTUDO FARMACOLÓGICO

### 4.2.1 Triagem Farmacológica Comportamental e Determinação DL<sub>50</sub>

Considerando os parâmetros citados por Almeida & Oliveira (2006), os animais tratados com o Extrato Aquoso das cascas (EAc) de *E. velutina*, apresentaram apenas redução da ambulação e uma leve perda do reflexo corneal nas doses de 1000 e 2000 mg/kg, com diminuição desses efeitos no decorrer das quatro horas de observação. Não foram constatadas mortes durante o experimento e no período de 72 horas.

A administração do Extrato Etanólico Bruto das cascas (EEBc) demonstrou após uma hora de experimento, que as doses de 125, 250 e 500 mg/kg diminuíram a ambulação e evidenciaram uma discreta perda do reflexo corneal, no entanto, as doses de 1000 e 2000 mg/kg além desses efeitos, promoveram leve sedação e diminuição da força para agarrar. Foram registradas duas mortes após o experimento na dose de 2000 mg/kg, sendo uma no período de 24 horas e outra em 48 horas.

O Extrato Aquoso das folhas (EAF) de *E. velutina* promoveu nos camundongos redução da ambulação, perda do reflexo corneal e resposta ao toque diminuída a partir da dose de 250 mg/kg, intensificando esses efeitos de forma dose-dependente. A sedação foi observada a partir da dose de 125 mg/kg. Ptose palpebral e redução da força para agarrar foram demonstradas apenas na dose de 2000 mg/kg. Mortalidade foi observada na dose máxima administrada, sendo uma morte durante o experimento e outras quatro no período de 24 horas, conferindo um total de cinco óbitos.

Os animais tratados com a Fração Metanólica (Fr.MeOH) do extrato aquoso das folhas apresentaram após trinta minutos os seguintes efeitos comportamentais a partir da dose de 125 mg/kg: ambulação diminuída, sedação, perda do reflexo auricular e corneal, esses efeitos se intensificaram de forma dose-dependente. Na dose de 500 mg/kg, também foi verificada a resposta ao toque reduzida, já nas doses de 1000 e 2000 mg/kg, além desse efeito, foi observado também a ptose palpebral e intensa sedação que persistiu após as quatro horas de experimento. Foram registradas duas mortes na dose de 2000 mg/kg, observadas durante o experimento.

Com base nos resultados obtidos (Quadro 1), os extratos da casca e das folhas de *E. velutina*, apresentaram alterações comportamentais semelhantes àquelas demonstradas por drogas depressoras do SNC. No entanto, o EAF e Fr.MeOH demonstraram atividade sedativa

mais significativa quando comparado ao EAc e EEBC. Neste contexto escolheu-se a Fr.MeOH originada do EAF para dar continuidade a investigação psicofarmacológica

Em relação a DL<sub>50</sub>, este parâmetro não pôde ser estimado para nenhum dos extratos/fração testados, demonstrando que a espécie apresenta baixa toxicidade.

**Quadro 1.** Dados referentes à triagem farmacológica realizada com os extratos obtidos de cascas e folhas de *Erythrina velutina* Willd: Fração Metanólica das Folhas (Fr.MeOH), Extrato Aquoso das Folhas (EAF), Extrato Aquoso das Cascas (EAc) e Extrato Etanólico Bruto das Cascas (EEBC).

ALTERAÇÕES	Fr.MeOH	EAF	EAc	EEBC
Resposta ao toque diminuída	++	+	0	0
Redução do reflexo corneal e auricular	+	+	+	+
Ambulação diminuída	++	+	+	+
Sedação	++	+	0	+
Número total de mortes	2	5	0	2

Legenda: 0 = ausente; + presente, ++ intenso. Número total de mortes: durante o experimento e após 72 h de observação.

## 4.2.2 Avaliação da Atividade Ansiolítica

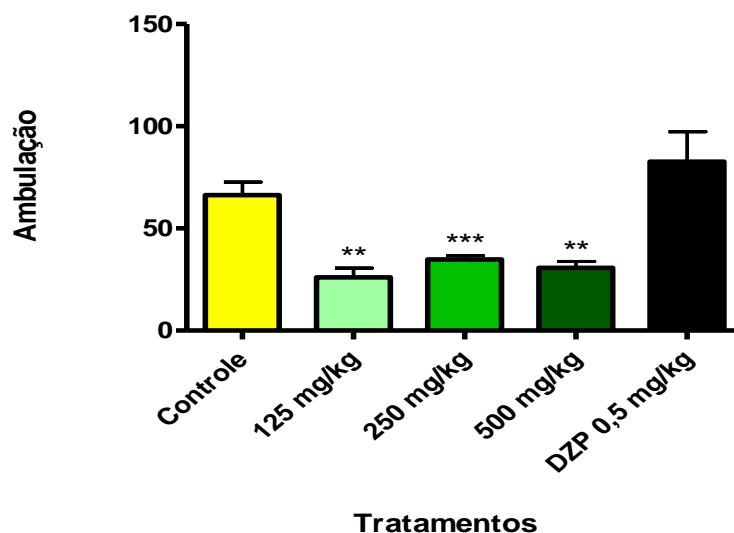
### 4.2.2.1 Modelo do Campo Aberto (Open-Field)

Os animais submetidos ao teste do campo aberto, apresentaram diminuição significativa na ambulação após tratamento prévio com a Fr.MeOH nas doses de 125 mg/kg ( $26,0 \pm 4,6$ ), 250 mg/kg ( $34,7 \pm 1,9$ ) e 500 mg/kg ( $30,6 \pm 3,2$ ) quando comparados ao controle

( $66,2 \pm 6,5$ ). Os valores da ambulação para o grupo tratado com diazepam 0,5 mg/kg foram de  $82,6 \pm 14,7$ , representando aumento em relação ao grupo controle (Gráfico 1).

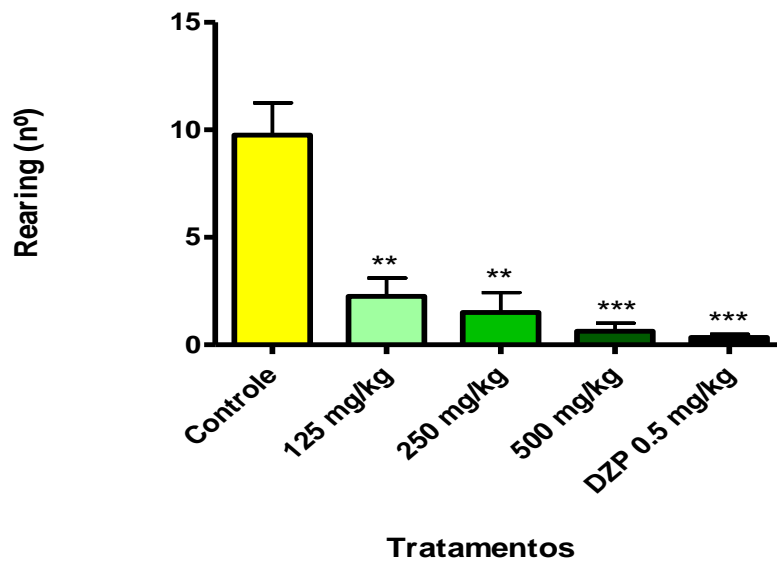
No parâmetro exploratório de levantar (Gráfico 2), foi evidenciada uma redução significativa de forma dose-dependente após administração das doses testes (125 mg/kg:  $2,2 \pm 0,9$ ; 250 mg/kg:  $1,5 \pm 0,9$  e 500 mg/kg:  $0,6 \pm 0,4$ ) em relação ao controle ( $9,7 \pm 1,5$ ). O diazepam ( $0,3 \pm 0,1$ ) também foi capaz de reduzir o ato de levantar dos animais.

De acordo com os resultados do Gráfico 3, os animais tratados com 125 mg/kg ( $33,5 \pm 7,5$  s) e 250 mg/kg ( $52,1 \pm 6,0$  s) da Fr. MeOH aumentaram significativamente o tempo despendido para a auto-limpeza (Grooming), quando comparados ao controle ( $16,1 \pm 4,8$  s). Deste modo, o diazepam ( $21,9 \pm 4,5$  s) e a dose teste de 500 mg/kg ( $16,2 \pm 4,6$  s) não alteraram este comportamento.

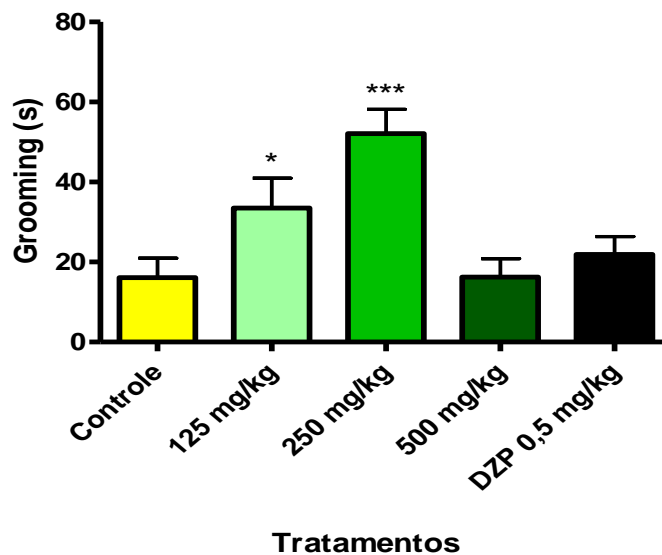


**Gráfico 1.** Efeito da fração metanólica (Fr.MeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p), sobre a ambulação no teste do Campo Aberto em camundongos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n=8). \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . Teste de Mann -Whitney.

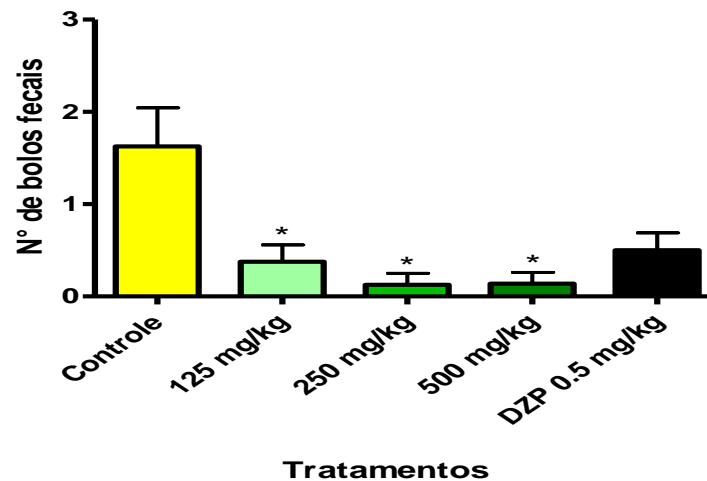
A quantidade de bolos fecais (Gráfico 4) foi reduzida de forma significativa em todas as doses da Fr. MeOH (125 mg/kg:  $0,4 \pm 0,2$ ; 250 mg/kg:  $0,12 \pm 0,1$  e 500 mg/kg:  $0,13 \pm 0,1$ ) em comparação aos grupos que receberam apenas o veículo ( $1,6 \pm 0,4$ ). Nenhum efeito significativo foi observado com o tratamento do diazepam ( $0,5 \pm 0,2$ ).



**Gráfico 2.** Efeito da fração metanólica (Fr.MeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p), sobre o comportamento de levantar (Rearing) no teste do Campo Aberto em camundongos. Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n=8). \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . Teste de Mann -Whitney.



**Gráfico 3.** Efeito da fração metanólica (Fr.MeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p), sobre a variação da auto-limpeza (tempo, em segundos) (Grooming) no teste do Campo Aberto em camundongos. Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n=8). \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ . Teste “t” de Student para amostras independentes.



**Gráfico 4.** Efeito da fração metanólica (Fr.MeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p), sobre a defecação no teste do Campo Aberto em camundongos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n=8). \*  $p < 0,05$ . Teste de Mann - Whitney.

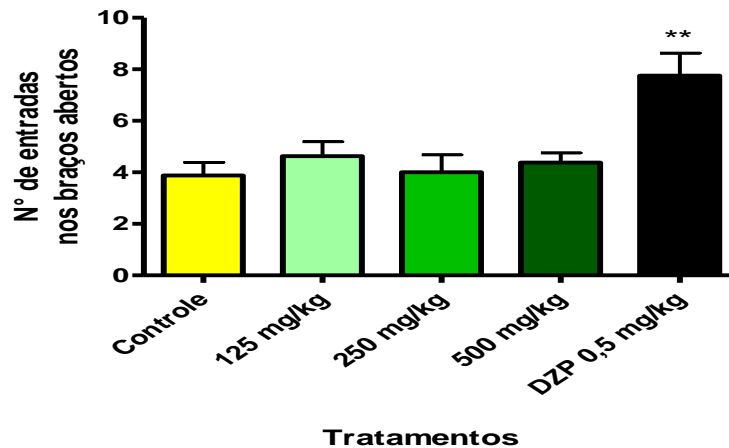
#### 4.2.2.2 Modelo do Labirinto em Cruz Elevado (Pluz-maze)

Os grupos tratados com a Fr.MeOH não apresentaram variação no nº de entradas nos braços abertos (125 mg/kg:  $4,6 \pm 0,5$ ; 250 mg/kg:  $4,0 \pm 0,7$ ; 500 mg/kg:  $4,4 \pm 0,4$ ) em comparação ao grupo controle (C:  $3,9 \pm 0,5$ ) (Gráfico 5A), no entanto, verificou-se um aumento significativo no tempo de permanência nos braços abertos (Gráfico 5B) nas doses de 125 mg/kg e 500 mg/kg (C:  $34,6 \pm 6,1$ ; 125 mg/kg:  $60,8 \pm 6,5$ ; 500 mg/kg:  $76,7 \pm 9,7$  s). A dose de 250 mg/kg ( $107,8 \pm 37,0$ ) não apresentou valor significativo provavelmente pelo forte efeito sedativo provocado em alguns animais durante o teste, que ocasionou intensa redução da ambulação e sonolência, fazendo com que dormissem ora nos braços abertos, ora nos braços fechados.

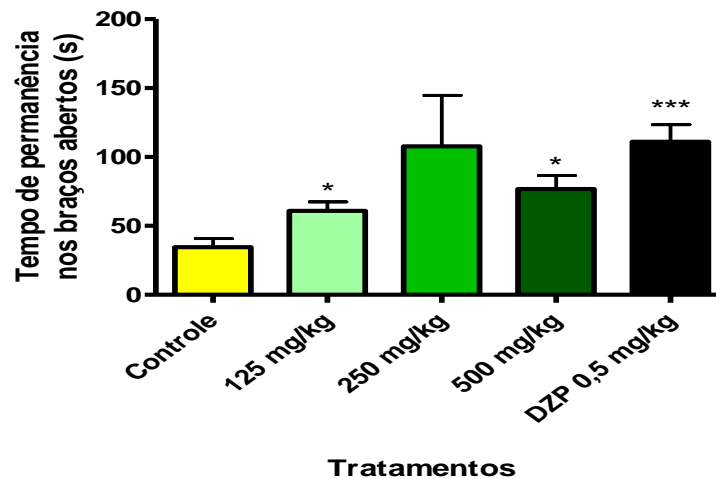
Em relação aos braços fechados, todas as doses foram capazes de diminuir de forma significativa o nº de entradas (C:  $11,2 \pm 1,1$ ; 125 mg/kg:  $6,9 \pm 0,9$ ; 250 mg/kg:  $3,5 \pm 0,9$ ; 500 mg/kg:  $5,5 \pm 0,5$ ) (Gráfico 6A), já no tempo de permanência nos braços fechados (Gráfico 6B), a diminuição foi significativa nas doses de 125 mg/kg e 500 mg/kg (C:  $210,4 \pm 7,2$ ; 125 mg/kg:  $192,0 \pm 8,9$ ; 250 mg/kg:  $136,4 \pm 36,8$ ; 500 mg/kg:  $166,4 \pm 13,6$  s). O diazepam (0,5 mg/kg) aumentou significativamente o número de entradas ( $7,7 \pm 0,8$ ) e o tempo de

permanência nos braços abertos ( $111 \pm 12,5$  s), enquanto que nos braços fechados, não ocorreu alteração no número de entradas ( $8,8 \pm 0,7$ ), mas reduziu de forma significativa o tempo de permanência ( $136,3 \pm 14,7$  s).

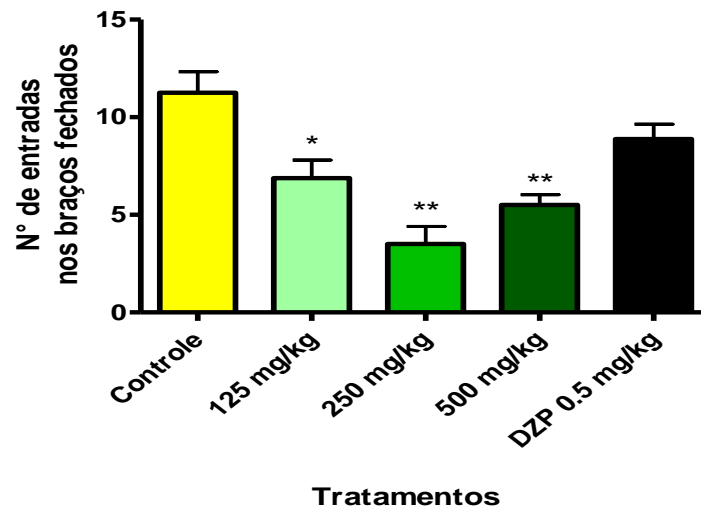
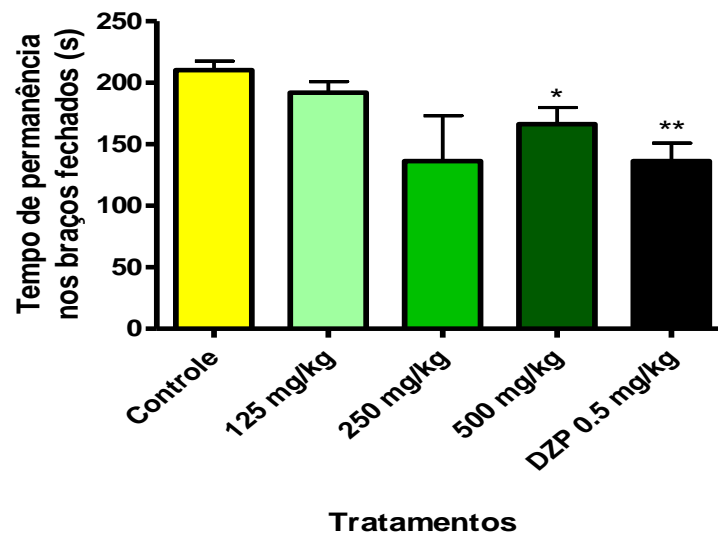
**A**



**B**



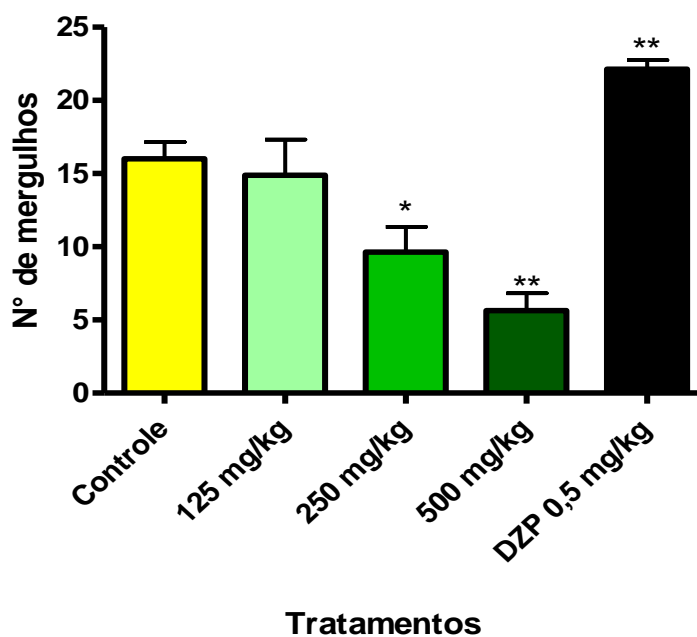
**Gráfico 5.** Efeito da fração metanólica (Fr.MeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p), em camundongos, no teste do Labirinto em Cruz Elevado – **A.** Número de entradas nos braços abertos, Teste de Mann-Whitney. **B.** Tempo de Permanência (segundos). Teste “t” de Student para amostras independentes. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n=8). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

**A****B**

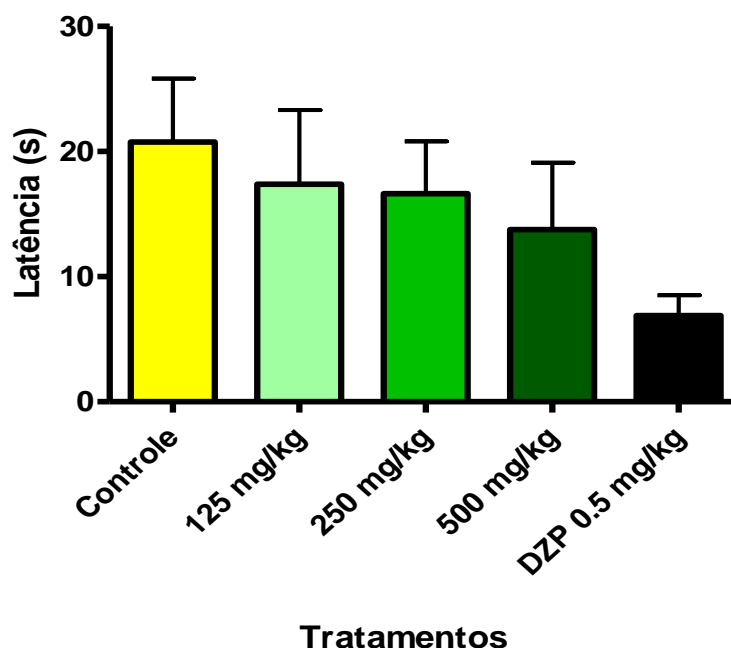
**Gráfico 6.** Efeito da fração metanólica (Fr.MeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p), em camundongos, no teste do Labirinto em Cruz Elevado –**A.** Número de entradas nos braços fechados.. Teste de Mann-Whitney. **B.** Tempo de Permanência (segundos). Teste “t” de Student para amostras independentes. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n=8). \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.2.2.3 Modelo da Placa Perfurada (Hole Board)

De acordo com os resultados observados no gráfico 7, os animais tratados com 250 mg/kg ( $9,6 \pm 1,7$ ) e 500 mg/kg ( $5,6 \pm 1,2$ ) da Fr.MeOH, diminuíram de forma significativa o número de mergulhos em relação aos animais tratados com o controle ( $16,0 \pm 1,1$ ). Enquanto que o diazepam ( $22,1 \pm 0,6$ ) promoveu o aumento do número de mergulhos na placa perfurada, refletindo o seu efeito ansiolítico. Contudo, o tempo de latência para o primeiro mergulho (Gráfico 8), não apresentou diferença significativa entre os grupos testes (125 mg/kg:  $17,4 \pm 6,0$  s; 250 mg/kg:  $16,6 \pm 4,2$  s; 500 mg/kg:  $13,7 \pm 5,4$  s), controle ( $20,7 \pm 5,1$  s) e padrão ( $6,9 \pm 1,6$  s).



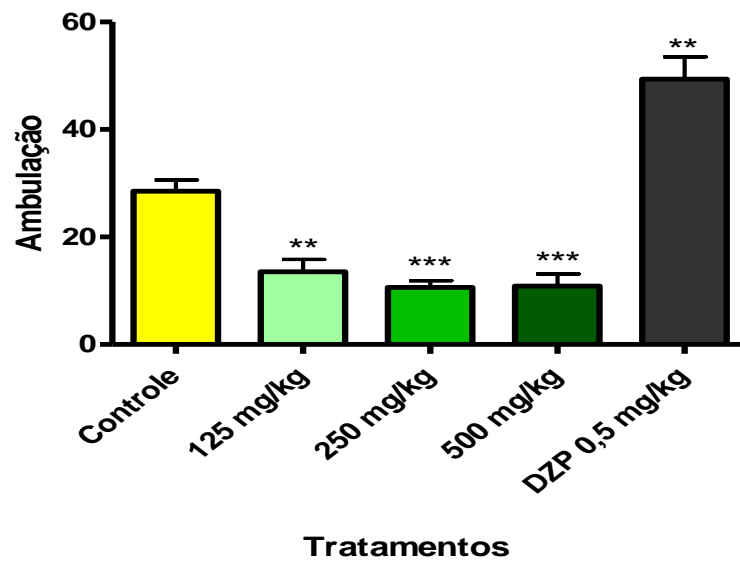
**Gráfico 7.** Efeito da fração metanólica (Fr.MeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p) sobre o número de mergulhos no teste da Placa Perfurada, em camundongos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n=8). \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  Teste de Mann -Whitney.



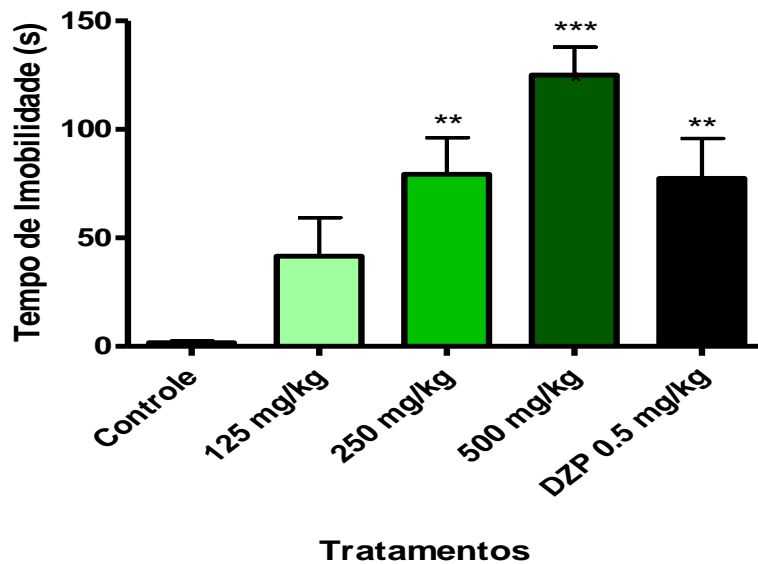
**Gráfico 8.** Efeito da fração metanólica (Fr.MeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p) sobre o tempo de latência (s) para o primeiro mergulho no teste da Placa Perfurada, em camundongos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n=8). Teste “t” de Student para amostras independentes.

Os animais submetidos ao teste da Placa Perfurada, apresentaram diminuição significativa na ambulação após tratamento prévio com a Fr.MeOH nas doses de 125 mg/kg ( $13,5 \pm 2,3$ ), 250 mg/kg ( $10,6 \pm 1,3$ ) e 500 mg/kg ( $10,9 \pm 2,3$ ) quando comparados ao controle ( $28,5 \pm 2,1$ ). No entanto, o diazepam na dose de 0,5 mg/kg ( $49,4 \pm 4,1$ ) apresentou, como o esperado, aumento deste parâmetro com valor significativo (Gráfico 9).

Conforme ilustrado no gráfico 10, o tempo de imobilidade aumentou em todas as doses teste, mas apenas foi significativo nas doses de 250 mg/kg ( $79,2 \pm 17,0$  s) e 500 mg/kg ( $125,0 \pm 13,0$  s), em relação ao controle ( $1,6 \pm 0,8$  s). O grupo padrão ( $77,4 \pm 18,4$  s) também demonstrou aumento para este parâmetro.



**Gráfico 9.** Efeito da fração metanólica (Fr.MeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p) sobre a ambulação no teste da Placa Perfurada, em camundongos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n=8). \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . Teste de Mann -Whitney.



**Gráfico 10.** Efeito da fração metanólica (Fr.MeOH) das folhas de *E. velutina* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (i.p) sobre o tempo de imobilidade (s) no teste da Placa Perfurada, em camundongos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n=8). \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  Teste “t” de Student para amostras independentes.

### 4.3 ESTUDO QUÍMICO

#### 4.3.1 Triagem Fitoquímica Preliminar

A avaliação qualitativa realizada por meio de reagentes de coloração ou precipitação evidenciou os grupos de constituintes presentes nos extratos e fração das folhas e cascas de *Erythrina velutina*, observadas no Quadro 2.

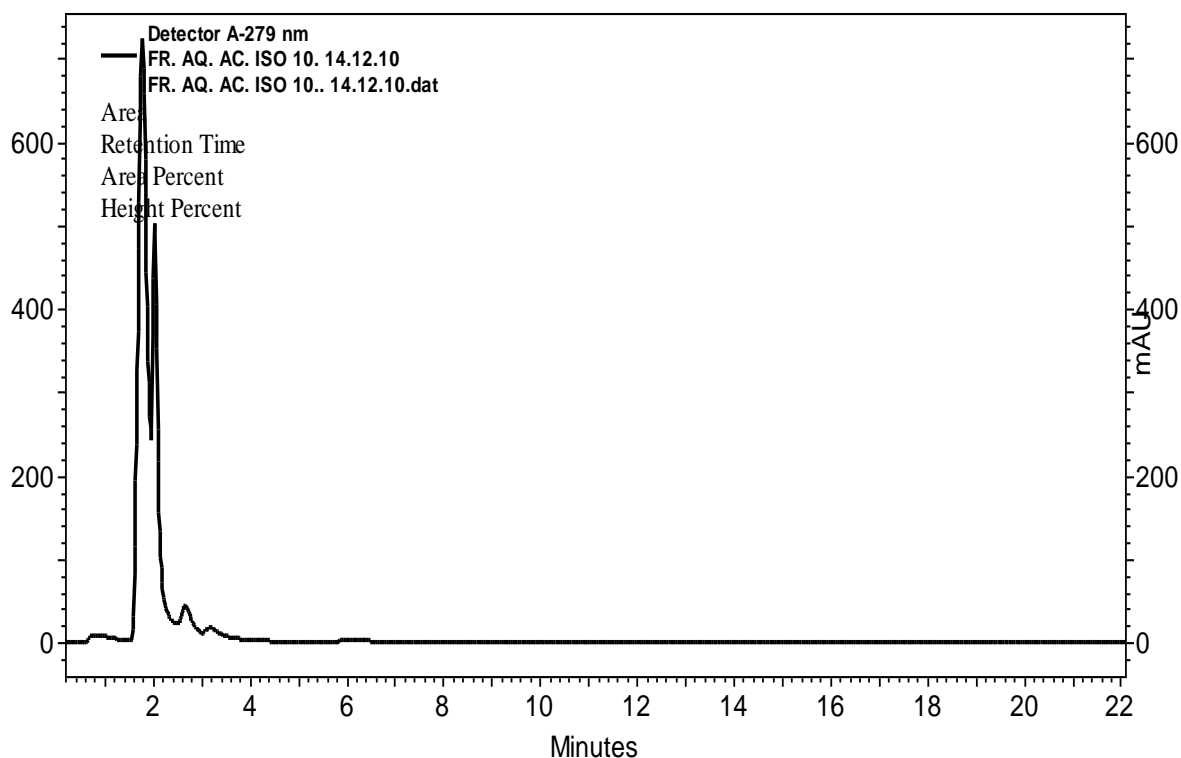
**Quadro 2.** Dados referentes à triagem fitoquímica realizada com os extratos obtidos de cascas e folhas de *Erythrina velutina* Willd: Extrato Aquoso das Folhas (Eaf), Fração Metanólica das Folhas (Fr.MeOH), Extrato Aquoso das Cascas (EAc) e Extrato Etanólico Bruto das Cascas (EEBc).

GRUPOS QUÍMICOS	REAGENTES	Eaf	Fr.MeOH	EAc	EEBc
<b>Alcalóides</b>	Dragendorff	-	+	-	+
<b>Esteróides e Terpenóides</b>	Liebermann-Burchard	+	+	+	+
<b>Taninos</b>	Cloreto Férrico 2%	+	+	-	-
<b>Flavonóides</b>	Fluorescência	+	+	+	+
<b>Saponinas</b>	Teste de espuma	-	-	-	-

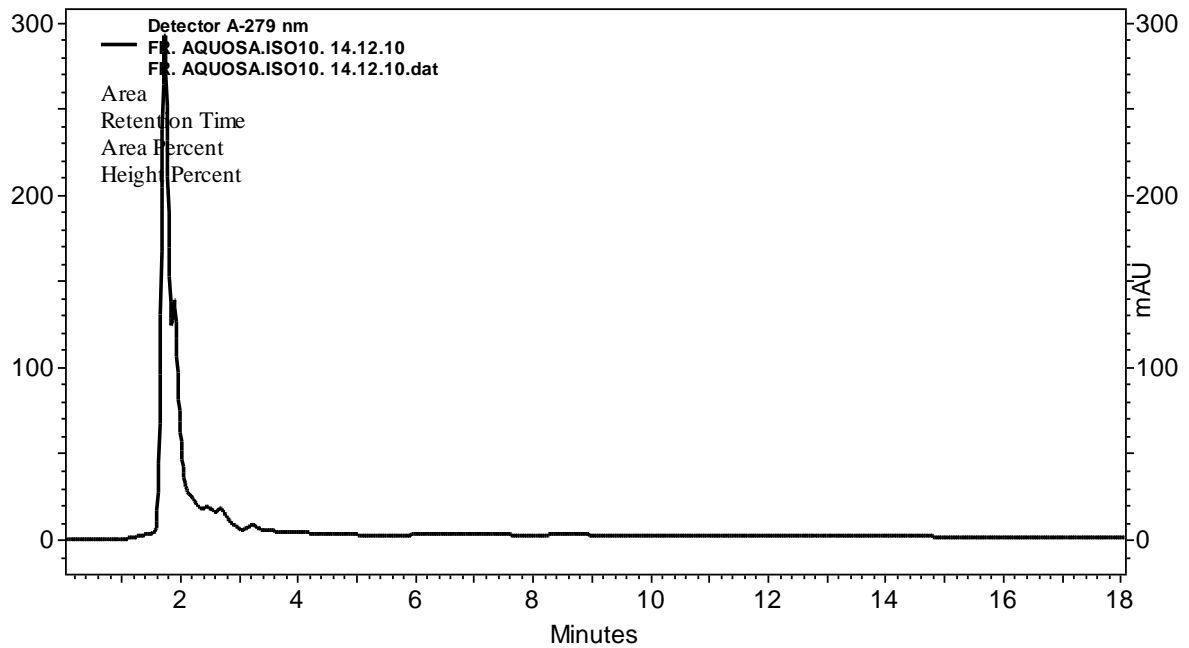
Legenda: (-) Reação negativa; (+) Reação positiva.

### 4.3.2 Perfil Cromatográfico

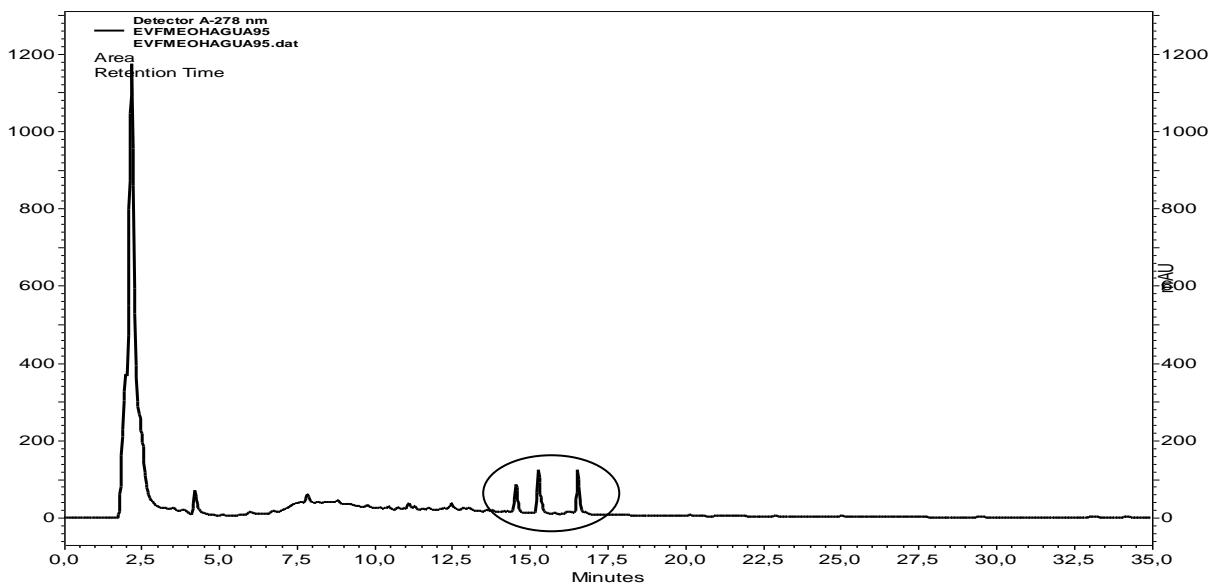
A partir do perfil cromatográfico das Frações, pode-se observar que o método de fracionamento (Ver Figura 11) do extrato aquoso utilizando Amberlite® XAD ®-2 foi eficiente, promovendo a remoção dos constituintes mais polares; provavelmente substâncias de alto peso molecular ou de alta polaridade, como moléculas de açúcar, proteínas, aminoácidos, para as frações aquosas (Figura 17 e 18). Já na Fração Metanólica além dos constituintes polares foram observadas a presença de compostos com tempo de retenção entre 14 e 17 minutos, os quais foram alvo de nosso interesse (Figura 19).



**Figura 17:** Expansão (de 0 a 22,0 min.) do cromatograma obtido por CLAE, da Fração Aquosa Ácida do extrato aquoso das folhas de *Erythrina velutina*. Fase Móvel: ACN: H<sub>2</sub>O: Trietilamina (10: 90: 0,1) em 35 min, fluxo 1 mL/min em coluna analítica.

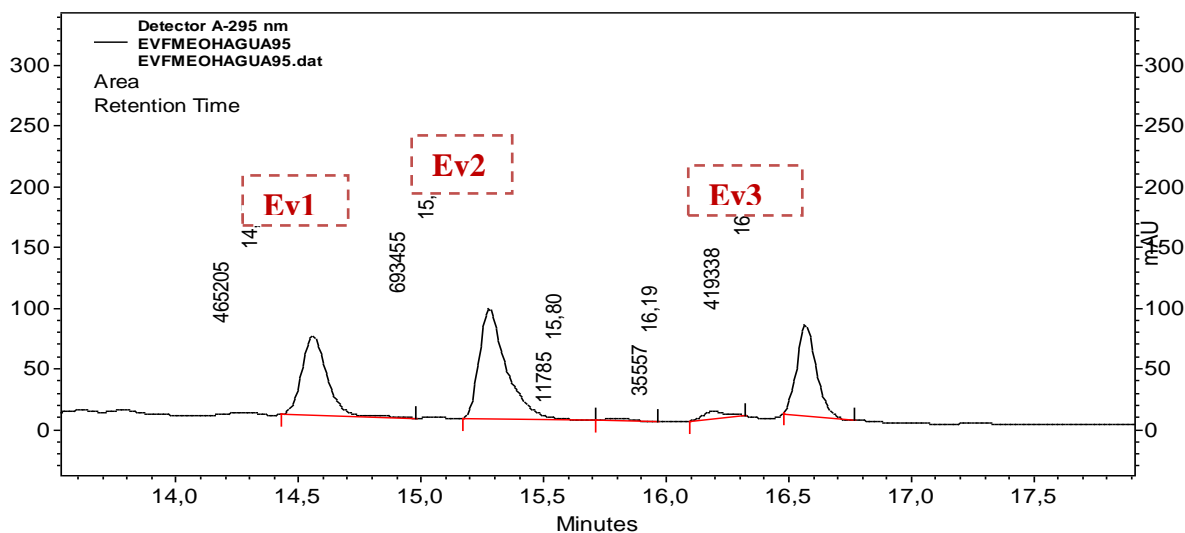


**Figura 18:** Expansão (de 0 a 18,0 min.) do cromatograma obtido por CLAE, da Fração Aquosa do extrato aquoso das folhas de *Erythrina velutina*. Fase Móvel: ACN: H<sub>2</sub>O: Trietilamina (10: 90: 0,1) em 35 min, fluxo 1 mL/min em coluna analítica.



**Figura 19:** Cromatograma obtido por CLAE, da Fração Metanólica do extrato aquoso das folhas de *Erythrina velutina*. Fase Móvel: ACN: H<sub>2</sub>O: Trietilamina 0,1%, em modo gradiente de 5 a 95%, em 35 min, fluxo 1 mL/min em coluna analítica. A elipse está destacando os picos que foram objeto de purificação por CLAE semi-preparativa.

### 4.3.3 Isolamento dos Constituintes



**Figura 20:** Expansão (de 13,5 a 18,0 min.) do cromatograma obtido por CLAE, da Fração Metanólica do extrato aquoso das folhas de *Erythrina velutina*. Fase Móvel: ACN: H<sub>2</sub>O: Trietilamina 0,1%, em modo gradiente 5 a 95% em 30 mim, fluxo de 5 mL/min em coluna semi-preparativa.

Os compostos codificados Ev1, Ev2 e Ev3 (Figura 20) da Fr.MeOH das folhas obtidas por CLAE, em método preparativo, foram submetidas ao teste de Dragendorff, o qual foi positivo para as três substâncias, indicando a provável presença de alcalóides. As substâncias Ev1 e Ev3 não apresentaram grau de pureza satisfatório e nem quantidade suficiente para a aquisição de espectros de RMN com relação sinal/ruído adequada, impossibilitando a identificação das estruturas. No entanto, os espectros de RMN de Ev2, após processo de purificação, apresentaram sinais sugestivos da presença de alcalóides tetracíclico do tipo eritrina (Figura 21), descritos a seguir:

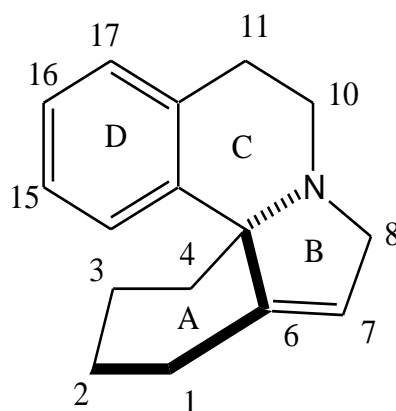
O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figuras 22) mostrou absorção em  $\delta$ C 65,6 atribuída ao carbono quaternário ligado diretamente ao nitrogênio (C-5), que absorve geralmente entre  $\delta$ C 63- 68 ppm e dos carbonos aromáticos C-14 e C-17 sugerido para o anel D tetra substituído, com os sinais em  $\delta$ C 113,1 e 113,8 respectivamente, que em geral absorvem em  $\delta$ C 108-112 (C-14) e  $\delta$ C 111-117 (C-17) (TSUDA; SANO, 1996). Observou-se, ainda, um sinal intenso

em  $\delta C$  56,6 que sugere a presença de duas metoxilas (Figura 22), reforçada pelos simpletos  $\delta H$  3,86 e 3,37, sendo a primeira aromática e a segunda alifática (Figura 24).

O espectro de RMN de  $^1H$  de Ev-2 sugere a presença de um sistema diênico conjugado entre os anéis A e B, devido a presença de prótons olefínicos, sendo um duplo duplete em  $\delta H$  6,6 ( $^1H$ ,  $J=10,5$ ; 10Hz) acoplado com um duplete em  $\delta H$  6,22 ( $^1H$ ,  $J= 10,5$  Hz), atribuídos aos hidrogênios H-1 e H-2 do anel A, respectivamente (Figura 25), corroborando com o sinal em  $\delta C$  134,2 (Figuras 22) atribuído ao carbono C-2, e a presença de um simpleto largo em  $\delta H$  5,90 atribuído ao hidrogênio H-7 (Figuras 25).

Observa-se a presença de prótons alifáticos (Figuras 26, 27, 28 e 29), que provavelmente seriam atribuídos aos hidrogênios dos anéis A, B e D, além de prótons aromáticos, como os dois simpletos largos em  $\delta H$  6,85 e 6,72, sugeridos para os hidrogênios H-14 e H-17, respectivamente, corroborando com a hipótese de um anel D tetra substituído para Ev-2.

Portanto, com base na análise dos dados espectrais acima descritos e na comparação com dados da literatura, foi possível sugerir que a substância Ev-2 seria o alcalóide: 3 $\beta$ -1,2,6,7-tetradehidro-3,16-dimetoxi-eritran-15-ol (erisovina) (Figura 30), composto anteriormente isolado das sementes e cascas de *Erythrina velutina*. (TSUDA; SANO, 1996; CABRAL, 2009).



**Figura 21:** Esqueleto típico de alcalóides de *Erythrina*.

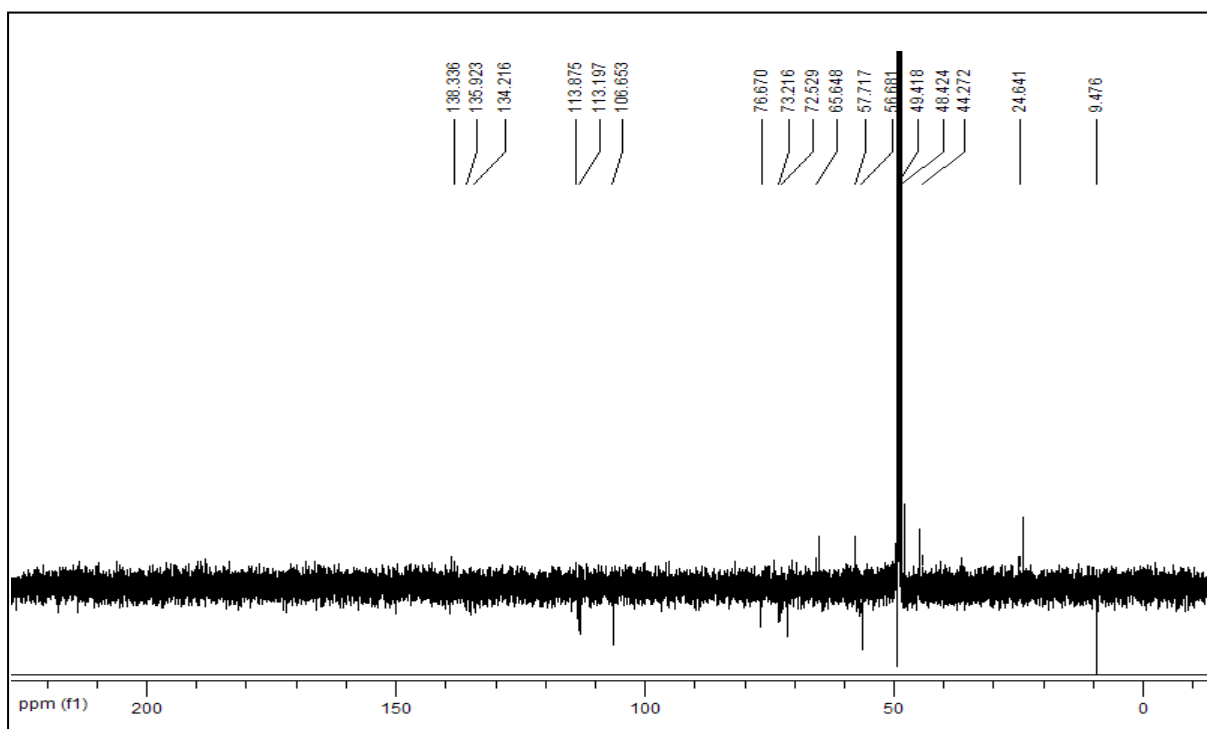


Figura 22. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de Ev-2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).

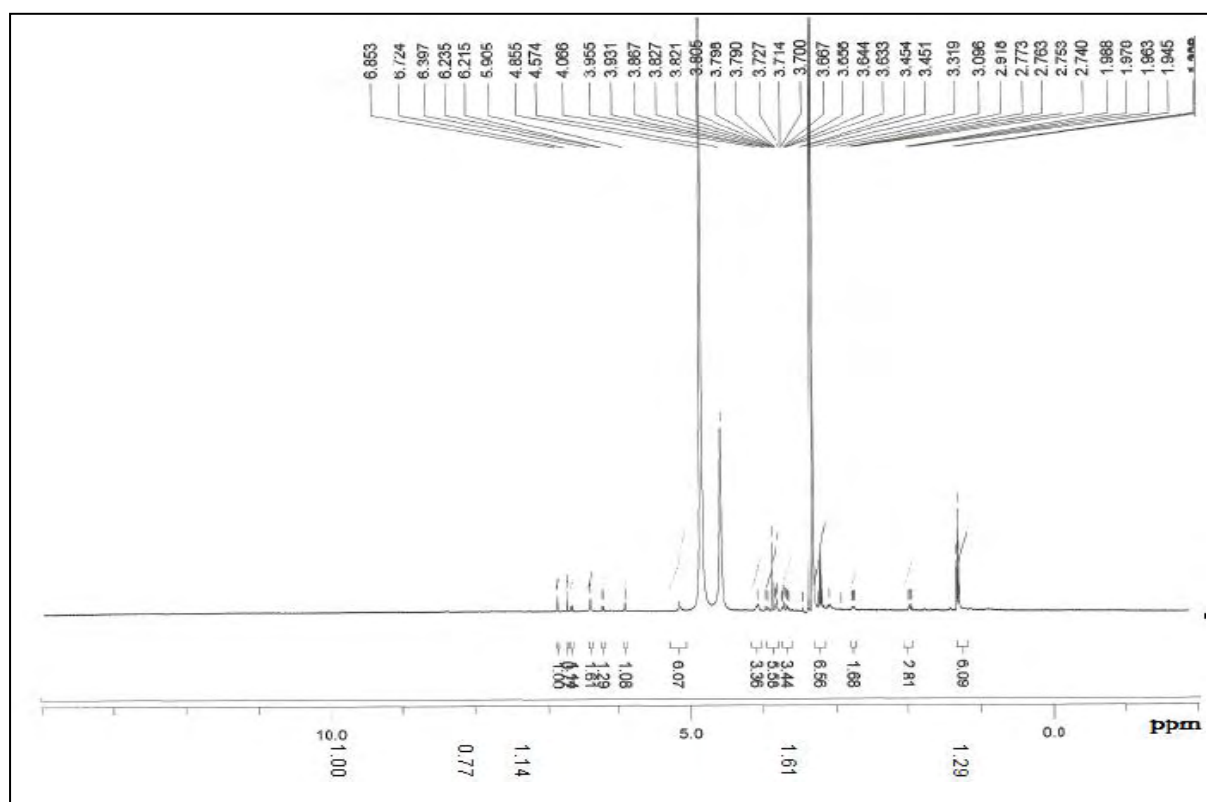
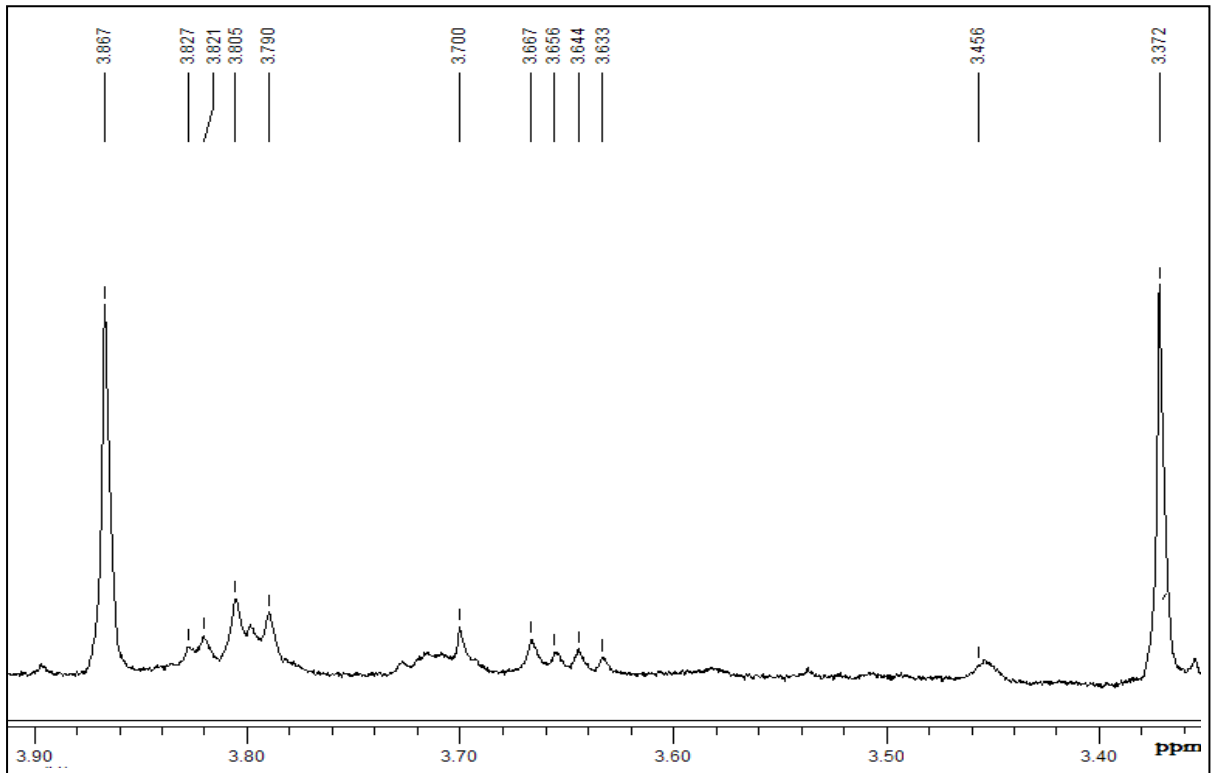
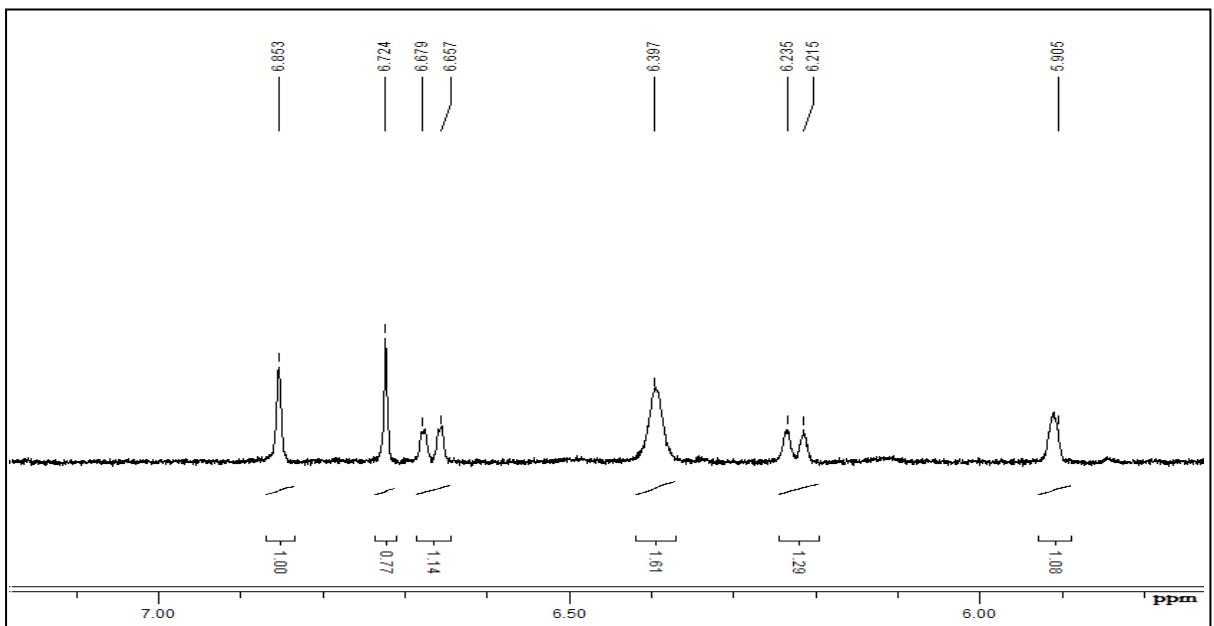


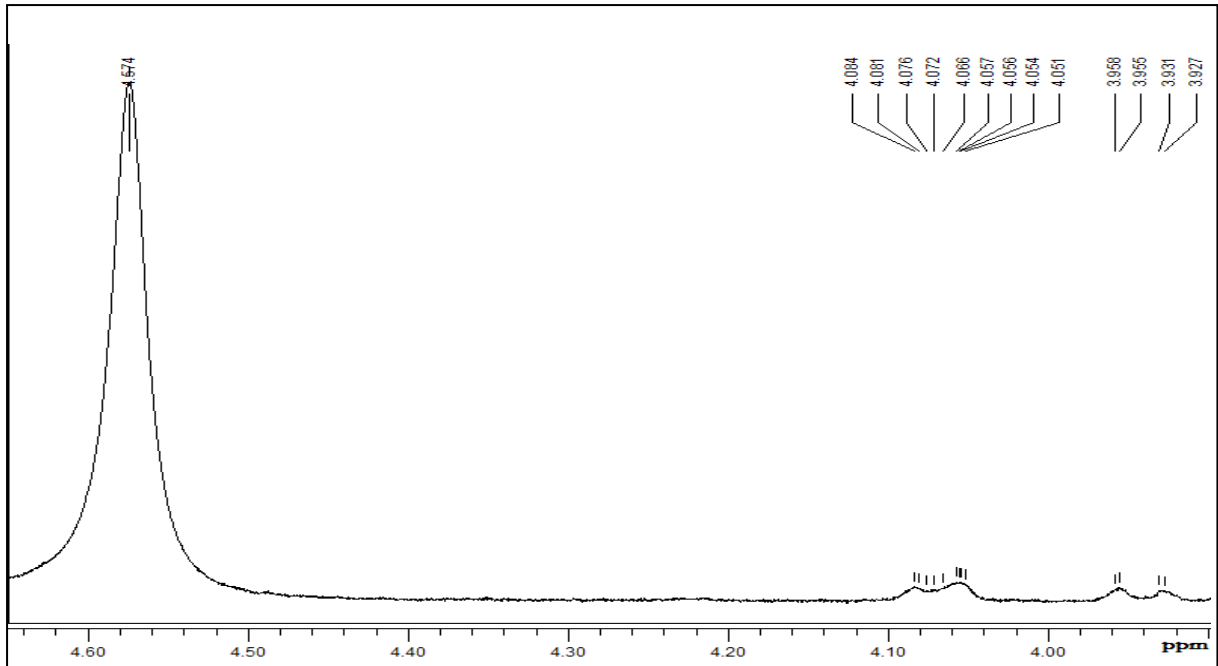
Figura 23. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Ev-2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).



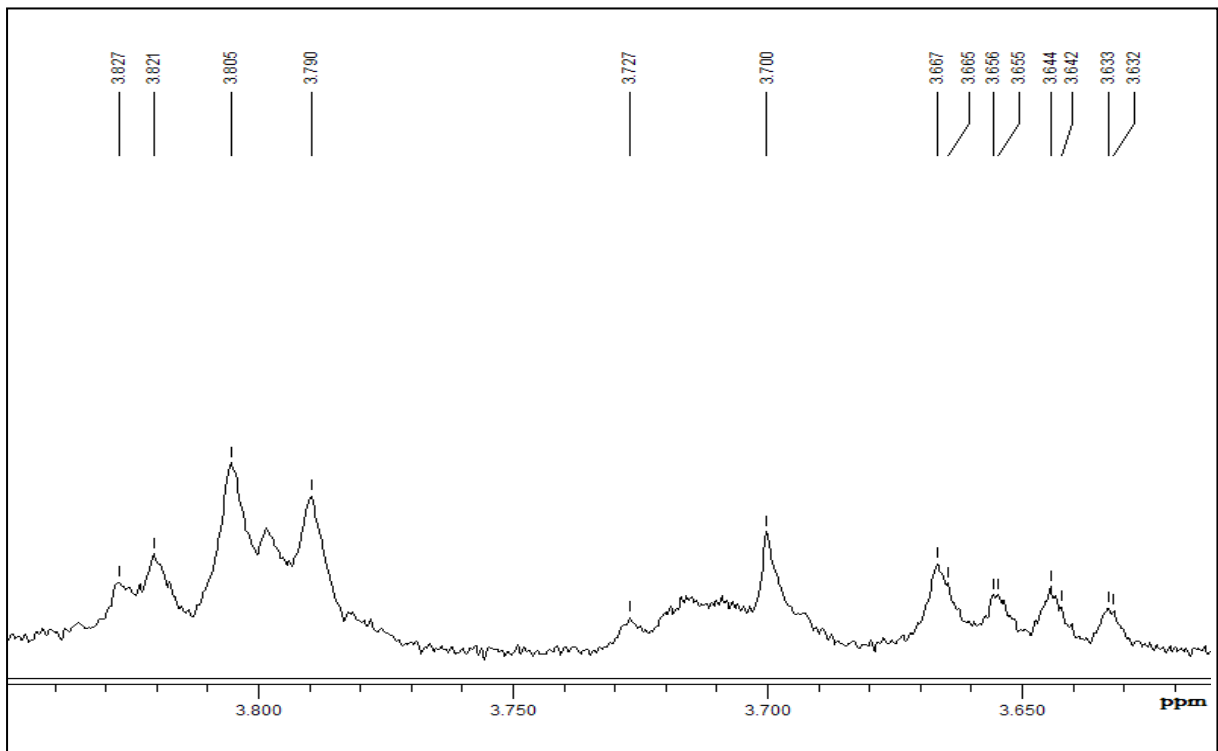
**Figura 24:** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de Ev-2 na região de 3,3 a 3,9 ppm (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).



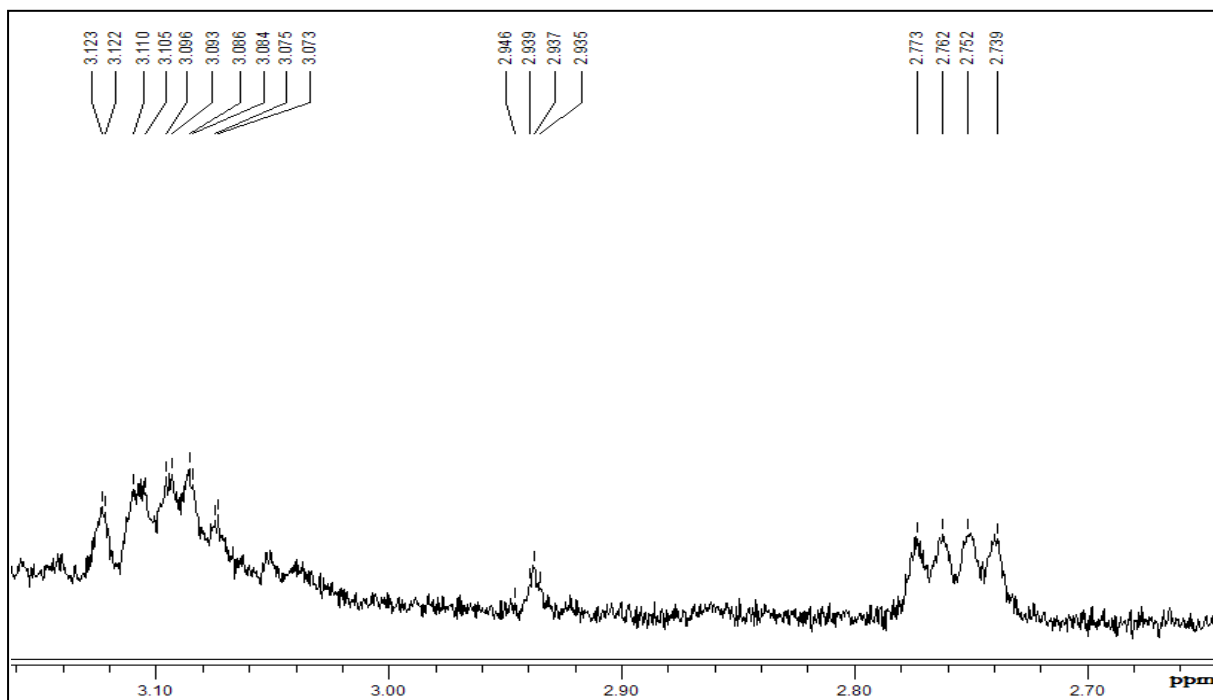
**Figura 25:** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de Ev-2 na região de 5,8 a 7,0 ppm (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).



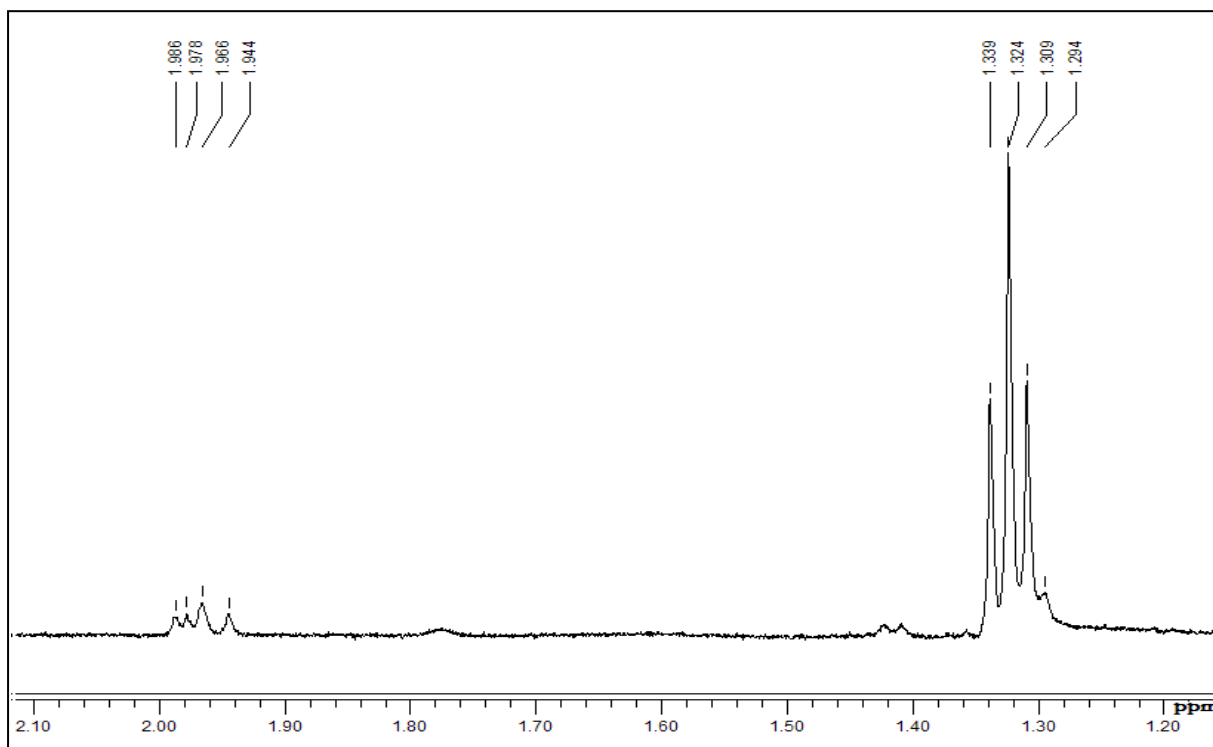
**Figura 26:** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de Ev-2 na região de 3,9 a 4,6 ppm (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).



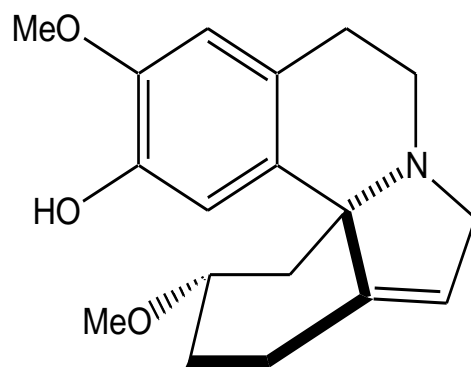
**Figura 27:** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de Ev-2 na região de 3,6 a 3,8 ppm (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).



**Figura 28:** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de Ev-2 na região de 2,7 a 3,1 ppm (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).



**Figura 29:** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de Ev-2 na região de 1,2 a 2,1 ppm (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).



**Figura 30:** Estrutura da Erisovina

# Discussão

## 5 DISCUSSÃO

O estudo morfológico de *Erythrina velutina* aponta características macroscópicas, fornecidas a partir dos frutos, sementes, flores e folhas, que permitem a sua diferenciação entre as espécies relacionadas como a *Erythrina verna*.

Apesar de pertencer ao mesmo gênero, o fruto de *E. verna* é do tipo folículo, de acordo com Bortoluzzi *et al.* (2004), diferindo do fruto de *E. velutina*, que é um legume típico (LEWIS, 1987) com sementes reniformes de testa vermelho-alaranjado, também comum a *E. cristagalli*, do qual se diferencia tanto pelo tamanho do fruto quanto pelo número de 6 a 12 e cor das sementes, testa castanha, hilo lateral branco, com base em Sossella, (2005). Em *Erythrina* a morfologia do fruto e semente constituem evidências taxonômicas muito importantes para a separação dos *taxa*. Segundo Gunn (1981), características externas e internas das sementes são pouco modificadas pelo ambiente, constituindo-se assim, em variáveis seguras para a identificação. Deste modo, a cor vermelho-alaranjada das sementes de *E. velutina*, pouco frequente, pode ser considerada um caráter bastante válido para sua identificação.

A estrutura foliar das Fabaceae tem sido estudada sob vários aspectos e é bastante variável, devido aos diferentes tipos de folhas destas plantas (MENEZES, 1985) e correlacionada com a diversidade de ambientes em que vivem, demonstrados em diferentes gêneros e espécies (METCALFE; CHALK, 1979). Dessa forma, *E. velutina* apresenta folhas alternas, folíolos sub-deltóides, ápice retuso, base cordada, cartáceos. *Erythrina falcata* possui folíolos ovais, coriáceos, com ápice acuminado (ALMEIDA, 2010). Em *E. speciosa* os folíolos são ovais a rombóides, obtusos ou subtruncados na base, agudos no ápice. *Erythrina verna* possui folíolos elípticos ou ovais, com a base obtusa a levemente cuneada, ápice agudo a acuminado (BORTOLUZZI *et al.*, 2004).

Outra característica importante e que pode ser observada facilmente é a presença ou não de acúleos. *Erythrina velutina* possui caule e ramos aculeados, assim como foi observado para *E. verna*. No entanto, *E. speciosa* e *E. falcata* caracterizam-se pela presença de acúleos no caule e folhas (BORTOLUZZI *et al.*, 2004; ALMEIDA, 2010).

A inflorescência de *E. velutina* é do tipo panícula racemosa, *E. falcata* apresenta-se em cachos, *E. speciosa* em racemo terminal e *E. verna* em pseudo-racemos axilares

(BORTOLUZZI *et al.*, 2004; ALMEIDA, 2010). Portanto, as flores vistosas do gênero *Erythrina* representam um caráter distintivo entre as espécies.

A anatomia foliar de *Erythrina velutina*, em vários aspectos, correspondeu ao padrão registrado por Metcalfe e Chalk (1979) para a família Fabaceae. Entretanto, a epiderme com células de parede periclinal externa plana a convexa, diferiu da epiderme papilosa, comum em muitas espécies de *Erythrina*, assim como em *Erythrina cristagalli* (SOSSELA, 2005). Já as paredes anticlinais, apresentaram contorno sinuoso, conforme observado para Faboideae (ARAÚJO, MENDONÇA, 1998); porém, este é um caráter que pode sofrer variações conforme a região da folha, devido a fatores ambientais, como intensidade luminosa e umidade atmosférica, podendo ser mais pronunciada na zona entre as nervuras, ou mesmo na epiderme adaxial. (CUTTER, 1986).

Células epidérmicas revestidas por cutícula lisa e espessa foram observadas nas seções transversais do mesofilo foliolar, pecíolo e peciólulo e confirmadas pelo teste do Sudam. Morfologia semelhante foi registrada para *E. cristagalli* e *E. falcata* (SOSSELA, 2005; ALMEIDA, 2010). De acordo com Eames e MacDaniels (1947), as camadas de cutícula variam em espessura e características, apresentando-se fina em plantas de sombra e lugares úmidos, e espessa em ambiente seco e ensolarado, como a região da Caatinga.

Segundo Metcalfe e Chalk (1979), não existe um tipo de estômato característico da família Fabaceae. A presença de folhas anfiestomáticas e estômatos do tipo paracítico e anisocítico, coincidem com relato anterior para *E. velutina* (VENTURA *et al.*, 2006). Além dos estômatos citados, foi observado em *E. falcata* a presença de estômatos do tipo anomocíticos (ALMEIDA, 2010).

O indumento pode funcionar na proteção de estômatos ou mesofilo, contra o excesso de calor e ainda no isolamento e reflexão da luz. Os tricomas do tipo glandular, em geral estão associados ao armazenamento de metabolitos secundários, como óleos essenciais. (FRANCINO, 2006). Quatro tipos de tricomas foram identificados, distribuídos amplamente na lâmina foliolar, pecíolo e peciólulo de *E. velutina*, diferentemente de *E. cristagalli*, na qual foi relatada a ausência de tricomas, e de *E. falcata*, na qual registrou-se apenas o tipo glandular claviforme, encontrados principalmente sobre as nervuras da lâmina foliolar (ALMEIDA, 2010; SOSSELA, 2005).

O mesofilo do tipo dorsiventral observado em *Erythrina velutina*, também descrito para *E. falcata*, é considerado comum às espécies de Fabaceae, de acordo com Metcalfe e Chalk (1979). Entretanto, este caráter difere em *E. cristagalli* que possui mesofilo isobilateral,

descrito por Ferreira e Assumpção (1978). Por outro lado, a presença do parênquima paravenal, que é constituído de um único estrato celular entre o parênquima paliçádico e o esponjoso, é um carácter distintivo a subfamília Faboideae, já descrito em 52 espécies (KEVEKORDES *et al.*, 1988 apud TEXEIRA; GABRIELLI, 2006), sendo raro ou ausente em Caesalpinoideae e Mimosoideae (CURT; LERSTEN, 1995). De acordo com Francino (2006), o parênquima paravenal tem sido relacionado a uma maior eficiência no transporte lateral de água e podendo funcionar como tecido armazenador de substâncias. Devido ao fato das plantas de campos rupestres estarem sujeitas a escassez de água constantemente, como é o caso desta espécie, à presença de parênquima paravenal se torna pertinente.

A nervura principal demonstrou contorno biconvexo e organização vascular que corroboram com descrição para *E. velutina*, segundo Ventura *et al.*, (2006).

A morfologia do pecíolo tem considerável importância taxonômica, visto que sua estrutura parece ser pouco afetada pela variação dos fatores ambientais. Exibe contorno semicircular, padrão para o gênero *Erythrina* e uma considerável faixa de estrutura vascular, que pode estar correlacionada com o hábito da planta, composta de feixes separados e fortemente protegido por esclerênquima, já descrito por Metcalfe e Chalk (1979) como característica de Faboideae.

A presença de idioblastos com cristais estilóides ou romboédricos são comuns à família Fabaceae, e observados em abundância, especialmente acompanhando os feixes vasculares do pecíolo e peciólulo, em concordância a *E. falcata* (ALMEIDA, 2010). Entretanto, não foi registrado cristais dispersos no mesofilo, assim como foi reportado em *E. cristagalli* (SOSSELLA, 2005),

Revelou-se por teste histoquímico, a presença de bainha amilífera circundando o feixe vascular do peciólulo, reportado pela primeira vez em *Erythrina velutina*. Segundo Fahn (1979), a ocorrência de grãos de amido próximos aos feixes vasculares evidencia sua função de armazenamento e produção de energia para a planta, visto que, os tecidos constituintes dos feixes vasculares são responsáveis pelo trânsito de substâncias pela planta, e que a produção de cristais próximos da bainha, também é um processo celular com gasto energético.

Os estudos farmacológicos de *Erythrina velutina*, compreenderam primeiramente, a seleção dos extratos das cascas e folhas com melhor perfil farmacológico, a partir de uma triagem comportamental e da determinação da DL<sub>50</sub>. Em seguida, foram realizados testes específicos com ênfase na avaliação da atividade ansiolítica e/ou sedativa.

A Triagem representa uma estimativa preliminar das propriedades em nível do sistema nervoso central de um extrato ou composto puro, possibilitando o direcionamento do estudo. A DL<sub>50</sub>, dose única de uma substância capaz de causar 50% de mortalidade dos animais tratados, permite avaliar determinado extrato ou substância, quanto a sua toxicidade, possibilitando o estudo farmacológico de plantas, com uma certa margem de segurança (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006)

Com base nos resultados da triagem comportamental, todos os extratos testados apresentaram perfil farmacológico sugestivo de droga depressora do SNC. No entanto, o melhor comportamento foi demonstrado pela Fr.MeOH do extrato aquoso das folhas, a qual exibiu nas primeiras quatro horas de observação: ambulação diminuída, sedação, perda do reflexo auricular e corneal, ptose palpebral e resposta ao toque reduzida.

Segundo Almeida & Oliveira (2006), a ambulação diminuída é a forma mais comum de verificar se uma substância analisada apresenta efeito depressor do SNC, porém não se pode utilizar apenas esse parâmetro como classificação, por existirem drogas depressoras que promovem o efeito contrário, ou seja, aumento da ambulação. A sedação consiste no grau de depressão do SNC que se caracteriza por sonolência, relaxamento, serenidade e diminuição da atividade motora, sem perda da consciência. Já a redução do reflexo auricular pode indicar o comprometimento através da inibição de estruturas encefálicas que controlam essa atividade. No caso do reflexo corneal, a diminuição pode estar relacionada com a ação anestésica provocada pela droga. A ocorrência de ptose palpebral é descrita em algumas classes de drogas depressoras como neurolépticos e os analgésicos de ação central. E a resposta ao toque diminuída pode indicar um estágio elevado de depressão em consequência do tratamento farmacológico.

Para a determinação da DL<sub>50</sub>, são fixadas cinco doses crescentes que englobam uma dose que não provoca morte nos animais, três doses que causam a morte de 10 a 90% dos animais, e uma que mata 100% dos animais; objetivando a obtenção de doses seguras para a utilização nas metodologias experimentais (SÁ; ALMEIDA, 2006). Neste contexto, a DL<sub>50</sub> não pôde ser estimada os extratos testados, corroborando com os dados de Craveiro *et al.*, (2008), portanto foram estabelecidas as doses de análise: 125, 250 e 500 mg/kg i.p, escolhidas porque os efeitos depressores observados foram bem visíveis nestas doses.

Uma vez selecionada a Fr.MeOH das folhas para dar continuidade aos experimentos e determinadas suas doses terapêuticas, seguiu-se com a investigação do possível efeito ansiolítico desta fração. Para tanto, foram utilizados modelos experimentais com

camundongos, que permitiram reproduzir nos animais um estado semelhante à ansiedade no homem, medida pelos sinais exteriores, como a atividade exploratória e locomotora, que puderam ser avaliados por meio dos seguintes modelos experimentais: Teste do Campo Aberto, Labirinto em cruz elevado e o Teste da Placa Perfurada.

O diazepam utilizado nos testes supracitados como droga padrão trata-se de um benzodiazepínico, que exerce poderoso efeito sedativo e ansiolítico, a depender da dose administrada. Atua potencializando o efeito inibitório do ácido gama-amino-butírico (GABA), modulando a atividade dos receptores GABA-A, por meio de sua ligação com seu sítio específico (receptor benzodiazepínico ou ômega). Essa ligação altera a conformação desses receptores, aumentando a afinidade do GABA com seus próprios receptores e a frequência da abertura dos canais de cloreto, provocando hiperpolarização da célula. O resultado da hiperpolarização é um aumento da ação gabaérgica inibitória do sistema nervoso central (RANG *et al.*, 2003).

O teste do campo aberto foi inicialmente proposto por Hall em 1941, e utilizado para avaliação de compostos estimulantes ou depressores do SNC, permitindo observar como o animal se comporta em amplo ambiente, medindo o seu estado emocional e sua atividade exploratória. Neste modelo, a Fr.MeOH em todas as doses testadas reduziu significativamente a ambulação dos animais (Gráfico 1), assim como a atividade vertical (rearing) que corresponde ao número de vezes que o animal eleva as patas dianteiras ficando apoiado apenas sob suas patas posteriores, representado um comportamento exploratório (Gráfico 2). Segundo PRUT & BELZUNG (2003), o teste é conveniente para avaliar não apenas a atividade ansiolítica, mas também o efeito sedativo. Neste caso, um aumento da ambulação espontânea é considerado como um efeito estimulante, enquanto uma diminuição conjunta tanto da ambulação, quanto do rearing, estão relacionados à sedação. O diazepam foi capaz de aumentar a ambulação, fato que corrobora com seu efeito ansiolítico de referência, no entanto, promoveu a diminuição do rearing, efeito contrário ao esperado.

A auto-limpeza (Grooming) é um comportamento inato em roedores que geralmente ocorre em direção céfalo-caudal (BERRIDGE; FENTRESS; PARR, 1987). Muitos hormônios, como a prolactina, vasopressina e ocitocina, são liberados sob condições de estresse e estimulam esta atividade (DRAGO *et al.*, 1980; 1983). De acordo com KALUEFF & TUOHIMAA (2004), o grooming pode ser aumentado em duas situações opostas: baixo ou alto estresse. No baixo ou nenhum estresse, o grooming ocorre como uma manifestação espontânea geralmente de forma ininterrupta e relaxada, refletindo a transição do repouso para

a atividade. Já em situações de alto estresse, o grooming é executado de forma rápida e incompleta. A Fr. MeOH elevou o tempo desprendido para o grooming de forma significativa (Gráfico 3), estes resultados sugerem que a fração não apresenta efeito ansiolítico nas doses testadas, porém indicam resultados compatíveis com efeito sedativo/hipnótico.

A defecação representa um indicador do grau emocional dos animais. Neste contexto, a alta emocionalidade está relacionada com o aumento da quantidade de bolos fecais, enquanto que drogas ansiolíticas reduzem este parâmetro (ANGRINI; LESLIE; SHEPHARD, 1998). A Fr.MeOH reduziu significativamente a defecação (Gráfico 4) em todas as doses testadas, especialmente na dose de 250mg/kg, quando comparados ao controle. Contudo, este parâmetro não é suficiente para afirmar que a Fração apresenta efeito ansiolítico.

O labirinto em cruz elevado é um método validado e um dos principais modelos usados no estudo da ansiedade, baseia-se na atividade exploratória espontânea e na aversão natural do animal pelos braços abertos. Ao serem expostos pela primeira vez ao labirinto, ratos e camundongos demonstram comportamentos de exploração e de emocionalidade, com a apresentação de comportamentos de “congelamento”, defecação, micção etc. (PELLOW *et al.*, 1985). A causa da aversão aos braços abertos tem sido explicada por diferentes hipóteses. A princípio, propôs-se que essa aversão resultaria da esquiva natural que os roedores apresentam em relação ao ambiente novo (MONTGOMERY, 1955). Posteriormente, sugeriu-se que a aversão aos braços abertos resultaria do medo da altura (PELLOW, 1986) e/ou dos espaços abertos (BARNETT, 1975; PELLOW *et al.*, 1985). Treit & Fundytus (1989), no entanto, propuseram que a impossibilidade do animal realizar o comportamento de tigmotaxia, tendência de o animal permanecer com o corpo próximo ou em contato com superfícies verticais, seria o estímulo aversivo associado aos braços abertos do labirinto. Grossen & Kelly (1972), justificam esse comportamento como uma estratégia evoluída para evitar predadores, sobretudo os predadores aéreos. Em 1989, Morato & Castrechini sugeriram que a luminosidade nos braços abertos seria o fator aversivo aos braços abertos.

O número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos são usados como indicadores inversamente relacionados à ansiedade, ou seja, quanto mais intensa a exploração dos braços abertos, menor a ansiedade (PELLOW *et al.*, 1985). Neste teste, não houve alteração no número de entradas nos braços abertos (Gráfico 5A), no entanto, as doses de 125 e 500 mg/kg foram capazes de aumentar significativamente o tempo de permanência nos braços abertos (Gráfico 5B).

Como muitos compostos podem apresentar atividade sedativa ou estimulante, interferindo diretamente sobre a exploração dos braços do labirinto pelos animais, a frequência de entradas nos braços fechados é utilizada para avaliar a atividade locomotora (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994). Os tratamentos empregados no presente estudo reduziram significativamente a ambulação dos animais (Gráfico 6A). Por outro lado, apenas a dose de 500 mg/kg reduziu significativamente o tempo de permanência nos braços fechados (Gráfico 6B). Entretanto, um efeito ansiolítico só poderia ser considerado se houvesse a elevação do número de entradas nos braços abertos sem prejuízo da locomoção, tal como foi observado no grupo padrão (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994).

O diazepam como droga padrão de escolha, foi bastante eficaz em aumentar o tempo e o número de entradas nos braços abertos, além de reduzir o tempo de permanência nos braços fechados, sem alterar a frequência de entradas, confirmando a sensibilidade do modelo a drogas ansiolíticas.

Quando se deparam com um ambiente ou objeto estranho, os animais frequentemente apresentam padrões de comportamento exploratório como a locomoção em torno do ambiente novo e o hábito de cheirar novos objetos. A exploração fornece ao animal novas informações sobre fontes de alimentos, abrigos ou oportunidades de acasalamento. No entanto, ao entrar em contato com um ambiente ou estímulo novo, ele também se expõe ao risco de predação e outros perigos (BERLYNE, 1950, 1960; GLICKMAN; SROGES, 1966; WELKER, 1957). O teste da Placa Perfurada tem sido amplamente utilizado para avaliar a emotividade, ansiedade e/ou respostas ao estresse em animais submetidos ao ambiente estranho (RODRIGUEZ; BROITMAN; FOSCOLO, 1987).

De acordo com achados anteriores (TAKEDA *et al.*, 1998; LISTER, 1987), doses baixas de benzodiazepínicos (0,3 mg/kg de diazepam neste estudo) administrados em ratos, promoveram a elevação do comportamento de mergulhar a cabeça nos orifícios do aparato, refletindo um efeito ansiolítico, tal como foi observado no nosso experimento para o grupo padrão tratado com o Diazepam 0,5 mg/kg. No entanto, os animais tratados com a Fr.MeOH, exibiram uma diminuição significativa do número de mergulhos de forma dose-dependente (Gráfico 7) e a latência para o primeiro mergulho não foi alterada (Gráfico 8).

Em geral, os camundongos mostram estimulação locomotora em resposta a baixas doses de benzodiazepínicos (CRABBE *et al.*, 1998; LISTER, 1990; IMAIZUMI *et al.*, 1994). De forma contrária ao grupo padrão, todas as doses foram capazes de diminuir significativamente a ambulação dos animais (Gráfico 9), fato que somado a redução do

número de mergulhos, corrobora com a hipótese de que a fração metanólica não apresenta efeito ansiolítico nas doses testadas. Os camundongos do grupo teste também apresentaram uma postura típica de imobilidade em todas as doses (Gráfico 10), o que justifica a redução da ambulação e fortalece a teoria de um efeito sedativo.

Em resumo, os resultados obtidos nos modelos testados com a Fr. MeOH do extrato aquoso das folhas demonstraram um potencial efeito sedativo de forma dose-dependente, dados estes que corroboram os resultados obtidos por DANTAS *et al.*, (2004). A ação depressora do sistema nervoso central pode ser explicada, uma vez que houve diminuição do número de mergulhos com prejuízo da atividade locomotora espontânea e vertical (rearing), reforçados pelo aumento do tempo de imobilidade do animal, parâmetros observados claramente nos testes do campo aberto e placa perfurada. Outras evidências que corroboram com a ausência da atividade ansiolítica para as doses testadas são a elevação do tempo de grooming e os resultados do teste do labirinto em cruz elevado, uma vez que não houve alteração no número de entradas nos braços abertos, associado a uma redução da ambulação, representada pelo número de entradas nos braços fechados.

A ausência de efeito ansiolítico para a Fr. MeOH corrobora dados anteriores onde foi constatado que mesmo usando-se doses variando de 200-800 mg/kg o extrato hidroalcoólico das cascas da planta não alterou as medidas de ansiedade quando comparados com o grupo controle (VASCONCELOS *et al.*, 2004), dados semelhantes também foram encontrados para o extrato aquoso das folhas de *Erythrina speciosa* (LOLLATO; SCARMINIO; MOREIRA, 2010). Entretanto, um estudo realizado por Teixeira-Silva *et al.*, (2008), com o extrato alcoólico das folhas em roedores, verificou atividade ansiolítica na dose de 20 mg/kg. Portanto, não se pode desconsiderar um efeito ansiolítico para a Fr. MeOH, o que provavelmente poderá ser evidenciado em doses mais baixas.

Neste sentido, buscou-se caracterizar quimicamente a Fr.MeOH com o intuito de compreender os efeitos farmacológicos de *Erythrina velutina*. Para tanto, foi realizada inicialmente, uma prospecção fitoquímica, que evidenciou pelas reações qualitativas, a presença de alcalóides, taninos, flavonóides, esteróides e terpenóides. Os mesmos testes foram aplicados para o EAf, que apresentou resultado semelhante, exceto para a presença de alcalóides, o que pode ser explicado, pelo fato de se tratar de um extrato bruto que contém inúmeras substâncias, provavelmente em maior quantidade, que podem ter mascarado este grupo químico, ocasionando um resultado negativo. Além disso, os perfis cromatográficos comparativos das Frações (Ver Figuras 17, 18 e 19) realizados por CLAE, indicaram que

houve uma visível separação dos constituintes químicos de acordo com a natureza da fase móvel, corroborando com a hipótese acima.

O resultado do fracionamento com a resina Amberlite® XAD® -2 aplicada para a obtenção da Fr.MeOH foi bastante significativo, permitindo a retenção dos constituintes mais hidrofóbicos. Esta resina tem sido amplamente utilizada para a adsorção de compostos orgânicos solúveis em meio aquoso e solventes orgânicos (GUERRINI *et al.*, 2009; IURLINA *et al.*, 2009; CHALAPATHI *et al.*, 2010). As substâncias hidrofílicas (mais polares) contidas no Extrato Aquoso das folhas, não foram adsorvidas pelos poros da resina, portanto eluíram primeiro. Enquanto que as substâncias hidrofóbicas (menos polares) foram adsorvidas pela superfície hidrofóbica da resina XAD-2 por forças de Van der Waals e em seguida, facilmente eluídas por metanol, solvente orgânico que se mostrou bastante adequado para este fim. Segundo Thurman & Mills (1998), os sorventes poliméricos possuem consideravelmente, uma maior capacidade no isolamento de substâncias polares do que a maioria das fases C-18 hidrofóbicas. Esta capacidade aumentada é muito importante quando baixos limites de detecção são requeridos. Outra vantagem dos sorventes poliméricos sobre os sorventes baseados em sílica é a sua tolerância a valores de pH altos e baixos, o que permite melhorar a adsorção de um composto alterando o seu balanço hidrofílico/hidrofóbico.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC- High Performance Liquid Chromatography) emprega colunas empacotadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões. Possui a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006). A partir do isolamento por CLAE e das análises espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foi possível sugerir que EV2 trata-se de um alcalóide eritrínico e que EV1 e EV3 provavelmente também seriam alcalóides, já que foram positivos para o teste de Dragendorff, no entanto será necessário isolar estes constituintes em maiores quantidades para a análise espectroscópica que permitirá a sua identificação inequívoca. Garín-Aguilar *et al.*, (2005), utilizando HPLC-MS mostraram que a fração de alcalóides livres em metanol de sementes de *Erythrina herbacea*, apresentou os alcalóides erisovina e erisodina com tempos de retenção 15.20 min e 15.68 min respectivamente, corroborando com o resultado encontrado para *Erythrina velutina* no presente estudo.

A baixa produção destes alcalóides pela espécie pode envolver diferentes fatores, tais como época de coleta, tipo de solo e parte da planta utilizada para armazenamento dos alcalóides. Esta última possibilidade é a mais provável, considerando que já foram isolados alcalóides das sementes e cascas desta espécie (FOLKERS; SHAVEL, 1942; AMER; SHAMMA; FREYER, 1991; OZAWA *et al.*, 2009; CABRAL, 2009).

Pesquisas tem demonstrado que os alcalóides presentes nas espécies de *Erythrina*, são responsáveis pelo efeito ansiolítico/sedativo registrado em animais em modelos experimentais. Decker *et al.*, (1995), constatou que erisodina é um potente e seletivo bloqueador da acetilcolina nos receptores nicotínicos neuronais, produzindo efeito ansiolítico. Flausino-Júnior *et al.*, (2007), propuseram que os alcalóides eritravina e (+)-11- $\alpha$ -hidroxi-eritravina são responsáveis pelo efeito ansiolítico do extrato bruto da inflorescência de *E.mulungu* (*E. verna*). O alcalóide indólico hipaforina isolado de sementes de *E. velutina*, se mostrou eficaz como agente indutor do sono por uma hora após a administração, sem demonstrar efeitos adversos em animais (OZAWA *et al.*, 2008). Segundo os mesmos autores, a hipaforina é um derivado do L-triptofano, precursor da serotonina (5-HT), que por sua vez forma a melatonina, um neuro-hormônio que tem como principal função a regulação do sono.

Tem sido relatado que os alcalóides presentes em diversas espécies de *Erythrina* afetam a neurotransmissão gabaérgica (BERNARD *et al.*, 1985; CARVALHO *et al.*, 2009) Esta teoria é válida, se considerarmos que os benzodiazepínicos agem sobre os receptores GABA A, e geralmente produzem perturbações motoras, ou seja, doses altas a moderadas podem prejudicar a locomoção, e a Fr.MeOH de *E. velutina*, alterou o comportamento locomotor, observados claramente nos testes do Campo Aberto e Placa Perfurada. Contudo seria necessário a realização de novos testes para elucidar o mecanismo de ação dos alcalóides eritrínicos, testando-os isoladamente.

# Conclusões

## 6 CONCLUSÕES

Diante da análise dos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- O estudo farmacobotânico evidenciou a presença de parâmetros distintivos para *Erythrina velutina*, facilmente identificáveis, de grande importância ao seu controle de qualidade, em relação às outras espécies do gênero, fornecendo fortes evidências morfo-anatômicas, distintivas, que poderão contribuir para seu diagnóstico e evitar que a droga seja objeto de falsificações e equívocos de identificação.
- A Fração Metanólica do Extrato Aquoso das folhas apresentou características de drogas com perfil sedativo, evidenciadas no teste do campo aberto. No entanto, nos testes do labirinto em cruz elevado e placa perfurada, revelaram resultados que não a correlaciona a um perfil de droga ansiolítica nas doses e vias testadas. Além disso, podemos considerar que a espécie demonstrou uma baixa toxicidade, baseado na observação durante a triagem farmacológica comportamental e nas 72 horas subsequentes;
- O estudo químico da Fração Metanólica das folhas, apontou a presença de alcalóides tetracíclicos do tipo eritrina que provavelmente são os responsáveis pelo efeito sedativo observado nos testes farmacológicos do presente estudo, no entanto, o mecanismo de ação ainda não está elucidado.

# Bibliografia

## 7 BIBLIOGRAFIA

AGRA, M. F; LOCATELLI, E; ROCHA, E. A; BARACHO, G. S; FORMIGA, S. C. 1996. Plantas medicinais dos Cariris Velhos, Paraíba. Parte II: subclasses Magnoliidae, Caryophyllidae, Dilleniidae e Rosidae. **Revista Brasileira de Farmácia**, 77(3): 97-102. 1996.

ALMEIDA, E. E. Caracterização farmacognóstica da espécie *Erythrina falcata* Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2010.

ALMEIDA, R. N; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem Farmacológica Comportamental. In: **Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos**, cap. 11. p. 131-132. Ed. Guanabara Koogan, 2006.

AMER, M. A; SHAMMA, M.; FREYER, A. J. The tetracyclic *Erythrina* alkaloids. **Journal of Natural Products**, v.54, n.2, p. 329-363, 1991.

ANDREATINI, R; BOERNGEN-LACERDA, R; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.23 (4),p.233-242, 2001.

ANGRINI, M; LESLIE, J. C; SHEPHARD, R. A. Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine and chlordiazepoxide on open-field behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 59, p. 387-397, 1998.

ARAÚJO, M. G. P; MENDONÇA, M. S. Escleromorfismo Foliar de *Aldina heterophylla* SPRUCE EX BENTH (LEGUMINOSAE: PAPILIONOIDEAE) em três campinas da Amazônia central. **Acta Amazonica**, 28(4): 353-371. 1998.

ATINDEHOU, K. K; QUEIROZ, E. F; TERREAUX, C; TRAORE, D; HOSTETTMANN, K. Three new prenylated isoflavonoids from the root bark of *Erythrina vogelii*. **Planta Medica**, v. 68, p. 181-183, 2002.

BARNETT, S. A. **The rat: A study in behavior**. Chicago: University of Chicago Press. 1975.

BERLYNE, D. E. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behavior. **British Journal of Psychology**, 41:68–80. 1950.

BERLYNE, D. E; MCGRAW H. Conflict, Arousal and Curiosity. New York . **British Journal of Psychology**, 350 pg. 1960.

BERLYN, G. P; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**, Ames (Iowa): The Yowa State University, 1976.

BERNARD, P. S; BENNETT, D. A; PASTOR, G; YOKOYAMA, N; LIEBMAN, J. M. Cgs-9896—agonist-antagonist benzodiazepine receptor activity revealed by anxiolytic, anticonvulsant and muscle-relaxation assessment in rodents. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 235, 98–105. 1985.

BERRIDGE, K.C., FENTRESS, J.C., PARR, H. Natural syntax rules control action sequence of rats. **Behavioural Brain Research**, 23, 59– 68. 1987.

BORTOLUZZI, R. L. C; CARVALHO-OKANO, R. M; GARCIA, F. C. P; TOZZI, A. M. G. A. Leguminosae, Papilionoideae no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. II: árvores e arbustos escandentes. **Acta Botânica Brasileira**, 18(1): 49-71. 2004

BRESOLIN, T. M. B; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Ed. Univale. Itajaí – SC, 2003.

BRUMMITT, R. K.; POWEL, C. E. **Authors of Plant Names**. Royal Botanic Gardens, Kew, 1992.

CABRAL, A. G. S. **Constituintes Químicos de *Erythrina velutina* Willd. (FABACEAE)**. [Dissertação]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 175p. Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Centro de Ciências da Saúde. 2009.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 33: 179-189. 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, 100: 131-134. 2005.

CARVALHO, P. E. R. **Embrapa Florestas**. Circular Técnica. Colombo, PR, 2008.

CARVALHO, A. C. C. S; ALMEIDA, D. S; MELO, M. G. D; CAVALCANTI, S. C. H; MARÇAL, R. M. Evidence of the mechanism of action of *Erythrina vellutina* Willd (Fabaceae) leaves aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacol**, 122: 374-378. 2009.

CECHINEL-FILHO, V; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, 21(1) 99. (1998).

CHALAPATHI, K; RAMESH, B. L. MADHU, P; C; MADDIAH, G. P. 2-Mercaptobenzimidazole Immobilized with Amberlite Xad-2 Using as Solid Phase Extractor for the Determination of Fe(II), Cu(II), and Cd(II) in Sewage and Waste Water Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Advances in Applied Science Research**, 1 (2): 27-35. 2010.

CORNELIUS, W. W; T AKENG'A, E; OBIERO, G. O; LUTTA, K. P. Antifeedant Activities of the Erythrinaline Alkaloids from *Erythrina latissima* against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera noctuidae). **Records of Natural Products**, 3:2. 96-103.2009.

CRABBE, J. C; GALLAHER, E. J; CROSS, S. J; BELKNAP, J. K. Genetic determinants of sensitivity to diazepam in inbred mice. **Behavioral Neuroscience**, 112:668–77. 1998.

CRAVEIRO, A. C. S. CARVALHO, D. M. M; NUNES, R. S; FAKHOURI, R; RODRIGUES, S.A; SILVA, F. T. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 18 (Supl.): 739-743, 2008.

CRUZ, A. P. M; FREI, F; GRAEFF, F. G. Etnopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49 (1), p. 171- 176. 1994.

CURT, L. B; LERTEN, N. R. Paraveinal mesophyll: Review and survey of the subtribe *Erythrinae* (*Phaseoleae*, *Papilionoideae*, *Leguminosae*). **Plant Systematics and Evolution**, 196: 31-62. 1995.

CUTTER, E. G. *Anatomia Vegetal. Parte I. Células e Tecidos*. 2 ed. São Paulo: Roca. 304p. 1986.

DA-CUNHA, E. V. L; DIAS, C; BARBOSA-FILHO, J. M; GRAY, A. I. Eryvellutinone, na isoflavanone from the stem bark of *Erythrina vellutina*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, pp.1371-1373, 1996.

DANTAS, M. C; OLIVEIRA, F. S; BANDEIRA, S. M, BATISTA, J. S; SILVA, C.D; ALVES, P.B. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, 94:129-33. 2004.

D'ARCY, B. A. **Antioxidants in Australian Floral Honeys** –Identification of health enhancing nutrient components. Rural Industries Research and Development Corporation, 2005. Disponível em: <https://rirdc.infoservices.com.au/items/05-040>. Acesso em: 24.01.2011.

DECKER, M. W; ANDERSON, D. J; BRIONI, D. L; DONELLY-ROBERTS, D. L; CHAE, K. H; O'NEILL, A. B; PIATTONI-KAPLAN, M; SWANSON, S; SULLIVAN, J. P. Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 280, p. 79-89, 1995.

DESHPANDE, V.H.; ENDSE, A. D.; PENDSE, R. Erythrinins A, B & C, tree new isoflavones from the bark of *Erythrina variegata*. **Indian Journal of Chemistry**, p. 205, 1977.

DRAGO, F., CANONICO, P. L., BITETTI, R., SCAPAGNINI, U. Systemic and intraventricular prolactin induces excessive grooming. **Journal of Pharmacology**, 65, 457–458. 1980.

DRAGO, F; BOHUS, B; GISPEN, W.H; SCAPAGNINI, U; WIED, D. Prolactin-enhanced grooming behavior: interaction with ACTH. **Brain Research**, 263, 277– 282.1983

EAMES, A. J; MacDANIELS, L. H. **An introduction to Plant Anatomy**. Second Edition. International Student Edition. New York: McGraw-Hill, 1947.

EMPERAIRE, L. **La Caatinga du sud-est du Piauí (Brésil): Étude Ethnobotanique**. Éd. Recherche sur les civilisations, Paris. 135p. 1983.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS - EPAMIG. O Gênero *Erythrina* L. no PAMG - Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Belo Horizonte. **Revista Daphne**, 3: 20-25. 1993.

ESTRADA, E. I; MORALES, R. T; SOTO-HERNÁNDEZ, M; VÁZQUEZ, M. M; MATEOS, R. G; MIGUEL-CHÁVEZ, R. S. Actividad antimicótica *in vitro* de erisovina. **Revista Fitotecnia Mexicana**, Vol. 32 (4): 327 - 330, 2009.

FAHN, A. **Secretory Tissues in Plants**. London: Academic Press Inc. 1979

FERREIRA, M. B; ASSUMPCÃO, W. R. C. **Leguminosae em Minas Gerais – II O gênero *Erythrina***. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 28, Belo Horizonte, 1978. Anais SBB, Belo Horizonte, 1978.

FERRERES, F.; ORTIZ, A.; SILVA, C.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; TOMÁS-LORENTE, F. Flavonoids of “La Alcarria” honey – a study of their botanical origin. **Zeitschrift-fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, 194, 139-143. 1992.

FLAUSINO-JÚNIOR, O; SANTOS, L. A; VERLI, H; PEREIRA, A. M; BOLZANI, V. S; NUNES-SOUZA, R. L. Anxiolytic effects of Erythrinian alkaloids from *Erythrina mulungu*. **Journal of Natural Products**, 70: 48-53. 2007.

FOLKERS, K; MAJOR, R. T. Isolation of erythroidine, an alkaloid of curare action, from *Erythrina Americana* Mill. **Journal of the American Chemical Society**, v. 59, p. 1580, 1937.

FOLKERS, K; SHAVEL, JR. J. *Erythrina* Alkaloids XII Chromatographic Analysis of Erysodine, Erysovine and Erysocine and Technique for Preparative Isolation. **Journal of the American Chemical Society**, n. 64, p. 1892, 1942.

FORMAN, L; BRIDSON, D. The Herbarium Handbook. Royal Botanic Gardens, Kew. Great Britanic. 214 p. 1989.

FRANCINO, D. M. T. **Anatomia Foliar de Espécies de *Chamaecrista* Moench. (Leguminosae/ Caesalpinioideae) ocorrentes em campo rupestre.** Dissertação. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. 2006.

GARÍN-AGUILAR, M. E; DEL TORO, G. V; SOTO-HERNÁNDEZ, M; KITE, G. High-performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometric Analysis of Alkaloids Extracted from Seeds of *Erythrina herbacea*. **Phytochemical Analysis**, 16, 302–306, 2005.

GLICKMAN, S. E; SROGES, R.W. Curiosity in zoo animals. **Behavior Processes**, 26:151–188. 1966.

GROSSEN, N. E., & KELLY, M. J. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 81, 307-310. 1972.

GUERRINI, A. BRUNI R; MAIETTI, S; POLI F; ROSSI, D; PAGANETTO, G; MUZZOLI, M; SCALVENZI, L; SACCHETTI, G. A. Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. **Food Chemistry**, 114, 1413–1420. (2009).

GUNN, C. R. Seed topography in the Fabaceae. Seed **Science and Technology**, Zürich, v.9, n.3, p.737-757, 1981.

HALL, C. S. **Psychological Bulletin**, 38, p.909. 1941.

HICKEY, M.; KING, C. **100 families of flowering plants**. Cambridge: University Press, p.196-199, 1981.

IMAIZUMI, M; SUZUKI, T; MACHIDA, H; ONODERA, K. A fully automated apparatus for a light/dark test measuring anxiolytic or anxiogenic effects of drugs in mice. **Japanese Journal of Psychopharmacology**, 14:83–91. 1994.

IURLINA, M. O; SAIZ, A. I; FRITZ, R; MANRIQUE, G. D. Major flavonoids of Argentinean honeys. Optimisation of the extraction method and analysis of their content in relationship to the geographical source of honeys. **Food Chemistry**, 115, 1141–1149. 2009.

JARDIM, I. C. S. F; COLLINS, C. H; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: **Fundamentos de Cromatografia**. Ed. Unicamp, 2006.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: W. H. Freeman & Co. 408 p., 1962.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York, McGraw-Hill, 523 p, 1940.

KALUEFF, A. V; TUOHIMAA, P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. **Brain Research Protocols**, 13, 151– 158. 2004.

KEVEKORDES, K. G; MCCULLY, M. E. & CANNY, M. J. 1988. The occurrence of an extended bundle sheath system (paraveinal mesophyll) in the legumes. *Canadian Journal of Botany* 66: 94-100, Apud: TEIXEIRA, S. P; GABRIELLI, A. C. Taxonomic value of foliar characters in *Dahlstedtia* Malme - Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae. **Acta Botanica Brasilica**, 20(2): 395-403. 2006.

LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. Kew: Royal Botanic Gardens. 369 p. 1987.

LIANDA, R. L. P; CASTRO, R. N. Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis mellifera*. **Química Nova**, Vol. 31, No. 6, 1472-1475, 2008.

LISTER, R. G. Interaction of Ro 15-4513 with diazepam, sodium pentobarbital and ethanol in a hole-board test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 28:75-9. 1987.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, 46:321-40. 1990.

LOLLATO, G; SCARMINIO, I. S; MOREIRA, E. G. Behavioral effects of aqueous and dichloromethane extracts of *Erythrina speciosa* Andrews, Fabaceae, leaves in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20(6): 939-944, 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileira**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo:Plantarium, 382p.1992.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 2002.

MARTINS-DA-SILVA, R. C. V. **Coleta e Identificação de Espécimes Botânicos**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Belém - PA, 2002.

MARTOS, I; COSSENTINI, M; FERRERES, F; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n8, p.2824-2829, 1997.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2a ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MENEZES, E. M. de. *Arachis prostrata* Benth. (Leguminosae Papilionoideae). Anatomia dos órgãos vegetativos. **Revista Rodriguesia**, v. 37, n. 63, p. 49-56, Rio de Janeiro Julho-Dez 1985.

METCALFE, C.R. & L. CHALK “**Anatomy of the dicotyledons**”. 2ª ed. Vol. I. Clarendon Press, Oxford. 1979.

MONTGOMERY, K. C. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploration behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, V.48, p. 181. 1955.

MORATO, S; CASTRECHINI, P. Effects of floor and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 22, 707-710. 1989.

NAKANISHI, K. Recent studies on bioactive compounds from plants. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 1, p. 15-26, 1982.

NEILL, A. D. Experimental studies on species relationships in *Erythrina* (Leguminosae: Papilionoideae). **Missouri Botanical Garden**, 75: 886-969. 1988.

NIERO, R; MALHEIROS, A; BITTENCOURT, C. M. S; BIAVATTI, M. W; LEITE, S. N; CECHINEL-FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. Capítulo 1, p28. IN: BRESOLIN, T. M. B; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Ed. Univale. Itajaí – SC, 2003.

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, Vol. 70, No. 3, 2007.

NKENGFAK, A. E; VOUFFO, T. W; FOMUM, Z. T; MEYER, M; BERGENDORFF, O; STERNER, O. Prenylated isoflavanone from the roots of *Erythrina sigmoidea*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 4, p. 1047 – 1051, 1994.

NKENGFAK, A. E; WAFFO, A. K; AZEBAZE, G. A; FOMUM, Z. T; MEYER, M; BODO, B; HEERDEN, F. R. Indicanine A, a new 3-phenylcoumarin from root bark of *Erythrina indica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 6, p. 855-856, 2000.

ONUSIC, G.M; NOGUEIRA, R. L; PEREIRA, A. M. S; VIANA, M. B. Effect of acute treatment with a water-alcohol extract of *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 35: 473-477, 2002.

OZAWA, M; HONDA, K; NAKAI, I; KISHIDA, A; OHSAKI, A. Hypaphorine, an indole alkaloid from *Erythrina velutina*, induced sleep on normal mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 18: 3992-3994. 2008.

OZAWA, M; ETOH, T; MASAHIKO, H; KOMIYAMA, K; KISHIDA, A; OHSAKI, A. TRAIL enhancing activity of Erythrinan alkaloids from *Erythrina velutina*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 19: 234-236. 2009.

PELLOW, S; CHOPIN, P; FILE, S. E; BRILEY, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, 14, 149-167. 1985.

PELLOW, S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects in a novel test of anxiety: A exploratory model of anxiety in rodents valid? Methods and Findings in **Experimental Clinical Pharmacology**, 8, 557-565. 1986.

PRUT, L; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3-33, 2003.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 467 p. 2009.

RABELO, L. A; AGRA, M. F; DA-CUNHA, E. V. L; SILVA, M. S; BARBOSA-FILHO, J. M. Homohesperetin and phaseollidin from *Erythrina velutina*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 5, p. 543-544, 2001.

RANG, H.P; DALE, M. M; RITTER, J. M; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5 ed. Elsevier. Londres, 2003.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. vol.39: 603-613. 2001.

RAUPP, I. F. M. **Efeito ansiolítico da administração prolongada do extrato de *Erythrina velutina* no labirinto em cruz elevado**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

REDEFITO: **estratégias de desenvolvimento para o país**. Disponível em: <http://www2.far.fiocruz.br/redesfito/v2/>. Acesso em: 10.09. 2009.

RIBEIRO, M.D; ONUSIC, G. M; POLTRONIERI, S. C; VIANA, M. B. Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 2006.

RODRIGUES, M. V. N; REHDER, V. L. C; SARTORATTO, A; JUNIOR, S. B; SANTOS, A. S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Multiciência**. 2006.

RODRIGUEZ, E. E. L; BROITMAN, S. T; FOSCOLO, M. R. Effects of the chronic ingestion of chlorimipramine and desipramine on the hole board response to acute stresses in male rats. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, 26:207–10. 1987.

ROGER, K. L; GRICE, I. D; GRIFFITHS, L. R. Modulation of in vitro platelet 5-HT release by species of *Erythrina* and *Cymbopogon*. **Life Sciences**, 69: 1817 – 1829. 2001.

ROHM & HAAS, C. **Amberlite XAD-2 Polymeric Adsorbent**: Product Specification. © Sigma-Aldrich Co. Supelco. 1997.

SÁ, R. C. S; ALMEIDA, R. N. Toxicidade Aguda. In: **Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos**. Ed. Guanabara Koogan, cap. 10. p. 128. 2006.

SCHRIRE, B. D; LEWIS, G. P; LAVIN, M. 2005b. Biogeography of the Leguminosae. IN: QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

SILVA, K. B; ALVES, B. U; BRUNO, R. L.A; MATOS, V.P; GONÇALVES, E. D. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas de *Erythrina velutina* Willd., Leguminosaeae – Papilionideae. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 30, nº 3, p. 104-114, 2008.

SINGH, H.; CHAWLA, A. S.; KAPOOR, V. K.; KUMAR, N. Investigation of *Erythrina* spp. IX. Chemical constituents in *Erythrina stricta* bark. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 5, p. 526-529, 1981.

SOSSELLA, A. G. **Potencialidade ornamental e paisagística, caracterização morfo-anatômica e propagação de *Erythrina cristagalli* L.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, 2005.

SOTO-HERNANDEZ, M.; JACKSON, A. H. Studies of alkaloids in foliage of *Erythrina berteriana* and *Erythrina poeppigiana*: Detection of beta-erythroidine in goats milk. **Phytochemical Analysis**, v. 4, p. 97-9, 1993.

SVENDSEN, A. B; VERPOORTE, R. Chromatography of Alkaloids. New York: **Elsevier Scientific Publishing Company**. 1983.

TAKEDA, H; TSUJI, M; MATSUMIYA, T. **European Journal of Pharmacology**, 350(1), p. 21. 1998. IN: BRESOLIN, T. M. B; CECHINEL, V. F. Ciências Farmacêuticas Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos. 239 p. Itajaí: UNIVALI, 2003.

TEIXEIRA-SILVA, F; SANTOS, F. N; SARASQUETA, D. F. O; ALVES, M. F. S; NETO ARAÚJO, V; PAULA, I. C. M; ESTEVAM, C. S; ANTONIOLLI, A. R; MARCHIORO, M. Benzodiazepine-like effects of the alcohol extract from *Erythrina velutina* leaves: Memory, anxiety, and epilepsy. **Pharmaceutical Biology**, 46(5): 321-328. 2008.

TELIKEPALLI, H.; GOLLAPUDI, S. R; KESHAVARZ-SHOKRI, A; VELAZQUEZ, L; SANDAMANN, R.A; VELIZ, E. A; JAGANNADHA RAO, K.V; MADHAVI, A.S.; MITSCHER, L.A. Isoflavonoids and a cinnamyl phenol from root extracts of *Erythrina variegata*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 2005-2007, 1990.

THURMAN, E. M; MILLS, M. S. Solid-phase Extraction: principles and practice. Chemical Analytical, **Wiley-interscience publication**, v. 147, 1998.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A; BLAQUEZ, M. A; GARCIA-VIGUERA, C; FERRERES, F; TOMÁS-LORENT, F. A comparative study of different amberlite XAD resins in flavonoid analysis. **Phytochemistry Analysis**, v.3, p. 178-181, 1992.

TREIT, D; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 31, 959-962. 1989.

TSUDA, Y; SANO, T. **The Alkaloids**. Chapter 4: *Erythrina* and Related Alkaloids, v. 48, p. 249-337, 1996.

UNANDER, D. W; WEBSTER, G. L; BLUMBERG, B. S. **Journal of Ethnopharmacology**, 45, 1. 1995.

VASCONCELOS, S. M; REBOUÇAS OLIVEIRA, G; MOHANA DE CARVALHO, M.; RODRIGUES, A. C. P; ROCHA SILVEIRA, E; MARIA FRANÇA FONTELES, M.; FLORENÇO SOUSA, F. C; BARROS VIANA, G. S. Antinociceptive activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.7, p. 946 -949, 2003.

VASCONCELOS, S. M; MACEDO, D. S; DE MELO, C. T; PAIVA, M. A; RODRIGUES A. C; SILVEIRA, E. R; CUNHA, G. M; SOUSA, F. C; VIANA, G. S. Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 56(3):389-93. 2004.

VASCONCELOS, S. M; LIMA, N. M; SALES, G. T. M; CUNHA, G. M. A; AGUIAR, L. M. V; SILVEIRA, E. R; RODRIGUES, A. C. P; MACEDO, D. S; FONTELES, M. M. F; SOUSA F. C. F; VIANA, G. S. B. Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. **Journal of Ethnopharmacology**, 110 (2): 271-274. 2007.

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18: 308-313. 2008.

VENTURA, S. J; MENINO, G. C. O; JESUS, F. M; SIMÕES, M. O. M; RIBEIRO, L. M. **Anatomia Foliar de *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae/Papilionoideae)**. In: 57º Congresso Nacional de Botânica, 2006, Gramado. Anais do 57º Congresso Nacional de Botânica, 2006.

VIRTUOSO, S; DAVET, A; DIAS, J. F. G; CUNICO, M. M; MIGUEL, M. D; OLIVEIRA, A. B; MIGUEL, O. G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15(2): 137-142, 2005.

WELKER, W. I. "Free" versus "forced" exploration of a novel situation by rats. **Psychological Reports**, 3:95-108. 1957.

WILKINSON, H. P. The plant surface. In: METCALFE, C. R.; CHALK, L. (Eds.) **Anatomy of the Dicotyledons**. - Systematic Anatomy of the leaf and stem. Oxford: Clarendon Press, 1979. v.1. p. 97-165.

## ANEXO

Protocolo experimental da Triagem Farmacológica Comportamental

Substância: \_\_\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ Via: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Horário: \_\_\_\_\_ Animal / Sexo / Idade: \_\_\_\_\_  
 Resp. pela administração: \_\_\_\_\_ Resp. pela observação: \_\_\_\_\_

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos				
	(0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30'	1h	2h	3h	4h
<b>1 - SNC</b>					
<b>a - Estimulante</b>					
Agressividade					
Ambulação aumentada					
Ander em círculo					
Autolimpieza					
Bocejo					
Contorções abdominais					
Convulsões					
Escalar					
Estereotípia					
Irritabilidade					
Levantar					
Movimentação intensa das vibrissas					
Podalar					
Sacudir a cabeça					
Saltos					
Tremores					
Vocalização					
<b>b - Depressora</b>					
Abandono das patas do trem posterior					
Ambulação diminuída					
Analgesia					
Anestesia					
Anxia					
Catatonía					
Cauda de Strub					
Hipnose					
Perda do reflexo miociliar					
Perda do reflexo corneal					
Prose palpebral					
Reflexo do estreitamento					
Resposta ao toque diminuída					
Sedação					
<b>2 - SNA</b>					
Constipação					
Defecação					
Diarreia					
Micção					
Lacrimagem					
Salivação					
Respiração					
Cinose					
Piloereção					
Força para agarrar					
Tonus muscular					
<b>3 - Morte</b>					