

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

"Análise fitoquímica e estudo biomonitorado da atividade
ansiolítica de *Erythrina mulungu* (Leguminosae -
Papilionaceae) em camundongos submetidos a diferentes
modelos animais de ansiedade."

Otavio A. Flausino Jr

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
USP, como parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências, Área de Psicobiologia.

Ribeirão Preto

- 2006 -

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

"Análise fitoquímica e estudo biomonitorado da atividade
ansiolítica de *Erythrina mulungu* (Leguminosae -
Papilionaceae) em camundongos submetidos a diferentes
modelos animais de ansiedade."

Otavio A. Flausino Jr

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
USP, como parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências, Área de Psicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luis Nunes de Souza

Ribeirão Preto

- 2006 -

FICHA CATALOGRÁFICA

Flausino Jr, Otavio Aparecido

Análise fitoquímica e estudo biomonitorado da atividade ansiolítica de *Erythrina mulungu* (Leguminosae - Papilionaceae) em camundongos submetidos a diferentes modelos animais de ansiedade. Ribeirão Preto, 2006

83 p.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Nunes-de-Souza, Ricardo Luis.

1. Fitoterápicos. 2. *Erythrina mulungu*. 3. Alcalóides. 4. Ansiedade. 5. Modelos animais

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, por ter aceitado a me orientar neste projeto. Sem a sua intervenção crítica e orientação estratégica das etapas a serem cumpridas este trabalho não teria rendido tão bons resultados.

À Prof.^a Dr.^a Vanderlan da Silva Bolzani, pela supervisão da etapa fitoquímica e por ter me ensinado a trabalhar em colaboração com a indústria farmacêutica.

À Prof.^a Dr.^a Milena de Barros Viana, por ter me orientado oficialmente junto à seção de pós-graduação durante o primeiro ano de doutoramento e por ter aceitado que este trabalho se desenvolvesse a partir de resultados obtidos anteriormente em seu laboratório.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) por ter permitido meu acesso às dependências do Laboratório de Farmacologia, onde foram realizados os testes biológicos do presente trabalho.

Ao Instituto de Química de Araraquara (UNESP) por ter permitido meu acesso às dependências do Departamento de Química Orgânica, onde foi desenvolvido o estudo fitoquímico do presente trabalho.

Às técnicas do Laboratório de Farmacologia, Elizabete e Rosana, pelo apoio técnico, imprescindível para o bom andamento do meu trabalho e por terem me ensinado a rotina de funcionamento do laboratório. E principalmente, pela amigável companhia durante os dias de trabalho e nas confraternizações de fim de ano.

Aos técnicos do Laboratório de Química Orgânica, Alberto Alécio e Hélia, pelo apoio técnico, sem o qual não teria resolvido muitos dos problemas

encontrados e por terem me ensinado muitas das técnicas utilizadas em estudos fitoquímicos. Agradeço também, pela amizade, pela preocupação com meu bem estar e pela cordialidade.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia, Eduardo, Karina, Alianda, Tarciso, Carol, Fábio, Marcelo, Chico, Cacá e Cléo, pelas agradáveis conversas durante os momentos de descontração, happy-hours e festas.

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica, Débora, Luciana, Andréia (Déinha), Cláudio, Pancada, Geraldo, Ângela, Maísa, Adriana, Mariana, Luís Otávio, Hosana, pelos agradáveis momentos de descontração durante as horas árduas de trabalho e pelas dicas importantíssimas durante a execução do estudo fitoquímico.

Aos amigos conquistados na cidade de Araraquara, Yannick, Cristina, Karina, Pedro, Sabrina e Henrique, por terem estado comigo durante muitos momentos desta fase da minha vida.

Aos amigos de Ribeirão Preto, Renata, Cíntia, Gustavo, Selma, Ana Laura, Andréia, Déco, Gabi, Edu, Lú, Tati e Fábio, por terem continuado a ser tão bons amigos mesmo quando não estávamos próximos.

À Prof.^a Dr.^a Ana Maria Pereira (UNAERP) pela dedicada e prestativa ajuda na coleta do material vegetal.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Medicamentos Fitoterápicos	1
1.2 – <i>Erythrina mulungu</i>	4
1.2.1 – Fitoquímica	5
1.2.2 – Atividades farmacológicas	8
1.3 – Fitoterápicos e ansiedade	10
1.4 – Ansiedade	11
1.4.1 – Modelos animais	11
1.4.1.1 – Labirinto em cruz elevado	12
1.4.1.2 – Labirinto em T elevado	13
1.4.1.3 – Modelo da Transição claro-escuro	16

2 – OBJETIVOS

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Fitoquímica	19
3.1.1 – Coleta da planta e preparação do extrato hidroalcoólico	19
3.1.2 – Fracionamento biomonitorado	19
3.1.3 – Isolamento dos constituintes ativos	20
3.2 - Farmacologia	22
3.2.1 – Animais	22
3.2.2 – Preparações naturais, droga padrão e controle	22
3.2.3 – Aparelhos e procedimento experimental	23

3.4 – Análise espectrométrica e estatística	26
4 - RESULTADOS	28
4.1 – Fitoquímica (Ressonância magnética nuclear)	28
4.2 - Farmacologia	33
4.2.1. – Experimento 1 – Labirinto em T elevado e Arena	33
4.2.2 – Experimento 2 – Modelo da transição claro-escuro	45
4.2.3 – Experimento 3 – Labirinto em cruz elevado	53
5 - DISCUSSÃO	54
6 - CONCLUSÕES	64
7 - RESUMO	66
8 - ABSTRACT	67
9 - BIBLIOGRAFIA	68

"Meditai se só as nações fortes podem fazer ciência,

ou se é a ciência que as fazem fortes"

Oswaldo Cruz

1. INTRODUÇÃO

1.1 Medicamentos Fitoterápicos

Há milênios as plantas medicinais são utilizadas pelas diferentes civilizações no tratamento de doenças e disfunções do organismo humano. O conhecimento popular do uso terapêutico de plantas na Ásia, por exemplo, data de milênios antes de Cristo e está registrado em “documentos médicos” tradicionais como o *Aryurveda*, na Índia, *Wu-Hsing*, na China e *Kampo*, no Japão (VOGEL, 1991; KANBA *et al.*, 1998; WONG *et al.*, 1998). Na Europa medieval, até o século XIX, os recursos terapêuticos da medicina tradicional eram predominantemente constituídos por extratos vegetais, o que pode ser constatado através das farmacopéias da época (SCHENKEL *et al.*, 2000).

No início do século XIX, alguns países do ocidente criaram órgãos públicos que visavam controlar a comercialização dos produtos naturais, uma vez que eram constantes os casos de intoxicação através de preparações adulteradas (ELVIN-LEWIS, 2001). Neste período, as substâncias ativas das plantas passaram a ser isoladas e seus efeitos terapêuticos estudados (SCHENKEL *et al.* 2000). A utilização terapêutica de alguns compostos isolados mostrou vantagens no que se refere à constância da composição, ao controle da qualidade dos produtos, à diminuição da toxicidade e, em alguns casos, mostrou maior eficácia terapêutica em relação ao extrato bruto da planta (SCHENKEL *et al.*, 2000). Paralelamente, com as contribuições da química orgânica, muitos compostos farmacológicos passaram a ser sintetizados a partir das descobertas de substâncias ativas presentes nas plantas. Pode-se citar à guisa de ilustração, a síntese do ácido acetilsalicílico, baseado nos

estudos sobre salicilina, um constituinte bioativo da *Salix alba* (SCHENKEL *et al.*, 2000).

Os remédios desenvolvidos a partir de extratos totais das plantas passaram, então, a ser substituídos nas farmácias por medicamentos contendo as substâncias ativas deles extraídas ou seus derivados sintéticos (LAPA *et al.*, 2000). Conseqüentemente, a partir do começo do século XX, o potencial terapêutico das plantas medicinais passou a ser pouco investigado segundo protocolos padronizados e fundamentados cientificamente (LAPA *et al.*, 2000). No entanto, os compostos naturais ainda constituem grande parte das preparações medicamentosas comerciais. Cerca de 25% dos agentes terapêuticos prescritos são derivados de plantas e, dos 252 medicamentos considerados como básicos e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente originários de plantas e um número significativo deles são compostos sintéticos obtidos de precursores naturais (RATES, 2001). Certamente, a terapêutica moderna, composta por um grande número de medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria atingido o grau de desenvolvimento atual se não fosse o auxílio dos produtos naturais, notadamente aqueles derivados das plantas superiores (CALIXTO, 2001). Adicionalmente, pode-se citar a importância das substâncias naturais como ferramentas em estudos farmacológicos, fisiológicos e bioquímicos, como por exemplo, os agentes muscarínicos e canabinóides (RATES, 2001).

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de medicamentos a partir de recursos naturais ganhou novo impulso por interesse tanto da sociedade científica quanto da indústria farmacêutica (MENTZ e SCHENKEL, 1989;

RATES, 2001). Este fato deve-se ao moderno contexto social e econômico, onde se constata que cerca de 65-80% da população mundial faz uso de plantas para cuidados médicos primários (CALIXTO, 2001). Estima-se que apenas 23% da população brasileira tenham acesso ao consumo de medicamentos comercializados, dos quais 80% são importados (ELIZABETSKY e SHANLEY, 1994). Por esse motivo, o uso de remédios caseiros feitos a partir de plantas constitui a principal opção para cuidados médicos primários (ELIZABETSKY e SHANLEY, 1994). Considerando o quadro mundial do uso de medicamentos naturais, a OMS, considera a fitoterapia como parte do seu programa de saúde e sugere procedimentos básicos para a validação de agentes medicamentosos originados a partir de plantas (RATES, 2001).

A importância das plantas medicinais e das preparações vegetais na farmacoterapia foi oficialmente reconhecida pela OMS na reunião internacional realizada em 23 de maio de 1978 (LAPA *et al.*, 2000). Nesta data, a OMS passou a recomendar a difusão, em nível mundial, dos conhecimentos necessários para sua utilização (LAPA *et al.*, 2000). No mesmo sentido, a OMS e o Conselho das Organizações Internacionais de Ciências Médicas estabeleceram as diretrizes legais para o registro de medicamentos naturais (LAPA *et al.*, 2000). Nas últimas décadas, observou-se um aumento expressivo no mercado dos medicamentos fitoterápicos em todo o mundo, especialmente nos países industrializados (CALIXTO, 2001). O mercado de medicamentos fitoterápicos atinge, por ano, cerca de 7 milhões de dólares na Europa, 4 bilhões na Ásia e 5 milhões nos Estados Unidos (CALIXTO, 2001). Este crescimento no mercado mundial de fitoterápicos tem despertado um interesse

expressivo das indústrias multinacionais no desenvolvimento de novas composições (CALIXTO, 2001). A médio prazo, isto resultará numa melhoria na qualidade destes produtos, bem como na confirmação da eficácia clínica e da segurança dos mesmo, uma vez que as grandes indústrias possuem recursos para custear os estudos (CALIXTO, 2001).

Atualmente, ainda são relativamente poucos os estudos desenvolvidos com a intenção de se avaliar a eficiência, o potencial terapêutico e a segurança no uso de fitoterápicos (CALIXTO, 2000). Desta forma, faz-se necessário a realização de estudos controlados que investiguem a atividade de extratos totais das plantas e a relação entre a atividade dos diferentes constituintes com a obtenção do efeito terapêutico desejado, uma vez que é conhecido que alguns componentes bioativos de plantas, através de atividade sinérgica, podem ter sua ação potencializada ou seus efeitos colaterais mitigados por outros compostos secundários encontrados nos extratos brutos (ELVIN-LEWIS, 2001).

1.2. *Erythrina mulungu*

A *Erythrina mulungu* (Papilionaceae-Leguminosae) (figura 1) é uma planta arbórea (10 - 14 metros de altura) de floração vermelha que ocorre nas florestas latifoliadas semidecíduas da bacia do Paraná e em regiões de cerrado, principalmente na região oeste do Estado de São Paulo e Triângulo Mineiro (LORENZI, 1992). A entrecasca da planta é utilizada pela população que reside nesta região como calmante e sedativo. Popularmente, é conhecida como mulungu, árvore-de-coral, mulungu-coral, capa-homem, suiná-suiná, tiriceiro entre outros (LORENZI, 1992). No Brasil, são encontradas oito

espécies de *Erythrina*: *E. mulungu*, *E. velutina*, *E. crista-galli*, *E. poeppigiana*, *E. fusca*, *E. falcata*, *E. speciosa* e *E. verna* (LORENZI, 1992).

Muitos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de se verificar as propriedades fitoquímicas e farmacológicas de outras espécies do gênero *Erythrina*, que também são conhecidas por serem utilizadas popularmente como sedativo, calmante e também como agente laxativo, anti-inflamatório e antidiurético (GARÍN-AGUILAR *et al.*, 2000). Apesar da escassez de estudos sobre a espécie *E. mulungu*, o seu extrato faz parte da composição de preparações fitoterápicas disponíveis no mercado farmacêutico brasileiro e internacional, no entanto, sem qualquer padronização quanto à qualidade do produto, podendo oferecer riscos à saúde do consumidor.



Figura 1 – Foto de *E. mulungu* (direita) e detalhe da flor (esquerda) (modificado de LORENZI, 1992).

1.2.1 Fitoquímica

O interesse pelo estudo do gênero *Erythrina* teve seu início em 1877, quando Domínguez e Altamirano descobriram a ação farmacológica do extrato das sementes da *E. americana*, semelhante aos efeitos da *d*-tubocurarina

(substância extraída de *Chondodendron tomentosum*) (HARGREAVES *et al.*, 1974; HIDER *et al.*, 1986; GARÍN-AGUILAR *et al.*, 2000). A partir de então, os extratos de diferentes espécies de *Erythrina* passaram a ter suas propriedades fitoquímicas e farmacológicas investigadas.

Anos mais tarde, após a confirmação da ação farmacológica exibida pelos extratos de várias espécies de *Erythrina*, intensificaram-se as pesquisas para o isolamento e identificação de alcalóides em plantas deste gênero (SARRAGIOTO *et al.*, 1981).

Até então, os ensaios farmacológicos eram realizados com extratos brutos. Em 1937, Folkers e Major (1937) investigaram quimicamente as sementes da *E. americana* Mill. e isolaram um alcalóide cristalino, a eritroidina, o qual apresentava atividade semelhante à da *d*-tubocurarina. Análises posteriores (BOEKELHEIDE e GRUNDON, 1953; BOEKELHEIDE *et al.*, 1953) mostraram que a eritroidina era uma mistura de dois alcalóides isoméricos que foram denominados α -eritroidina e β -eritroidina, sendo este último o responsável pela atividade colinérgica, devido à sua capacidade de antagonizar receptores nicotínicos periféricos (HARGREAVES *et al.*, 1974; HIDER *et al.*, 1986; GARÍN-AGUILAR, *et al.*, 2000).

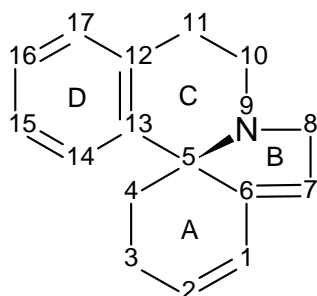


Figura 2 – Esquema do esqueleto básico de alcalóides eritrínicos.

Após o isolamento de α e β -eritroidina de *E. americana*, e as descobertas de suas propriedades farmacológicas, houve grande interesse no estudo de outras espécies de *Erythrina*, resultando no isolamento de novos alcalóides de esqueleto eritrínico (figura 2) (FOLKERS e KONIUSZY, 1940; FOLKERS *et al.*, 1944; BOEKELHEIDE e GRUNDON, 1953; BOEKELHEIDE *et al.*, 1953; TANDON *et al.*, 1969; ITO *et al.*, 1970; BARTON *et al.*, 1970; GHOSAL *et al.*, 1970; GHOSAL *et al.*, 1971; ITO *et al.*, 1971; MIANA *et al.*, 1972; GHOSAL *et al.*, 1972 a,b; BARTON *et al.*, 1973; ITO *et al.*, 1973, a,b,c,d; GHOSAL e SRIVASTAVA, 1974; MILLINGTON *et al.*, 1974; GAMES *et al.*, 1974; ITO *et al.*, 1976; BARAKAT *et al.*, 1977; EL-OLEMY *et al.*, 1978; AHMAD *et al.*, 1979; TIWARI e MASSOD, 1979a,b; MASSOD e TIWARI, 1980; SARRAGIOTO *et al.*, 1981).

A elucidação da estrutura básica dos alcalóides eritrínicos foi realizada através de trabalhos de degradação e de síntese (GRUNDON e BOEKELHEIDE, 1953; GRUNDON *et al.*, 1953; WEINSTOCK e BOEKELHEIDE, 1953; BOEKELHEIDE *et al.*, 1953). Foi estabelecida a presença de um esqueleto espiroamínico (figura 2) na estrutura destes alcalóides facilitando a identificação posterior de novos compostos.

Os alcalóides eritrínicos podem ser de três tipos. Os dienóides apresentam um sistema diênico nos anéis A e B (figura 2). Os alquenóides possuem uma dupla ligação $\Delta^{1,6}$ no anel A. Um terceiro grupo de alcalóides eritrínicos inclui: erisodienona, 3-desmetoxi eritratidinona, α -eritroidina e β -eritroidina. 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.

Num estudo fitoquímico realizado com *E. mulungu* foram isolados, a partir do extrato etanólico preparado com as flores secas, cinco alcalóides (erisotrina, *N*-óxido de erisotrina, eritartina, *N*-óxido de eritartina e hipaforina) e um terpenóide, o fitol (SARRAGIOTO *et al.*, 1981; SARRAGIOTO, 1981).

Estudos fitoquímicos recentes têm demonstrado que as espécies de *Erythrina* também são ricas em outras classes de substâncias, como em flavanonas, isoflavanonas, isoflavonas e pterocarpanos (DA-CUNHA *et al.*, 1996; TANAKA *et al.*, 1996, 1997a,b; 1998; 2001; OH *et al.*, 1999; YENESEW *et al.*, 2000; NKENGFAK *et al.*, 2001).

1.2.2. Atividades farmacológicas

Entre as principais ações farmacológicas de algumas espécies de *Erythrina* destaca-se sua atividade periférica sobre o sistema colinérgico que tem sido comparada aos efeitos da *d*-tubocurarina (HARGREAVES *et al.*, 1974; HIDER *et al.*, 1986; GARÍN-AGUILAR, *et al.*, 2000). Este efeito foi atribuído ao alcalóide dihidro- β -eritroidina (DHBE), um antagonista de receptores nicotínicos (HIDER *et al.*, 1986) isolado de *E. americana* (BOEKELHEIDE e GRUNDON, 1953; BOEKELHEIDE *et al.*, 1953) e *E. tholloniana* (CHAWLA *et al.*, 1985). Mais recentemente, num teste *in vitro*, a DHBE foi caracterizada como um antagonista de receptores serotoninérgicos do tipo 3 (5-HT₃) (ELSELÈ *et al.*, 1993). A atividade sobre o sistema serotoninérgico também foi observada em outro estudo (ROGER *et al.*, 2001), onde os autores demonstraram que o extrato bruto de *E. vespertilio* inibiu a liberação cálcio-dependente de

serotonina plaquetária, uma das principais atividades dos antagonistas de receptores 5-HT₃.

No entanto, a maioria dos trabalhos ainda é realizada utilizando-se extratos brutos de diferentes espécies de *Erythrina*, sem a verificação das substâncias envolvidas nas atividades observadas. Como exemplo das atividades destas espécies de plantas observadas sobre o sistema nervoso central pode-se citar efeitos anticonvulsivante, hipnótico, anestésico, sedativo e ansiolítico (GHOSAL *et al.*, 1972; HARGREAVES *et al.*, 1974; RATNASOORIYA e DHARMASIRI, 1999; ONUSIC *et al.*, 2002, 2003).

Num trabalho realizado com *E. velutina*, foi demonstrado que o tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico diminuiu a atividade de camundongos no teste do campo aberto (com as doses de 250 e 500 mg/Kg, v.o), bem como aumentou o tempo de sono induzido por pentobarbital e o tempo para o início da convulsão induzida por pilocarpina (com as doses de 500 e 1000 mg/Kg, v.o), indicando um efeito depressor sobre o SNC (CABRAL *et al.*, 2000). Em outro trabalho (GARÍN-AGUILAR *et al.*, 2000), foi observado que o tratamento agudo com a fração hexânica de *E. americana* (3 mg/Kg, i.p) diminuiu o comportamento agressivo em ratos machos, de forma semelhante ao diazepam. Recentemente, em um estudo realizado com o extrato hidroalcoólico de *E. mulungu* (ONUSIC *et al.*, 2002), foi observado que o tratamento agudo com a dose de 200 mg/Kg (v.o) apresentou efeito ansiolítico em ratos na tarefa de esquiva inibitória no teste do LTE, comparável ao do ansiolítico benzodiazepínico (BDZ), diazepam. ONUSIC e colaboradores (2002) também observaram efeito ansiolítico de *E. mulungu*, com a mesma dose, no modelo da TCE, tanto na medida do número de transições entre os dois

compartimentos do modelo quanto no tempo de permanência no compartimento claro. Em outro trabalho, foi observado que o tratamento crônico v.o (9 dias) com o extrato de *E. mulungu* apresentou efeito ansiolítico nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, tanto na tarefa de esquivas inibitória, quanto na fuga do braço aberto do labirinto em T elevado (ONUSIC *et al.*, 2003). No modelo da transição claro-escuro, o extrato das flores de *E. mulungu*, com a dose de 50 mg/Kg, também apresentou efeito ansiolítico após tratamento crônico de 14 dias (ONUSIC *et al.*, 2003).

1.3. Fitoterápicos e ansiedade

Os fitoterápicos constituem uma alternativa amplamente utilizada pela população para o tratamento de transtornos ansiosos (BERNICK *et al.*, 1997). Por outro lado, existe uma relativa escassez de ensaios pré-clínicos e estudos clínicos controlados, que visem avaliar a eficácia, a segurança e o controle de qualidade das preparações comerciais disponíveis (BERNICK *et al.*, 1997; ANDREATINI, 2000). A kava-kava (*Piper methysticum*) é o único fitoterápico ansiolítico com estudos clínicos controlados que corroboram sua eficácia (BERNICK *et al.*, 1997; ANDREATINI, 2000). No entanto, outros fitoterápicos utilizados como ansiolíticos, como por exemplo, o extrato de *Valeriana officinalis*, de *Passiflora spp.* e de *Erythrina mulungu*, não possuem estudos que garantam sua eficácia e segurança (BERNICK *et al.*, 1997; ANDREATINI, 2000).

1.4. Ansiedade

1.4.1. Modelos animais

Os modelos animais constituem um importante instrumento de investigação em pesquisas sobre os efeitos farmacológicos e os possíveis mecanismos de ação de novas drogas ou agentes terapêuticos (TREIT, 1985; RODGERS *et al.*, 1997; GRAEFF e ZANGROSSI, 2002).

A importância do uso de modelos animais em estudos sobre a ansiedade concentra-se na tentativa de se reproduzir em laboratório alguns aspectos da sintomatologia, da etiologia e do tratamento de um transtorno específico (LISTER, 1990; STEPHENS e ANDREWS, 1991). Nos últimos 50 anos, a utilização dos modelos animais tem contribuído tanto para os estudos dos substratos neuro-humorais que modulam a expressão da ansiedade no homem, como para as análises pré-clínicas de seleção de novas drogas ou agentes terapêuticos (TREIT, 1985; RODGERS *et al.*, 1997).

De acordo com a natureza do estímulo que utilizam, os modelos animais de ansiedade podem ser classificados, segundo alguns autores (TREIT, 1985; FILE, 1992; ZANGROSSI JR., 1997; GRAEFF, 1999; GRAEFF e ZANGROSSI, 2002), em dois tipos: os que se utilizam de estímulos neutros, que adquirem propriedades aversivas através de condicionamento, como os modelos baseados em aprendizagem associativa, e os baseados em estímulos inatamente aversivos, os chamados modelos etologicamente fundamentados, como o labirinto em cruz elevado e o labirinto em T elevado (TREIT, 1985; BLANCHARD *et al.*, 1993; RODGERS *et al.*, 1997; LISTER, 1990; FILE, 1992; ZANGROSSI JR., 1997; GRAEFF, 1999).

1.4.1.1. Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE foi desenvolvido por Handley e Mithani (1984), considerando-se a aversão natural de roedores a lugares abertos e elevados do chão. Foi observado que ratos e camundongos expostos a um labirinto elevado, constituído por dois braços abertos unidos perpendicularmente a dois braços circundados por paredes, exibiam maior atividade exploratória neste último (HANDLEY e MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985; LISTER, 1990). As medidas consideradas como representativas de ansiedade no LCE são as porcentagens de entradas e de tempo gasto pelos animais nos braços abertos do modelo (CRUZ *et al.*, 1994; RODGERS *et al.*, 1997). Como muitos compostos podem ter 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 *et al.*, 1994).

Em termos farmacológicos, com a administração de benzodiazepínicos (BZDs) e barbitúricos, é possível observar um aumento do número de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE, o que indica um efeito ansiolítico (HANDLEY e MITHANI, 1984; PELLOW *et al.*, 1985). Por outro lado, tem sido proposto que o labirinto em cruz não é um modelo capaz de detectar a atividade ansiolítica de compostos com atividade serotoninérgica (HANDLEY e MACBLANE, 1993). Drogas ansiolíticas como a buspirona, um agonista de receptores do tipo 5-HT_{1A}, e a ritanserina, um antagonista não seletivo de receptores 5-HT₂, demonstraram, em diferentes estudos, tanto efeito ansiolítico como ansiogênico, ou até, ausência de efeitos (HANDLEY e MCBLANE, 1993). Devido a estes resultados contraditórios o

LCE tem sido considerado com um modelo misto de ansiedade (HANDLEY e MCBLANE, 1993; ZANGROSSI JR. e GRAEFF, 1997; GRAEFF e ZANGROSSI JR., 2002).

1.4.1.2. Labirinto em T elevado (LTE)

O LTE (GRAEFF *et al.*, 1993; VIANA *et al.*, 1994; ZANGROSSI JR. e GRAEFF, 1997) é derivado do LCE (PELLOW *et al.*, 1985), através do fechamento de um dos braços fechados do modelo e da alteração do procedimento experimental. O LTE foi desenvolvido para permitir a medida, no mesmo animal, de dois tipos de respostas comportamentais defensivas relacionadas com a ansiedade, uma de natureza condicionada, a esquiva inibitória dos braços abertos, e outra de natureza incondicionada, a fuga dos braços abertos (VIANA *et al.*, 1994; ZANGROSSI JR. e GRAEFF, 1997; GRAEFF *et al.*, 1997, 1998; TEIXEIRA *et al.*, 2000).

Os trabalhos de validação farmacológica do LTE (VIANA *et al.*, 1994; GRAEFF *et al.*, 1998) mostraram que o composto ansiolítico da classe dos BZDs, diazepam, bem como os agonistas de receptores 5-HT_{1A}, ipsapirona e buspirona, e o antagonista não-seletivo de receptores 5-HT₂, a ritanserina, prejudicaram o desempenho dos ratos na esquiva inibitória dos braços abertos enquanto mantinham inalterada a fuga.

Por outro lado, o efeito ansiolítico na fuga dos braços abertos foi observado após 21 dias de tratamento com diferentes compostos da classe dos antidepressivos, como os tricíclicos, imipramina (TEIXEIRA *et al.*, 2000) e clomipramina, e o inibidor seletivo da recaptação de serotonina, fluoxetina (POLTRONIERI *et al.*, 2003). Estes resultados, no entanto, foram obtidos

somente após a inclusão de um novo parâmetro no procedimento do teste: a pré-exposição forçada, por 30 minutos, a um dos braços abertos do LTE. Esta modificação resultou em uma diminuição da latência de saída deste braço em tentativas posteriores. Teixeira e colaboradores (2000) sugerem que o procedimento de pré-exposição diminui o tempo gasto na atividade exploratória no braço aberto, assegurando que durante as medidas de fuga, os animais estão realmente fugindo do estímulo aversivo.

Resultados recentes têm mostrado que o LTE também pode ser utilizado para estudos etológicos e farmacológicos com camundongos (JARDIM *et al.*, 1999; CARVALHO-NETTO e NUNES-DE-SOUZA, 2004). No entanto, algumas modificações no aparelho e no procedimento experimental têm sido propostas. Carvalho-Netto e Nunes-de-Souza (2004) demonstraram que a esquivia inibitória dos braços abertos é melhor caracterizada quando são realizadas 5 exposições ao braço fechado.

Considerando estas alterações, os experimentos realizados com compostos ansiolíticos, como o diazepam, a buspirona e a fenfluramina, e ansiogênicos, como a cafeína, mostraram que o LTE para camundongos também apresenta previsibilidade farmacológica para o estudo de novos agentes com atividade ansiolítica (CARVALHO-NETTO e NUNES-DE-SOUZA, 2004).

Por outro lado, tem sido proposto que o comportamento dos camundongos exibido durante a exposição aos braços abertos não representa uma resposta de fuga (CARVALHO-NETTO e NUNES-DE-SOUZA, 2004). A velocidade com que os animais deixam o braço aberto do labirinto (0,01 m/s) (CARVALHO-NETTO e NUNES-DE-SOUZA, 2004) é menor do que a observada na medida

de fuga na bateria de testes defensivos para camundongos (BTDC) (BLANCHARD *et al.*, 1998). Carvalho-Netto e Nunes-de-Souza (2004) sugerem que as altas latências de saída do braço aberto do LTE podem ser devidas ao tempo gasto pelos camundongos em avaliação de risco. Resultados obtidos em outros modelos também demonstraram que mesmo na presença de um predador os camundongos apresentam comportamento de avaliação de risco (BLANCHARD *et al.*, 1997; BLANCHARD *et al.*, 2001). Foi observado que a buspirona e a gepirona, drogas que atuam sobre o sistema serotoninérgico, diminuem o comportamento de avaliação de risco na BTDC (BLANCHARD *et al.*, 1997). No modelo do LTE para camundongos a buspirona e a fenfluramina, um liberador de serotonina, diminuíram a latência de saída do braço aberto (CARVALHO-NETTO e NUNES-DE-SOUZA, 2004). Juntos, estes resultados sugerem que o efeito observado com a buspirona e a fenfluramina no labirinto em T pode estar relacionado a uma diminuição no comportamento de avaliação de risco executado pelos animais durante a exposição ao braço aberto (CARVALHO-NETTO e NUNES-DE-SOUZA, 2004). A cafeína, por outro lado, aumentou a latência de saída do braço aberto, sugerindo um aumento no tempo gasto pelos animais em avaliação de risco (CARVALHO-NETTO e NUNES-DE-SOUZA, 2004). Considerando estes resultados, tem sido proposto que a diminuição na latência de saída do braço aberto representaria um efeito ansiolítico, como observado com a buspirona, por outro lado, um aumento nesta medida estaria relacionado a um efeito ansiogênico, como observado com a cafeína (CARVALHO-NETTO e NUNES-DE-SOUZA, 2004). Desta forma, a interpretação da latência de saída do braço aberto do LTE para camundongos pode ser oposta à originalmente sugerida para ratos, ou seja,

uma diminuição desta latência pode ser considerada como um efeito ansiolítico, enquanto que um aumento pode ser considerado um efeito ansiogênico (CARVALHO-NETTO e NUNES-DE-SOUZA, 2004).

1.4.1.3. Modelo da transição claro-escuro (TCE)

O TCE, desenvolvido inicialmente por Crawley e Goodwin (1980), é baseado no comportamento exploratório de roedores e considera a aversão natural destes animais por ambientes novos e iluminados. Neste modelo, os animais são expostos a uma caixa com dois compartimentos, um iluminado com alta intensidade de luz e outro escuro, sem nenhuma iluminação (CRAWLEY e GOODWIN, 1980; HENDRIE *et al.*, 1996; SANCHÉS, 1996; CHAULOFF *et al.*, 1997; HASCÖET e BOURIN, 1998; BOURIN e HACÖET, 2003).

O caráter aversivo do TCE (novidade e alta luminosidade) parece ser potencializado quando o animal é inicialmente colocado no compartimento iluminado (CHAULOFF *et al.*, 1997). Evidências demonstram que, quando expostos ao modelo nestas condições, roedores exibem preferência em permanecer no compartimento escuro (CRAWLEY e GOODWIN, 1980). Desta forma, o número de transições feitas pelos animais entre os dois compartimentos (CRAWLEY e GOODWIN, 1980; BOURIN e HASCÖET, 2003), bem como o tempo que permanecem no compartimento iluminado (CHAULOFF *et al.*, 1997; HASCÖET e BOURIN, 1998; BOURIN e HASCÖET, 2003) são medidas que têm sido usados como índices de ansiedade.

Drogas BDZs, como o diazepam, o alprazolam e o clordiazepóxido (MERLO PICH e SAMANIN, 1989; CHAULOFF *et al.*, 1997; HASCÖET e

BOURIN, 1998), bem como agonistas de receptores serotoninérgicos do tipo 1A, como a buspirona, apresentam efeito ansiolítico no modelo de transição claro-escuro (SANCHÉS, 1996; HENDRIE *et al.*; 1997; GRIEBEL *et al.*; 1998). Por outro lado, drogas que atuam sobre a inibição de recaptação de monaminas como a imipramina (MERLO PICH e SAMANIN, 1989; DE ANGELIS, 1996) e a fluoxetina (DE ANGELIS, 1996; SANCHÉS e MAIER, 1997) têm demonstrado resultados contraditórios no modelo, mostrando tanto efeito ansiolítico, como ansiogênico ou até ausência de efeitos.

OBJETIVOS

Considerando-se a ampla utilização das cascas de *Erythrina mulungu* pela população como "calmante", sua comercialização em preparações fitoterápicas não padronizadas e resultados recentes mostrando efeito ansiolítico do extrato hidroalcoólico de *Erythrina mulungu* em ratos submetidos a modelos animais de ansiedade (ONUSIC *et al.*, 2002; 2003), o objetivo da presente pesquisa foi:

- Isolar e identificar os constituintes bioativos de *E. mulungu* presentes no extrato hidroalcoólico preparado com as flores;
- Investigar os efeitos do extrato bruto de *E. mulungu*, das frações e dos alcalóides eritrínicos em camundongos submetidos a diferentes modelos animais de ansiedade, o LCE, o LTE e o TCE, com o propósito de se verificar qual a participação destes constituintes na atividade ansiolítica desta planta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. FITOQUÍMICA

3.1.1. Coleta da planta e preparação do extrato hidroalcoólico

Foram coletadas as flores de árvores adultas durante a estação do inverno na região de Rifaina (SP). O material vegetal fresco (6 Kg) foi submetido à extração por processo de maceração com etanol/água (EtOH/H₂O) (7:3) durante 7 dias. Em seguida, o extrato foi filtrado e concentrado com auxílio de um rota-evaporador, resultando em 292 g de extrato hidroalcoólico seco.

3.1.2. Fracionamento biomonitorado

Foi realizada a extração ácido-base com a intenção de se purificar o extrato bruto e originar uma fração onde a concentração de alcalóides eritrínicos fosse otimizada (figura 3). Para isso, o extrato hidroalcoólico seco (120 g) foi dissolvido em solução aquosa de ácido acético (10%) e submetido à extração líquido/líquido com clorofórmio (CHCl₃). A fase orgânica foi separada da fase aquosa e o solvente evaporado, resultando na fração 1 (7,83 g). Em seguida, a fase aquosa foi basificada com hidróxido de amônio (NH₄OH) em volume suficiente para atingir pH entre 9-10 e submetida novamente à extração com CHCl₃. A fase orgânica foi separada e o solvente evaporado, resultando na fração purificada (F2) (670 mg). A F2 foi analisada em cromatografia de camada delgada (CCD) em sílica, utilizando-se CHCl₃/metanol (MeOH) (7:1). Como o teste com o revelador Dragendorff foi positivo para alcalóides na F2, esta fração foi submetida ao teste farmacológico com o labirinto em T elevado onde apresentou atividade. Desta forma, esta fração foi selecionada para dar continuidade ao processo de isolamento dos constituintes ativos.

3.1.3. Isolamento dos constituintes ativos

Foram utilizados solventes de grau “para análise”.

Para a CCA (5 cm de diâmetro e 15 cm de altura) foi utilizada como fase estacionária sílica (0,035-0,070 mm, ϕ 6 η m) e como fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (10:0 – 8:2). Para a separação foram utilizados 670 mg da F2 e coletadas 101 frações de aproximadamente 20 mL (figura 3).

Após terem sido submetidas à CCD analítica, em fase móvel de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:1) e reveladas com Dragendorf, as 101 frações foram reunidas em fração A (**FA** – 136,2 mg) (1-27), fração B (**FB** – 93,4 mg) (28-50), fração C (**FC** – 148,3 mg) (51-69), fração D (**FD** – 284,5 mg) (70-101) (figura 3). As frações B, C e D revelaram positivo para alcalóides.

Para o isolamento e a purificação dos alcalóides foi realizada cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), usando-se como fase estacionária sílica (Merck) com fluoresceína e como fase móvel tolueno, acetona, etanol e NH_4OH (45:45:7:3). A partir da fração B foi isolada a eritartina (**1**) (48 mg), das frações C e D, a eritravina (**2**) (61 e 34,82 mg, respectivamente) e da fração D, a 11-OH-eritravina (**3**) (36,98 mg) (figura 3).

Para as análises espectrométricas das substâncias isoladas a partir da CCDP foi utilizado espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Varian Unit operando em 500 MHz. Foi utilizado como padrão interno o tetrametilsilano e como solvente o clorofórmio deuterado (CDCl_3).

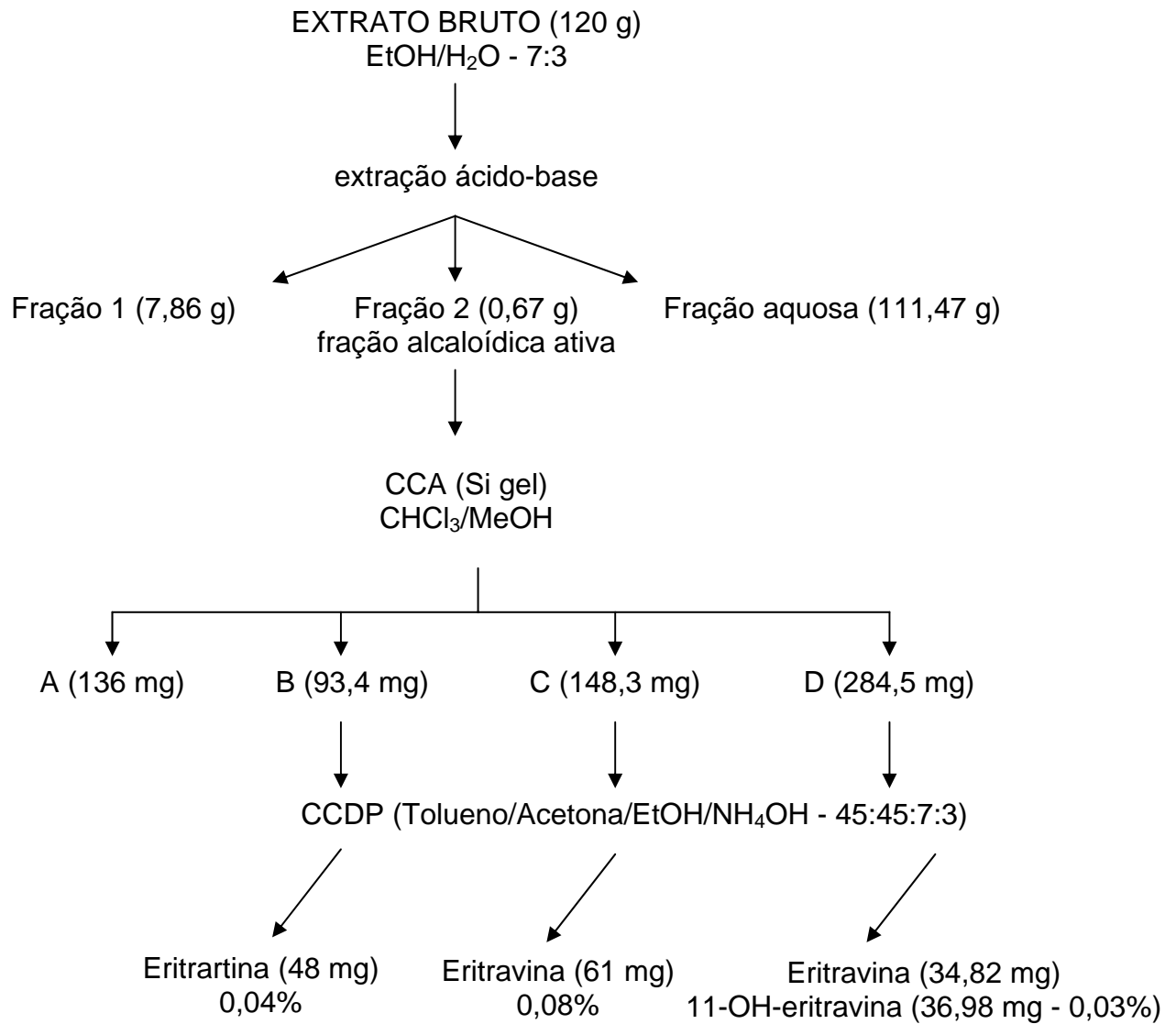


Figura 3 - Fluxograma do fracionamento do extrato bruto, da fração purificada rica em alcalóides (F2) e isolamento dos alcalóides.

3.2. FARMACOLOGIA

3.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos Suíços, pesando entre 25-35 g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista – UNESP/Araraquara. Os animais foram alojados em grupos de 10-12 animais, em gaiolas de polipropileno com serragem no assoalho, com comida e água oferecidas *ad libitum*. O biotério foi mantido em temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, iluminação controlada em ciclo de 12 horas, das 7:00 às 19:00 h e umidade de 50-60%. O presente protocolo de uso de animais está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP – Araraquara/SP) (nº 35/2004).

3.2.2. Preparações naturais, droga padrão e controle

Foi utilizado o extrato hidroalcoólico liofilizado (50, 100, 200 e 400 mg/Kg), a fração purificada rica em alcalóides (F2) (3, 6, 10, 17 e 30 mg/Kg) e os alcalóides eritartina, eritravina e 11-OH-eritravina (3 e 10 mg/Kg), administrados via oral (v.o) por gavagem. Como droga padrão foi utilizado o Diazepam (DZP) em dose de 2 mg/Kg (via intraperitoneal, i.p). Todas as soluções foram preparadas no dia do experimento com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (0,9% NaCl) e sonificado por 15 minutos. O diazepam foi dissolvido em 0,9% NaCl e Tween-80 a 2 %.

Os experimentos foram realizados no período entre 11:00 e 17:00 h.

3.2.3. Aparelhos e procedimento experimental

O LCE (figura 4) é feito com paredes de vidro translúcido e o assoalho de madeira e consiste de dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm) unidos perpendicularmente a dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm), elevados a 38,5 cm do solo por um suporte de madeira. Neste modelo cada animal era colocado no quadrante central do aparelho voltado para um dos braços fechados e seu comportamento de exploração dos braços fechados e abertos era vídeo gravado por cinco minutos para posterior análise. Foram analisadas as seguintes medidas: o número de entradas nos braços abertos e fechados e tempo de permanência nos braços abertos. Como índices de ansiedade foram usados a porcentagem de entradas nos braços abertos pelo total de entradas em ambos os braços e o tempo de permanência nos braços abertos. O número total de entradas nos braços fechados foi usado como medida de atividade locomotora.

Para o teste do LTE (figura 4) foi utilizado um LCE com uma barreira na entrada de um dos braços fechados. Neste teste, eram realizadas cinco medidas consecutivas de esquiva inibitória (latência basal, esquivas 1, 2, 3 e 4) e uma medida de fuga dos braços abertos, com intervalos de 30 segundos entre cada tentativa. Nas medidas de esquiva os animais eram colocados na porção distal do braço fechado e a latência de saída deste braço, com as quatro patas, em direção ao braço aberto era cronometrada. Na medida de fuga, os animais eram colocados na extremidade do braço aberto direito e o tempo de saída deste braço era medido. O tempo máximo de permanência dos animais nos braços do labirinto durante as medidas era de 300 segundos. O aparelho era limpo com etanol 20% após a exposição de cada animal.



Figura 4 – Foto do aparelho utilizado para os experimentos com o labirinto em cruz elevado e com o labirinto em T elevado (após a interrupção de um dos braços fechados).

Com a intenção de se evitar falsos positivos ou negativos, imediatamente após a exposição ao labirinto em T elevado, os animais eram submetidos ao teste de atividade locomotora na arena (figura 5). O aparelho consiste em uma caixa de polipropileno branco com base retangular (40 x 48 cm), cercada por paredes de 30 cm de altura. O assoalho é subdividido em 30 quadrados (8 x 8 cm). Para a realização do teste os animais eram colocados no centro da caixa e sua atividade gravada em vídeo, por cinco minutos, para posterior análise do número de cruzamentos das áreas dos quadrados e número de levantamentos (WALSH e CUMMINS, 1976).



Figura 5 – Foto da arena utilizada para as medidas da atividade locomotora dos animais.

O TCE (figura 6) era constituído de uma caixa de plexiglas (44,5 x 37 x 25 cm) dividida por uma barreira com uma passagem (7 x 7,5 cm) através da qual os camundongos podiam transitar entre dois compartimentos, um feito de paredes brancas (27 x 37 x 25 cm) e iluminado por uma luz branca (1320 lux) e outro de paredes pretas (17 x 37 x 25 cm) iluminado por uma luz vermelha (35 lux). Para a realização deste teste cada animal era colocado no centro do compartimento iluminado e, após a primeira passagem para o compartimento escuro, era cronometrado cinco minutos durante os quais o comportamento do animal era gravado em vídeo para análise do tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado e número de cruzamentos entre os dois compartimentos do modelo.



Figura 6 – Foto do modelo da transição claro-escuro.

3.4. ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA E ESTATÍSTICA

Para a determinação das estruturas químicas dos alcalóides isolados foram utilizadas espectrometrias de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como espectrometria bidimensional de HMQC (heteronuclear multiple quantum coherence), HMBC (heteronuclear multiple bond connectivity) e COSY (“H-H correlation spectroscopy). Os resultados foram comparados com informações já existentes na literatura sobre alcalóides eritrínicos.

Para os resultados obtidos com os modelos animais, todos os dados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade de Levene. Os resultados que se mostraram heterogêneos foram convertidos em escala logarítmica e posteriormente analisados estatisticamente.

Os resultados obtidos com o labirinto em T elevado foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias, com o tratamento como fator independente e as tentativas como fator dependente. Quando o efeito do

tratamento se mostrava significativo os dados eram analisados através da ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. Os resultados obtidos com as medidas realizadas na arena, no modelo da transição claro-escuro e no labirinto em cruz elevado foram submetidos à ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. FITOQUÍMICA (RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR - RMN)

Por meio da CCDP realizada com a **FB**, foi isolado o alcalóide **1**. O alcalóide **2** foi isolado tanto a partir de **FC**, quanto de **FD**. A partir de **FD** foi possível isolar, também, o alcalóide **3**.

O espectro de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 para as substâncias **1**, **2** e **3** (tabela 1) mostrou a presença de sinais característicos do esqueleto de alcalóides eritrínicos (figura 2). Desta forma, foi possível identificar sinais de dois singletos (s) de prótons aromáticos referentes aos hidrogênios H-14 e H-17 e de dois singletos atribuídos aos hidrogênios das metoxilas na posição dos carbonos C-15 e C-16 (tabela 1). A presença de três sinais de prótons olefínicos (singleto largo (sl), H-7; dubleto largo (dl), H-1; duplo dubleto (dd), H-2), foram atribuídos aos hidrogênios do sistema diênico do esqueleto eritrínico (anéis A e B, figura 2).

Sarragioto *et al.* (1981) determinaram as ressonâncias do C-1 e C-2 em 125,3 δ e 131,2 δ , respectivamente. No entanto, no presente trabalho, a correlação entre os deslocamentos químicos dos espectros bidimensionais de HMQC revelou estas ressonâncias em 131,5 δ e 125,5 δ , respectivamente.

Tabela 1 – Valores dos deslocamentos químicos (δ , em ppm) e constantes de acoplamento (J) da RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) (em CD_3Cl) de eritratina, eritravina e 11-OH-eritravina.

Posição	Eritratina (1)		Eritravina (2)		11-OH-Eritravina (3)	
	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}
1	5,94 (d; 10,5)	131,52	5,9 (d 10,0)	134,18	6,01(d; 15,5)	135
2	6,52 (dd; 10,5; 2,5)	125,53	6,4 (dd; 10,0; 1,5)	124,96	6,56 (dd)	124,5
3	3,98 m	75,98	4,37 m	67,73	4,5 m	67,27
4	1,75 t	40,46	1,91 t	45,33	1,91t	43,9
	2,3 (dd; 11,5; 3,5)		2,5 (dd; 11,0; 5,0)		2,57dd	
5	-----	66,30	-----	67,11	-----	
6	-----	142,00	-----	141,88	-----	141,32
7	5,67 s	123,50	5,66 s	122,81	5,76s	124,45
8	3,81(d; 3,0)	58,71	3,58 d	56,45	3,99 d	58,78
	3,88 (dd)		3,7 d		3,93 d	
10	3,54 (dd; 14,0; 3,5)	50,92	3,05 (dd; 6,0; 4,5)	43,40	3,10 dd	50,83
	3,07 (dd; 14,0; 4,5)		3,50-3,53 m		3,59 dd	
11	4,64 t	64,55	2,9 (dd, 10,0; 6,5) 2,6-2,7 m	23,76	4,74 t	63,69
12	-----	128,32	-----	126,01	-----	
13	-----	129,68	-----	130,61	-----	
14	6,91 s	108,68	6,64 s	111,52	6,71s	108,36
15	(MeO)	148,28	(MeO)	147,19	(MeO)	141,32
16	(MeO)	148,52	(MeO)	147,77	(MeO)	148,76
17	6,77 s	110,33	6,72 s	109,16	6,93 s	110,36

s = singleto; d = duplete; dd = duplo duplete; t = tripleto; m = multiplete; MeO = metoxila

Eritrartina

Após a identificação dos sinais característicos de hidrogênios do esqueleto eritrínico (tabela 1), foi observado que somente a substância **1** apresentava sinal em 3,24 δ , referente a três hidrogênios de metoxila localizada em C-3. De acordo com os dados encontrados na literatura para alcalóides 11-oxigenados, foi atribuída a presença de uma hidroxila em C-11, considerando os deslocamentos observados nos espectros de RMN de ^1H (triplete (t) em 4,64 δ) e de ^{13}C (64,55 δ) e as correlações obtidas com o teste de HMQC. Desta forma, o alcalóide **1** foi identificado como sendo a eritrartina (SARRAGITO et al., 1981) (figura 7). No entanto, diferentemente dos trabalhos anteriores (SARRAGITO *et al.*, 1981) foi sugerida uma orientação equatorial para o grupo hidroxila em C-11, a partir dos valores das constantes de acoplamento entre $\text{H}_{10a-11e}$ ($J = 3,54 \text{ Hz}$) e $\text{H}_{10e-11e}$, ($J = 3,07 \text{ Hz}$).

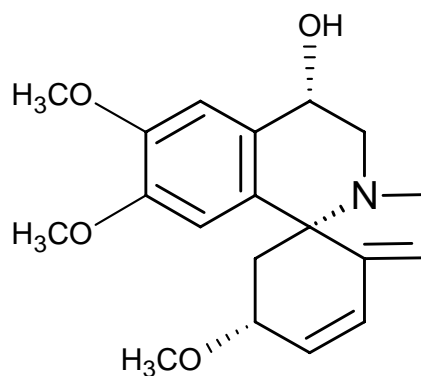


Figura 7 – Estrutura química do alcalóide eritrartina, isolado a partir do extrato bruto das flores de EM.

Eritravina

Diferentemente da substância anterior, o espectro de RMN de ^1H da substância **2** não apresentou sinal de metoxila na posição C-3 (tabela 1). O multiplete (m) observado em 4,37 δ associado ao deslocamento químico observado em 67,73 δ do espectro de ^{13}C , sugere a presença de um substituinte oxigenado nesta posição. Para a posição C-11 o duplo dubleto observado em 2,9 δ ($J_{\text{H11ax-H10ax}} = 10,0$ Hz; $J_{\text{H11ax-H11eq}} = 6,5$ Hz) e o multiplete observado na região de 2,65-2,69 δ foram atribuídos aos H-11 axial (ax) e equatorial (eq), respectivamente. Esta substância foi identificada como eritravina (MILLINGTON *et al.*, 1974; CHAWLA *et al.*, 1985), um alcalóide eritrínico que não havia ainda sido isolado de EM (figura 8).

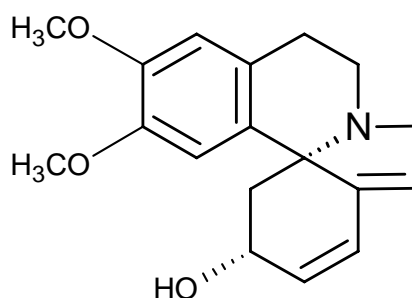


Figura 8 – Estrutura química do alcalóide eritravina, isolado a partir do extrato bruto das flores de EM.

11-hidroxi-eritravina (11-OH-eritravina)

No espectro de RMN de ^1H para a substância **3** (tabela 1), de forma semelhante à eritravina foi observado um multiplete em 4,5 δ referente a um substituinte oxigenado, atribuído à posição C-3. De forma semelhante como observado para a eritartina, os espectros de RMN ^1H e de ^{13}C , revelaram deslocamentos químicos em 4,74 δ (t) e 63,69 δ , respectivamente, atribuídos à presença de uma hidroxila em C-11. Estes resultados estão sendo reportados

pela primeira vez na literatura, desta forma, a substância **3** foi reconhecida como sendo um novo alcalóide eritrínico, ao qual foi dado o nome de 11-hidroxi-eritravina (11-OH-eritavina) (figura 9).

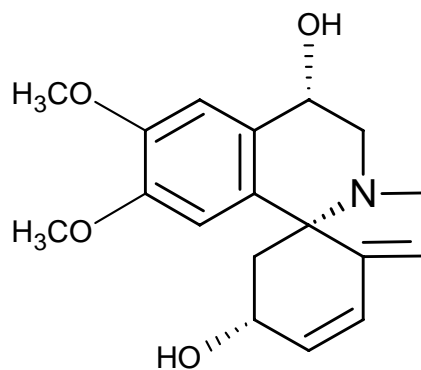


Figura 9 – Estrutura química de um novo alcalóide, o 11-OH-eritravina, isolado a partir do extrato bruto das flores de EM.

4.2. FARMACOLOGIA

4.2.1. EXPERIMENTO 1 – Labirinto em T elevado e arena

EXTRATO BRUTO

Labirinto em T elevado

Como demonstrado na figura 10, o tratamento agudo com o extrato bruto padronizado de EM prejudicou o desempenho dos animais na esQUIVA INIBITÓRIA do braço aberto do labirinto em T elevado. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do tratamento ($F(5,49) = 5,44; p < 0,0001$) e das tentativas ($F(4,196) = 27,37; p < 0,0001$), mas não da interação entre tratamento e tentativas ($F(20,196) = 0,87, p = 0,628$). A ANOVA de uma via mostrou que houve diferença significativa entre os grupos de tratamento na latência basal (LB) ($F(5,49) = 2,34; p = 0,056$), esQUIVA 1 (E1) ($F(5,49) = 3,97; p < 0,01$), esQUIVA 2 (E2) ($F(5,49) = 3,75; p < 0,01$); esQUIVA 3 (E3) ($F(5,49) = 3,39; p = 0,01$) e esQUIVA 4 (E4) ($F(5,49) = 2,62; p < 0,05$). Na figura 10 pode ser observada a diferença entre os grupos, quando comparados com o controle, de acordo com o teste *post hoc* de Duncan.

Na medida de fuga do braço aberto do labirinto em T elevado, a ANOVA de uma via mostrou que houve diferença significativa entre os grupos ($F(5,49) = 3,48; p < 0,01$). O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que esta diferença era referente a uma diminuição da latência de saída do braço aberto em direção ao fechado apresentada pelo grupo tratado com a dose de 400 mg/Kg de EM (figura 10), quando comparado ao grupo controle.

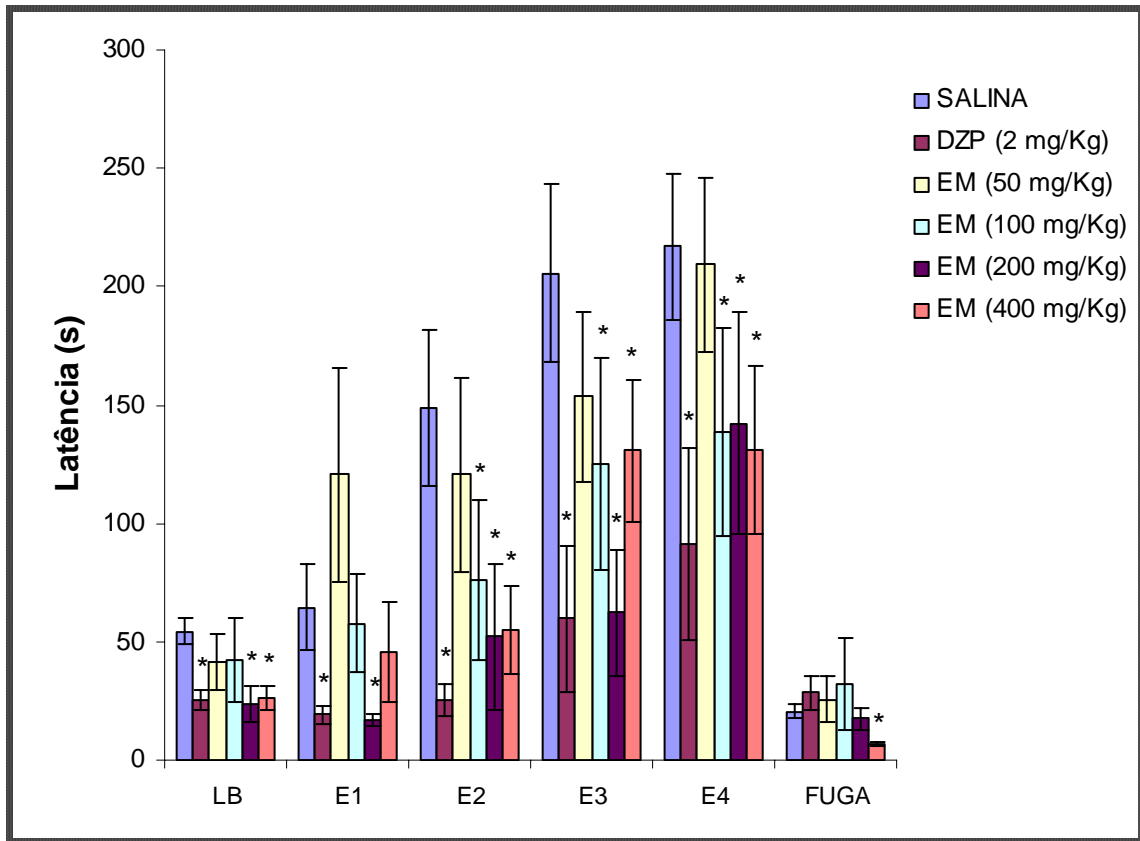


Figura 10 – Efeito (média e EPM) do tratamento agudo (v.o) com extrato bruto de *Erythrina mulungu* (EM) sobre os comportamentos de esquia inibitória e fuga em camundongos submetidos ao modelo do labirinto em T elevado. $N = 8$ (salina), 9 (DZP), 9 (EM 50 mg/Kg), 9 (EM 100 mg/Kg), 10 (EM 200 mg/Kg), 9 (EM 400 mg/Kg). * $p < 0,05$ versus salina (Teste *post hoc* de Duncan)

Atividade locomotora - Arena

A atividade locomotora dos animais medida na arena não foi alterada pelo tratamento agudo com nenhuma das doses do extrato bruto de EM (figura 11). A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas entre os grupos na medida do número de cruzamentos ($F(5,49) = 0,78$; $p = 0,56$), nem na medida do número de levantamentos ($F(5,49) = 1,90$; $p = 0,11$).

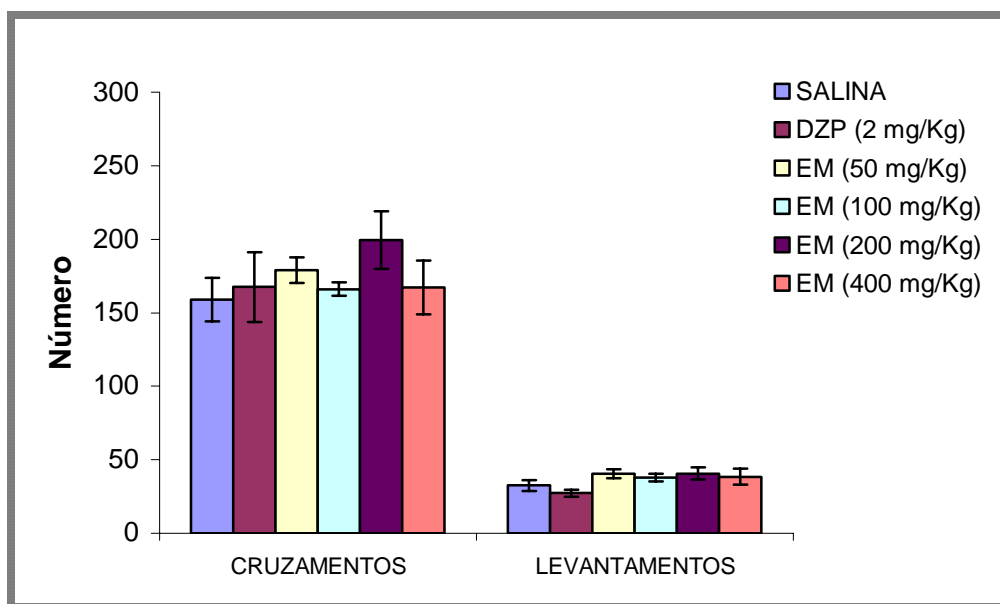


Figura 11 – Efeito (média e EPM) do tratamento agudo (v.o) com o extrato bruto de *Erythrina mulungu* sobre a atividade locomotora de camundongos na arena. $N = 8$ (salina), 9 (DZP), 9 (EM 50 mg/Kg), 9 (EM 100 mg/Kg), 10 (EM 200 mg/Kg), 9 (EM 400 mg/Kg).

FRAÇÃO PURIFICADA RICA EM ALCALÓIDES ERITRÍNICOS (F2)

Labirinto em T elevado

O tratamento agudo com a F2 prejudicou a aquisição da esquiva inibitória do braço aberto do labirinto em T elevado, como demonstrado na figura 12. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do tratamento ($F(4,40) = 7,00$; $p < 0,0001$) e das tentativas ($F(4,160) = 11,18$; $p < 0,0001$), mas não da interação entre tratamento e tentativas ($F(16,160) = 1,48$, $p = 0,112$). A ANOVA de uma via mostrou que houve diferença significativa entre os grupos de tratamento na LB ($F(6,69) = 2,7$; $p < 0,05$), E1 ($F(6,69) = 4,86$; $p < 0,0001$), E2 ($F(6,69) = 7,49$; $p < 0,0001$); E3 ($F(6,69) = 5,60$; $p < 0,0001$) e E4 ($F(6,69) = 7,83$; $p < 0,0001$). Na figura 12 podem ser observadas as diferenças entre os grupos de tratamento, quando comparados com o grupo salina, de acordo com o teste *post hoc* de Duncan.

A ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos ($F(4,40) = 0,96$; $p = 0,46$) na medida de fuga do braço aberto do labirinto em T elevado (figura 12).

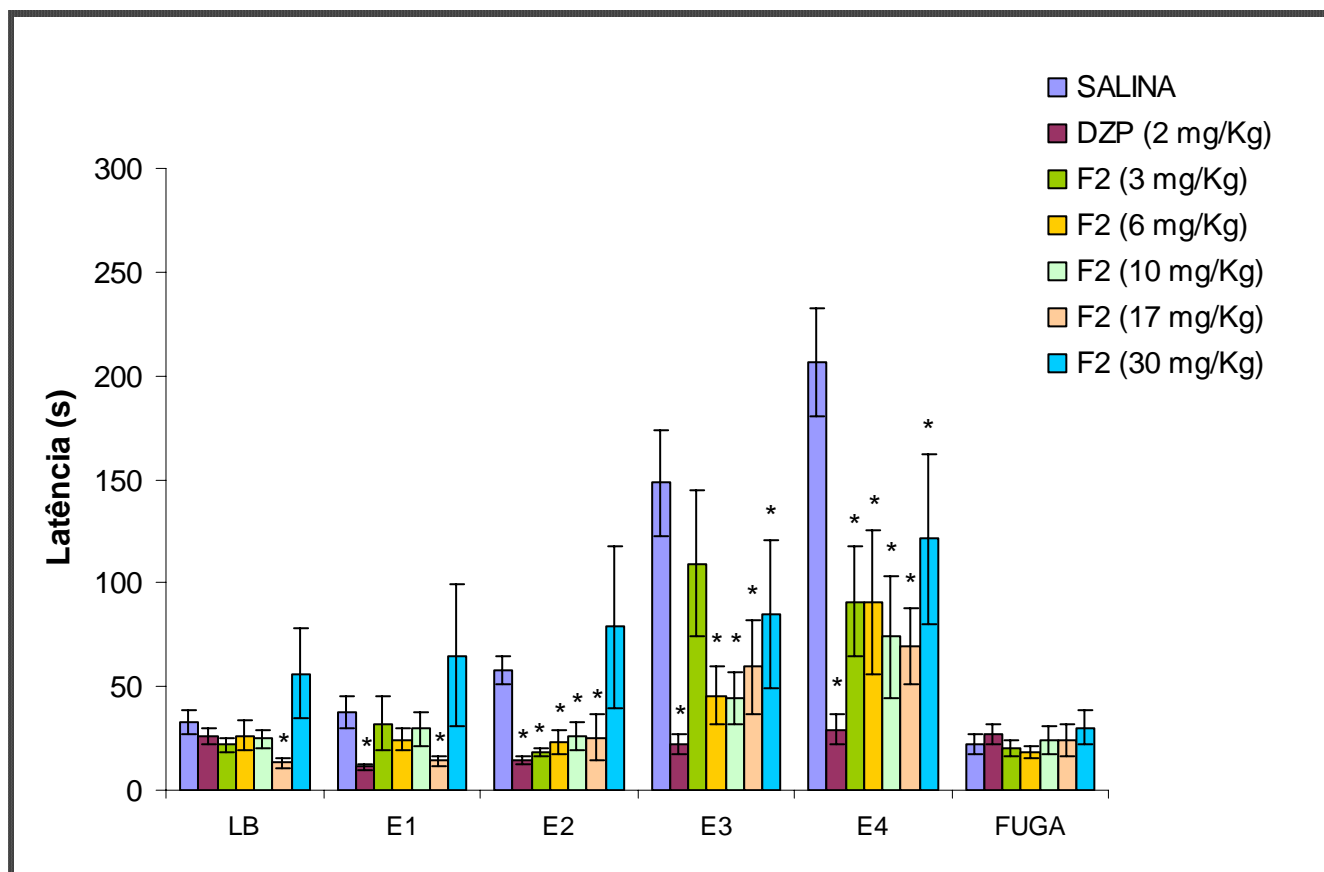


Figura 12 – Efeito (média e EPM) do tratamento agudo (v.o) com a F2 (fração rica em alcalóides) sobre os comportamentos de esquiva inibitória e fuga em camundongos submetidos ao modelo do labirinto em T elevado. $N = 16$ (salina), 16 (DZP), 11 (F2 3 mg/Kg), 8 (F2 6 mg/Kg), 8 (F2 10 mg/Kg), 9 (F2 17 mg/Kg), 8 (F2 30 mg/Kg). * $p < 0,05$ versus salina (Teste *post hoc* de Duncan)

Atividade locomotora - Arena

A atividade locomotora dos animais medida na arena não foi alterada pelo tratamento agudo com nenhuma das doses da F2 (figura 13). A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas entre os grupos na medida do

número de cruzamentos ($F(4,40) = 0,30$; $p = 0,87$), nem na medida do número de levantamentos ($F(4,40) = 0,81$; $p = 0,52$).

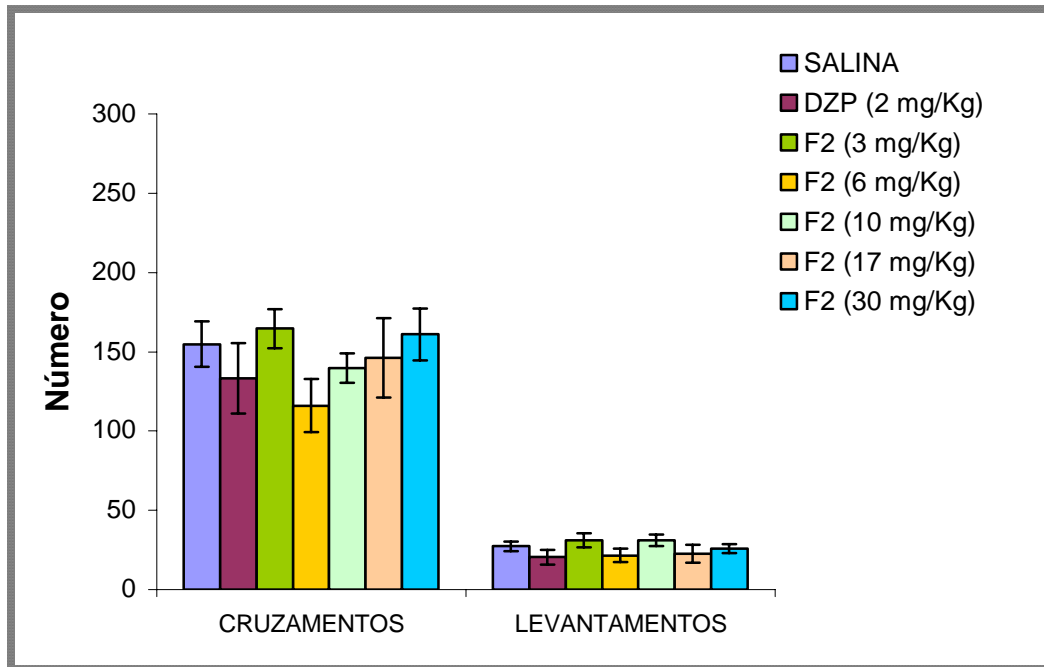


Figura 13 – Efeito (média e EPM) do tratamento agudo (v.o) com a F2 (fração rica em alcalóides) sobre a atividade locomotora de camundongos na arena. $N = 16$ (salina), 16 (DZP), 11 (F2 3 mg/Kg), 8 (F2 6 mg/Kg), 8 (F2 10 mg/Kg), 9 (F2 17 mg/Kg), 8 (F2 30 mg/Kg).

ERITRARTINA

Labirinto em T elevado

A administração oral de eritratina (1) prejudicou a aquisição da esquiiva inibitória dos braços abertos do labirinto em T elevado, como ilustrado na figura 14. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do tratamento ($F(3,31) = 7,65$; $p < 0,001$), das tentativas ($F(4,124) = 18,38$; $p < 0,0001$) e da interação entre tratamento e tentativas ($F(12,124) = 2,14$; $p < 0,01$). A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento na E1 ($F(3,31) = 7,40$; $p < 0,001$), E2 ($F(3,31) = 5,66$; $p < 0,01$), E3 ($F(3,31) = 9,24$; $p < 0,001$) e E4 ($F(3,31) = 3,49$; $p < 0,05$), mas não na latência basal ($F(3,31) = 2,11$; $p = 0,11$).

Para a medida de fuga dos braços abertos do labirinto em T elevado, a ANOVA de uma via mostrou que não houve diferenças significativas entre os grupos de tratamento ($F(3,31) = 0,24$; $p = 0,86$) (figura 14).

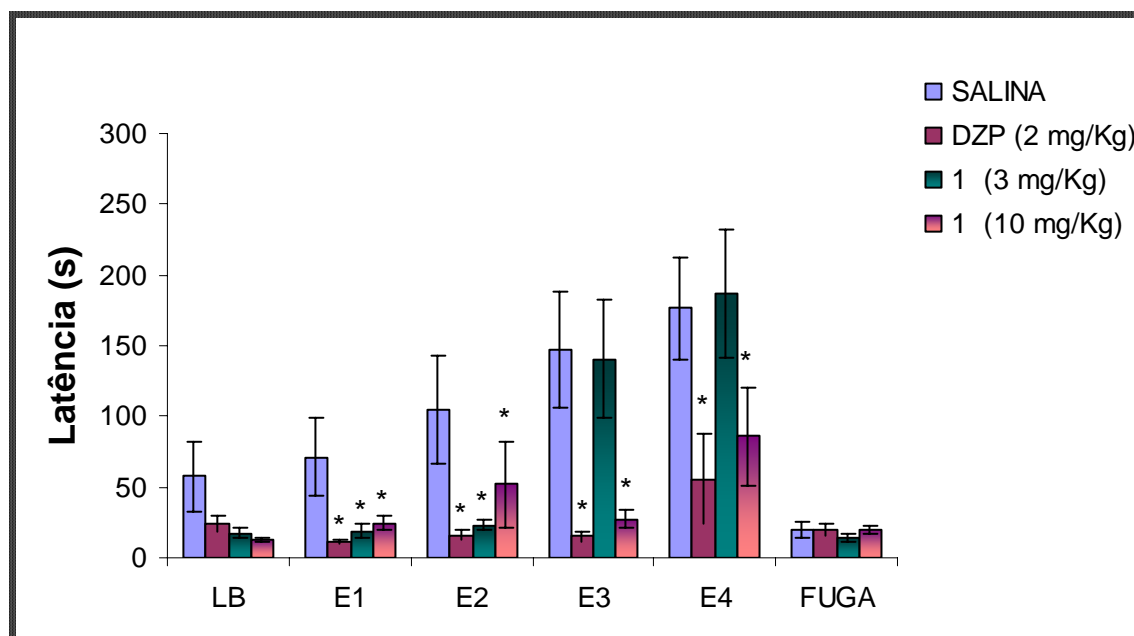


Figura 14 – Efeito (média e EPM) do tratamento agudo (v.o) com eritratina (1) sobre os comportamentos de esquiiva inibitória e fuga em camundongos submetidos ao modelo do labirinto em T elevado. $N = 9$ (salina), 9 (DZP), 9 (1 – 3 mg/Kg), 8 (1 – 10 mg/Kg). * $p < 0,05$ versus salina (Teste *post hoc* de Duncan).

Atividade locomotora – Arena

Os resultados obtidos com a arena mostraram que a eritartina não alterou a atividade locomotora dos animais (figura 15). A ANOVA de uma via mostrou que não houve diferenças significativas entre os grupos quanto às medidas do número de cruzamentos ($F(3,31) = 0,63$; $p = 0,59$) e de levantamentos ($F(3,31) = 1,54$; $p = 0,22$), como pode ser observado na figura 15.

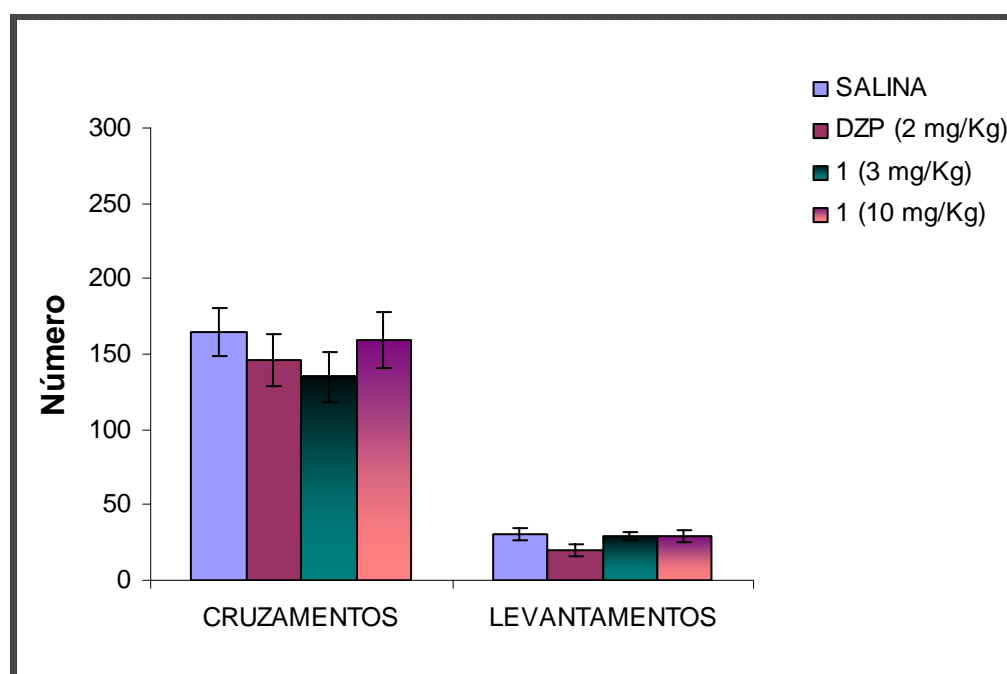


Figura 15 – Efeito (média e EPM) do tratamento agudo (v.o) com eritartina sobre a atividade locomotora de camundongos na arena. $N = 9$ (salina), 9 (DZP), 9 (1 – 3 mg/Kg), 8 (1 – 10 mg/Kg).

ERITRAVINA

Labirinto em T elevado

Na figura 16 podem ser observados os resultados obtidos com a eritravina sobre o comportamento dos camundongos no labirinto em T elevado. A ANOVA de duas vias mostrou que houve efeito significativo do tratamento ($F(3,55) = 13,40$; $p < 0,0001$), das tentativas ($F(4,220) = 44,23$; $p < 0,0001$) e da interação entre tratamento e tentativas ($F(12,220) = 6,33$; $p < 0,0001$). A ANOVA de uma via mostrou que, quando comparados ao grupo controle, os grupos de tratamento apresentaram diferenças significativas nas medidas da E1 ($F(3,55) = 5,94$; $p < 0,001$), E2 ($F(3,55) = 7,80$; $p < 0,001$), E3 ($F(3,55) = 11,88$; $p < 0,0001$) e E4 ($F(3,55) = 19,27$; $p < 0,0001$). As diferenças dos grupos em relação ao grupo controle, de acordo com o teste *post hoc* de Duncan, podem ser observadas na figura 16.

Por outro lado, como demonstrado pela ANOVA de uma via, o tratamento agudo com a eritravina não afetou o comportamento dos animais na medida de fuga do braço aberto do labirinto em T elevado ($F(3,55) = 0,61$; $p = 0,60$) (figura 16).

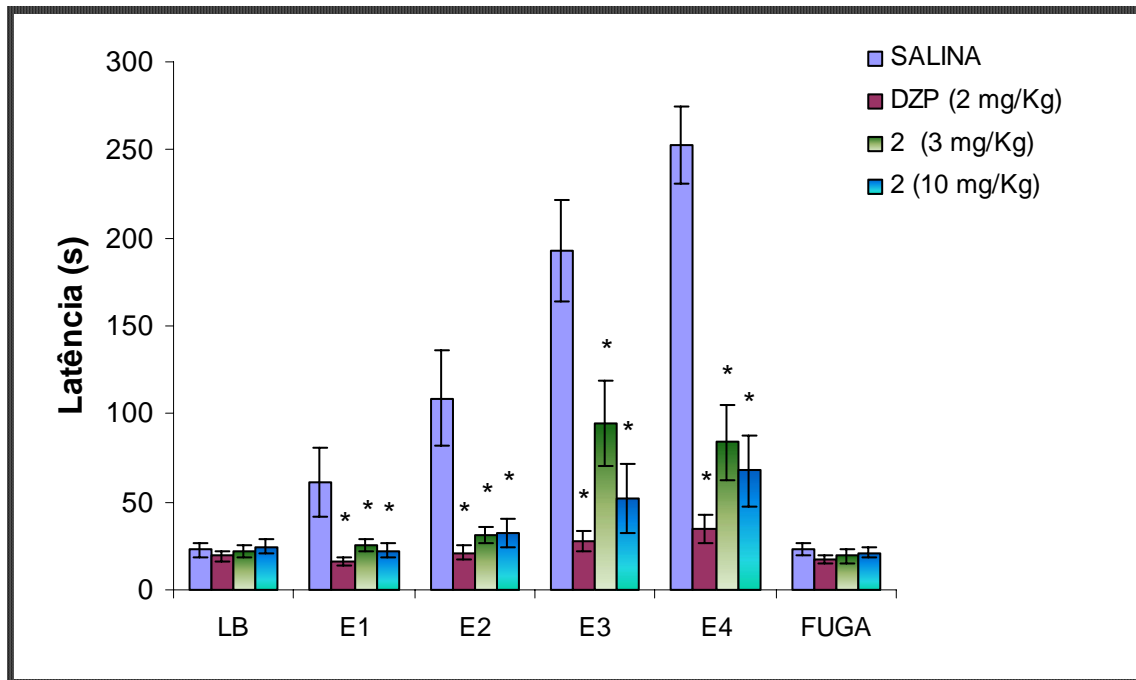


Figura 16 – Efeito (média e EPM) do tratamento agudo (v.o) com eritravina (2) sobre os comportamentos de esquiva inibitória e fuga em camundongos submetidos ao modelo do labirinto em T elevado. $N = 16$ (salina), 14 (DZP), 15 (2 – 3 mg/kg), 14 (2 – 10 mg/Kg). * $p < 0,05$ versus salina (Teste *post hoc* de Duncan)

Atividade locomotora - Arena

A eritravina não alterou a atividade locomotora dos animais na arena como pode ser observado na figura 17. A ANOVA de uma via não mostrou efeito significativo do tratamento na medida do número de cruzamentos dos quadrantes da arena ($F(3,55) = 1,12$; $p = 0,34$), nem na medida do número de levantamentos ($F(3,55) = 2,72$; $p = 0,10$).

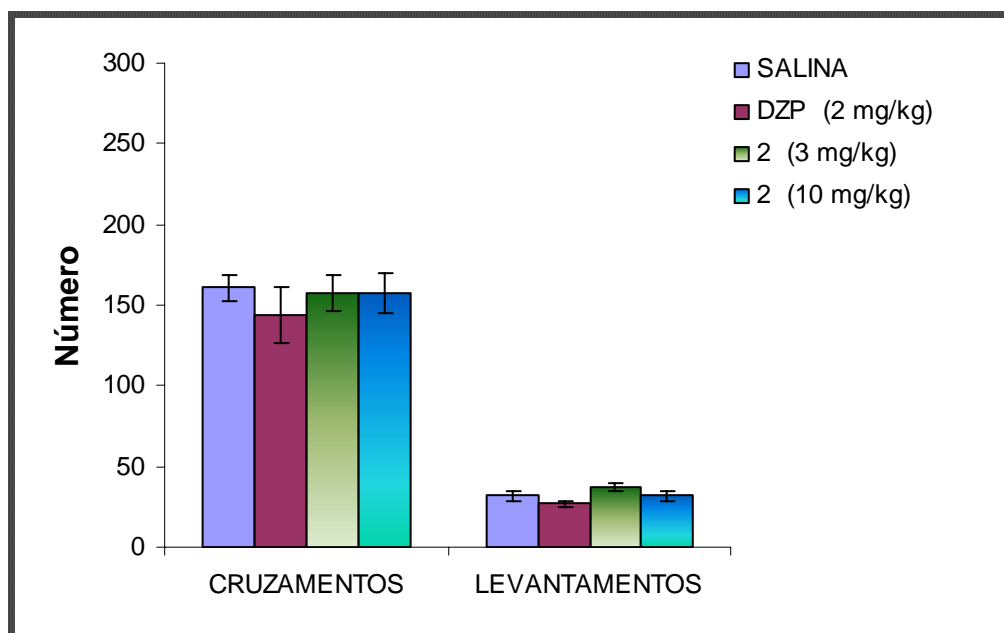


Figura 17 – Efeito (média e EPM) do tratamento agudo (v.o) com eritavina (ERI) sobre a atividade locomotora de camundongos na arena. $N = 16$ (salina), 14 (DZP), 15 (2 – 3 mg/kg), 14 (2 – 10 mg/Kg).

11-OH-ERITRAVINA

Labirinto em T elevado

Como pode ser observado na figura 18, a 11-OH-eritavina prejudicou o desempenho dos animais na tarefa de esquiva inibitória no modelo do labirinto em T elevado. De acordo com a ANOVA de duas vias pode ser observada diferença significativa do tratamento ($F(3,33) = 8,30$; $p < 0,001$), das tentativas ($F(4,132) = 14,75$; $p < 0,0001$) e da interação entre tratamento e tentativas ($F(12,132) = 2,42$; $p < 0,01$). A ANOVA de uma via mostrou diferenças significativas entre os grupos de tratamento na E1 ($F(3,33) = 4,47$; $p < 0,01$), E2 ($F(3,33) = 5,29$; $p < 0,01$), E3 ($F(3,33) = 5,29$; $p < 0,01$) e E4 ($F(3,33) = 10,29$; $p < 0,0001$), mas não na latência basal ($F(3,33) = 0,51$; $p = 0,67$). A figura 18 mostra a diferença entre os grupos quando comparados com o controle, de acordo como o teste *post hoc* de Duncan.

Em relação à medida de fuga dos braços abertos a ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença entre os grupos de tratamento quando comparados como o grupo controle ($F(3,33) = 0,71$; $p = 0,54$) (figura 18).

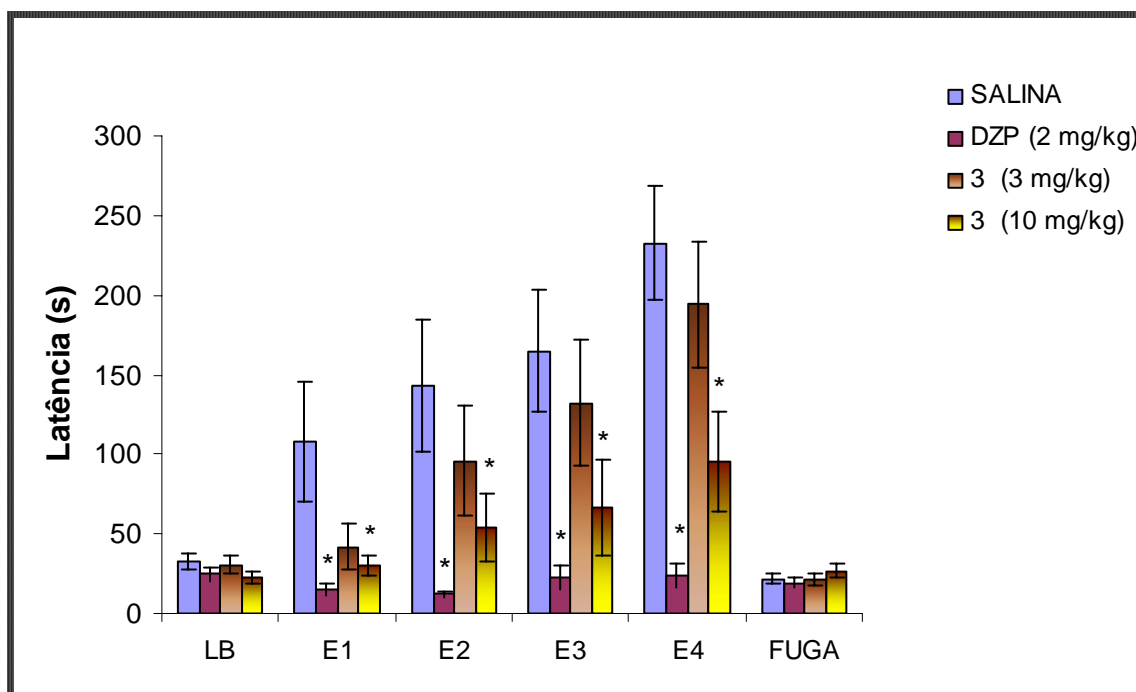


Figura 18 – Efeito (média e EPM) do tratamento agudo (v.o) com a 11-OH-eritavina sobre os comportamentos de esquiva inibitória e fuga em camundongos submetidos ao modelo do labirinto em T elevado. $N = 10$ (salina), 8 (DZP), 10 (3 – 3 mg/Kg), 9 (3 – 10 mg/Kg). * $p < 0,05$ versus salina (Teste *post hoc* de Duncan).

Atividade locomotora - Arena

Na figura 19 estão apresentados os resultados obtidos com o teste da atividade locomotora. A ANOVA de uma via mostrou que nenhuma das doses de 11-OH-eritavina (3 ou 10 mg/Kg) alteraram a atividade locomotora dos animais, tanto em relação ao número de cruzamentos dos quadrantes da arena ($F(3,33) = 0,76$; $p = 0,51$), quanto ao número de levantamentos realizados ($F(3,33) = 1,20$; $p = 0,32$).

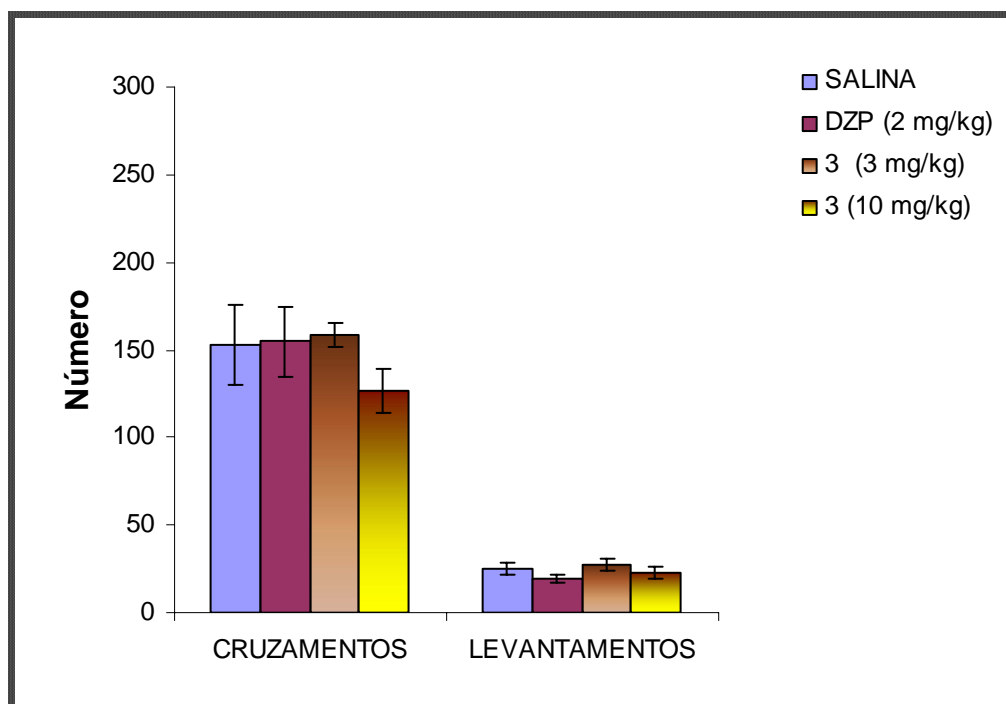


Figura 19 – Efeito (média e EPM) do tratamento agudo (v.o) com 11-OH-eritavina (**3**) sobre a atividade locomotora de camundongos na arena. *N* = 10 (salina), 8 (DZP), 10 (**3** – 3 mg/Kg), 9 (**3** – 10 mg/Kg).

4.2.2. EXPERIMENTO 2 – Modelo da transição claro-escuro

EXTRATO BRUTO

A figura 20 mostra os resultados obtidos com o extrato bruto de EM com o modelo da TCE. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento na medida de tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado ($F(4,43) = 4,82; p < 0,01$) (figura 20 A). O teste *post hoc* de Duncan revelou um aumento desta medida nos grupos tratados com 100 mg/Kg e 200 mg/Kg de EM e com o DZP, quando comparados ao grupo controle. De acordo com a ANOVA de uma via não houve diferenças significativas do tratamento sobre o número de transições entre os dois compartimentos ($F(4,43) = 1,34; p = 0,26$) (figura 20 B).

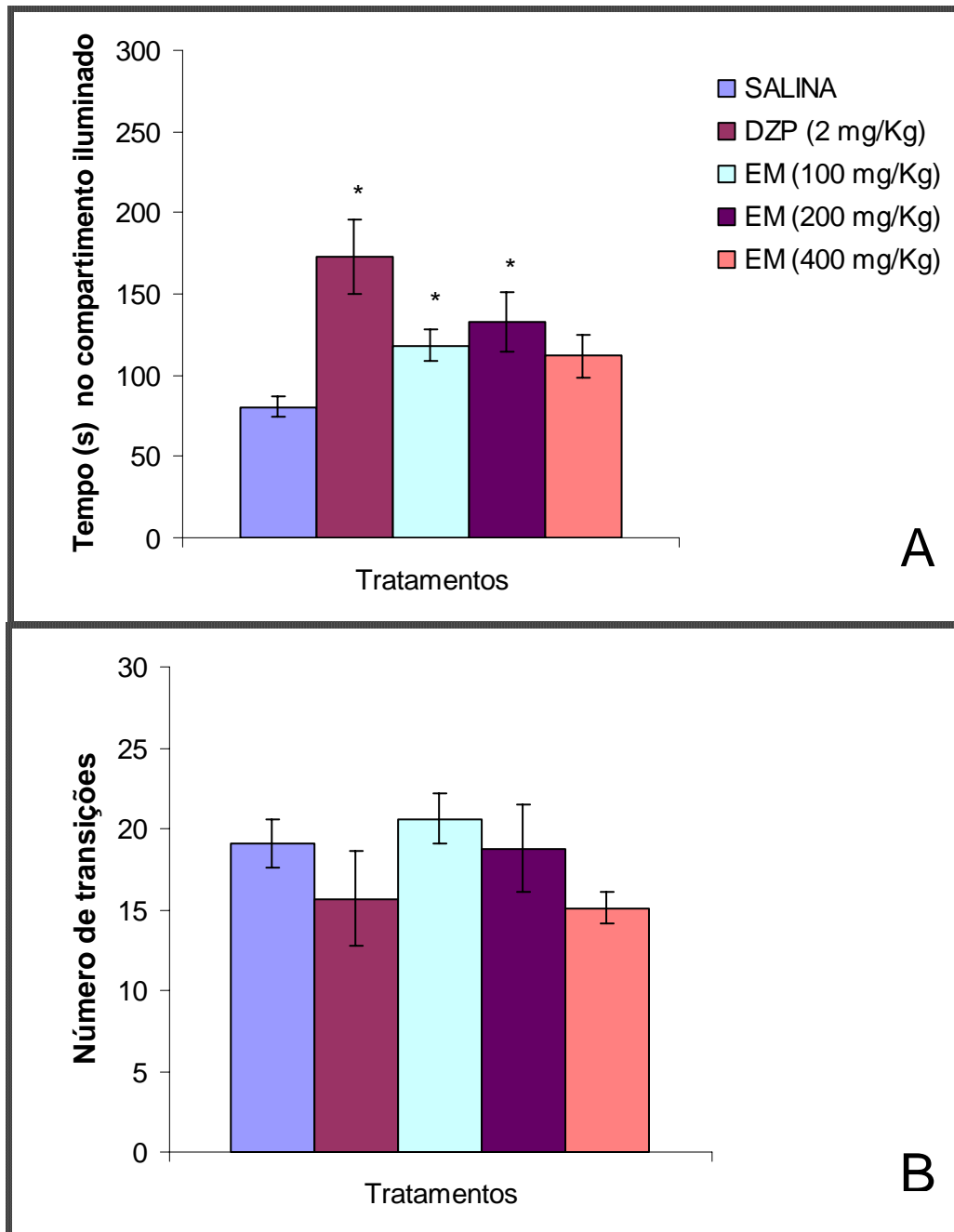


Figura 20 – Efeito (média e EPM) do tratamento agudo (v.o) com o extrato bruto de *Erythrina mulungu* (EM) sobre o tempo gasto pelos camundongos no compartimento iluminado (A) e número de transições entre os dois compartimentos do modelo da transição claro-escuro (B). $N = 11$ (salina), 9 (DZP), 10 (EM 100 mg/Kg), 9 (EM 200 mg/Kg), 9 (EM 400 mg/Kg). * $p < 0,05$ versus salina (Teste *post hoc* de Duncan)

ERITRARTINA

Os efeitos obtidos com a eritratina (1) no modelo de transição claro-escuro podem ser observados pelos dados apresentados na figura 21. A ANOVA de uma via revelou efeito significativo na medida de tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado ($F(3,49) = 3,66; p < 0,01$) (figura 21 A). Este efeito, de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$), foi observado somente para o grupo de animais tratados com o DZP (2 mg/Kg).

A ANOVA de uma via não mostrou efeito significativo do tratamento na medida do número de transições entre os dois compartimentos do modelo ($F(3,49) = 1,19; p < 0,31$) (figura 21 B).

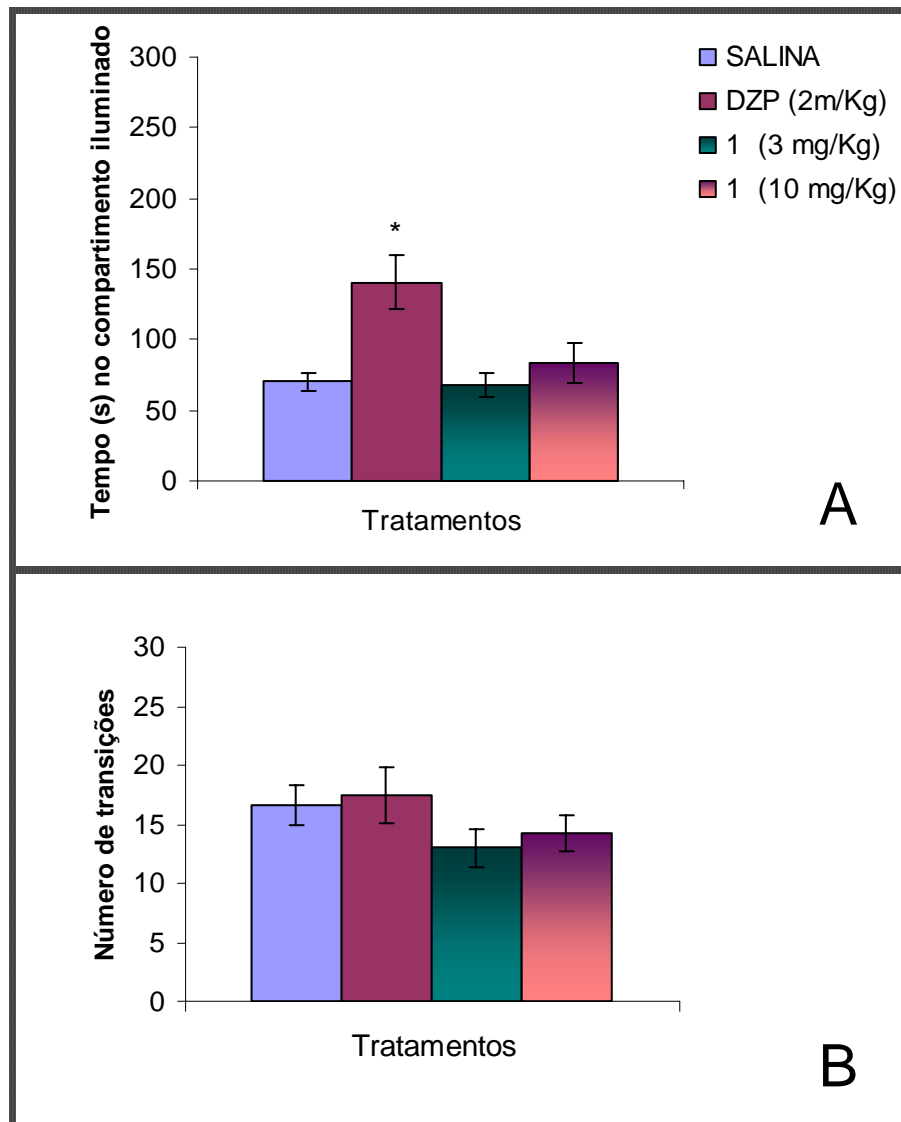


Figura 21 – Efeito (média e EPM) do tratamento agudo (v.o) com eritratina (1) sobre o tempo gasto pelos camundongos no compartimento iluminado (A) e número de transições entre os dois compartimentos do modelo da transição claro-escuro. $N = 17$ (salina), 12 (DZP), 12 (1 – 3 mg/Kg), 12 (1 – 10 mg/Kg) * $p < 0,05$ versus salina (Teste *post hoc* de Duncan)

ERITRAVINA

Os resultados obtidos com a eritravina (2) em camundongos submetidos ao modelo da transição claro escuro estão demonstrados na figura 22. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento na medida de tempo gasto no compartimento iluminado ($F(3,39) = 4,27; p = 0,01$) (figura 22 A). O teste *post hoc* de Duncan mostrou que o tempo gasto no compartimento iluminado dos grupos de animais tratados oralmente com as doses de 3 mg/Kg e 10 mg/Kg de eritravina e com o DZP foi significativamente maior que o grupo controle. Para a medida do número de transição entre os dois compartimentos, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas entre os grupos ($F(3,39) = 1,13; p = 0,34$) (figura 22 B).

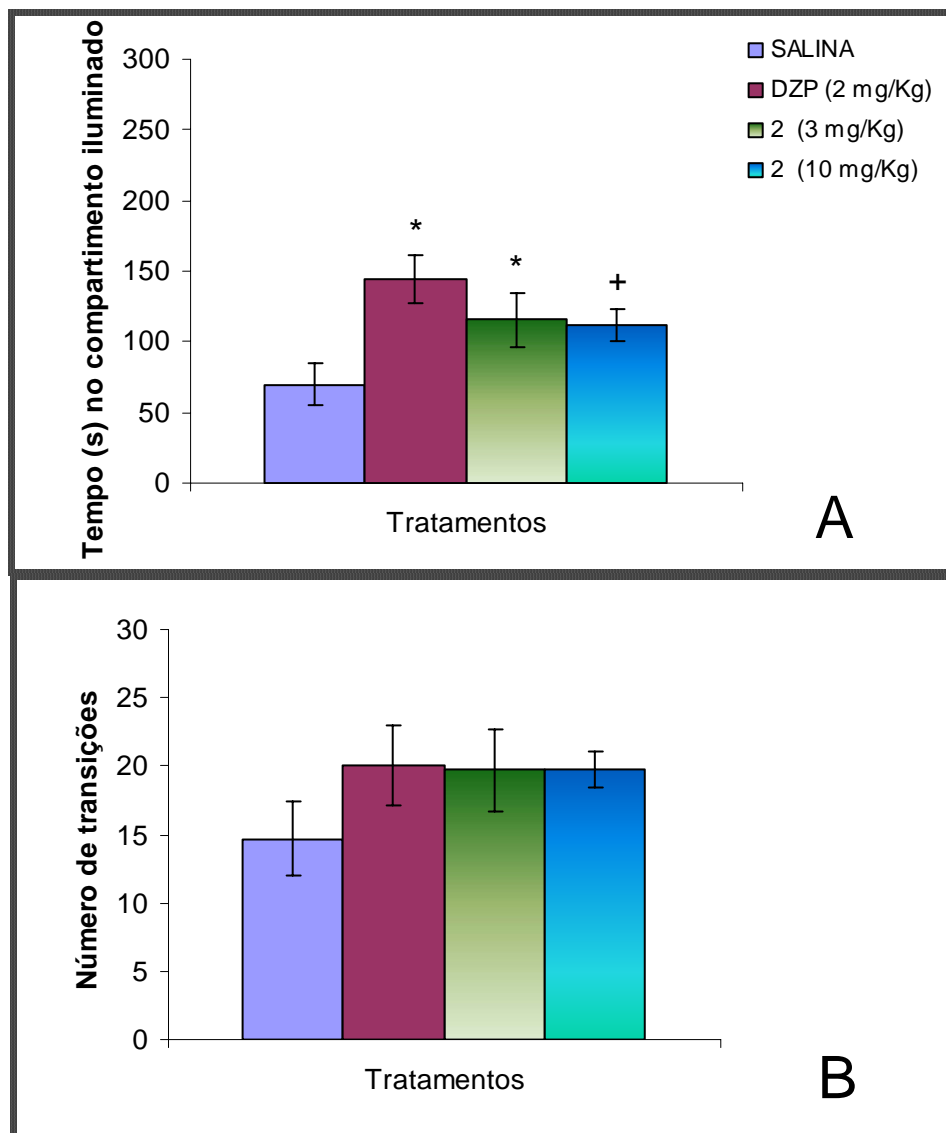


Figura 22 – Efeito (média + EPM) do tratamento agudo (v.o) com eritavina (**2**) sobre o tempo gasto pelos camundongos no compartimento iluminado e número de transições entre os dois compartimentos do modelo da transição claro-escuro. $N = 12$ (salina), 10 (DZP), 10 (**2** – 3 mg/Kg), 10 (**2** – 10 mg/Kg). * $p < 0,05$; + $p = 0,06$ versus salina (Teste *post hoc* de Duncan)

11-HIDROXI-ERITRAVINA

Na figura 23 estão demonstrados os resultados obtidos com a 11-hidroxi-eritravina no modelo da transição claro escuro. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento no tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado ($F(3,38) = 3,14; p < 0,05$) (figura 23 A) e também no número de transições entre os dois compartimentos ($F(3,38) = 3,36; p < 0,05$) (figura 23 B). O teste *post hoc* de Duncan revelou que o DZP e a 11-hidroxi-eritravina (10 mg/Kg) aumentaram significativamente o tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado, quando comparados com o grupo controle. O número de transições entre os dois compartimentos do modelo também foi aumentado pela administração de 11-hidroxi-eritravina, com a dose de 3 mg/Kg ($p < 0,05$).

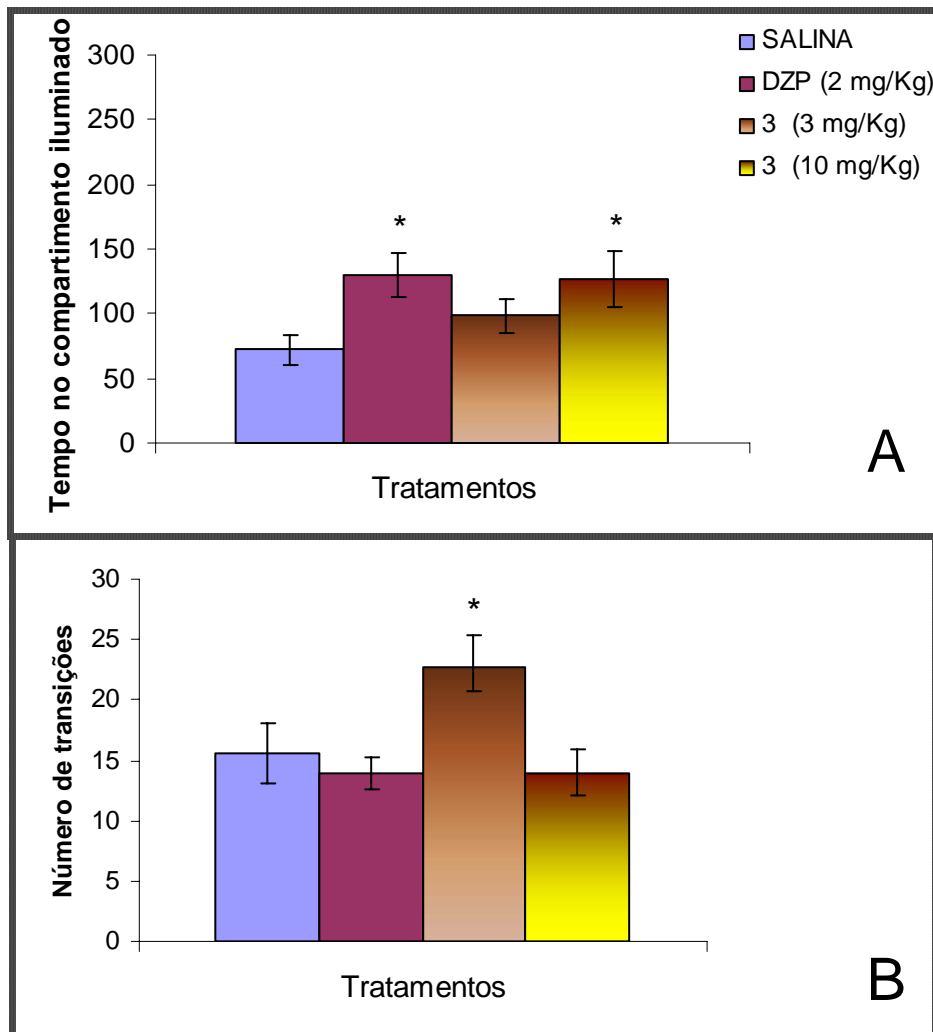


Figura 23 – Efeito (média + EPM) do tratamento agudo (v.o) com a 11-OH-eritavina sobre o tempo gasto pelos animais (A) e número de transições entre os dois compartimentos do modelo da transição claro-escuro (B). $N = 12$ (salina), 12 (DZP), 9 (**3** – 3 mg/Kg), 9 (**3** – 10 mg/Kg). * $p < 0,05$ versus salina (Teste *post hoc* de Duncan)

4.2.3. EXPERIMENTO 3 - Labirinto em cruz elevado

Na figura 24 podem ser observados os resultados obtidos o extrato bruto de EM no modelo do LCE. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento na medida de % de entradas nos braços abertos ($F(4,38) = 4,00$; $p < 0,01$) e de % de tempo gasto nos braços abertos ($F(4,38) = 8,95$; $p < 0,001$). Comparações posteriores revelaram que apenas o grupo tratado com DZP diferiu do grupo controle (teste *post hoc* de Duncan, $p < 0,05$). A ANOVA não revelou diferenças significativas entre os grupos para a medida do número de entradas nos braços fechados ($F(4,38) = 1,48$; $p = 0,22$).

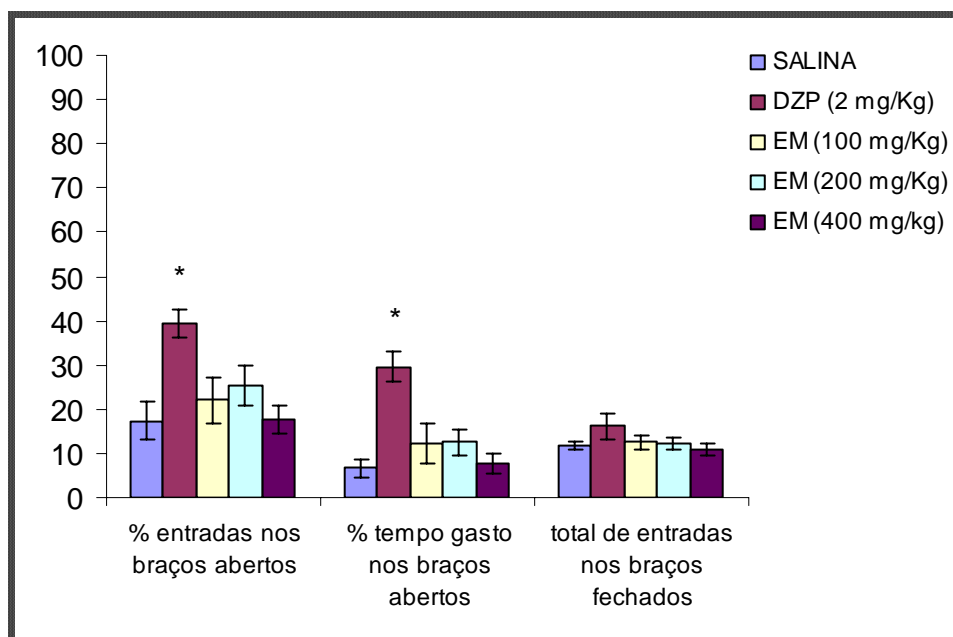


Figura 24 – Efeito do tratamento agudo (v.o) com o extrato bruto de Erythrina mulungu (EM) sobre o comportamento dos camundongos no modelo do labirinto em cruz elevado. $N = 9$ (salina), 7 (DZP), 9 (EM 100 mg/Kg), 9 (EM 200 mg/Kg), 9 (EM 400 mg/Kg). * $p < 0,05$ versus salina (Teste *post hoc* de Duncan)

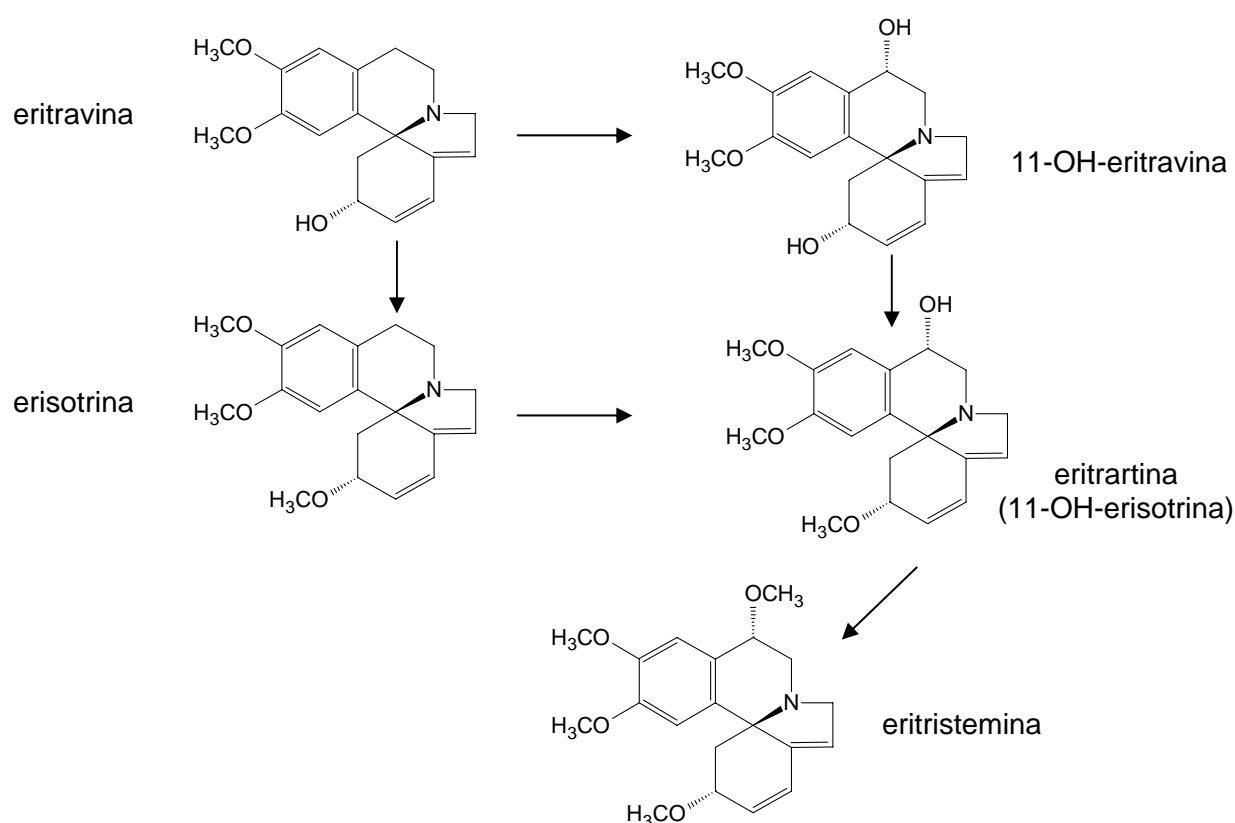
5. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que o extrato hidroalcoólico bruto das flores de *Erythrina mulungu* apresentou efeito ansiolítico em camundongos expostos aos modelos do labirinto em T elevado (100, 200 e 400 mg/kg) e da transição claro-escuro (100 e 200 mg/kg). A partir do extrato hidroalcoólico bruto foi separada uma fração contendo uma mistura de alcalóides (F2), a qual apresentou efeito ansiolítico no modelo do labirinto em T elevado (3 – 30 mg/kg). Como esta fração mostrou resultados positivos, seus alcalóides, presentes em mistura, foram separados. Desta forma, foram isolados os alcalóides eritartina, eritravina e 11-OH-eritravina, que apresentaram efeito ansiolítico (3 e 10 mg/kg) nos modelos do labirinto em T elevado e da transição claro-escuro. Estes resultados mostraram que são os alcalóides eritrínicos os responsáveis pelo efeito ansiolítico observado com o extrato.

Sarragioto e colaboradores (1981) já haviam reportado a presença da eritartina, da *N*-óxido-eritartina, da erisotrina e da *N*-óxido-erisotrina, no extrato metanólico bruto de *E. mulungu*. No presente trabalho, porém, somente o isolamento da eritartina, a partir do extrato hidroalcoólico, corrobora estes resultados. No entanto, o *N*-óxido-eritartina, a erisotrina e seu respectivo *N*-óxido não foram encontrados. A eritravina já havia sido isolada anteriormente do extrato das sementes de *E. folkersii* (MILLINGTON *et al.*, 1974) e de *E. cochleata* (CHAWLA *et al.*, 1985), mas o presente trabalho registra a primeira vez que está sendo isolada de *E. mulungu*.

Pela primeira vez na literatura está sendo reportado o isolamento da 11-OH-eritravina. Considerando que as principais diferenças entre os alcalóides eritrínicos ocorre nas posições dos carbonos C-3 e C-11, este resultado

esclarece mais uma etapa da biossíntese destes alcalóides. A formação da 11-OH-eritravina ocorre pela adição de uma hidroxila na posição C-11 da eritravina. Este mesmo processo ocorre na biossíntese da eritartina, uma vez que essa substância é formada pela hidroxilação da erisotrina (ver abaixo) na posição C-11. Sugere-se aqui que o próximo passo na rota biossintética desses alcalóides seria a metoxilação na posição C-11, a partir da eritartina, resultando em outro alcalóide eritrínico já conhecido, a eritristemina (BARTON *et al.*, 1973). O esquema 1 mostra a rota biossintética proposta para os alcalóides citados acima.



Esquema 1 – Rota biossintética dos alcalóides eritrínicos 3, 11, 14, 15 substituídos.

Os resultados do presente trabalho sugerem ser os alcalóides de *E. mulungu*, eritartina, eritravina e 11-hidroxi-eritravina as substâncias responsáveis pelo efeito ansiolítico do extrato bruto da planta.

O tratamento com o extrato bruto de *E. mulungu* alterou o comportamento dos animais tanto na medida de esquiva inibitória quanto na fuga do braço aberto do labirinto em T elevado, indicando um efeito ansiolítico. As doses de 100, 200 e 400 mg/Kg administradas agudamente prejudicaram a aquisição da esquiva inibitória dos braços abertos. Adicionalmente, a dose de 400 mg/Kg também prejudicou a fuga dos braços abertos do labirinto. Estes resultados confirmam evidências recentes que demonstraram efeito ansiolítico agudo (200 mg/kg) e crônico (50, 100 e 200 mg/Kg) do extrato de *E. mulungu*, na medida de esquiva no labirinto em T para ratos (ONUSIC *et al.*, 2002; 2003). No entanto, Onusic e colaboradores (2003) observaram efeito ansiolítico na medida de fuga em ratos somente após tratamento crônico de 21 dias. Esta diferença nos resultados obtidos com a medida da fuga pode ser explicada em relação à diferença do comportamento realizado por ratos e roedores durante a execução desta tarefa (JARDIM *et al.*, 1999; CARVALHO-NETTO e NUNES-DE-SOUZA, 2004).

No trabalho de validação do labirinto em T para camundongos, Carvalho-Netto e Nunes-de-Souza (2004) sugerem que camundongos apresentam altas latências de saída do braço aberto (± 20 s) quando comparados com ratos (± 10 s), pois perdem mais tempo realizando comportamentos de avaliação de risco. Blanchard e colaboradores (2003) também sugerem que camundongos executam comportamentos de avaliação de risco com mais freqüência do que os ratos no modelo da bateria de testes

defensivos. Carvalho-Netto e Nunes-de-Souza (2004) mostraram que o tratamento agudo com a buspirona, um ansiolítico conhecido por diminuir a frequência de avaliação de risco em camundongos (BLANCHARD *et al.*, 1998), nas doses de 1,0 e 2,0 mg/Kg, diminuiu a latência de saída do braço aberto do labirinto em T elevado pelos animais, um efeito considerado como ansiolítico. Considerando as informações acima, pode-se sugerir que o extrato de *Erythrina mulungu* inibiu o comportamento de avaliação de risco realizado pelos camundongos durante a tarefa de fuga. No entanto, este comportamento não foi quantificado no presente trabalho, pois se fazem necessários experimentos de validação comportamental com o labirinto em T elevado para padronização das medidas etológicas.

O labirinto em T foi utilizado como teste para biomonitoramento com a intenção de se selecionar uma fração para dar continuidade ao processo de identificação das substâncias ativas do extrato. Sendo assim, foi selecionada uma fração purificada (F2), rica em alcalóides eritrínicos como substâncias majoritárias. Foi observado que esta fração demonstrou efeito ansiolítico na medida de esquiva inibitória dos braços abertos. A administração aguda de F2, nas doses de 3, 6, 10 e 17 mg/Kg, prejudicou a aquisição da esquiva inibitória, de forma semelhante ao ansiolítico clássico diazepam, indicando um efeito antiaversivo da fração.

Desta forma, deu-se continuidade ao processo de isolamento das substâncias ativas a partir da F2. Foram isolados então, a eritartina, a eritravina e um novo alcalóide eritrínico, a 11-OH-eritravina. Quando testadas isoladamente no modelo do labirinto em T elevado, foi observado que a eritartina (3 e 10 mg/Kg), eritravina (3 e 10 mg/Kg) e a 11-hidroxi-eritravina (10

mg/Kg) apresentaram efeito ansiolítico na medida da esquia inibitória dos braços abertos, porém não alteraram a fuga, um resultado que se mostrou semelhante ao provocado pelo diazepam.

Diante destes resultados, é plausível sugerir que o efeito ansiolítico observado com o extrato bruto de *Erythrina mulungu* deve-se, pelo menos em parte, à presença de alcalóides eritrínicos em sua composição. No entanto, o efeito observado na medida de fuga dos braços abertos com o extrato brutos não foi reproduzido com a F2 e nem com os alcalóides isolados. Deve-se considerar que os efeitos observados com extratos de plantas, muitas vezes, são resultantes de atividade sinérgica ou aditiva entre os diferentes constituintes químicos presentes em sua constituição. Como exemplo, pode-se citar a ausência de efeito no teste do nado forçado dos constituintes ativos de *Hypericum perforatum*, as naftodiantronas, quando administrados isoladamente. Butterweck e colaboradores (1998) mostraram que a adição de uma procianidina, outro constituinte presente no extrato bruto de *Hypericum*, aumentou a solubilidade das naftodiantronas em suspensão aquosa. Os autores mostraram que quando administrados em presença da procianidina, as naftodiantronas apresentaram efeito semelhante ao extrato bruto de *Hypericum perforatum* no teste do nado forçado. Desta forma, o efeito observado com extrato bruto de *Erythrina mulungu* na fuga dos braços abertos do labirinto em T elevado pode ser resultado da soma da atividade entre os alcalóides eritrínicos e outras substâncias presentes em sua composição ou da interação entre suas atividades, ou até mesmo, ser devido ao efeito de outra substância presente nas frações que não foram testadas.

Com o propósito de se confirmar o efeito ansiolítico observado no teste do labirinto em T elevado, no presente estudo, o extrato bruto de *E. mulungu* e os alcalóides eritartina, eritavina e 11-OH-eritavina foram testados também no modelo da transição claro-escuro, um modelo animal de ansiedade clássica utilizado para o estudo da atividade de drogas gabaérgicas e serotoninérgicas (BOURIN e HASCÖET, 2003). Os resultados mostraram efeito ansiolítico do extrato bruto (100 e 200 mg/Kg) e dos alcalóides eritavina (3 e 10 mg/Kg) e 11-hidroxi-eritavina (10 mg/Kg) na medida de tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado. Resultados positivos neste modelo com o extrato de *E. mulungu* haviam sido demonstrados recentemente num estudo com ratos (ONUSIC *et al.*, 2002). Os autores observaram que os tratamentos agudo (200 e 400 mg/Kg) e crônico (50 mg/Kg) com o extrato bruto da planta aumentaram o número de transições entre os dois compartimentos do modelo e o tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado. No presente trabalho, foi observado também que a 11-OH-eritavina, administrada na menor dose (3 mg/Kg), aumentou o número de transições entre os dois compartimentos do modelo. Tem sido sugerido que um aumento nesta medida pode refletir alterações sobre atividade locomotora dos animais devido a um efeito estimulante do composto administrado (HASCÖET e BOURIN, 1998; BOURIN e HASCÖET, 2003). Por outro lado, alterações nesta medida podem estar relacionadas somente à desinibição comportamental decorrente do efeito ansiolítico (HASCÖET e BOURIN, 1998; BOURIN e HASCÖET, 2003). Sendo assim, os resultados obtidos na medida do número de transições entre os compartimentos do modelo da transição claro-escuro devem sempre ser comparados com resultados obtidos em outros testes de atividade locomotora.

Desta forma, como os resultados obtidos no presente trabalho com a arena mostraram que a 11-OH-eritrovina não alterou a atividade locomotora dos animais, pode-se sugerir que a dose de 3 mg/Kg deste alcalóide atenuou seletivamente a ansiedade no modelo da transição claro-escuro.

Em conjunto, os resultados obtidos no modelo da transição claro-escuro reforçam a hipótese de que o efeito ansiolítico observado com o extrato bruto está relacionado com a presença de alcalóides eritrínicos em sua composição.

No entanto, deve-se ressaltar aqui a ausência de efeitos da eritrovina com as doses de 3 e 10 mg/Kg no modelo da transição claro-escuro. Esta ausência de atividade pode estar relacionada com as doses utilizadas, portanto, faz-se necessário um estudo utilizando-se um espectro maior de doses para se confirmar ou rejeitar a propriedade antiaversiva deste composto eritrínico, nos parâmetros medidos no modelo da transição claro-escuro. A diferença dos resultados observados entre a eritratina, eritrovina e 11-OH-eritrovina pode trazer informações importantes para futuros estudos sobre a relação estrutura-atividade dos alcalóides eritrínicos.

Considerando que alguns compostos utilizados na farmacoterapia para o tratamento da ansiedade generalizada, como o BDZ, diazepam, e o agonista de receptores serotoninérgicos do tipo 1A, a buspirona (RICKELS *et al.*, 1993; LADER, 1998; DAVIDSON JR., 2001), os quais apresentam efeito ansiolítico na medida de esquiva inibitória do braço aberto do labirinto em T elevado (GRAEFF *et al.*, 1993; VIANA *et al.*, 1994; GRAEFF *et al.*, 1998; CARVALHO-NETTO e NUNES-DE-SOUZA, 2004) e no modelo da transição claro-escuro (MERLO PICH e SAMANIN, 1989; CHAUOFF *et al.*, 1997; HASCÖET e BOURIN, 1998; BOURIN e HASCÖET, 2003), alguns autores sugerem que os

comportamentos de defesa dos animais observados nestes modelos podem ser correlacionados, em termos clínicos, com o distúrbio da ansiedade generalizada (GRAEFF *et al.*, 1993; VIANA *et al.*, 1994; GRAEFF *et al.*, 1998; GRAEFF e ZANGROSSI, 2002; BOURIN e HASCÖET, 2003). Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho fornecem importantes informações para futuros estudos clínicos voltados a avaliar o potencial efeito ansiolítico de preparações fitoterápicas contendo extratos de *Erythrina mulungu* ou as suas substâncias isoladas sobre o distúrbio de ansiedade generalizada.

A ausência de efeito ansiolítico no teste do labirinto em cruz elevado com o extrato bruto de *E. mulungu* corrobora resultados anteriores onde foi observado que mesmo usando-se doses variando de 200-800 mg/Kg o extrato da planta não alterou as medidas de ansiedade quando comparados com o grupo controle (VASCONCELOS *et al.*, 2004). Tem sido observado que drogas ansiolíticas que atuam sobre o sistema serotoninérgico não apresentam efeito ansiolítico no modelo do labirinto em cruz elevado, ou podem apresentar até mesmo efeito ansiogênico. Tais evidências parecem enfraquecer a validade preditiva do modelo para drogas serotoninérgicas (HANDLEY e MACBLANE, 1993; GRAEFF *et al.*, 1993). Alguns autores têm atribuído estes resultados contraditórios à ineficiência do modelo em separar os diferentes subtipos de ansiedade. Dentro deste contexto, o labirinto em cruz elevado tem sido considerado um modelo misto de ansiedade (HANDLEY e MACBLANE, 1993; ZANGROSSI JR e GRAEFF, 1997).

A determinação dos mecanismos envolvidos no efeito ansiolítico dos alcalóides eritrínicos não foi objeto do presente estudo. No entanto, estudos futuros serão de grande importância para demonstrarem como os alcalóides

presentes no extrato de *Erythrina mulungu* afetam a neurobiologia da ansiedade. Hipoteticamente, pode-se sugerir que os alcalóides eritrínicos poderiam atuar sobre o complexo de receptores GABA/Benzodiazepínicos, bem como sobre os receptores serotoninérgicos 5-HT1A, 5-HT2 ou 5-HT3. Esta hipótese é baseada em estudos prévios que demonstram a participação destes sistemas de receptores no efeito ansiolítico de algumas drogas. Como apresentado acima, tem sido demonstrado que as medidas de esquivia inibitória dos braços abertos do labirinto em T elevado e o tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado do modelo da transição claro-escuro são sensíveis ao efeito ansiolítico de baixas doses de drogas benzodiazepínicas, como o diazepam, bem como a drogas serotoninérgicas, como o agonista de receptores 5-HT1A, a buspirona, e o antagonista de receptores 5-HT2, a ritanserina (VIANA *et al.*, 1994; GRAEFF *et al.*, 1998; CARVALHO-NETTO e NUNES-DE-SOUZA, 2004; HASCÖET e BOURIN, 1998; BOURIN e HASCÖET, 2003). Ademais, tem sido também demonstrado efeito ansiolítico do antagonista de receptores 5-HT3, como o ondansetron e o zacopride, em diferentes modelos de ansiedade, incluindo o modelo da transição claro-escuro (JOHNSON e YOUNG, 1991; OLIVER *et al.*, 2000; BOURIN e HASCÖET, 2003).

Considerando que drogas que atuam sobre o sistema de receptores GABA/Benzodiazepínicos, como o diazepam, que em doses altas prejudica a atividade locomotora e que no presente trabalho o extrato bruto de *E. mulungu*, a eritartina, a eritravina e a 11-OH-eritravina não alteraram a locomoção dos animais, mesmo com as doses mais altas, é plausível sugerir que não há envolvimento deste sistema de receptores, pelo menos diretamente, na atividade ansiolítica destes compostos eritrínicos.

Apesar de muitos trabalhos mostrarem a participação dos sistemas de receptores GABA/Benzodiazepínicos e serotoninérgicos 5-HT1A e 5-HT2 na modulação da ansiedade, não se pode descartar a participação dos receptores 5-HT3 na atividade ansiolítica de *E. mulungu*. Evidências para esta hipótese podem ser observadas em alguns estudos *in vitro*. Foi demonstrado que o extrato bruto de *E. vespertilio* inibiu a liberação de serotonina plaquetária (ROGER *et al.*, 2001). Esse tem sido um modelo *in vitro* muito utilizado para se estudar a liberação de serotonina cálcio-dependente, que é o modo de ação dos receptores 5-HT3 (ROGER *et al.*, 2001). Adicionalmente, em outro estudo, foi observado que o alcalóide eritrínico β -eritroidina inibiu os efeitos da serotonina sobre os receptores 5-HT3 de gerar correntes elétricas em oócitos de *Xenopus*, o que foi considerado um efeito antagonista (ELSELEÉ *et al.*, 1993). Considerando os estudos *in vitro*, pode-se sugerir que o efeito ansiolítico de *E. mulungu* pode estar relacionado à atividade de seus alcalóides, a saber, a eritartina, a eritravina e a 11-OH-eritravina, como antagonistas dos receptores serotoninérgicos 5-HT3, assim como observado com a β -eritroidina. No entanto, esta hipótese necessita ser testada empiricamente por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*.

Os resultados do presente trabalho mostraram que um novo alcalóide, a 11-OH-eritravina, bem como dois outros já conhecidos, a eritartina e a eritravina, isolados de *Erythrina mulungu*, parecem ser responsáveis, pelo menos em parte, pelos efeitos ansiolíticos desta planta, o que confirma sua ampla utilização popular como “calmante”.

6. CONCLUSÕES

- 1) O extrato bruto de *Erythrina mulungu* (100 – 400 mg/Kg) e os alcalóides eritratina, eritravina e 11-OH-eritravina (3 e 10 mg/Kg) prejudicaram a esquivia inibitória dos braços abertos do labirinto em T elevado, um efeito considerado como ansiolítico.
- 2) O extrato bruto de *Erythrina mulungu* na dose de 400 mg/Kg diminuiu a latência de fuga do braço aberto do labirinto em T elevado, o que tem sido considerado com um efeito ansiolítico
- 3) O extrato bruto de *Erythrina mulungu* (100 – 400 mg/Kg) e os alcalóides eritravina e 11-OH-eritravina (3 e 10 mg/Kg) aumentaram o tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado do modelo da transição claro-escuro, o que pode ser considerado como efeito ansiolítico.
- 4) A 11-OH-eritravina na dose de 3 mg/Kg aumentou o número de transições entre os compartimentos do modelo da transição claro-escuro, o que pode ser considerado como um efeito ansiolítico uma vez que este composto não alterou as medidas de atividade locomotora na arena.
- 5) O extrato bruto de *Erythrina mulungu* não alterou o comportamento dos animais no labirinto em cruz elevado, um modelo que tem sido considerado como um modelo misto de ansiedade, corroborando resultados anteriores.
- 6) Em conclusão, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que tanto o extrato bruto de *Erythrina mulungu*, quanto os alcalóides dele isolados a eritratina, a eritravina e a 11-OH-eritravina apresentaram efeito ansiolítico em modelos animais de ansiedade

sensíveis ao efeito de ansiolíticos que atuam sobre os sistemas de receptores benzodiazepínicos e serotoninérgicos.

7. RESUMO

Resultados recentes mostraram efeito ansiolítico do extrato hidroalcoólico bruto de *Erythrina mulungu* (EM) em ratos submetidos aos modelos do labirinto em T elevado (LTE) e da transição claro-escuro (TCE). O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo fitoquímico biomonitorado com a intenção de se verificar a participação dos alcalóides eritrínicos na atividade ansiolítica do extrato. Foi observado que o extrato bruto de EM apresentou efeito ansiolítico nas medidas de esquiva inibitória (100, 200 e 400 mg/Kg) e fuga (400 mg/Kg) dos braços abertos do LTE e na medida de tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado (100 e 200 mg/Kg) no TCE. A partir do extrato hidroalcoólico de EM foi isolado um novo alcalóide eritrínico, a 11-hidroxi-eritravina, e dois já registrados na literatura, a eritartina e a eritravina. Os testes com o LTE mostraram que a eritartina, a eritravina (3 e 10 mg/Kg) e a 11-hidroxi-eritravina (10 mg/Kg), apresentaram efeito ansiolítico na medida de esquiva inibitória dos braços abertos. No TCE foi observado efeito ansiolítico com a eritravina (3 e 10 mg/Kg) e com a 11-hidroxi-eritravina (10 mg/Kg) na medida de tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado. No TCE, a 11-hidroxi-eritravina (3 mg/Kg) também apresentou efeito ansiolítico aumentando o número de transição entre os dois compartimentos do modelo. Os efeitos ansiolíticos provocados pelos três alcalóides foram independentes de qualquer alteração locomotora, pois nenhum dos compostos estudados e, tampouco, o extrato bruto alterou o comportamento avaliado na arena. Desta forma, os resultados do presente trabalho mostraram que os alcalóides eritartina, eritravina e 11-hidroxi-eritravina são responsáveis pelo efeito ansiolítico observado com o extrato bruto, o que explica a ampla utilização popular das plantas do gênero *Erythrina* como "calmante".

8. ABSTRACT

One new erythrinian alkaloid derivative 11-OH-erythravine (**3**) and the known erythravine (**2**), and erythartine (**1**) from *Erythrina mulungu* were isolated, and their structures were determined by spectral analysis. The relative stereochemistry of the new alkaloid was determined mainly by ¹H NMR experiments, including NOESY spectrometry. Furthermore, the anxiolytic properties of the hydroalcoholic crude extract (CE) and of the alkaloids were evaluated using the elevated plus-maze test (EPM), the elevated T-maze test (ETM) and the light-dark transition model (LDTM) for mice. The CE showed anxiolytic-like effects in the ETM, i.e., the doses 100, 200, and 400 mg/kg (*po*) of CE impaired the inhibitory avoidance of the open arms of the maze. In the LDTM, CE (100 and 200 mg/kg) increased the time spent by the animals in the illuminated compartment, an anxiolytic-like effect. Since CE did not alter the anxiety related responses in mice exposed to the EPM, we did not use this model to test the anxiolytic-like effects of the erythrinian alkaloids. Interestingly, the compounds **1**, **2**, and **3** also attenuated anxiety in the ETM, an effect that was confirmed in the LDTM with the alkaloids **2** and **3**. Taken in account, these results strongly suggest that these erythrinian alkaloids are the compounds responsible for the anxiolytic properties attributed to the crude extract and seem to supports the folk medicinal use as a natural anxiolytic.

9. BIBLIOGRAFIA

AGUILAR, M.I.; GIRAL, F.; ESPEJO, O. Alkaloids from the flowers of *Erythrina americana*. **Phytochemistry**. v. 20 (8), p. 2961-2962. 1981.

AHMAD, V.U.; NAJMUS, S.Q.; USMANGHANI, K.; MIANA, G.A. Isolation of erysotrine and 11-hydroxy-erysotrine from the leaves of *Erythrina herbacea* Linn. **J. Chem. Soc. Pak.** v. 1 (1), p. 79-80. 1979.

ANDREATINI, R. Uso de fitoterápicos em psiquiatria. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v.22 (3), 104-105. 2000.

ANSELONI, V.Z.; MOTTA, V.; LIMA, G.; BRANDÃO, M.L. Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls. **Braz. J. Med. Biol Res.** v. 28, p. 597-601. 1995.

BALLENGER, R.J.; Panic disorder: efficacy of current treatments. **Psychopharmacol. Bull.** v. 29, p. 477-486. 1993.

BARAKAT, I.; JACKSON, A.H.; ABDULLA, M.I. Further studies of *Erythrina* alkaloids. **Lloydia**. v. 40, p. 471-475. 1977.

BARTON, D.H.R.; JENKINS, P.N.; LETCHER, R.; WIDDOWSON, D.A. Erythristemine, a new alkaloid from *Erythrina lysistemon*: a spectroscopic and crystallographic study. **Chem. Comm.** p. 391. 1970.

BARTON, H.R.D.; GUNATILAKA, A.L.A.; LETCHER, M.R.; LOBO, M.F.T.A.; WIDDOWSON, A.D. Phenol oxidation and biosynthesis. Part XXII. The alkaloids of *Erythrina lysistemon*, *E. abyssinica*, *E. poeppigiana*, *E. fusca* and *E. lithosperma*: the structure of Erythratidine. **J. Chem. Soc. Perkin I.** p. 874-880. 1973.

BERNICK, M.A.; LOTUFO-NETO, F.; ANDRADE, L.H.S.G. A importância médico social dos transtornos ansiosos. *In*: Gentil, V.; Lotufo-Neto, F.; Bernik,

M.A. **Pânico, fobias e obsessões. A experiência do projeto AMBAM.** p.55.
3ª Ed. EDUSP. 1997.

BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J.A.; BLANCHARD, D.C.
Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse
defense test batteries. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v. 21, p. 783-789. 1997.

BLANCHARD, R.J.; HEBERT, M.A.; FERRARI, P.; PALANZA, P.;
FIGUEIRA, R.; BLANCHARD, D.C. Defensive behaviors in wild and laboratory
(Swiss) mice: the mouse defense test battery. **Physiol. Behav.** v. 65, p. 201 -
209. 1998.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. The mouse
defense test battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and
panic. **Europ. J. Pharmacol.** v. 463, p. 97-116. 2003.

BLANCHARD, R.J.; YUDKO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C.
Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the
pharmacology of fear and anxiety. **Behav. Brain Res.** v. 58, p. 155-165. 1993.

BOEKELHEIDE, V.; GRUNDON, M.F.A characterization of α -
erythroidine. **J. Am. Chem. Soc.** v. 75 (11), p. 2563-2566. 1953.

BOEKELHEIDE, V.; WEINSTOCK, J.; GRUNDON, M.F.; SAUVAGE,
G.L.; AGNELLO, E.J. The structure of β -erythroidine and its derivatives. **J. Am.**
Chem. Soc. v. 75 (11), p. 2550-2558. 1953.

BOURIN, M.; HASCÖET, M. The mouse light/dark box test. **Eur. J.**
Pharm. v. 463, p. 55-65. 2003.

BUTTERWECK, V.; PETEREIT, F.; WINTERHOFF, H.; NAHRSTEDT, A.
Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert

antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Medica**. v. 64, p. 291 – 294. 1998.

CABRAL, J.B.; ALBUQUERQUE, R.F.; MATOS, D.B.C.; NASCIMENTO, L.S.; FRAGA, M.C.A.; AFIATPOUR, P.; WNADERLEY, A.G. Atividade depressora do sistema nervoso central do extrato da casca de *Erythrina vellutina* (mulungu). Annais do XVI Congresso Latino Americano de Farmacologia, Águas de Lindóia, São Paulo, 2000.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 33, p.179-189. 2000.

CALIXTO, J.B. Medicamentos fitoterápicos. YUNES, R.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicina moderna. 1ª Ed. Chapecó, SC. Argos Editora Universitária, UNOESC. 2001. Cap. 7, p. 297 – 315.

CARVALHO-NETTO, E.F.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Use of elevated T-maze to study anxiety in mice. **Behav. Brain Res.** 148, p. 119-132. 2004.

CHAULOFF, R.; DURANT, M.; MORMÈDE, D. Anxiety- and activity-related effects of two diazepam and chlordiazepoxide in the rat light-dark and dark-light test. **Behav. Brain. Res.** v. 85, p. 27-35. 1997.

CHAWLA, A.S.; REDHA, F.M.J.; JACKSON, A. Alkaloids in seeds of four *Erythrina* species. *Phytochemistry*. v. 24 (8), p. 1821-1823. 1985.

CRAWLEY, J.N.; GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol. Bioch. Behav.** v. 13, p. 167-170. 1980.

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

DA-CUNHA, E.V.L.; DIAS, C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GRAY, A. Eryvellutinone, an isoflavone from the stem bark of *Erythrina vellutina*. **Phytochemistry**, v. 43 (6), p. 1371-1373. 1996.

DAVIDSON, J.R. Pharmacotherapy of generalized anxiety disorder. **J. Clin. Psych.** v. 62, p. 46-50. 2001.

DEAKIN, J.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense. **J. Psychopharmacol.** v. 5, p. 305-315. 1991.

DE ANGELIS, L. Experimental anxiety and antidepressant drugs: the effects of moclobemide, a selective reversible MAO-A inhibitor, fluoxetine and imipramine in mice. **Naun. Schmied. Arch. Pharmacol.** v. 354, p. 379 – 383. 1996.

ELIZABETSKY, E.; SHANLEY, P. Ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Pharmacol. Ther.** v. 64, p. 201-214. 1994.

EL-OLEMY, M.M.; ALI, A.A.; MOTTALEB, M.A. Erythrina alkaloids. I – The alkaloids of the flowers and seeds of *Erythrina variegata*. *Lloydia*. v. 41 (4), p. 342-347. 1978.

ELSELÉ, J.; BERTRAND, S.; GALZI, J.; DEVILLERS-THIÉRY, A.; CHANGEUX, J.; BERTRAND, D. Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. **Nature**. v. 366, p. 479-483. 1993.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **J Ethnopharm.** v. 75, p. 141-164. 2001.

ERNST, E.; RAND, J.I.; STEVINSON, C. Complementary therapies for depression. **Arch. Gen. Psychiatry.** v. 55, p. 1026-1032. 1998.

FILE, S. Behavioural detection of anxiolytic aciton. *In*: ELIOT, J.M.; HEAL, D.J.; MARSDEN, C.A. **Experimental approaches to anxiety and depression.** John Willey and Son eds. 1992. p. 25-44.

FLAUSINO JR., O.A.; ZANGROSSI JR., H.; VIANA, M.B. Effects of acute and chronic treatment with *Hypericum perforatum* L. (LI 160) on different anxiety-related responses in rats. **Pharm. Biochem. Behav.** v. 71, p. 251-257. 2002.

FOLKERS, K.; KONIUSZY, F. Erythrina alkaloids VII – Isolation and characterization of the new alkaloids, erythraline and erythartine. **J. Am. Chem. Soc.** v. 62, p. 437. 1940.

FOLKERS, K.; KONIUSZY, F.; SHAVEL, J. Isolation and characterization of erisothiovine and erysothiopine, new alkaloids containing sulfur. **J. Am. Chem. Soc.** v. 66, p. 1083. 1944.

FOLKERS, K.; MAJOR, R.T. Isolation of erythroidine, an alkaloid of curare action, from *Erythrina americana* Mill. **J. Am. Chem. Soc.** v. 59, p. 1580. 1937.

FURUKAWA, H.; ITO, K.; HARUNA, M.; JINNO, Y. Studies on the erythrina alkaloids XI. Alkaloids of *Erythrina crista-galli* Linn. Structure of new alkaloid, Crystamidina. **Chem. Pharm. Bull.** v. 24, p. 52-55. 1976.

GAMES, D.E.; JACKSON, A.H.; KHAN, N.A.; MILLINGTON, D.S. Alkaloids of some African, Asian, Polynesian and Australian species of *Erythrina*. **Lloydia.** v. 37, (4), p. 581. 1974.

GARCÍA-MATEOS, R.; SOTO-HERNANDEZ, M.; KELLY, D. Alkaloids from six *Erythrina* species endemic to Mexico. **Bioch. Syst. Ecol.** v. 26, p. 545-551. 1998.

GARÍN-AGUILAR, M.E.; LUNA, J.E.R; SOTO-HERNÁNDEZ, M; DEL TORO, G.V.; VÁZQUEZ, M.M. Effect of crude extracts of *E. americana* Mill. on aggressive behavior in rats. **J. Ethnopharm.** v. 69, p. 189-196. 2000.

GHOSAL, S.; GHOSH, D.K.; DUTTA, S.K. Occurrence of erysotrine and other alkaloids in *Erythrina variegata*. **Phytochemistry.** v. 9 (11), p. 2397-2398. 1970.

GHOSAL, S.; MAJUMDAR, S.K.; CHAKRABOTTI, A. *Erythrina* alkaloids. Occurrence of (+) N-norprotosinomemine and other alkaloids in *Erythrina lithosperma*. **Austr. J. Chem.** v. 54, p. 2733-2735. 1971.

GHOSAL, S.; DUTTA, S.; BATTACHARYA, S.K. *Erythrina* – chemical and pharmacological evaluation. II: Alkaloids of *Erythrina variegata* L. **J. Pharm. Sci.** v. 61 (8), p. 1274-1277. 1972 a.

GHOSAL, S.; CHAKRABARTI, A.; SRIVASTAVA, R.S. Erythrascine and other alkaloids in seeds of *Erythrina arborescens*. **Phytochemistry.** v. 11 (6), p. 2101-2103. 1972 b.

GHOSAL, S.; SRIVASTAVA, R. Structure of erysophorine: a new quaternary alkaloid from the seeds of *Erythrina arborescens*. **Phytochemistry.** v. 13, p. 2603-2605. 1974.

GRAEFF, F.G. Medicamentos ansiolíticos. *In*: GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos de psicofarmacologia.** São Paulo, Atheneu, 1999. Cap. 7, p. 123-160.

GRAEFF, F.G.; FERREIRA NETO, C.; ZANGROSSI JR., H. The elevated t-maze as an experimental model of anxiety. **Neurosc. Biobehav. Rev.** v. 23, p. 237-246. 1998.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 26, p. 67-70. 1993.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI JR., H. Animal models of anxiety disorders. *In: Biological Psychiatry.* D'HAENE, H.; DEN BOER, J.A.; WILLNER, P. (eds.) Wiley & Sons, London, England. 2002.

GRIEBEL, G.; PERRAULT, G.; SANGER, D.J. Characterization of the behavioral profile of the non-peptide CRF receptor antagonist CP-154,526 in anxiety models in rodents. Comparison with diazepam and buspirone. **Psychopharmacology.** v. 138 (1), p. 55 - 66. 1998.

GRUNDON, M.F.; BOEKELHEIDE, V. A study of the Hofmann degradation of Apo- β -erythroidine. **J. Am. Chem. Soc.** v. 75 (11), p. 2537-2541. 1953.

GRUNDON, M.F.; SAUVAGE, G.L.; BOEKELHEIDE, V. The structure of Apo- β -erythroidine. **J. Am. Chem. Soc.** v. 75 (11), p. 2541-2545. 1953.

HANDLEY, S. L.; MITHANY, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behavior. **Naun. Arch. Pharm.** v. 327, p. 1-5. 1984.

HANDLEY, S.L.; MACBLANE, J.W. 5-HT drugs in animal models of anxiety. **Psychopharmacology.** v. 112, p. 13-20. 1993.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.W. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry.** v. 55, p. 481-504. 2000.

HARGREAVES, R.; JOHNSON, D.; MILLINGTON, D.; MONDAL, M.; BEAVERS, W.; BECKER, L.; YOUNG, C.; RINEHART, K.L. Alkaloids of American species of *Erythrina*. **Lloydia**. v. 37 (4), p. 569-580. 1974.

HASCÖET, M.; BOURIN, M. A new approach to the light-dark test procedure in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 60 (3), 645-653. 1998.

HENDRIE, C.A.; WEISS, S.M.; EILAM, D. Exploration and predation models of anxiety: evidence from laboratory and wild species. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 54 (1), p. 13-20. 1996.

HIDER, R.C.; WILKINSHAW, M.D.; SPENGER, W. Erythrina alkaloids nicotinic antagonist: structure-activity relationships. **Eur. J. Med. Chem.** v. 21, p. 231-234. 1986.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.54 (1), p. 21-30. 1996.

ITO, K.; FURUKAWA, H.; TANAKA, H. Structure of *Erythrina indica* Lam. **Chem. Comm.** p. 107. 1970.

ITO, K.; FURUKAWA, H.; TANAKA, H. Structure of erybidine, a new alkaloid from *Erythrina x bidwilli* Lind. **Chem. Pharm. Bull.** v. 19 (7), p. 1509-1511. 1971.

ITO, K.; FURUKAWA, H.; HARUNA, M. Erythrina alkaloids. VI. Alkaloids of *Erythrina arborescens*. I – Extraction and isolation of alkaloids. **Yakugaku Zasshi**. v. 93 (12), p. 1611. 1973 a.

ITO, K.; FURUKAWA, H.; HARUNA, M. Structure of new alkaloids, erysotramidine, erythrabine and hidroxierisotrine. **Yakugaku Zasshi**. v. 93 (12), p. 1617. 1973 b.

ITO, K.; FURUKAWA, H.; HARUNA, M.; LU, S.T. Erythrina alkaloids. IV – Alkaloids of *Erythrina orientalis*. **Yakugaku Zasshi**. v. 93 (12), p. 1671-1674. 1973 c.

ITO, K.; FURUKAWA, H.; HARUNA, M. Erythrina alkaloids. V – Alkaloids of *Erythrina crista-galli*. **Yakugaku Zasshi**. v. 93 (12), p. 1674-1678. 1973 d.

ITO, K.; HARUNA, M.; JINNO, Y.; FURUKAWA, H. Studies on the Erythrina alkaloids. XI – Alkaloids of *Erythrina crista-galli* Linn. Structure of new alkaloid cristamidine. **Chem. Pharm. Bull.** v. 24, p. 52-55. 1976.

JARDIM, M.C.; NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Evaluation of the elevated T-maze as an animal model of anxiety in the mouse. **Brain Res. Bull.** v. 48 (4), p. 407-411. 1999.

JOHNSON, D.; YOUNG, R. Comparison of routes of administration and time course effects of Zacopride and Buspirone in mice using an automated light/dark test. **Pharm. Biochem. Behav.** v. 40, p. 733 – 737. 1991.

KANBA, S.; YAMADA, K.; MIZUSHIMA, H.; ASAI, M. Use of herbal medicine for treating psychiatric disorders in Japan. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**. v. 52, S331-S333, Suppl. 1998.

LADER, M.H. The nature and duration of treatment for GAD. **Acta Psychiatr. Scand. Suppl.** v. 393, p. 109-117. 1998.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; LIMA, T.C.M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2^a ed. Porto Alegre, Universidade/UFRGS, Florianópolis, UFSC Ed. 2000. cap. 11, p. 181-196.

LIEBOWITZ, M.R. Antidepressants in panic disorders. **Br. J. Psychiatry.** v. 155 (suppl. 6), p. 46-52. 1989.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol. Ther.** v. 46, p. 321-340. 1990.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 2ª ed. Nova Odessa, SP. Plantarum, 1992, vol. 1.

MASSOD, M.; TIWARI, K.P. Iso-erysopinophorine, a new quaternary alkaloid from the seeds of *Erythrina arborescens*. **Phytochemistry.** v. 19, p. 490-491. 1980.

MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. A coerência e a confiabilidade das indicações terapêuticas. **Caderno de Farmácia.** v. 5, (1/2), p. 71-83. 1989.

MERLO PICH, E.; SAMANIN, R. A two-compartment exploratory model to study anxiolytic/anxiogenic effects of drugs in the rat. **Pharmacol. Res.** v. 21 (5), p. 595-602. 1989.

MIANA, G.A.; IKRAM, M.; SULTANA, F.; KHAN, M. Isolation and characterization of erisotrine from the leaves of *Erythrina suberosa*. **Lloydia.** V. 35 (1), p. 92-93. 1972.

MILLINGTON, D.S.; STEINMAN, D.H.; RINEHART JR, K.L. Isolation, gas chromatography-mass spectrometry and structures of new alkaloids from *Erythrina folkersii* Krukoff and Moldenke and *Erythrina salviiflora* Krukoff and Barneby. **J. Am. Chem. Soc.** v. 96, p. 1909-1917. 1974.

NKENGFAK, A.; AZEBAZE, A.G.B.; WAFFO, A.K.; FOMUM, Z.T.; MEYER, M.; van HEERDEN, F.R. Cytotoxic isoflavones from *Erythrina indica*. **Phytochemistry.** v. 58, p. 1113-1120. 2001.

NOGUEIRA, E.; ROSA, G.J.M.; HARAGUCHI, M.; VASSILIEF, V. Involvement of GABA_A – benzodiazepine receptor in the anxiolytic effect induced by hexanic fraction of *Rubus brasiliensis*. **J. Ethnopharm.** v. 61, p. 119-126. 1998.

NOGUEIRA, E.; VASSILIEF, V.S. Hypnotic, anticonvulsant and muscle relaxant effects of *Rubus brasiliensis*. Involvement of GABA_A –system. **J. Ethnopharm.** v. 70, p. 275-280. 2000.

NUTT, DJ. Anxiety and its therapy: today and tomorrow. In: Briley, M, File, SE, editors. New concepts in anxiety. London: McMillan Press; 1991. p. 1-12.

OH, W.K.; LEE, H.S.; AHN, S.C.; AHN, J.S.; MBAFOR, J.T.; WANDJI, J.; FOMUM, Z.T.; CHANG, H.K.; KIM, Y.H. Prenylated isoflavonoids from *Erythrina senegalensis*. **Phytochemistry.** v.5 1, p. 1147-1150. 1999.

ONUSIC, G.M.; NOGUEIRA, R.L.; PEREIRA, M.S.; VIANA, M.B. Effects of acute treatment with water-alcohol extract of *E. mulungu* on anxiety-related responses in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 35, p. 473–477, 2002 (short communication).

ONUSIC, G.M.; NOGUEIRA, R.L.; PEREIRA, M.S.; FLAUSINO JR., O.A.; VIANA, M.B. Effects of chronic treatment with a water-alcohol extract from *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. **Biol. Pharm. Bull.** v. 26, p. 1538-1542, 2003.

OLIVER, B.; VAN WIJNGAARDEN, I.; SOUDIJN, W. 5-HT₃ receptor antagonists and anxiety; a preclinical and clinical review. *European Neuropsychopharmacology.* v. 10, p. 77-95, 2000.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosc. Meth.** v.14, p.149-167. 1985.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 24, p. 525-529. 1986.

PETROVICK, P.R.; MARQUES, L.C.; DE PAULA, I.C. New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brazil. **J. Ethnopharm.** v. 66, p. 51-55. 1999.

POLTRONIERI, S.C.; ZANGROSSI JR., H.; VIANA, M.B. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research.** v. 147, p. 185 – 192. 2003.

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

RATNASOORIYA, W.; DHARMASIRI, M.G. Aqueous extract of Sri Lankan *Erythrina indica* leaves has sedative but not analgesic activity. **Fitoterapia.** v. 70, p. 311-313. 1999.

RICKELS, K.; DOWNING, R.; SHEWEIZER, E.; HASSMAN, H. Antidepressants for the treatment of generalized anxiety disorder. A placebo-controlled comparison of imipramine, trazadone, and diazepam. **Arch. Gen. Psych.** v. 50 (11), p. 884-895. 1993.

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Braz. Jour. Med. Biol. Res.** v. 30, p. 289-304. 1997.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Indicação, parte e preparo de plantas medicinais. In: RODRIGUES, V.E.G. e CARVALHO, D.A. (ed.). **Plantas medicinais do cerrado**. UFLA, Lavras, MG, Brasil. 2001.

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*. **2001**, 69, 1817-1829.

SALGUEIRO, J.B.; ARDENGHI, P.; DIAS, M.; FERREIRA, M.B.C.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. **Pharm. Biochem. Behav.** v. 58, p. 887-891. 1997.

SÁNCHEZ, C. 5-HT 1A receptors play an important role in modulation of behavior of rats in a two-compartment black and white box. **Behav. Pharm.** v. 7, p. 788 – 797. 1996.

SÁNCHEZ, C.; MAIER, E. Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they alike? **Psychopharmacol.** v. 129, p. 197 – 205. 1997.

SARRAGIOTO, M.H. Isolamento e síntese de alcalóides eritrínicos. Tese de Mestrado. Instituto de Química, UNICAMP. 1981.

SARRAGIOTO, M.H.; LEITÃO FILHO, H.; MARSAIOLI, A.J. Erythrine-*N*-oxide and erythartine-*N*-oxide, two novel alkaloids from *Erythrina mulungu*. **Can. J. Chem.** v. 59, p. 2771-2775. 1981.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK,

P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 2^a ed. Porto Alegre, Universidade/UFRGS, Florianópolis, UFSC Ed. 2000. cap. 15, p. 291-320.

STEPHENS, D.N.; ANDREWS, J.S. Screening for anxiolytic drugs. *In*: WILLNER, P. **Behavioural models in psychopharmacology.** Cambridge, CUP. 1991. P. 50-75.

TANAKA, H.; ETOH, H.; WATANABE, N.; SHIMIZU, H.; AHAMAD, M.; RIZWANI, G.H. Erysubins C-F, four isoflavoids from *Erythrina suberosa* var. *glabrescences*. **Phytochemistry.** v. 56, p. 769-773. 2001.

TANAKA, H.; TANAKA, T.; ETOH, H. A pterocarpan from *Erythrina orientalis*. **Phytochemistry.** v. 42 (5), p. 1473-1475. 1996.

TANAKA, H.; TANAKA, T.; ETOH, H. A pterocarpan from *Erythrina orientalis*. **Phytochemistry.** v. 45 (1), p. 205-207. 1997a.

TANAKA, H.; TANAKA, T.; ETOH, H. Three pterocarpans from *Erythrina crista-galli*. **Phytochemistry.** v. 45 (4), p. 835-838. 1997b.

TANAKA, H.; TANAKA, T.; ETOH, H. Erythrinan alkaloid from *Erythrina x bidwillii*. **Phytochemistry.** v. 48, p. 1461-1463. 1998.

TANDON, S.P.; TIWARI, K.P.; GUPTA, A.P. New alkaloid from the seeds of *Erythrina lithosperma*. **Nat. Acad. Sci. Ind. Sect A.** vol. 39, p. 263-264. 1969.

TEIXEIRA, R.C.; ZANGROSSI JR., H.; GRAEFF, F.G. Behavioral effects of acute and chronic Imipramine in the elevated T maze model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 65 (4), p. 571-576. 2000.

TIWARI, K.P.; MASSOD, M. Eryso-pinophorine a new quaternary alkaloid from pods of *Erythrina arborescens* – **Phytochemistry.** v. 18 (12), p. 2069-2070. 1979 a.

TIWARI, K.P.; MASSOD, M. Alkaloids from pods of *Erythrina arborescens*. **Phytochemistry**. v. 18 (12), p. 704-705. 1979 b.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neurosc. Biobehav. Rev.** v.9, p. 203-222. 1985.

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

VIANA, M.B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F.G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharm. Biochem. Behav.** v.49, p. 549-554. 1994.

VOGEL, H.G. Similarities between various systems of traditional medicine, considerations for the future of ethnopharmacology. **J. Ethnopharm.** v. 35, p. 179-190. 1991.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open field test: a critical review. **Psychological Bulletin**. v. 83 (3), p. 482-504. 1976

WEINSTOCK, J.; BOEKELHEIDE, V. Hofmann degradation studies on β -erythroidine. The structure of des-N-methyl-dihydro- β -erythroidinol. **J. Am. Chem. Soc.** v. 75 (11), p. 2546-2550. 1953.

WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; MARDER, M.; WASOWSKI, C.; ARDENGHI, P.; IZQUIERDO, I.; PALADINI, A.C.; MEDINA, J.H. Anxiolytic properties of 6,3'-dinitroflavone, a high-affinity benzodiazepine receptor ligand. **European Journal of Pharmacology**. v. 318, p. 23-30. 1996.

WONG, A.H.; SMITH, M.; BOON, H.S. Herbal remedies in psychiatry practice. **Archives of General Psychiatry**. v. 55, p. 1033-1044. 1998.

YENESEW, A.; MIDIWO, J.O.; HEYDENREICH, M.; SCHANZENBACH, D.; PETER, M.G. Two isoflavonoids from the stem bark of *Erythrina saculeuxii*. **Phytochemistry**. v. 55, p. 457-459. 2000.

ZANGROSSI JR., H. Modelos animais de ansiedade. *In*: HETEM, A.B.; GRAEFF, F.G. **Ansiedade e transtornos de ansiedade**. Científica Nacional, Rio de Janeiro. 1997. Cap. 4, p. 85-120.

ZANGROSSI JR., H.; GRAEFF, F.G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Res. Bull.** v.44 (Suppl. 1), p.1-5. 1997.